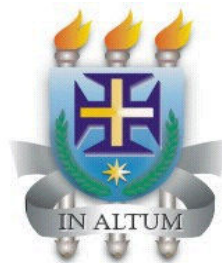


**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO
VEGETAL**



**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA POPULAÇÃO F₁ (TSH1188xCCN51)
DE CACAUEIRO QUANTO A RESISTÊNCIA À PODRIDÃO-PARDA
E AO NÚMERO DE ÓVULOS POR OVÁRIO**

Rita de Cássia Siqueira Bahia

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Janeiro de 2007

RITA DE CÁSSIA SIQUEIRA BAHIA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA POPULAÇÃO F₁ (TSH1188xCCN51) DE
CACAEIRO QUANTO À RESISTÊNCIA À PODRIDÃO-PARDA E AO
NÚMERO DE ÓVULOS POR OVÁRIO**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Produção Vegetal.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Janeiro de 2007

RITA DE CÁSSIA SIQUEIRA BAHIA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA POPULAÇÃO F₁(TSH1188xCCN51) DE
CACAEIRO QUANTO A RESISTÊNCIA À PODRIDÃO-PARDA E AO
NÚMERO DE ÓVULOS POR OVÁRIO**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Produção Vegetal.

APROVADA: 5 de janeiro de 2007

Prof. Dr. Dário Ahnert
UESC

Prof. Dr.^a Edna Dora Martins Newman Luz
CEPLAC

Dr.^a Regina Celle Rebouças Machado
Almirante Cacau

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa
UESC – Orientador

Dedicatória

Aos meus pais, Djalma Baptista Bahia (*in memoriam*) e Zildete Siqueira Bahia, pelos ensinamentos de amor e perseverança.

Aos meus filhos Ticiano e Calin, motivo da minha incansável busca na evolução profissional.

A minha prima Ana Lúcia Bahia, pela força e amizade;

Ao meu irmão José Jorge Siqueira Bahia, pela ajuda nos momentos difíceis;

A Dra. Edna Dora Martins Newman Luz, pelo incentivo, amizade e amor atribuído durante toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de ter nascido na família Siqueira Bahia, e de ter a oportunidade de realizar mais esta missão na minha vida, com muito amor.

À Dra. Edna Dora Luz, pela paciência e orientação, e por estar sempre presente nos momentos difíceis.

Ao Prof^o Dr. Ronan Xavier Corrêa, pela orientação, amizade e compreensão nos momentos de decisões em minha vida.

Ao Dr. Uilson Vanderlei Lopes, pela paciência e auxílio nas análises estatísticas.

Ao Dr. Dário Ahnert, por sempre acreditar na minha capacidade profissional.

Ao Dr. Raul Valle, pela confiança e coragem na montagem do Laboratório de Biotecnologia do Centro de Pesquisa do Cacau, e pelo apoio à minha vida profissional.

Ao amigo-irmão Reinaldo Figueiredo dos Santos, pelo apoio e companheirismo durante toda a minha vida, principalmente no auxílio inestimável nas atividades de laboratório para a conclusão desse trabalho.

A Acassi Flores, pela amizade e incentivo nos momentos críticos que passamos juntas no Laboratório de Biotecnologia do CEPEC.

Ao amigo José Raimundo Bonadie, pelo incentivo profissional e pela convivência de muitos anos.

Ao Banco do Nordeste, pelo apoio financeiro na execução deste trabalho.

À Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), ao Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), ao *Common Fund of Commodities* (CFC), à *International Cocoa Organization* (ICCO), fomentadores do

“CCFC/ICCO/CEPLAC – *Biomol Project*“, pelo auxílio financeiro na execução desse projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico, fomentador do projeto PADCT/CNPq/UESC/UFV/UFRGS, pelo auxílio financeiro na execução deste projeto.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pela oportunidade de realização dos cursos de Mestrado e Graduação.

À Almirante Cacau, pela condução e manutenção da população de cacauero em campo e, especialmente, a Marcus, Valdivino e Nay, pela ajuda nas coletas dos dados fenotípicos e na extração de DNA.

A Dra. Regina Celle Rebouças Machado, pelo apoio e pela amizade.

Ao Sr. Martin Aitkins, pela confiança na execução do projeto.

Ao meu amigo e procurador Rogério Mercês, pela intensa ajuda durante todo o curso de Mestrado e pela amizade.

Aos colegas de turma Eline, Bruna, Cilene, Marcus Antônio, Alberto, Sândalo, Carlyle e Durval, pelo convívio e pela amizade.

À Cenilda Serra e Edarcy Primo, pela colaboração na coleta dos dados de inoculação dos milhares de discos de folha com *Phytophthora spp.*

Aos eternos amigos Denise, Cenilda, Ana Rosa, Lourdinha, Ronaldo, Alfredo, Milton Macoto, Márcia, Ademilde, Nádia, Glória, Stela Dalva, Luis Cordeiro, Karina, Valdivia, Angélica, Marlene, Francisco, Verinha, Selma, Jaqueline, Gersonita, Kleber, Ricardo, Olívia, Dr. Bezerra, Marival, Wilson Monteiro e Marily.

E a todos aqueles que sempre acreditaram em um crescimento profissional, através da perseverança, honestidade e humildade.

ÍNDICE

EXTRATO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Resistência genética do cacaueteiro à podridão-parda.....	3
2.2. O gênero <i>Phytophthora</i> e as espécies importantes para o cacaueteiro	5
2.3. Epidemiologia, etiologia e sintomatologia.....	8
2.4. Estratégias de controle.....	10
2.5. Métodos para avaliação da resistência à podridão-parda	11
2.7. Ferramentas moleculares em estudos de <i>Phytophthora</i> spp	14
2.8. Inferindo sobre a capacidade produtiva pelo número de óvulos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Material vegetal	18
3.2. Inoculação e avaliação dos sintomas em discos de folhas	19
3.3. Avaliação do número de óvulos por ovário.....	22
3.4. Análises moleculares.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. Resistência à podridão-parda.....	25
4.2. Número de óvulos por ovário	29
4.3. Identificação de locos SSR polimórficos.....	35
5. CONCLUSÕES	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

EXTRATO

BAHIA, Rita de Cássia Siqueira, M.Sc., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, dezembro de 2006. **Caracterização fenotípica da população F₁(TSH1188xCCN51) de cacaueteiro quanto a resistência à podridão-parda e ao número de óvulos por ovário.** Orientador: Ronan Xavier Corrêa. Co-orientadores: Dário Ahnert, Edna Dora Martins Newman Luz. Colaborador: Regina Celle Rebouças Machado.

A podridão-parda é a mais importante doença do cacaueteiro em termos mundiais, sendo que *Phytophthora citrophthora* e *P. palmivora* são as duas espécies mais agressivas entre as quatro (*P. palmivora*, *P. capsici*, *P. citrophthora* e *P. hevea*) que causam essa doença no cacaueteiro, na Bahia. Neste trabalho, objetivou-se avaliar em 282 plantas F₁ do cruzamento de TSH1188 e CCN51 quanto à resistência a podridão-parda, causada por *P. citrophthora* e *P. palmivora*, e ao número de óvulos por ovário como característica do potencial de produção. Além disso, buscou-se identificar marcadores microssatélites polimórficos entre os genitores para serem utilizados na construção de um mapa genético de ligação. Para a avaliação da resistência à podridão-parda foram usados 20 discos com aproximadamente 2 cm de diâmetro obtidos de cinco a seis folhas com aspecto visual de boas condições fisiológicas com cerca de dois meses de idade, de cada uma das plantas da progênie, parentais (TSH1188 e CCN51) e dos genótipos tomados como padrão de resistência (Sca 6) e suscetibilidade (Catongo). Os discos de folhas foram colocados em caixas plásticas que serviam como câmara úmida e a cada disco foi então inoculado com uma gota de suspensão de inóculo na concentração de 3×10^5 zoósporos/mL e o experimento foi repetido duas vezes para cada espécie de patógeno. Após sete

dias da inoculação, a cada disco foi atribuída uma nota e calculada a média de 20 discos para cada planta. Para avaliação final utilizou-se a escala com uma classificação, que varia de 0 a 5. Na avaliação do número médio de óvulos por ovário, foram contados 10 botões florais de cada planta da progênie. A resistência à podridão-parda segregou na população, indicando sê-la ideal para mapeamento genético, visando identificar genes relacionados com esse caráter. Amostras de DNA dos genitores foram amplificadas com 47 *primers* microssatélites, identificando oito *primers* polimórficos que poderão ser utilizados para genotipar as plantas da progênie. O número médio de óvulos apresentou variação significativa na população, indicando que esse caráter poderá ser mapeado nesta população.

