

revista
THEOBROMA



V. 6 - JULHO - SETEMBRO - 1976 N. 3
Ilhéus - Brasil

REVISTA THEOBROMA

COMISSÃO EDITORIAL

Paulo de Tarso ALVIM
José Correia de SALES
Fernando VELLO

ASSESSORES CIENTÍFICOS QUE PARTICIPARAM DA REVISÃO DOS TRABALHOS CONTIDOS NO PRESENTE NÚMERO:

Paulo de Tarso ALVIM
Ronald ALVIM
Raimundo Santos BARROS
Robert L. FOWLER
Antonio Henrique MARIANO
Arnaldo Gomes MEDEIROS
Francisco Ilton de Oliveira MORAIS
Clóvis Peixoto PEREIRA
José Antonio VENTOCILLA

Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC)
Centro de Pesquisas do Cacau
Km 22 da Rodovia Ilhéus/Itabuna
Ilhéus, Bahia, Brasil
Vinculada ao Ministério da Agricultura

Rev. Theobroma	Ilhéus (Bahia)	v. 6	nº 3	p. 67 – 86	1976
----------------	----------------	------	------	------------	------

**REVISTA THEOBROMA, Ilhéus, Bahia, Brasil, Comissão Executiva
do Plano da Lavoura Cacaueira, 1971 – Trimestral**

1971:

Distribuição por permuta

Endereço para correspondência

Address for correspondence

CEPLAC

Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC)

Caixa Postal 7

45 600 – Itabuna, Bahia, Brasil

Tiragem: 3 000 exemplares

Revista Theobroma, v. 6 nº 3 1976

**Ilhéus, Comissão Executiva do Plano
da Lavoura Cacaueira, 1971 –**

v. 22,5 cm

**1. Cacau – Periódicos. I. Comissão Executiva
do Plano da Lavoura Cacaueira, ed.**



CDD 630.7406

CONTEÚDO

1. Influência das condições climáticas na composição química e características físicas da manteiga do cacau **P.R.F. Berbert.** 67

Influence of climatic conditions on the chemical composition and the physical characteristics of cocoa butter. (Abstract) p. 67

2. Hormonal control of cellular proliferation in cultured callus derived from *Theobroma cacao* L. **B.R. Searles, P. de T. Alvim e W. R. Sharp.** 77

Controle hormonal da proliferação celular em calo derivado de tecidos de Theobroma cacao. (Resumo) p. 81

3. Nematodes of the Cocoa Region of Bahia, Brazil V – Nematodes associated with fruit tree seedlings in nurseries **R.D. Sharma e S. A. Sher.** 83

Nematóides da região cacaueira da Bahia V – Nematóides associados com mudas de plantas frutíferas. (Resumo) p. 86

Rev. Theobroma	Ilhéus (Bahia)	v. 6	nº 3	p. 67 – 86	1976
----------------	----------------	------	------	------------	------

INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DA MANTEIGA DO CACAU

*Paulo Romeu F. Berbert **

ABSTRACT

Influence of climatic conditions on the chemical composition and the physical characteristics of cocoa butter

Cocoa butter analysis by gas chromatography and differential scanning calorimetry (DSC) indicate that the butter's chemical composition and, in consequence, its physical characteristics (hardness and melting point) are affected by small variations in the ambient temperature during pod development. Cocoa beans from fruits that had developed during the cooler winter months in Bahia (harvested between August and October) were found to have a butterfat containing 5% more unsaturated fatty acids (oleic and linoleic) than beans from fruits which had developed during the warmer summer months. This resulted in the cocoa butter from the latter having a higher melting point.

Similarly, cocoa beans produced in warmer regions like the Amazon valley have a butterfat with a higher melting point than those produced in Bahia or Ghana.

INTRODUÇÃO

A composição química da manteiga de cacau e, conseqüentemente, as suas características físicas são fatores de importância econômica na indústria chocolateira, principalmente quando se tem em vista o fabrico de chocolate em barra;

quando confeccionado com manteiga de baixo ponto de fusão, esse tipo de chocolate está sujeito a amolecimento durante os dias quentes.

Vários autores pesquisaram os fatores responsáveis pela variação do grau de saturação de ácidos

Recebido para publicação em 31 de janeiro de 1975.

* Divisão de Fitologia, CEPEC.

Revista Theobroma, Ilhéus, Bahia, Brasil, 6 (3): 67-76, Jul.-set, 1976

graxos em diversas espécies vegetais (4, 7, 8, 9, 10). O clima, sobretudo a temperatura, é citado frequentemente como o principal responsável pela qualidade desses ácidos, podendo ocasionalmente causar diferenças no seu grau de saturação, sendo estas, às vezes, superiores às existentes entre variedades de uma mesma espécie (3, 5, 6, 12, 13).

No caso particular do cacau, pouco tem sido feito para avaliar o efeito da variação da temperatura ambiental (conforme o local onde é cultivado) ou da variação sazonal de temperatura na composição da sua manteiga. Berbert e Alvim (1), através da determinação do índice de iodo, mediram o grau de saturação dos ácidos graxos componentes da manteiga de cacau em diferentes épocas do ano e em diferentes localidades, encontrando variações significativas (35 a 42). Essas variações estavam correlacionadas com a temperatura ambiental durante a fase de desenvolvimento do fruto.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência do clima, durante o desenvolvimento do fruto na composição química e características físicas da manteiga de cacau.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas amostras de manteiga de cacau da variedade

"Comum", proveniente de Gana, Amazonas e Bahia (CEPEC, Ilhéus), a fim de se identificar e quantificar os seus ácidos graxos componentes bem como determinar a sua resistência à fusão. Devido à dificuldade de obtenção de amostras de Gana e do Amazonas, destas localidades foram analisadas manteigas de frutos colhidos em uma só época (novembro). No caso da Bahia, foram feitas coletas quase que mensais, pelo período de 1 ano. Devido ao retardamento do "temporão" do ano em que foi feito o estudo (1973), a coleta de março constou de frutos tardios da safra anterior. A manteiga foi extraída por prensagem a 60°C.

A identificação e quantificação dos ácidos foram feitas por cromatografia de gás, usando-se detector de ionização de chama. Para essas análises, os ácidos foram transformados em ésteres metílicos por interesterificação segundo o método descrito por Stoffel et al (11). Utilizou-se coluna 0,2 mm de diâmetro interno e 1,8 m de comprimento, compactada com dietilenoglicosucinato (DEGS) a 10% em chromosorb W 80/100 malhas. As condições de análise foram: temperatura do detector: 260°C, temperatura da estufa: 170°C, temperatura do ponto de injeção: 250°C e o gás de arraste empregado, He, na razão de 60 cm³ por minuto.