Palavras-chave: *Theobroma cacao* L., *Phytophthora* spp., inoculação em discos foliares, genes de resistência, biologia da reprodução, mapeamento genético.

ABSTRACT

BAHIA, Rita de Cássia Siqueira, M.Sc., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, dezembro de 2006. **Phenotypic characterization of resistance to black pod disease and the ovule number by ovary in an cocoa F₁(TSH1188xCCN51) population.** Advisor: Ronan Xavier Corrêa. Advisory Committee Members: Dário Ahnert, Edna Dora Martins Newman Luz and Regina Celle Rebouças Machado.

Brown pod rot (BPR) is the most important disease in cocoa crop spreaded in world regions where cocoa is produced and *Phytophthora citrophthora* and *P. palmivora* are the most aggressive among four species (*P. palmivora*, *P. capsici*, *P. citrophthora* e *P. hevea*) that infect cocoa and cause disease in Bahia plantations. In this work we proposed evaluate a population of 282 F₁ plants from the cross between TSH-1188 and CCN-51 cocoa clones for resistance to BPR, caused by *P. citrophthora* and *P. palmivora*, and to the ovule number by ovary as a potential production trait. Evaluation of the resistance was screened using 20 leaf discs with at about 2 cm of diameter obtained from five to six leaves showing good physiological conditions with at about two months old, from any progeny, genitors (TSH-1188 e CCN-51)and genotypes used as resistance (Sca 6) and susceptibility (Catongo) pattern. Leaf discs were arranged in plastic boxes used as humid chamber and inoculated with an inoculums suspension drop in a concentration of 3×10^5 zoospores/mL and the experiment repeated twice for each pathogen species. Seven days after inoculation a note was attributed for each disc and mean calculated based on 20 disc for each progeny. For final evaluation an scale, varying from 0 to 5, was used as a classification criterion. Evaluation of the mean number of ovule/ovary was conducted counting 10 floral buds from each progeny. The resistance to BPD segregates in the population, showing that it is

ideal for genetic mapping, in a search for molecular markers associated to genes for this trait. Ovule mean number showed significant variation in the population, indicating that this trait can be mapped using this population. DNA samples from genitors were amplified with 47 microsatellite *primers* from which eight were identified as polymorphic and can be used to genotype progeny plants.

Key-words: *Theobroma cacao* L., *Phytophthora* spp., leaves discs inoculation methods, resistance genes, biology of reproduction, mapping.

1. INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) é uma espécie nativa das florestas tropicais do Continente Americano. A planta é perene, arbórea, monóica, cauliflora, com inflorescências formadas no tronco, denominadas almofadas florais, compostas de flores hermafroditas e pentâmeras, que apresentam de 30 a 70 óvulos (DIAS, 2001). Pertence à ordem Malvales, família Malvaceae e gênero *Theobroma* (ALVERSON et al., 1999) sendo suscetível a diversas doenças em todas as partes do mundo onde é cultivado. Apresenta um genoma haplóide com 10 pares de cromossomos e tamanho reduzido, em torno de 0,43 pg (FIGUEIRA et al., 1992) quando comparado a outras espécies tropicais.

A podridão-parda é a mais importante doença do cacauieiro em termos mundiais. Entre os agentes causais da doença, as espécies *Phytophthora citrophthora* e *P. palmivora* são as mais agressivas nas plantações de cacau a Bahia (LUZ et al., 1989). Além do cacauieiro, várias outras culturas de importância econômica são também afetadas por estas espécies (PAIM, 2005). No Brasil, as perdas de frutos com podridão-parda em cacau variam de ano para ano e podem reduzir a produção em até 80% (LUZ et al., 2001). Os primeiros registros de ocorrência da doença em frutos de cacauieiro na Bahia datam de 1909, segundo relatos das viagens de Zehntner (1914) e de Torrend (1917), à região sul da Bahia, onde esta enfermidade também conhecida como “mela” ou “geada”.

Segundo Dias (2001), o melhoramento do cacauieiro para resistência à doenças é, geralmente, considerado mais complexo que para caracteres agrônômicos ou morfológicos desde que a eficácia da resistência à doença não é estática, e é influenciada, simultaneamente, pelas características do hospedeiro e pela variabilidade genética do patógeno. O uso de variedades resistentes é, sem

dúvida, a alternativa mais viável, técnica e economicamente, para o produtor controlar esta doença.

Germoplasma resistentes de diferentes origens têm sido identificadas (LUZ et al., 1995) e um programa de melhoramento genético visando obter genótipos resistentes a esta e outras doenças, está em andamento no CEPEC (PIRES et al., 1996). Obstáculos como o longo período de geração do cacaueteiro, de 3 a 4 anos, o porte das plantas, chegando a 5 m de altura, e o tempo necessário para produção de frutos em quantidade suficiente para a identificação de indivíduos resistentes, que é de 5 a 6 anos, tornam o melhoramento visando resistência um processo extremamente lento. Nos últimos anos, vários estudos de mapeamento genético molecular vem sendo realizado visando o uso de *Marker Assisted Selection* (MAS), viabilizando a seleção precoce e segura de plantas com resistência a doenças e alguns resultados interessantes já foram obtidos no Brasil (BAHIA et al., 2003; QUEIROZ et al., 2003; FALEIRO et al., 2004;) e na França (LANAUD et al., 1995; CROUZILLAT et al., 2000; FLAMENT et al., 2001). Entretanto, maior número de marcadores moleculares associados aos genes de resistência precisa ser identificado.

Neste trabalho objetivou-se: i) caracterizar fenotipicamente a progênie F₁ oriunda do cruzamento entre os clones TSH1188 x CCN51 quanto à resistência à podridão-parda; ii) avaliar essa progênie quanto ao número de óvulos por ovário como indicador do potencial de produção; iii) identificar marcadores polimórficos entre esses clones para serem utilizados na construção de um mapa de ligação, visando identificação de genes de resistência à podridão-parda, localização de QTLs (*quantitative trait loci*) para número de óvulos por ovário e inferência sobre a utilidade desta progênie em estudos de mapeamento genético e melhoramento genético do cacaueteiro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Resistência genética do cacauero à podridão-parda

O cacauero (*Theobroma cacao* L.), é uma espécie neotropical, cultivada em todos os continentes, envolvendo mais de 2 milhões de produtores em mais de 50 países (Knight, 2000). A cultura do cacau é uma atividade agrícola relevante para muitos países em desenvolvimento. A produção de cacau concentra-se em uma faixa bastante estreita ao longo do Equador e dentre os principais países produtores encontra-se o Brasil. Grande parte do cacau produzido nessas regiões, no entanto, é consumido principalmente nos países de renda média e alta das zonas temperadas do mundo como a União Européia, Estados Unidos da América, Japão, Canadá, Rússia, Europa Oriental e Austrália (ARAÚJO, 2003). A região sul da Bahia é a principal produtora de cacau do Brasil, onde o cacauero foi introduzido em 1746 pelo colono francês Luiz Frederico Warneaux, no município de Canavieiras (VELLO; GARCIA, 1971). No ano de 1989, a vassoura-de-bruxa foi detectada pela primeira vez na região cacauera baiana (PEREIRA et al., 1991). Os danos severos causados pela doença aliados aos baixos preços do cacau no mercado internacional, à baixa produtividade das lavouras e aos fatores climáticos adversos, desencadeou um processo de empobrecimento da região. Esse fato resultou na falência de inúmeros produtores, no desemprego de milhares de trabalhadores rurais que migraram para outras regiões, na erradicação de parte de lavoura cacauera e substituição por pastagens e café, na depreciação da infra-estrutura e desvalorização das propriedades rurais e, ainda mais, na exploração descontrolada de espécies

arbóreas de valor ecológico e econômico como alternativa de complementação da renda dos produtores descapitalizados pela crise (DANTAS NETO, 2004)

O conhecimento da amplitude de variabilidade genética em *Phytophthora* é o requerimento básico para a identificação de materiais que são dotados de resistência ou tolerância, visando a adoção de novas estratégias para o melhor controle e manejo da podridão-parda do cacauzeiro (CHOWDAPPA e MOHANAN, 1997). O clone CCN51, selecionado no Equador, foi considerado resistente a doenças como podridão-parda e vassoura-de-bruxa (CAMPO & ANDÍA, 1997) o que foi confirmado por Pires (2003) no Brasil. Populações derivadas dos clones TSH1188 e CCN51 têm sido avaliadas para resistência a doenças, sendo consideradas resistentes ou segregantes para o caráter, sendo utilizadas para trabalhos de caracterização fenotípica, análise de segregação e mapeamento genético (DANTAS NETO, 2005). Saul-Maora et al. (2003), analisando a durabilidade da resistência em Papua Nova-Guiné, verificaram que, em condições de campo, a reação de progênies híbridas a *Phytophthora*, permaneceu estável e similar, após 5 anos de avaliação e que a resistência em campo pode estar ligado a várias características como susceptibilidade do fruto, a habilidade do patógeno em produzir inóculo na planta infectada, arquitetura da planta e da época e duração do período de frutificação. Efombagn et al. (2004), verificaram que quanto mais cedo começa o período de frutificação, mais susceptível é um clone; o clone mais resistente começou a florir um mês após o mais susceptível, escapando do pico de severidade da doença e que o clone mais resistente produz mais frutos no tronco que na copa, embora os frutos no tronco estejam mais sujeitos do patógeno.

Entre 82 genótipos testados na Bahia, apenas as cultivares PA 30 e PA 150 apresentaram resistência a *P. palmivora*, *P. capsici* e *P. citrophthora*, ao mesmo tempo. Dezenove outros materiais mostraram resistência ora a uma ou duas espécies, mas não às três, podendo ainda assim ser utilizados em programas de melhoramento genético visando resistência às doenças do cacauzeiro (LUZ et al., 1996; 1997).

2.2. O gênero *Phytophthora* e as espécies importantes para o cacauero

O gênero *Phytophthora*, cujo nome deriva do grego e significa literalmente destruidor de planta, pertence atualmente ao reino Stramenipila, à classe dos *Oomycetes*, ordem *Pythiales* e família *Pythiaceae*, tendo sido estabelecido por Anton de Bary em 1876, quando descreveu a espécie *P. infestans* (Mont.) de Barry e embora seja tratado como um fungo, está atualmente no reino, em realidade, Stramenopila, mas já foi fungo protista e cromista (LUZ e MATSUOKA, 1996). Jenman e Harrison fizeram o primeiro relato da ocorrência da podridão-parda em cacaueros na Guiana e em Trinidad e a ela se referiram como “cacau negro” (CHOWDAPPA e MOHANAN, 1997). Masee (1898), após examinar frutos doentes em Trinidad, identificou o fungo causador das lesões como *Phytophthora omnivora* de Barry. Em 1909 o agente causal de podridão em frutos de cacau foi isolado por Von Faber e descrito por Maublanc com o nome de *Phytophthora faberi* Maubl. (WATERHOUSE, 1970). No entanto, Butler (1920) fez a descrição taxonômica do patógeno como *P. palmivora* (Butl) Butl. Por esta ocasião as descrições e identificações de isolados de *Phytophthora* obtidos de cacau, coco e seringueira foram totalmente baseadas em características morfológicas, dos órgãos vegetativos e ou reprodutivos (BUTLER, 1925; TURNER, 1961), seguido de características ligadas à fisiologia ou a patogenicidade dos isolados (TUCKER, 1931). É frequentemente observada substancial diversidade entre os isolados estudados, dentro de uma espécie, dependendo do critério usado, dos isolados estudados, e da metodologia empregada pelo autor, o que levou ao questionamento de quais os limites de uma espécie, e qual a extensão da variabilidade em cada espécie que pode ser tolerada (DUCAMP et al, 2004). As características morfológicas, apresentam uma tendência de sobreposição nas espécies, criando confusão na identificação e classificação destas. Outro problema existente para classificação de *Phytophthora* reside no fato das espécies intercruzarem facilmente, produzindo híbridos interespecíficos. Assim, em muitos casos e principalmente no estudo das espécies que fazem parte do complexo *Phytophthora* x Cacauero é preciso considerar não somente caracteres morfológicos, mas também variações fisiológicas e moleculares para delinear as espécies e determinar a extensão da variabilidade dentro da espécie

(CHOWDAPPA e MOHANAN, 1997). Até 1979 considerava-se a espécie *P. palmivora* (Butler) Butler., como o único agente causal da podridão-parda em cacau. Desde então, novas descobertas tem modificado a taxonomia dos agentes causais. Três das quatro formas reconhecidas de *P. palmivora* (MF1, MF3 e MF4), são agora consideradas espécies distintas. MF1 foi reclassificada como *P. palmivora* 'sensu Butler'; MF3 como sendo *P. megakarya* Brasier & Griffin, e a MF4 é agora considerada como *P. capsici* Leonian (OLIVEIRA e LUZ, 2005). Para diferenciação de *P. megakarya* (Branier & Sansone) a estrutura cromossômica foi fator decisivo (GREGORY e MADDISON, 1981). Sansone et al (1979) estudaram detalhadamente a citologia de isolados africanos enfatizando, particularmente, a meiose e a fertilização e fizeram a distribuição entre as duas espécies: *P. megakarya* com 6 cromossomos grandes e *P. palmivora* com 9 cromossomos pequenos. Estes autores verificaram também que havia possibilidade de variabilidade através da hibridação sexual intra e interespecífica, dependendo da presença dos tipos compatíveis A₁ e A₂ das duas espécies. No final da década de 70 e início dos anos 80, estudos sobre diversidade morfológica e fisiológica foram conduzidos na Bahia, resultando na identificação de uma outra espécie *P. citrophthora* Leonian (KELLAM e ZENTMYER, 1982; CAMPELO & LUZ, 1981). Em levantamentos efetuados então, comprovou-se a predominância de *P. capsici* nas regiões da Bahia e Espírito Santo (95% dos isolados), 3% de *P. palmivora* e 2% de *P. citrophthora* (CAMPELO & LUZ, 1981). Outros estudos comprovaram no entanto, ser *P. citrophthora* a mais agressiva das espécies à diferentes partes do cacau (LUZ, 1989, LAWRENCE et al., 1982), seguida de *P. palmivora*, sendo *P. capsici* a menos virulenta. Outras espécies menos importantes tem sido identificadas como causadoras de doença em cacau, através da inoculação de frutos, como *P. heveae* Thompson, *P. botryosa* Chee, *P. megasperma* Dreschler e *P. katsurae* Ko e Chang (CHOWDAPPA e MOHANAN, 1997). Quatro espécies de *Phytophthora* têm sido identificadas como causadoras de podridões em cacau: *P. palmivora*, de ampla ocorrência em todas as zonas produtoras de cacau; *P. citrophthora*, a espécie mais rara e de menor importância econômica; *P. capsici*, a mais comum no continente americano, todas ocorrendo no Brasil e *P. megakarya*, de ocorrência restrita ao continente africano (DESPRÉAUX, 2004), sendo considerada a mais agressiva entre as espécies que atacam o cacau.