Para análise de resistência à fusão, feita por calorimetria diferencial (DSC), amostras de manteiga de aproximadamente 10 mg, após terem sido colocadas no recipiente apropriado e lacradas, foram fundidas a 50°C e deixadas solidificar por 72 horas, a 15°C. Utilizou-se calorímetro diferencial da Perkin-Elmer, modelo DSC-18, iniciando-se a corrida de cada amostra a 0°C, sendo a temperatura elevada de 2,5°C por minuto até a fusão total da manteiga. Os gráficos obtidos das curvas de

fusão foram divididos em três partes: 0-22, 22-26 e acima de 26°C (Figura 1). As áreas, no gráfico, compreendidas entre essas temperaturas foram recortadas e pesadas separadamente, determinando-se assim as percentagens da amostra que permaneceram sólidas até esta atingir as temperaturas citadas. Procedeu-se também à determinação do ponto de fusão (escorregamento), pelo método de capilar aberto, recomendado por British Standards Methods for Analysis of Oils and Fats (2).

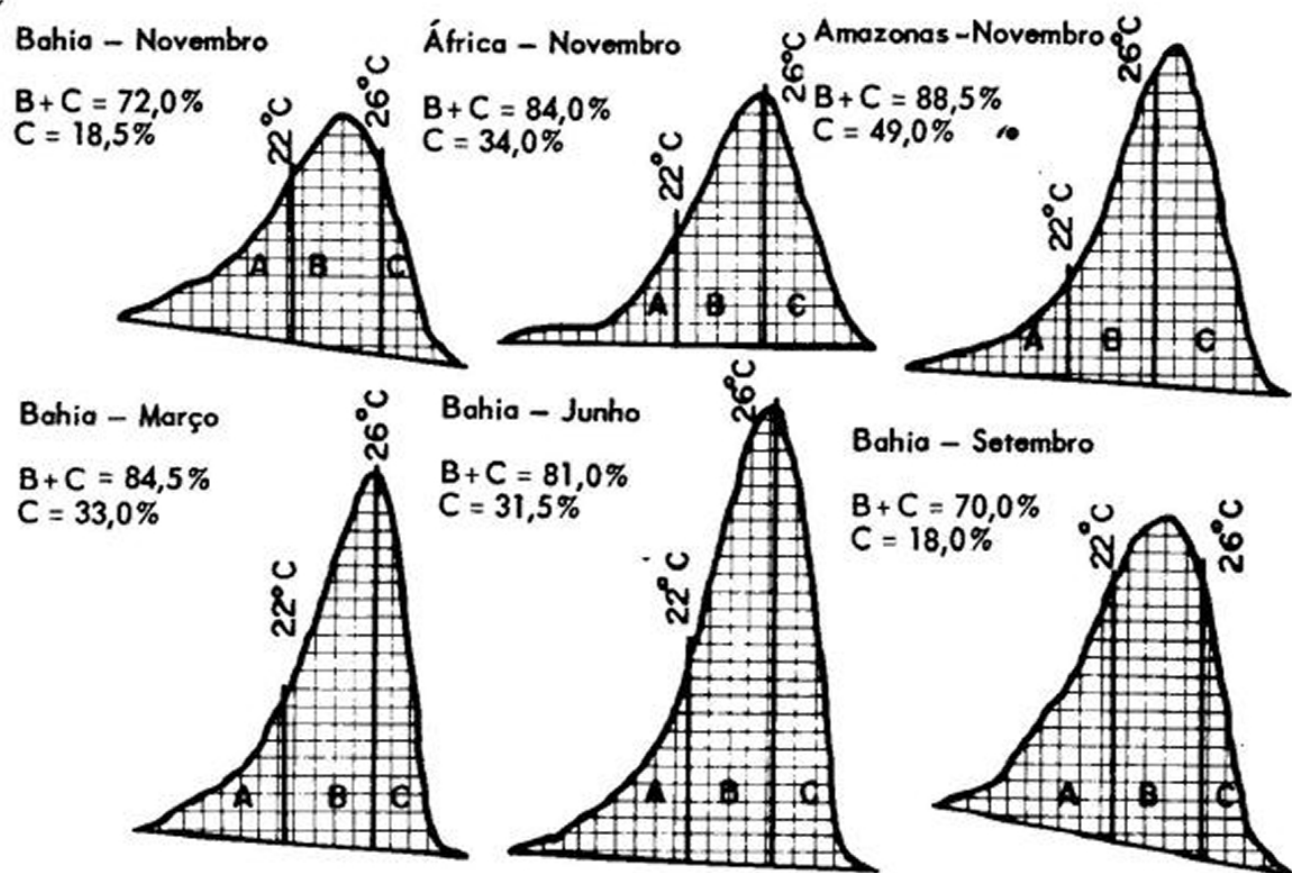


Figura 1 - Curvas de fusão das manteigas obtidas por calorimetria diferencial de frutos colhidos em diferentes localidades e épocas do ano (1973). Em Gana e no Amazonas, os frutos foram colhidos somente em novembro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O total de ácidos graxos saturados na manteiga de cacau da Bahia alcançou o seu valor máximo em amêndoas coletadas em março. Até junho, este valor permaneceu bastante elevado (Quadro 1). A partir deste mês, notou-se um declínio

acentuado no teor de ácidos saturados até alcançar o seu valor mínimo em setembro. Como não foram coletadas amostras em abril e maio, não se pode estabelecer em qual dos 3 meses (março, abril ou maio) ocorreu o teor máximo dos saturados. No entanto, considerando-se a relação direta, observada em to-

Quadro 1 — *Percentagem dos ácidos graxos da manteiga de cacau em diferentes épocas do ano de 1973 e em diferentes localidades.*

Local e época	Á c i d o s (%)					
	Mirístico	Palmítico	Palmitoleico	Esteárico	Oleico	Linoleico
Bahia						
Jan	0,0	27,0	0,0	34,3	35,7	2,5
Mar	0,0	29,6	0,0	34,4	34,5	1,3
Jun	0,0	28,6	0,0	34,7	34,5	2,0
Jul	0,0	28,1	0,0	33,4	35,6	2,6
Ago	0,0	26,5	0,0	32,8	37,1	3,4
Set	0,0	26,4	0,0	32,2	39,2	4,1
Nov	0,0	25,7	0,0	33,1	36,7	3,9
Dez	0,0	25,5	0,0	34,2	37,1	3,0
Gana						
Nov	0,0	29,8	0,0	32,5	32,7	3,9
Amazonas						
Nov	0,0	26,1	0,0	38,5	31,3	3,0
	Araquídico	Linolênico	Total saturados	Total insaturados	Relação saturados / insaturados	
Bahia						
Jan	0,3	0,0	61,7	38,2		1,61
Mar	0,1	0,0	64,1	35,9		1,78
Jun	0,2	0,0	63,5	36,5		1,74
Jul	0,2	0,0	61,7	38,2		1,61
Ago	0,2	0,0	59,5	40,5		1,47
Set	0,2	0,0	58,8	41,3		1,42
Nov	0,1	0,0	58,9	41,1		1,43
Dez	0,1	0,0	59,8	40,2		1,49
Gana						
Nov	1,1	0,0	63,3	36,6		1,72
Amazonas						
Nov	1,1	0,0	65,7	34,3		1,91