(DJIEKPOR et al., 1981; DAKWA, 1984). A podridão-parda ocorre em todas as regiões produtoras de cacau do Brasil causando perdas que variam entre 20 e 30% dos frutos produzidos (MEDEIROS, 1977). No entanto, na Bahia, principal estado produtor, perdas de 70 a 80% da produção eram comuns, até o final da década de 80 (LUZ et al., 1997). Por se tratar de uma doença muito influenciada por altas precipitações pluviométricas, principalmente nos meses mais frios do ano, e o retorno de altas precipitações pluviométricas nos últimos anos, os danos causados pela podridão-parda novamente se elevaram (LUZ & SILVA, 2001). Em cultivos na África *P. megakarya* pode causar perdas de 60 a 100%, e como a produção é tipicamente oriunda de agricultura familiar, estas perdas tornam-se mais dramáticas para o produtor (APPIAH et al., 2004). Novas técnicas de análises têm sido desenvolvidas e utilizadas para resolver ambigüidades entre as espécies do gênero e novas ferramentas moleculares e bioquímicas estão disponíveis para a resolução da variabilidade intra e interespecífica. Técnicas como imunologia, eletroforese de proteínas totais, análise de isoenzimas, hibridização *in situ* DNA-DNA, marcadores moleculares como Polimorfismos de Comprimentos de Fragmentos de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphisms* - RFLP), Polimorfismos de DNA Amplificado ao Acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA* – RAPD). Estes marcadores tem apresentado discriminação mais efetiva de genótipos e caracterização mais eficiente de estruturas populacionais, facilitando e ampliando a obtenção de informações complementares para caracterização mais efetiva dos limites interespecíficos (DUCAMP et al., 2004). Estudos de estrutura populacional tem sinalizado para existência de um ancestral Amazônico comum, ligando grupos e subgrupos populacionais estudados e para a maioria deles a grande diversidade interpopulacional detectada e a existência de alelos raros como para *Pgi*, são encontradas no Brasil (DUCAMP et al., 2004), o que explica, em parte a maior diversidade da espécie atacando o cacau no Brasil, que em outras regiões produtoras. As estruturas sexuais são compostas de um anterídio (componente masculino) e um oogônio (componente feminino). Meiose ocorre tanto nos anterídeos como nas oogônias. Este é o único estágio haplóide no ciclo de vida de *Phytophthora*, a maior parte do ciclo sexual é diplóide. Um tubo de fertilização que parte do anterídeo rompe a parede do oogônio e deposita o núcleo anteridial.

Um único oósporo é formado dentro do oogônio e germina sob condições favoráveis para formar únicos ou múltiplos tubos germinativos. O gênero *Phytophthora* inclui algumas espécies que são heterotáticas (Tipos Compatíveis A1 e A2), incluindo *P. infestans*, *P. palmivora* e algumas homotáticas (auto-férteis) como *Phytophthora sojae* ou *Phytophthora porri* e algumas de sexualidade indefinida, como *P. citrophthora*.

2.3. Epidemiologia, etiologia e sintomatologia

De acordo com Thorold (1974), não existem relatos históricos precisos de onde e quando ocorreu o primeiro ataque de *Phytophthora* ao cacauero. Rorer (1910), aponta que perdas de frutos de cacau em Trinidad em 1727, podem ter sido devido a *Phytophthora*, mas outros relatos, como o de Kennedy et al. (1926) atribuem tais perdas a um furacão. Numerosos fatores, tanto ambientais como genéticos estão envolvidos na expressão da doença em campo e afetam a taxa de aparecimento de frutos doentes. Condições propícias ao desenvolvimento da doença resultam da combinação de fatores ambientais na plantação, de sobrevivência e disseminação do patógeno, da espécie e das linhagens envolvidas e da natureza genética do hospedeiro (CILAS et al., 2004). A doença não ocorre aleatoriamente distribuída por toda a plantação, ela sempre ocorre em pequenas áreas (reboleiras) em torno de sítios de infecção. Um aspecto curioso é que as plantas que apresentam as primeiras infecções após a estação seca não são, em geral, aquelas que desenvolvem muitas infecções posteriores (GREGORY e MADDISON, 1981), parecendo atuar como sinalizadoras da presença do patógeno na área. O solo é considerado a principal fonte natural de inóculo de *Phytophthora*, para o início da infecção. De acordo com Medeiros (1967), a presença de casqueiros na lavoura está positivamente correlacionada com a incidência da doença. Outras fontes de inóculo são frutos mumificados não removidos da planta e frutos infectados em outros estágios, remanescentes na planta. Um único fruto pode produzir, após 5 dias de infecção, em condições adequadas, oitenta mil novos zoosporângios de *P. palmivora*/cm² de área necrótica ou 4 milhões de esporângios em uma lesão de tamanho normal. Após a

colonização completa do fruto, em quinze dias, cem milhões de propágulos foram produzidos (MEDEIROS, 1977). A chuva é o principal fator responsável pela disseminação da *Phytophthora* spp. Segundo (LELLIS, 1952), as maiores perdas na produção de cacau causada por *Phytophthora palmivora* foram registradas nos meses mais frios do ano, ficando estabelecida uma correlação entre a temperatura e a incidência da doença. Miranda e Cruz (1953), por sua vez, encontraram correlação entre temperaturas baixas (20 °C) e umidades relativas do ar acima de 85 % com o aparecimento da podridão-parda. Medeiros (1967), observou que a incidência da podridão-parda era diretamente proporcional ao número de frutos por planta e à ocorrência de chuvas (OLIVEIRA e LUZ, 2005). Luz e Silva (2001), relata que a temperatura, umidade do ar e chuvas são os fatores climáticos que mais influenciam a incidência e a severidade da podridão-parda do cacauzeiro (Rocha e Machado, 1972; Waed e Griffin, 1981; Butler, 1981).

De acordo com Blaha (1995), o ciclo biológico no gênero *Phytophthora* compreende duas fases, sendo uma fase vegetativa ou assexual e uma fase sexual. Na fase vegetativa, órgãos de multiplicação vegetativa, denominados esporócitos ou esporângios são formados a partir de um talo micelial ou do cruzamento entre dois talos, que em condições adequadas germinam ou formam estruturas de resistência, denominadas clamidósporos. Na fase sexuada, o contato de dois talos miceliais resulta na formação de órgãos sexuais masculinos (anterídios) e femininos (oogônios), que se fundirão para formar um zigoto, cuja germinação resultará na formação de novo talo micelial (CILAS et al., 2004). De acordo com Medeiros (1977), os fatores conhecidos que afetam a esporulação de *Phytophthora*, isolados ou combinados são: nutrientes, pH, luz, temperatura, umidade, aeração e interação com outros organismos. Em geral, a progressão da doença pode ser dividida em dois estágios: disseminação horizontal e disseminação vertical (MEDEIROS, 1969). A disseminação horizontal ocorre no estágio inicial da doença, ou durante os primeiros meses do período da safra, com um ou dois frutos infectados por planta. Estes frutos localizam-se próximos ao solo (OKAISADOR, 1974), no meio do tronco ou da copa. A disseminação vertical ocorre dois ou três meses depois, aumentando o número de frutos infectados por planta, disseminando-se progressivamente para frutos acima ou abaixo do ponto inicial de infecção. A combinação destes dois padrões de

disseminação provoca o aumento do número de frutos infectados ao longo do tempo (MEDEIROS, 1969). Inoculações artificiais em almofadas florais para determinar o período de sobrevivência do fungo, resultam em grande variação. Manço (1965), verificou que o fungo pode sobreviver no tronco e em almofadas florais por um período mínimo 8 meses e pode permanecer ativo por até sete meses, em frutos não removidos da planta. A doença é caracterizada pela aparição no córtex de frutos de uma pequena mancha amarronzada de borda translúcida que escurece rapidamente, entre 24-48h e cresce mais ou menos rapidamente em função do genótipo infectado e da agressividade do inóculo, levando cerca de duas semanas para se espalhar por todo o fruto (McMAHON e PURWANTARA, 2004). No decorrer da infecção, ocorre o aparecimento de uma massa branca a creme na superfície do fruto, resultante de mudanças no ciclo de vida do patógeno. Alguns dias após o início da infecção, os frutos doentes são totalmente destruídos e as sementes inutilizadas para a indústria (BLAHA e LOTODÉ, 1976; LASS, 1985). Ao fim da evolução da infecção os frutos que permanecem aderidos à planta tornam-se mumificados (NYASSÉ, 1997) e são colonizados por fungos secundários (McMAHON e PURWANTARA, 2004).