das as demais épocas, entre a composição dos ácidos graxos e a temperatura média dos 4 meses que antecederam à colheita dos frutos (Figura 2), pode-se deduzir que, entre março e junho, o teor dos saturados alcança o seu valor máximo. Considerando-se ainda que a temperatura sofre flutuações de ano para ano, é provável que o valor máximo do grau de saturação da manteiga de cacau não ocorre todos os anos no mesmo mês, mas sofre um leve desvio para o mês anterior ou posterior, conforme as variações climáticas de cada ano.

O aumento de 3° C na média das temperaturas dos 4 meses que antecederam o amadurecimento do fruto (de 23 para 26° C) provocou um decréscimo de cerca de 5% no total de ácidos graxos insaturados (olei-

co e linoleico). Isso correspondeu a uma elevação no ponto de fusão de 2° C.

Pelas suas características físicas, a manteiga do cacau da Bahia proveniente de frutos colhidos a partir de janeiro até a metade de julho (fim de safra e quase todo o temporão, portanto) é mais adequada ao fabrico de chocolate em barra — e a outras finalidades que exijam uma maior resistência à fusão — que manteigas de outras épocas do ano, ou seja, fim de temporão e início de safra.

O teor de ácidos graxos saturados da manteiga de cacau do Amazonas, de frutos colhidos em novembro de 1973, foi superior ao da africana dessa mesma época e à da Bahia em qualquer época daquele ano (Figura 2 e Quadro 1). A manteiga africana proveniente de frutos colhidos em novembro mostrou teor de saturados semelhante ao alcançado pela manteiga da Bahia oriunda de frutos colhidos em março e junho (Figuras 2 e 3).

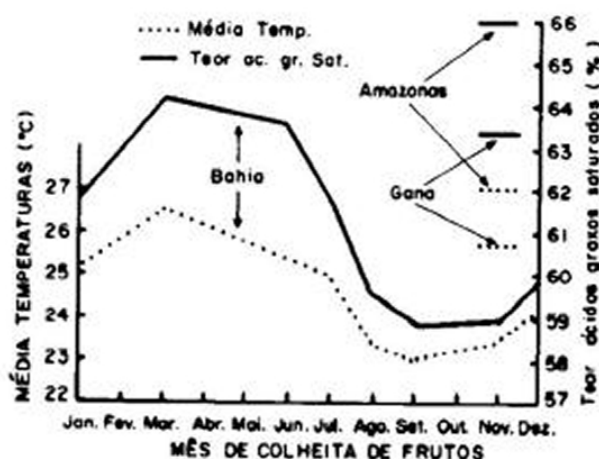


Figura 2 — Influência das médias das temperaturas dos 4 meses que antecederam à colheita dos frutos sobre o teor de ácidos graxos saturados das manteigas das amêndoas em diferentes épocas e localidades.

Como as variações das temperaturas médias mensais no Amazonas e em Gana são menores que as da Bahia (Figura 4), é de se supor que a influência das variações sazonais na relação de saturados para insaturados seja igualmente inferior nas manteigas dessas localidades, principalmente na do Amazonas.