2.4. Estratégias de controle

O controle eficiente de fungos envolve estudos de diferentes aspectos do ciclo da doença como localização de fontes de inóculo, modos de dispersão, duração do período de incubação e dos fatores ambientais que influenciam o progresso da doença (MANÇO, 1965). De acordo com Luz (1989), a identificação de fontes de inóculo, sua importância relativa em cada região produtora e o conhecimento dos modos de dispersão do patógeno, são informações fundamentais para o fornecimento de bases racionais para o controle de doenças.

A ocorrência de várias espécies de *Phytophthora* em regiões produtoras de cacau, tem implicações consideráveis para o controle da doença, seja por meio químico, práticas culturais ou pelo uso de variedades resistentes. As dificuldades no controle da podridão-parda do cacaueiro começam pela habilidade de *Phytophthora spp.* em sobreviver e esporular em diferentes substratos, passa pelo

modo e taxa de dispersão do patógeno em plantações de cacau, na sua frequência de ocorrência e virulência relativa em diferentes partes da planta e sua tolerância a fungicidas cúpricos. O controle cultural inclui a regulação da sombra, remoção de frutos infectados e poda do cacaueiro. Embora as práticas culturais não controlem totalmente a doença, são importantes para diminuir a fonte de inóculo presente na lavoura. De acordo com os resultados de Ndoumbe-Nkeng et al. (2004), a prática cultural de fitossanitária de remoção de frutos afetados pela podridão-parda, causada por *P. megakarya*, seria um método de controle potencialmente eficiente. Entretanto, seria necessário associar com outros métodos de controle para estabelecer um manejo integrado de controle, pelos produtores. Monterroso (1976), citado por Yaeggy (1981), assinala que em relação ao controle químico de *Phytophthora palmivora*, o essencial é limitar ao máximo todas as fontes de inóculo da planta. Pelo menos a cada 8 dias, na estação chuvosa, todos os bilros (frutos jovens) e frutos que apresentem alguma lesão que indique início do ataque, devem ser removidos e destruídos (YAEGGY, 1981). Bayley e Garcia (1978), reportam que para o controle da podridão-parda do cacaueiro, causada por *Phytophthora palmivora*, se tem estudado diversos métodos, enfatizando-se o controle químico e a busca por resistência. Embora tenham sido obtidos resultados promissores, estes não têm conduzido, de forma consistente, a um controle efetivo da enfermidade. Entre os métodos de controle utilizados para reduzir os efeitos das infecções causadas por *Phytophthora spp.*, o controle químico tem se mostrado um dos mais eficientes, para diversas espécies onde ainda não foram identificados materiais com resistência genética. Nsemwa e Mayona (2006), testaram Metalaxy/Mancozeb no controle da queima-da-folha em batata, causada por *P. infestans*, e comprovaram a eficiência do tratamento com rendimentos de 63,3 a 88,8% na produção, sobre a testemunha sem controle químico.

2.5. Métodos para avaliação da resistência à podridão-parda

Segundo Zadoks (1996), a maioria dos testes de avaliação de resistência a patógenos de plantas usa materiais genéticos oriundos da própria região, na forma de populações ou isolados purificados. Para aquele autor bons métodos

fitopatológicos de avaliação deveriam ser combinados com análise genética, para aprovar ou rejeitar interações do tipo genótipo X patógeno, genótipo X genótipo ou genótipo X ambiente, que sugerem a existência de raças fisiológicas do patógeno e resistência poligênica. Para Lawrence (1984), antes que avaliações rotineiras de resistência a fitopatógenos sejam iniciadas, é necessário um conhecimento básico do comportamento das diferentes espécies de *Phytophthora*, principalmente em relação à virulência em diferentes órgãos do cacaueteiro e da biologia da infecção em frutos. Só então avaliações de resistência poderiam ser conduzidas com confiabilidade e acurácia.

Todos os testes de inoculação mostraram que *P. palmivora* e *P. citrophthora* foram consistentemente mais virulentas que *P. capsici* em todos os cacaueteiros testados, embora *P. capsici* foi-se àquela ocasião, a espécie predominante em frutos (LAWRENCE, 1984).

Em métodos de avaliação da resistência a fungos fitopatogênicos a produção abundante e confiável de esporos *in vitro* é essencial para a preparação de inóculo padronizado (LAWRENCE, 1984). É extremamente difícil distinguir rápida e confiavelmente entre materiais genéticos de acordo com a sua performance em campo em relação à resistência/tolerância a diferentes espécies de *Phytophthora* por meio da observação das infecções naturais. Para obter dados confiáveis em nível de campo, além da necessidade da instalação de experimentos com delineamentos bem estruturados, é necessário esperar vários anos até que os cacaueteiros entrem em produção e outros tantos de avaliação para a correta caracterização do material experimental. Além disto, resultados localizados podem não ser válidos para outros locais de cultivo, devido ao forte componente ambiental que afeta o padrão de expressão da doença.

Por todos estes fatores, vários pesquisadores têm desenvolvido testes visando acessar diferenças na resistência entre genótipos, de modo rápido e confiável. Tais testes envolvem inoculações artificiais de diferentes órgãos da planta, em particular àqueles mais atacados pelo patógeno, como frutos e folhas, no caso de *Phytophthora* (THÉVENIN et al., 2004). Diferentes métodos de inoculação em frutos têm sido utilizados para a detecção da resistência em clones de cacaueteiros. Desde avaliações de infecções naturais ocorridas no campo (THOROLD, 1956; WHARTON, 1957; THROWER, 1960; SORIA e ESQUIVEL,

1970); inoculação de frutos no campo, sem cobertura plástica formando câmara úmida (MEDEIROS e MELO, 1966; ROCHA e MARIANO, 1969; ROCHA e VELLO, 1971) e com uso de câmara úmida (MEDEIROS, 1967; PARTIOT, 1975 em Lawrence, 1978). O uso de um ou outro método apenas não revelou o grau de colonização do patógeno em tecidos de cacau, inviabilizando a análise da resistência pós-penetração. Blaha (1974, em THÉVENIN, 2004)), recomendou a utilização simultânea dos dois métodos, como estratégia para diferenciar os diversos tipos de resistência. Também é utilizada a inoculação de frutos em laboratório, com utilização de diferentes fontes de inóculo, como zoósporo, esporângios e suspensão zoósporo-esporangial (BLAHA, 1967; MEDEIROS, 1967 em Lawrence, 1978); micélio ou fragmentos de frutos doentes (MEDEIROS, 1967; PRENDERGAST e SPENCE, 1967 em Lawrence, 1978), desenvolvimento de *P. palmivora* em meio de cultura com extratos de tecidos de frutos (TURNER, 1963 em Lawrence, 1978), inoculação de sementes pré-germinadas com zoósporo ou suspensão micelial-esporangial (AMPOSAH e ASARE-NYAKO, 1973; PARTIOT, 1975; TARJOT, 1977 em Lawrence, 1978).

Para Thévenin (2004), a avaliação para resistência a *Phytophthora* em frutos deve ser realizada com inoculação de frutos com e sem câmara úmida, simultaneamente no mesmo fruto. Esta dupla inoculação possibilitaria definir os níveis e sítios de resistência nos frutos de um clone (penetração e pós-penetração).

No Brasil, o uso de folhas para desenvolver um teste precoce, não-destrutivo, que pode ser repetido na mesma planta, é uma idéia atrativa que é justificada pelo fato de que folhas jovens podem ser atacadas naturalmente por *Phytophthora*, especialmente por *P. palmivora* e que a estrutura histológica da face abaxial da folha é similar à camada superficial de frutos (van der VOSSSEN, 1997 em Thévenin;). Ensaios de inoculações de folhas inteiras e discos de folhas permitiram constatar que a idade da folha apresenta influência na expressão da sensibilidade à doença e os resultados são mais evidentes quando o inóculo é depositado na face inferior da folha (BLAHA e TARJOT, 1975 em NYASSÉ, 1997), e que existe uma correlação positiva entre a sensibilidade das folhas e de frutos, quando as folhas são inoculadas com uma suspensão calibrada de zoósporos (TONDJÉ et al., 1988; RABOIN, 1991 em NYASSÉ). Os primeiros

trabalhos realizados, utilizando discos de folhas foram realizados por Nyassé et al. (1995). Variações quanto à repetibilidade dos dados de resistência/susceptibilidade obtidos através da inoculação em folhas de plantas adultas no campo ou plantas jovens em casa de vegetação, tem sido observadas.