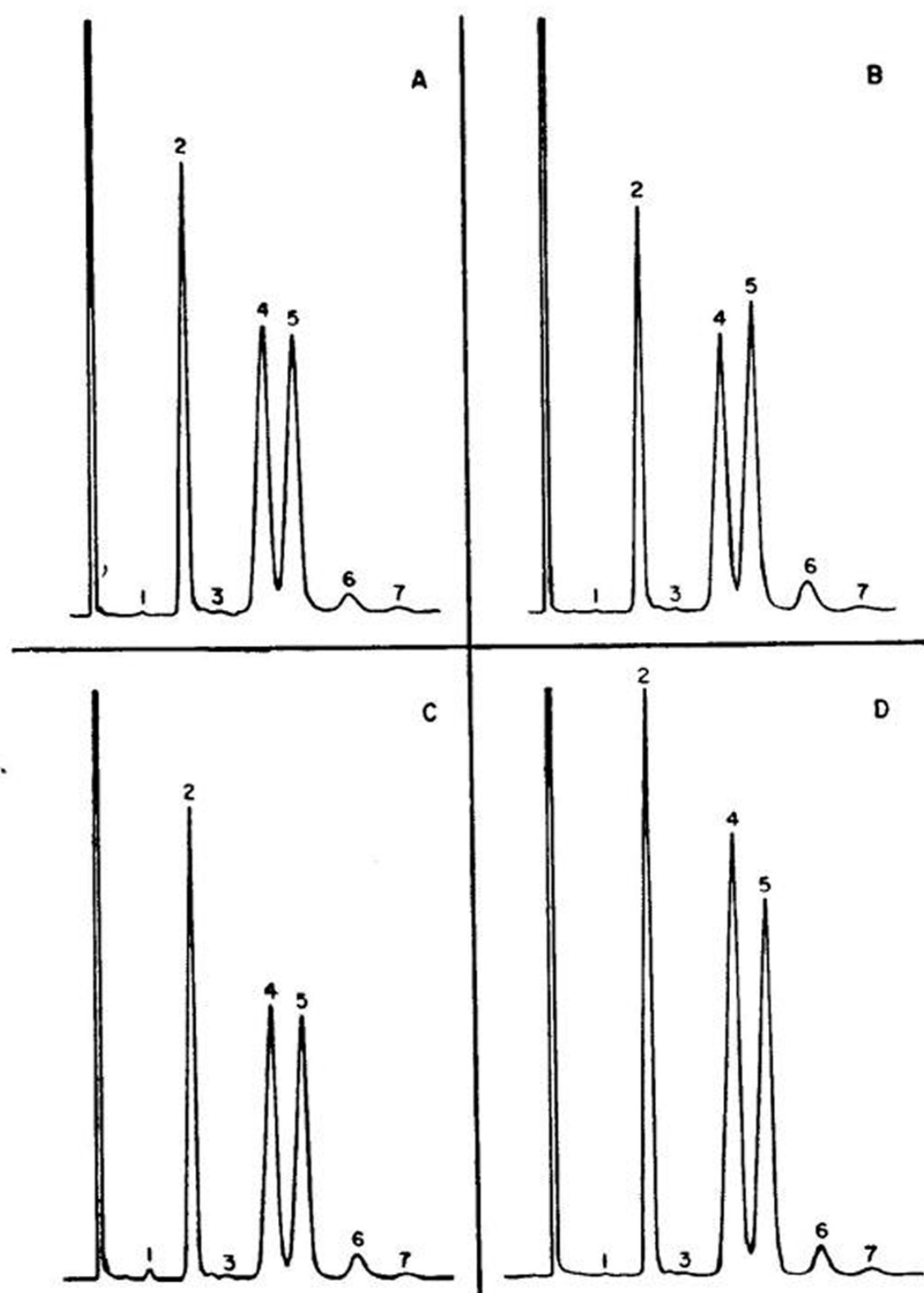


Figura 3 — Análise das manteigas de cacau de frutos colhidos em diferentes localidades e épocas do ano (1973), feita por cromatografia de gás. A) CEPEC, junho; B) CEPEC, novembro; C) Gana, novembro e D) Amazonas, novembro. Ácidos: 1) mirístico; 2) palmítico; 3) palmitoleico; 4) esteárico; 5) oleico; 6) linoleico e 7) araquídico.

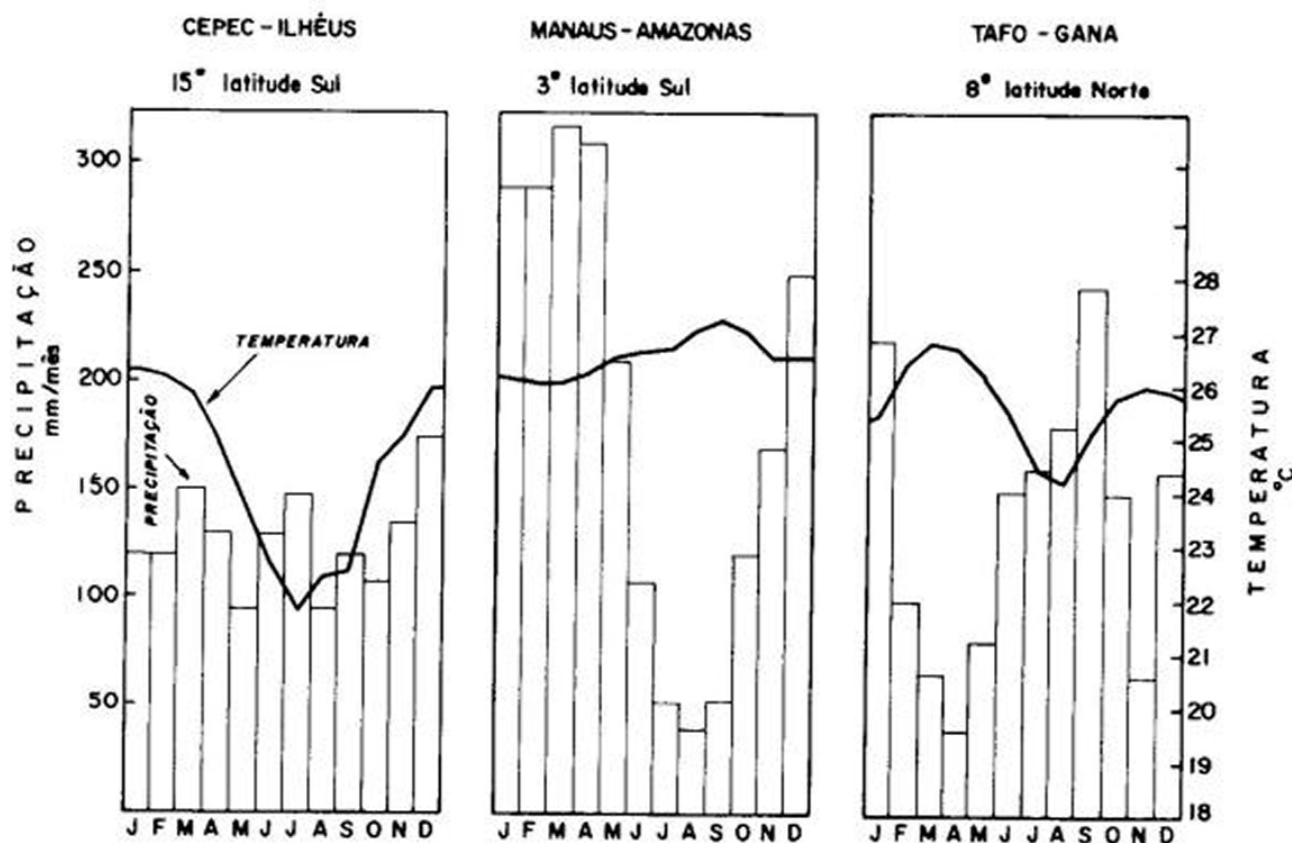


Figura 4 - Precipitação mensal e médias mensais de temperatura das diferentes localidades estudadas (média de 5 anos).

As Figuras 5 e 6 mostram que os resultados das análises de resistência à fusão e dos pontos de fusão concordam entre si e com a relação entre os ácidos graxos saturados e insaturados. Essa concordância existe também nas manteigas do Amazonas e de Gana.

A precipitação é distribuída uniformemente durante o ano na Bahia (Ilhéus); entretanto, a composição da manteiga, nessa localidade, varia, fato que leva a se supor que aquela não afeta esta última (Figura 4). A temperatura, entretanto, como já demonstrado em trabalho anterior por Berbert e Alvim (1), é

realmente o fator climático responsável pela variação na composição da manteiga de cacau.

CONCLUSÕES

1. A composição química da manteiga do cacau é afetada pela variação de temperatura no Sul da Bahia durante o ano bem como pelas variações de temperatura devidas à localização das zonas produtoras.
2. A manteiga de frutos colhidos de março a junho, na Bahia, possui relação de ácidos graxos

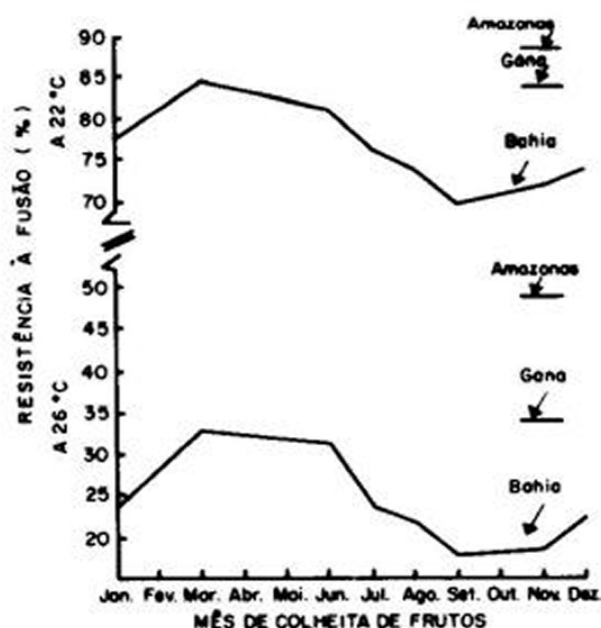


Figura 5 - Resistência à fusão - a duas diferentes temperaturas - da manteiga de amêndoas de frutos colhidos em diferentes localidades e épocas do ano (1973). Para Gana e Amazonas foram feitas determinações apenas em novembro.

saturados para insaturados sensivelmente mais elevada do que nas demais épocas do ano. Nesse período, a manteiga da Bahia, pela sua composição química e características físicas, é semelhante à de Gana originária de frutos colhidos em novembro.

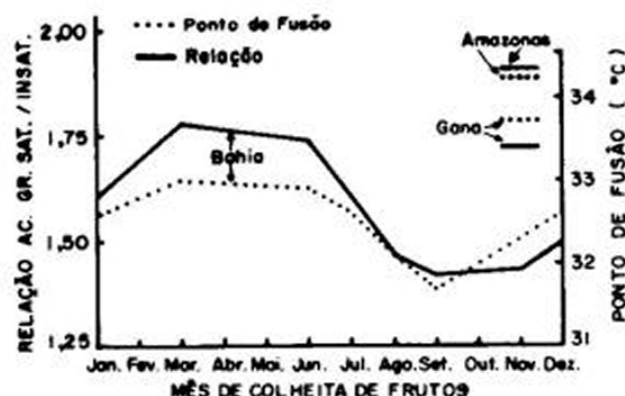


Figura 6 - Ponto de fusão (de escorregamento) e a relação entre os ácidos graxos saturados e os insaturados das manteigas de cacau extraídas de amêndoas de frutos colhidos em diferentes épocas e localidades (1973).

3. A manteiga do Amazonas, de frutos colhidos em novembro, apresenta relação de ácidos graxos saturados para insaturados - e, conseqüentemente, ponto de fusão - mais elevada que a da Bahia, em qualquer época do ano, ou a de Gana, em novembro.
4. A precipitação parece não influir na qualidade da manteiga de cacau.

LITERATURA CITADA

1. BERBERT, P.R. e ALVIM, P. de T. Fatores que afetam o índice de iodo da manteiga de cacau do Brasil. *Revista Theobroma* (Brasil) 2(1): 3-16. 1972.
2. BRITISH STANDARD INSTITUTION. *Methods of analysis of oils and fats*. London, British Standard Institution, 1958. p.74 (British Standard, 684).

3. HILDITCH, T.P. e WILLIAMS, P.N. The chemical constitution of natural fats. London, Chapman & Hall, 1964. pp. 211-212.
4. HILL, A.B. e KNOWLES, P.F. Fatty acid composition of the developing seeds of different varieties of safflower. *Crop Science* 8(3): 275-277. 1968.
5. JAMIESON, S. Vegetable fats and oils. 2 ed. New York, Reinhold, 1943. p. 15.
6. KNOWLES, P.F. Variability in oleic and linoleic acid contents of safflower oil. *Economic Botany* 19:35-62. 1965.
7. PATTERSON, G.W. Effects of light and temperature on lipid biosynthesis in *Chlorella*. *Plant Physiology: Abstracts of papers presented at the Annual Sectional Meetings*. Vol. 44. p. 42. 1969.
8. SANTOS RUIZ, A. Bioquímica de los lípidos. Madrid, Aguilar, 1950. pp. 8-50.
9. SEKHON, K.S. et al. Fatty acid composition and correlation studies in linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Oléagineux* 28 (11): 525. 1973.
10. SHORTLAND, F.B. The comparative aspects of fatty acid occurrence and distribution. In Florkin, M. e Mason, H.S., eds. *Comparative biochemistry a comprehensive treatise*. New York, Academic Press, 1962. v. 3, pp. 22, 52.
11. STOFFEL, W., CHU, F. e AHRENS JUNIOR, E.W. Analysis of long chain fatty acids by gas-liquid chromatography; Micromethod for preparation of methyl esters. *Analytical Chemistry* 31(2): 307-308. 1959.
12. WORTHINGTON, R.E. e HAMMONS, R.O. Genotypic variation in fatty composition and stability of *Arachis hypogea* L. oil. *Oléagineux* 26(11): 693. 1971.
13. YERMANOS, D.M., HEMSTREET, S. e GARBER, M.J. Inheritance of quality and quantity of seed-oil in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Crop Science* 7:417. 1967.

RESUMO

Análises realizadas por cromatografia de gás e por calorimetria diferencial (DSC) mostraram que a composição química – e, conseqüentemente, as características físicas – da manteiga de cacau são afetadas por variações da temperatura ambiental durante o desenvolvimento do fruto. Amêndoas de frutos desenvolvidos durante o inverno (colhidos entre agosto e outubro) na região cacaueira da Bahia possuem manteigas com cerca de 5% a mais de ácidos graxos insaturados (oleico e linoleico) que amêndoas de frutos desenvolvidos no verão. Conseqüentemente, aquelas manteigas apresentam menor resistência à fusão que as últimas. Frutos desenvolvidos em regiões mais quentes, como o Amazonas, produzem manteigas sensivelmente mais resistentes à fusão (maior teor de ácidos graxos saturados) que manteigas de frutos da Bahia colhidos em qualquer época do ano, ou de Gana colhidos em novembro.



HORMONAL CONTROL OF CELLULAR PROLIFERATION IN CULTURED CALLUS DERIVED FROM *Theobroma cacao* L.

Bruce R. Searles *

Paulo de T. Alvim **

William R. Sharp ***

ABSTRACT

Optimal cellular proliferation for cacao leaf tissue and fruit explants occurred on modified Murashige and Skoog's medium supplemented with kinetin (2-6 mg/l) in the absence of indole-3-acetic acid (IAA) or with zeatin (0.25 - 1.0 mg/l) and IAA (0.0 - 0.5 mg/l).

Theobromine does not seem to be a regulatory molecule in culture explants of cacao but proved to be an effective agent in the control of phenolic oxidation. Other effective chemicals for the control of phenolic oxidation were 2-mercaptoethanol, caffeine, sodium metabisulfite, polyvinylpyrrolidone, cysteine HCl, and ascorbic acid.

INTRODUCTION

The study of certain aspects of growth and development of *Theobroma cacao* L. could be greatly

aided by investigation using tissue culture, whereby an organism can be simplified into its component organs, tissues, and cells. Such studies hold promise of providing the

Received for publication on April 19th, 1976.