Teste a resistência de *Phytophthora* foi testada em frutos não destacados, e também em sementes pré-germinadas e caules de plantas com 6 meses de idade (LAWRENCE & LUZ, 1985; LUZ et al. 1995). No entanto, um método mais rápido e fácil de executar era requerido.

Este método está sendo utilizado para selecionar precocemente resistência à podridão-parda (NYASSÉ et al, 1999) e também para testar progênie de cruzamentos de interesse para os estudos de resistência e identificação de QTLs relacionados à resistência do cacauero a *Phytophthora* spp.

2.7. Ferramentas moleculares em estudos de *Phytophthora* spp

A exemplo de muitas outras características agronômicas, resistência a *Phytophthora* apresenta variação fenotípica contínua em *T. cacao*, sugerindo tratar-se de uma característica poligênica, o que tem sido sugerido por vários autores (BLAHA e LOTODÉ, 1976; ENRIQUEZ e SALAZAR, 1980; CILAS et al., 1994 em Lanaud et al, 2004). A maioria das espécies de *Phytophthora* pode crescer facilmente em laboratório e numerosos estudos bioquímicos, citológicos e fisiológicos foram realizados. Entretanto, *Phytophthora* é notória como “um pesadelo” para geneticistas de fungo (SHAW, 1983), e o desenvolvimento de ferramentas genéticas e moleculares não tem sido tarefa simples. Somente a partir de 1991 foi reportada a primeira transformação genética estável de *P. infestans* (JUDELSON et al. 1991). Este autor estabeleceu um protocolo confiável que foi utilizado com sucesso por outros grupos (van WEST et al., 1998, 1999, 1999a; BOTTIN et al., 1999). Transformação estável pode ser obtida pela integração de vetores contendo diferentes genes repórteres, para monitorar a progressão de doenças na planta (KAMOUN et al., 1998), ou para estudos de padrões da expressão temporal e espacial de genes induzidos de plantas (KAMOUN et al., 1997). O uso de mutagênese insercional em *Arabidopsis* sinaliza

para obtenção de inúmeros defectivos, no processo de desenvolvimento ou rotas de defesa (KONCZ et al., 1992) e é uma estratégia promissora para a pesquisa em *Phytophthora* (KAMOON, 2000). A obtenção de genes nocauteados tem sido demonstrada por van West et al. (1999), que demonstraram que um clone de cDNA completo do gene *inf1* da elicítina, poderia ser usado sem modificações para transformar *P. infestans* e gerar linhagens silenciadas (não patogênicas).

As ferramentas moleculares têm permitido, também, através da utilização dos marcadores microssatélites, a construção de mapas genéticos; esses marcadores, se caracterizam por serem co-dominantes, locus-específico, altamente polimórficos, com alta repetibilidade e por requerem pequenas quantidades de DNA (LANAUD et al., 2004), principalmente aqueles desenvolvidos pelo CIRAD. Um grande número de QTLs relacionados à resistência a *Phytophthora*, caracterizados através da análise fenotípica em campo e inoculações artificiais, foram identificadas em várias progênies analisadas (LANAUD et al., 2004). De acordo com Brown e Schnell (2005), QTLs para resistência a podridão-parda foram encontrados nos clones DR1 e IMC78 em uma região similar àquela localizada por Clement et al. (2003a, 2003b) no cromossomo 4, entretanto, possíveis interações com características morfológicas dos frutos pode ter influenciado a detecção destes QTLs, como sugerido por Flement et al. (2001).

A construção de um mapa genético envolve inúmeras etapas, que vão desde o desenvolvimento e escolha das populações a serem mapeadas, escolhas dos marcadores polimórficos nos parentais (*screening* de *primers*), até a construção dos grupos de ligações com os marcadores polimórficos na população. O estudo de locos controladores de características quantitativas (QTLs) associado ao uso de mapas genéticos obtidos por marcadores moleculares permite identificar, mapear e quantificar o efeito dos QTLs. A eficiência na detecção de QTLs depende do número de QTLs, magnitude do seu efeito, herdabilidade da característica, interações entre os genes, tipo e tamanho da população segregante, tamanho do genoma, frequência de recombinação entre o QTL e o marcador e saturação do mapa (TANKSLEY, 1993; YOUNG, 1996). Em programas de melhoramento de espécies perenes como os cacau, a estratégia de mapeamento utilizando a técnica 'pseudotestcross' envolve a

progênie F1 devido à dificuldade de se obter gerações avançadas. O princípio da técnica do 'pseudotestcross' é que se um parental for heterozigoto para um marcador RAPD e o outro parental apresentar formas alélicas não detectadas (genótipo nulo), a progênie F1 segrega na proporção de 1:1 para ausência e presença do segmento de RAPD detectado. Em resumo, a geração F1 obtida do cruzamento entre duas plantas de uma mesma espécie heterozigota se assemelha a uma progênie F2 ou um retrocruzamento nos modelos clássicos de culturas anuais (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994). Várias populações tem sido caracterizadas para resistência a *Phytophthora*, seja através da avaliação em campo (DANTAS NETO et al, 2005) ou pela inoculação artificial de frutos e discos de folhas (NYASSÉ et al 1995), coletadas em plantas adultas (LANAUD et al., 2004). Marcadores moleculares tem sido usados em estudos de *Phytophthora* relacionados à diversidade genética de isolados de cacauzeiros (FALEIRO et al., 2004), esclarecer relações filogenéticas dentro do gênero (COOKE et al., 2000 em Appiah et al, 2004), análise da variabilidade intra e entre espécies (APPIAH et al., 2004) e para o mapeamento genético de QTLs (*Quantitative Trait Loci*), relacionados à resistência a *Phytophthora* em *T.cação* (RISTERUCCI et al., 2003; CLEMÉNT et al., 2003).

2.8. Inferindo sobre a capacidade produtiva pelo número de óvulos

O número de óvulos por ovário é um caráter importante que tem sido utilizado como descritor de cultivares devido à sua consistência e baixa variabilidade ambiental, além de ser um bom estimador do número de sementes por frutos, sendo considerado um importante componente do rendimento, que é altamente afetado pelas condições ambientais (LÓPEZ et al., 1988). O número de óvulos por ovário foi considerado por Pound (1932), como um caráter muito estável e para estimá-lo sugeriu uma amostra de cinco ovários por árvore. Este critério foi posteriormente ratificado por outros autores (ENRÍQUEZ & SORIA, 1967; MARTINSON, 1973; OSTENDORF, 1956). De acordo com Esquivel & Soria (1962), as médias mais altas do número de óvulos por ovário foram encontradas em clones do tipo Forasteiros e as mais baixas em clones do tipo Crioulo. Bartley

(1964) observou que, em muitos clones, o número de óvulos varia em torno de 50 dependendo da origem do material, confirmando os dados de Esquivel & Soria (1962) acerca dos materiais Forasteiros e controle genético para o número alto de óvulos parece exercer efeito de dominância sobre o menor número, o que foi posteriormente reafirmado por Soria & Esquivel (1969). Carletto (1974) estabeleceu uma classificação de cultivares de cacau com base no número de óvulos por ovário, a qual considerava alto, materiais com valores maiores ou iguais a 51,5; médio entre 45,5 e 51,0 e baixo aqueles com números inferiores ou iguais a 45,0. Aquele autor ainda estimou uma herdabilidade de 70% para este caráter. O cacauzeiro, por se tratar de uma espécie com número relativamente baixo de óvulos por ovário, não apresenta grande requerimento quanto número de grãos de pólen transportados pelos agentes polinizadores. Ao contrário de espécies como *Tabebuia pulcherrima* Sandw, que por apresentar um número elevado de óvulos, requerem agentes polinizadores que possuam capacidade de transportar grande quantidade de grãos de pólen (SOUZA et al., 2004).

Embora seja o óvulo o principal órgão reprodutor da planta e considerando, portanto, que é um componente essencial para a produção de chocolate, visto que sua fecundação resultará na formação de frutos dos quais serão obtidas as amêndoas necessárias ao fabrico do produto, poucos estudos tem sido realizados a respeito da biologia floral do cacauzeiro. SWANSON (1995), foi o primeiro a conduzir trabalhos moleculares visando o melhor entendimento do desenvolvimento floral no cacauzeiro. Para Silva (1996), o número de semente em cupuaçuzeiro não é proporcional ao número de óvulos, pois trata-se de um caráter de produção muito variável que também depende do percentual de fertilização. Assim, fatores ambientais que influenciam a polinização das flores afetam indiretamente a fertilização. Pereira et al. (1994) relatam que esse caráter relacionado ao fruto de cacau é o único a ser influenciado pela origem do grão de pólen.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Uma população segregante constituída por 282 indivíduos resultantes do cruzamento entre os clones TSH1188 e CCN51 constituiu o material vegetal utilizado neste trabalho. A população está localizada na Fazenda Almirante Cacau, Itajuípe-BA, tendo sido plantada em maio de 2002 de forma controlada, em que foram protegidas as flores masculinas e femininas para evitar qualquer tipo de contaminação.

As progênies (caracterizada por uma árvore de cada indivíduo-semente) estão plantadas na mesma área dos genitores (cinco árvores de cada um), sendo utilizada a planta da bananeira como sombreamento, considerada adequada na conservação do solo florestal. As árvores de sombra são plantadas no mesmo alinhamento do cacau. Desse modo as entrelinhas, após o desaparecimento do sombreamento provisório, ficarão livres para os trabalhos de vigilância, combate às pragas e moléstias, adubação e colheita.

O TSH-1188 (*Trinidad Selected Hybrids*) originou-se de cruzamentos envolvendo os clones IMC-67, ICS-1 e SCA-6 e P-18. Produz frutos vermelhos e com rugosidade áspera (CEPEC, 1987) e apresenta resistência à vassoura-de-bruxa (LUZ et al., 1997).

O CCN-51 (*Colección Castro Naranja*) é oriundo de uma planta F₁ do cruzamento entre ICS-95 x IMC-67, cruzada com um clone nativo do oriente equatoriano denominado "Canelos" (BARTLEY, 1999). Produz frutos vermelho-arroxeados quando imaturos, passando a amarelo-alaranjados quando maduros,

com casca levemente enrugada e sementes com coloração interna púrpura clara (CASTRO, 1986), apresentando resistência moderada à vassoura-de-bruxa.

3.2. Inoculação e avaliação dos sintomas em discos de folhas

No período de 2004 a 2005, para a avaliação da resistência da progênie à podridão-parda foram coletadas nas primeiras horas da manhã, na Fazenda Almirante Cacau, de cinco a seis folhas em boas condições fisiológicas, em fase de maturação intermediária, com aproximadamente 2 meses de idade, de cada uma das 282 plantas da progênie, dos parentais (TSH-1188 e CCN-51; Fig. 1A e 1B, respectivamente) e dos genótipos tomados como padrão de resistência (Sca 6) e de suscetibilidade (Catongo).

No laboratório de *Phytophthora* na seção de Fitopatologia do Centro de Pesquisa do Cacau (Cepec), as folhas foram lavadas em água estéril, duas vezes e secadas em toalhas de papel estéreis. Após, com auxílio de um furador foram retirados 20 discos de cada genótipo, com aproximadamente 2 cm de diâmetro e colocados com a face abaxial para cima, em caixas plásticas com dimensões de 32,5 cm X 22,0 cm, contendo na parte inferior uma espuma umedecida esterilizada. Os discos foram dispostos em blocos ao acaso em quatro repetições de cinco discos para cada material (Fig. 1C).

Os isolados 62 (*Phytophthora citrophthora*) e 252 (*P.palmivora*) foram usados como inóculo, sendo ambos oriundos de frutos de cacau da região Sul da Bahia. Foram preparadas dez placas para cada isolado, em meio de cenoura-líquido (200 gramas de cenoura/L de água deionizada) para o isolado 62 e cenoura-ágar (200 gramas de cenoura + 20 gramas de agar/L) para o 252. Após a repicagem dos isolados, as placas foram mantidas na incubadora a temperatura de 25°C por dez dias (LUZ e SILVA, 2001). Em seguida, após verificar ao microscópio se as colônias estavam esporuladas, foram colocados, 10mL de água estéril gelada em cada placa, transferindo-as para geladeira onde permaneceram por 20 minutos. Depois deste período de tempo, as placas foram retiradas e colocadas à temperatura ambiente, por mais 25 minutos.

À suspensão obtida para cada espécie de *Phytophthora* foi adicionada uma gota de FAA (Formol; Álcool; Ácido Acético Glacial) para imobilizar os zoósporos liberados, permitindo assim a contagem dos mesmos. A leitura da concentração da suspensão foi realizada através de um hematocitômetro, em duas repetições, ajustando-se a concentração final da suspensão para $3,0 \times 10^5$ zoóporos por mL. A mesma concentração de inóculo foi usada para as duas espécies de *Phytophthora* avaliadas.

A inoculação foi feita colocando-se uma gota da suspensão de inóculo ao centro de cada disco de folha (Figura 1D). Ao término das inoculações, as caixas foram fechadas e mantidas no escuro, com a temperatura em torno de 24°C, até o dia da avaliação.

Decorridos cinco dias da inoculação, as caixas foram cuidadosamente abertas e procedeu-se a avaliação usando uma escala de notas desenvolvida por Nyassé et al. (1999), cujos valores, variando de 0 – 5 correspondem ao seguinte: 0 – sem sintoma; 1 – pequenos pontos cloróticos; 2 – pontos cloróticos conectando-se entre si; 3 – pontos necróticos coalescentes; 4 – lesão marrom em expansão; 5 – lesão necrótica grande.

A cada disco foi atribuída uma nota da escala e calculada a média dos 20 discos para cada indivíduo da progênie. O ensaio foi repetido duas vezes, sendo, portanto os valores obtidos para cada planta, a média dos índices de 40 discos de folhas inoculados com cada espécie.

Com o auxílio do programa, SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM – SAS, 1989), calculou-se a estatística descritiva da resistência à doença com base nos valores máximo, mínimo e médio, no desvio padrão, na variância, e na distribuição da frequência de sintomas. Os dados foram digitados e analisados individualmente referentes aos sintomas obtidos para cada espécie.