* Division of Phytology, Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), Itabuna, Bahia, Brazil. Supported by grants from the American Cocoa and Research Institute (ACRI). Present address: c/o Dept. of Microbiology, The Ohio State University, Columbus, Ohio, U.S.A.

** Division of Phytology, CEPEC.

*** Department of Microbiology, The Ohio State University, Columbus, Ohio, U.S.A.

Revista Theobroma, Ilhéus, Bahia, Brasil, 6 (3): 77-81. Jul.-set. 1976.

physiologist with a better understanding pertaining to the control of flushing, flowering, fruiting, and some physiological disturbances such as the wilting of young fruits — a malady commonly known as cherelle wilt. Dublin (2) points out that the ability to cultivate and regenerate *Theobroma* *in vitro* would be a valuable tool to the geneticist in the rapid vegetative propagation of important cultivars. Other applications of course relate to the use of haploids and/or somatic cell hybridization in the development of new cultivars.

Theobroma callus derived from isolates of bark has been previously cultured on Gauthret's medium and the cultures transferred to White's medium after 2–3 months (1). As this medium supported only slow callus growth, it was supplemented with coconut milk. However, the highest growth rate occurred on a liquid medium consisting of pure coconut milk.

This report is based on a preliminary investigation pertaining to the procedures for culturing explants from leaf tissue and young fruits on a defined culture medium. The studies concern the effectiveness of various chemical agents in the control of phenolic oxidation of tissue culture explants and the effects of assorted growth factors and their interactions on the regulation of growth.

MATERIALS AND METHODS

All experiments were conducted using either leaf tissue sections or explants of immature fruits of *T. cacao*, clone SIC 250. Leaves were surface sterilized in 20% (v/v) commercial Na-hypochlorite for 15 minutes. Following two rinses in distilled H₂O, they were sectioned into approximately 5 mm squares and transferred to 2 oz French square bottles. Immature fruits, 9.3 cm in length, were washed in tap water and the peduncle removed with a scapel and discarded. The cut surface of the fruit was then dipped in melted paraffin to limit exposure to oxygen and curtail phenolic oxidation at the wound surface. Then, the fruit was immersed in a disinfectant solution, 0.1% mercuric chloride, for 80 minutes. Following this, it was rinsed in distilled water, and aseptically transferred to sterile Petri dishes containing modified Murashige and Skoog's medium, MMS, (3) plus 50 mg/l of cysteine-HCl for the control of phenolic oxidation. Slices of fruit tissue 2 mm in thickness were excised and aseptically placed in culture bottles charged with 20 ml aliquots of MMS.

The MMS consisted of Murashige and Skoog salts, sucrose 30 g/l, thiamine 8 mg/l, inositol 100 mg/l, cysteine-HCl 10 mg/l, and 8 g/l Difco agar. Following the addition of growth hormones, the pH of the

medium was adjusted to 5.5 and aliquots of 20 ml were dispensed into two oz French square bottles. These were sealed with aluminum foil and autoclaved for 15 minutes at 121 C.

Diallele experiments were performed using additives of phytohormones to the culture medium (indole-3-acetic acid (IAA), Zeatin, and kinetin) and the alkaloid, theobromine. Tests were made pertaining to interactions between different concentrations of the following compounds: (A) 0-15 mg/l IAA versus 0-15 mg/l kinetin, (B) 0-15 mg/l IAA versus 0-4.0 mg/l zeatin, and (C) 0-15 mg/l IAA versus 0-500 mg/l theobromine.

The following chemicals were tested to study the possibility of controlling phenolic oxidation in cultured fruit tissue explant: polyvinylpyrrolidone (PVP) - 10^{-3} M, ascorbic acid - 10^{-5} M, Na-metabisulfite - 10^{-3} , 10^{-6} M, caffeine 10^{-6} M, cysteine-HCl - 10^{-6} M, and mercapto-ethanol - 10^{-7} M.

Ten replicates treatments were conducted for each test medium variation. All cultures were placed under constant environmental conditions (25°C, 12-h photoperiod; illumination from cool-white fluorescent lamps giving about 200 ft-c. outside of the culture bottles). Following 4 weeks of culture all tests were evaluated for callus growth. A

scale of 0-7 was used for visually scoring callus with 0 being the score for no growth.

RESULTS AND DISCUSSION

Control of callus tissue proliferation was achieved in cultured explants of either immature leaf tissues or fruit tissues of *T. cacao* clone SIC 250 (Figure 1). This achievement, although now common for many temperate crops, is more difficult in tropical crops, i.e., *T. cacao*, on account of the accumulation of phenolic oxidation products in tissue culture explants which causes the tissues to suc-

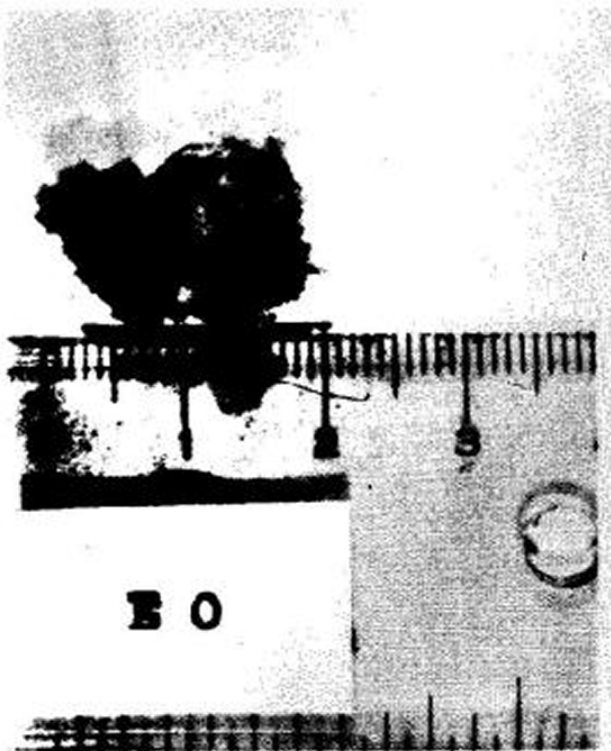


Figure 1 - A typical callus culture derived from either an immature leaf or fruit tissue explant following 6 weeks of growth.

cumb, that is, unless precautionary measures are taken for control of this problem.

Optimal cellular proliferation for leaf tissue and fruit explants occurred on MMS supplemented with kinetin concentration ranging between 2-6 mg/l in the absence of IAA or at zeatin concentrations of 0.25, 0.50, and 1.0 mg/l and IAA concentrations of 0.00- 0.50 mg/l. It can be concluded from the diallele experiments that cacao leaf tissue explants require only a cytokinin for cellular proliferation and that these tissues are apparently self-sufficient in auxin. In most instances, exogenous auxin in the culture medium was inhibitory to callus proliferation.

Callus growth from excised fruit slices developed on the outer portions of the fruit, apparently originating from the epidermal tissue rather than from the cut surface tissues. The callus was dense and

creased as compared to the light colored friable callus originating from the foliar tissue explants.

Other experiments using leaf tissue explants evaluated the growth effect of the native alkaloid of cacao theobromine. Native alkaloids of other species, i.e., tobacco (4) have been observed to have regulatory effects pertaining to growth and development. Theobromine, however, was not observed to be a regulatory substance in cultured explants of cacao.

Tests pertaining to the effectiveness of chemical additives for the control of phenolic oxidation in cultured fruit tissue explants are listed in the order of effectiveness: (i) mercaptol etanol, (ii) caffeine, (iii) Na-metabisulfite, (iv) polyvinylpyrrolidone, (v) cysteine-HCl, and (vi) ascorbic acid. Furthermore, theobromine was observed to be an effective agent in the control of phenolic oxidation in IAA-theobromine diallele experiment.

LITERATURE CITED

1. ARCHIBALD, J.F. Culture *in vitro* of cambial tissue of cacao. Nature 173:351-352. 1954.
2. DUBLIN, P. Les haploïdes de *Theobroma cacao* L. diploïdisation et obtention d'individus homozygotes. Cafe Cacao Thé 18:83-94. 1974.
3. MURASHIGE, T. and SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497. 1962.

4. PETERS, J.E. et al. Rooting and metabolism of nicotine in tobacco callus cultures. *Physiologia Plantarum* 31 : 97-100. 1974.

RESUMO

Controle Hormonal da Proliferação Celular em Calo Derivado de Tecidos de *Theobroma cacao*

Tecidos de folha e de fruto do cacaueiro exibiram melhor proliferação celular quando cultivados em meio modificado de Murashige e Skoog com a adição de cinetina (2 – 6 mg/1), sem ácido indolacético, ou com a adição de zeatina (0,25 – 1,0 mg/1) e ácido indolacético (0,0 – 0,5 mg/1).

A theobromina parece não ter nenhum papel regulador no crescimento de tecidos de cacau, mas comprovou ser eficiente no controle da oxidação fenólica dos tecidos. Outros produtos químicos que também se revelaram eficientes no controle da oxidação fenólica foram: mercapto etanol, cafeína, metabissulfito de sódio, polivinilpirrolidone, cisteína-HCl e ácido ascórbico.



NEMATODES OF THE COCOA REGION OF BAHIA, BRAZIL V – NEMATODES ASSOCIATED WITH FRUIT TREE SEEDLINGS IN NURSERIES

Ravi Datt Sharma *

Samuel Alexis Sher **

ABSTRACT

In 1973 a nematode survey of the fruit nursery of the Cocoa Research Center, Ilhéus, State of Bahia, Brazil was conducted. Twenty soil and root samples were collected from the rhizospheres of 20 different species of fruit plants. Eleven genera and 13 species of plant parasitic nematodes were identified, of which the most frequently encountered were *Helicotylenchus dihystera*, *Xiphinema* sp., *Rotylenchulus reniformis* and *Pratylenchus brachyurus*. *Trichodorus porosus* and *Boleodorus* sp. are reported for the first time from Bahia, Brazil. All the plant species sampled are recorded herein as new hosts for the different species of plant parasitic nematodes encountered in this survey.

INTRODUCTION

Knowledge about plant parasitic nematodes in fruit nurseries in the State of Bahia is entirely lacking. The earlier reports on nematodes dealt largely with field surveys and observations on specific crops (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). This paper presents information on plant parasitic nematodes found in a fruit

nursery of the Cacao Research Center, Ilhéus, State of Bahia, Brazil during a survey made in February and March of 1973.

MATERIALS AND METHODS

Twenty different species of fruit tree seedlings were purchased from a company located in the State

Received for publication on July 30, 1976.

* Division of Phytoparasitology, CEPEC.

** Department of Nematology, University of California, Riverside, Cal, 92502 U.S.A.

Revista Theobroma, CEPEC, Ilhéus, Brasil, 6 (3): 82-86. Jul.-set. 1976.

of São Paulo, Brazil, for introduction into the cocoa producing region of Bahia. These plants were growing in red clay soil in various types of containers, such as bamboo baskets, tin cans, and plastic bags. Before being transplanted to the field in Bahia, however, the seedlings were maintained for sometime in a nursery at the Cocoa Research Center. While the plants were here, it was observed that many of them had died and others were dying, which suggested that nematodes might be the possible causal agent. Thus, a nematode study was made. From several plants of each species, one sample of 1.5 kg of soil and 100 g of feeder roots were collected for this investigation. Twenty samples in all were examined.

The nematodes were isolated from the soil and plant root samples and then processed to permanent mounts as described by Sharma and Sher (6, 8, 9).

RESULTS AND DISCUSSION

A total of 11 genera and 13 species of plant parasitic nematodes were identified in the 20 samples. These genera and species, except for *Trichodorus porosus* and *Boleodorus* sp. had been reported previously from several fruit trees in Bahia but are recorded herein for the first time on these new hosts.

Table 1 gives the identity and percentage occurrence of the nematode encountered in the rhizospheres of the different fruit tree species.

There are three possibilities for nematode contamination in the nursery at the Cocoa Research Center. They are: (i) irrigation water; (ii) cultural practices i.e. weeding or hoeing, and (iii) direct contact with the naturally infested seedbeds through the damaged bottoms of the containers. Since *Trichodorus porosus* and *Boleodorus* sp. were not encountered in our previous surveys in the State of Bahia, it is speculated that they were introduced from São Paulo.

Despite the limited number of samples collected it appears that large numbers and diverse forms of plant parasitic nematodes were present in the rhizospheres of the different fruit tree seedlings in the nursery. As stated above, some of the seedlings were already dead while others were growing very poorly, indicating nematode damage. Before the end of this study most of the seedlings had died. Based on the information published earlier and that developed in the present study, it is evident that these nematodes are not only widespread in their distribution but are also very polyphagous, which complicates nematode control programs.

Table 1 — Occurrence of plant parasitic nematodes in the rhizospheres of 20 different species of fruit seedlings introduced in Bahia, Brazil.

Nematodes	Occurrence	
	* Fruit seedlings	% of 20 samples
<i>Helicotylenchus dihystera</i>	A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N, O,P,Q,R,S,T.	85
<i>Xiphinema</i> sp.	B,C,D,E,F,H,J,K,L,O,P,S.	60
<i>Rotylenchulus reniformis</i>	B,E,G,J,P,R,S.	35
<i>Pratylenchus brachyurus</i>	C,F,H,K,L,S.	39
<i>Pratylenchus</i> sp.	B,Q,R.	15
<i>Peltamigratus</i> sp.	I,J.	10
<i>Meloidogyne</i> sp. (larvae)	J,M.	10
<i>Criconeoides</i> sp.	M.	5
<i>Hemicycliophora</i> sp.	R.	5
<i>Trichodorus monohystera</i>	P.	5
<i>T. porosus</i>	H.	5
<i>Boleodorus</i> sp.	E.	5
<i>Tylenchus</i> sp.	F.	5

* Fruit seedlings

A — <i>Averrhoa carambola</i>	K — <i>Genipa americana</i>
B — <i>Calocarpum sapota</i>	L — <i>Lucuma caimito</i>
C — <i>Campomanesia maschalantha</i>	M — <i>Malpighia coccifera</i>
D — <i>Chrysophyllum caimito</i>	N — <i>Mangifera indica</i>
E — <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	O — <i>Myrcianthes edulis</i>
F — <i>Eugenia alba</i>	P — <i>Persea americana</i>
G — <i>E. dombeyi</i>	Q — <i>Psidium guajava</i> var <i>pomifera</i>
H — <i>E. jambolana</i>	R — <i>P. guajava</i> var <i>pyrifera</i>
I — <i>Flacourtia romantchi</i>	S — <i>Punica granatum</i>
J — <i>Garcinia mangostana</i>	T — <i>Stenocalyx michelli</i>

LITERATURE CITED

1. LORDELLO, L.G.E. Nematóides associados a uma doença do cacau-eiro. *Revista de Agricultura (Brasil)* 43(3-4):154. 1968.
2. MANÇO, G.R. Nematóides em plântulas de cacau. In Itabuna, Bahia, Brasil. Centro de Pesquisas do Cacau. Informe Técnico 1968 e 1969. Itabuna, s.d. pp. 99-101.

3. SHARMA, R.D. Nematodes associated with cacao and rubber in Bahia. *Revista Theobroma (Brasil)* 1(3): 43-45. 1971.
4. _____ and LOOF, P.A.A. Nematodes associated with different plants at the Centro de Pesquisas do Cacau, Bahia. *Revista Theobroma (Brasil)* 2(4):38-43. 1972.
5. _____ and LOOF, P.A.A. Nematodes of the Cocoa Region of Bahia, Brazil. I - Plant parasitic and free living nematodes associated with rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) *Revista Theobroma (Brasil)* 3(1):36-41. 1973.
6. _____ and SHER, S.A. Occurrence of plant parasitic nematodes in avocado in Bahia, Brazil. *Nematropica* 3(1):20-23. 1973.
7. _____ and SHER, S.A. Plant nematodes associated with jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) in Bahia, Brazil. *Nematropica* 3(1):23-24. 1973.
8. _____ and SHER, S.A. Nematodes associated with banana in Bahia, Brazil. *Ciência e Cultura (Brasil)* 25(7):665-668. 1973.
9. _____ and SHER, S.A. Nematodes associated with citrus in Bahia, Brazil. *Ciência e Cultura (Brasil)* 25(7):668-672. 1973.

RESUMO

NEMATÓIDES DA REGIÃO CACAUEIRA DA BAHIA V - NEMATÓIDES ASSOCIADOS COM MUDAS DE PLANTAS FRUTÍFERAS

Foi feito um levantamento nematológico em mudas de plantas frutíferas em viveiro, no Centro de Pesquisas do Cacau, Ilhéus, Bahia, Brasil. Foram coletadas 20 amostras de solo da rizosfera das diferentes plantas. Dentre os 11 gêneros e 13 espécies de nematóides parasitas encontrados, *Helicotylenchus dibytera*, *Xiphinema* sp., *Rotylenchulus reniformis* e *Pratylenchus brachyurus* foram os mais frequentes. *Trichodorus porosus* e *Boleodorus* sp. foram registrados pela primeira vez na Bahia. Todas as mudas estudadas no presente trabalho se comportaram como hospedeiras das diferentes espécies de nematóides registrados■

INFORMAÇÃO AOS COLABORADORES

Os conceitos e opiniões, emitidos nos artigos, são da exclusiva responsabilidade dos autores. São aceitos para publicação trabalhos que se constituam em real contribuição para um melhor conhecimento dos temas relacionados com problemas agrônômicos e sócio-econômicos de áreas cacaueiras.

Os artigos devem ser datilografados em espaço duplo, com o máximo de 2.500 palavras ou 10 folhas tamanho carta (28,0 x 21,5 cm), em uma só face e com margens de 3 cm por todos os lados. Os originais devem ser acompanhados de duas cópias perfeitamente legíveis.

Desenhos e gráficos devem ser feitos com tinta nankin e não ultrapassar a medida de 18,0 x 20,0 cm; as fotografias devem ter 15,0 x 23,0 cm, em papel fotográfico brilhante com bom contraste. As ilustrações devem ser numeradas e com legendas escritas a máquina, em papel separado. Recomenda-se não dobrá-las para evitar dificuldades na reprodução.

As referências no texto devem ser feitas pelo nome do autor, acompanhado do número de ordem da citação bibliográfica. Ex.: Medeiros (5), ou simplesmente (5). A *Literatura Citada* deve ser organizada por ordem alfabética dos autores, com número de ordem, usando-se o seguinte sistema:

5. MEDEIROS, A.G. Método para estimular a esporulação do *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. em placas de Petri. *Phyton* 22(1):73-77. 1965.

O resumo não deve exceder meia página datilografada, sendo acompanhado de versão em inglês. São aceitos artigos em português, espanhol, inglês e francês.

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

Concepts and opinions given in articles are the exclusive responsibility of the authors. Only articles concerned with agronomic and social-economic problems of cocoa growing areas, which represent a new contribution to the subject, will be accepted for publication.

Articles should be typed in double spacing with a maximum of 2,500 words or 10 letter sized pages (28.0 x 21.5 cm) with a 3 cm margin on all sides, together with two legible copies.

Drawings and graphs should be prepared with India ink not exceeding 18.0 x 20.0 cm; photographs should be 15.0 x 23.0 cm glossy prints with good contrast. Illustrations must be numbered, with the machine typed subtitles on separate paper. To avoid reproduction difficulties it is recommended that enclosures should not be folded.

Text references should appear with the name of the author and/or the order number in the literature citation. The *Literature Cited* should be numbered in alphabetical order employing the following system:

5. MEDEIROS, A.G. Método para estimular a esporulação do *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. em placas de Petri. *Phyton* 22(1):73-77. 1965.

Articles are accepted in Portuguese, Spanish, English, and French.



COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA



PREPARADO E IMPRESSO NA DICOM