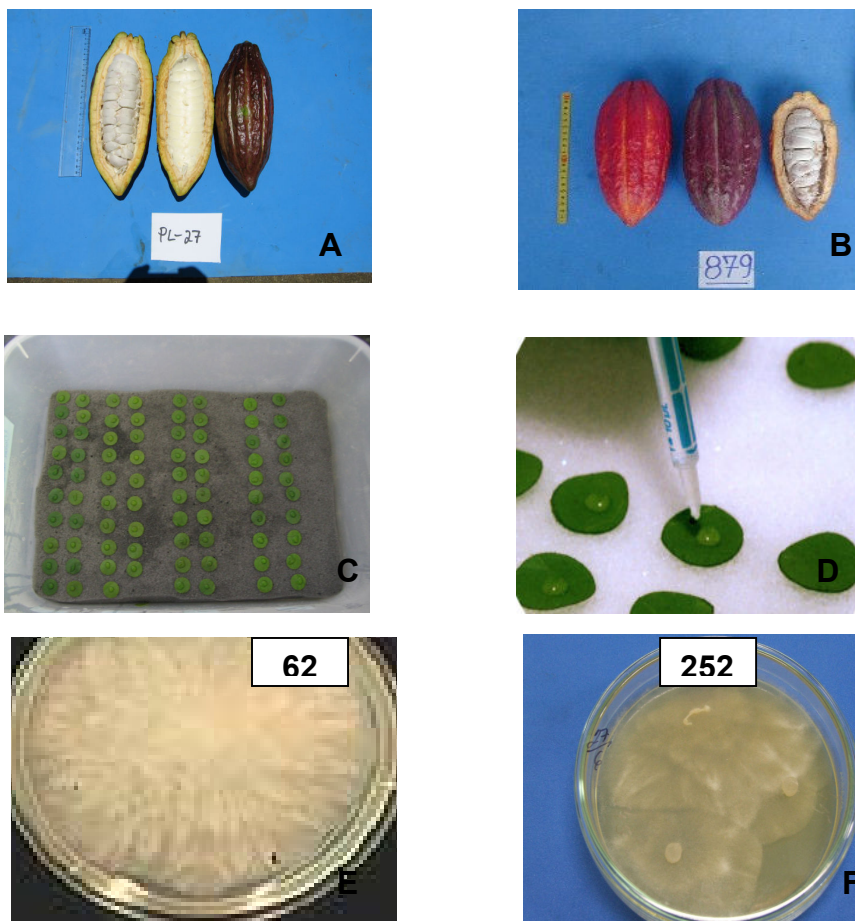


Figura 1 – A e B padrões de frutos dos clones TSH1188 e CCN51; C - são exemplo de arranjo dos discos de folhas nas bandejas; D – detalhe da inoculação; E e F são os isolados 62 (*Phytophthora citrophthora*) e 252 (*P. palmivora*) usados como inóculo, na avaliação da resistência à podridão-parda

3.3. Avaliação do número de óvulos por ovário

Dez botões florais por planta de cada progênie e dos parentais, foram coletados nas primeiras horas da manhã na Fazenda Almirante Cacau, onde foram realizadas as contagens, após armazená-los em tubos de ensaio com água destilada estéril. Com o auxílio de uma lupa com aproximadamente 10X de aumento, contou-se o número de óvulos presentes em cada ovário dos dez botões florais de cada indivíduo da progênie, após uma incisão lateral nos mesmos (Figura 2A e B).



Figura 2. A e B – Botão floral sendo incisado para contagem do número de óvulos com auxílio de uma lupa com aproximadamente 10 X de aumento.

A análise dos dados obtidos foi realizada através do programa computacional SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM – SAS, 1989). Calculou-se a estatística descritiva com base nos valores máximo, mínimo, médio desvio padrão, distribuição de frequência e variância da média do número de óvulos/ovário obtida para cada indivíduo.

3.4. Análises moleculares

No laboratório de Biologia molecular do CEPEC, O DNA genômico de folhas em estágio intermediário de maturação de cada uma das 282 plantas F1 e

dos genitores (TSH 1188 e CCN 51), foi extraído de 300 mg do tecido vegetal, de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990), otimizado por FALEIRO et al., (2002). As amostras de DNA foram purificadas com Kit Prep-A-Gene-Mapris da BIO RAD.

Para verificar a integridade do DNA extraído, uma alíquota de 3µL de cada amostra, adicionada de 3µL do corante tipo IV (Bromofenol Blue a 0,25%, sacarose 40%) foi aplicada em gel de agarose a 0,8%, utilizando como tampão de corrida o TBE 1X (EDTA 2mM; Tris-borato 90mM) .

A corrida eletroforética foi realizada com 80 V, durante 1 hora. Os géis foram corados com brometo de etídio a 10mg/mL, fotodocumentados sob luz ultra violeta (UV) com o sistema da VILBER LOURMAT. A concentração do DNA de cada amostra foi estimada pelo espectrofotômetro a 260 nm Cary Winv 50, utilizando-se o software RNA&DNA, (SAMBROOK et al., 1989) e, em seguida diluída para 10ng/µL.

As seqüências dos *primers* microssatélites utilizados foram isolados e caracterizados por Lanaud et al. (1999) para a cultura do cacau e disponibilizados pelo CIRAD ao Laboratório de Biotecnologia da CEPLAC/CEPEC. Amplificaram-se quarenta e sete *primers* microssatélites nos parentais TSH 1188 e CCN 51, e as reações foram aplicadas em gel de agarose a 3%, sob corrida eletroforética de 100 volts, durante 3 horas. Trinta e dois *primers* marcados com fluorescência azul (FAM), verde (VIC) e amarelo (NED), foram amplificados com as mesmas amostras vegetais e aplicados em gel de poliacrilamida a 6,0 %, no seqüenciador automático 377 da ABI Prism. O DNA das quatorze plantas da progênie selecionadas, em função das características fenotípicas de produção e de resistência às duas espécies de *Phytophthora*, avaliada através de inoculações, foi usado para a amplificação com os trinta e dois *primers* marcados com fluorocromos. Essas amplificações ocorreram em um volume final de 15,5 µL de mistura contendo: Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2,4 mM, 0,15 mM de cada um dos desoxiribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 3 pM de cada um dos dois *primers* (*forward and reverse*), meia unidade da enzima *Taq* polimerase (CENBIOT) e 30 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador da PTC-100 MJ Research, Inc. conforme o seguinte programa: 4 minutos a 94 °C + 10 ciclos (30 segundos a 94

°C + 60 segundos a 60 °C –1 °C a cada ciclo + 90 segundos a 72 °C) + 30 ciclos (30 segundos a 94 °C + 60 segundos à temperatura específica para cada *primer* + segundos a 72 °C) + 6 minutos a 72°C, sendo que após a amplificação, a temperatura das amostras foi reduzida para 4°C. Um volume de 2,0µL da amplificação final de duas fluorecências diferentes foram adicionadas a 2,0µL de formamida deionizada da marca USB a 1%, Loading Buffer Part No: 360974, constituída com Blue Dextran/EDTA e o padrão de peso molecular ROX500, ambos da Applied Biosystems. As amostras foram desnaturadas no termociclador por 4 minutos a 94°C. As reações concentradas foram diluídas numa proporção de 1/10 para as três fluorecências FAM, VIC e NED e os pares de *primers* foram agrupados em duplex conforme especificação do filtro GS 36A 2400, utilizado no seqüenciador automático de DNA ABI 377. Então as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, no seqüenciador, numa voltagem constante de 2400, por um período de 3horas e meia.

Após a obtenção dos géis, os dados foram analisados utilizando-se os programas GENESCAN e GENOTYPER. O Genescan foi utilizado na elaboração dos projetos para análise de dados, extraindo os eletroferogramas dos géis e determinando o tamanho dos fragmentos, em pares de bases, utilizando-se padrão de peso molecular (ROX500). As informações armazenadas nesse projeto foram analisadas, por meio do programa Genotyper, com base na presença/ausência de fragmentos, gerando-se, assim, uma matriz de dados binários.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resistência à podridão-parda

A análise de variância dos dados obtidos para as plantas da progênie, os progenitores e os controles demonstrou que houve diferenças estatisticamente significativas, pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade para blocos (caixas), plantas, espécies e para interação espécie e plantas (Tabela 1). Isto significa que houve reação diferenciada das plantas às duas espécies testadas e também do material genético testado entre si, indicando variabilidade entre as plantas da progênie, os clones parentais e as testemunhas.

Tabela 1. Análise de variância dos níveis de infecção de duas espécies de *Phytophthora* nos clones parentais TSH1188 e CCN51, controles de resistência (Scavina-6) e suscetibilidade (Catongo) e nas 282 plantas oriundas do cruzamento TSH1188 X CCN51

Fonte da Variação	GL	Quadrado Médio	F
Caixa	7	1.61	5.59 *
Clones	285	16.76	58.31 **
Espécie	1	2.73	9.49 **
Planta*Espécie	285	1.59	5.53 **
Resíduo	1741	0.29	
CV (%)	27.43		

* Significativo a 5% de probabilidade.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Ao comparar a reação dos parentais às duas espécies inoculadas *P. citrophthora* e *P. palmivora* com as reações dos clones usados como controles Sca- 6 (resistente) e Catongo (suscetível) a estas mesmas espécies (Tabela 2) comprovou-se a resistência do clone Sca 6, às duas espécies e a suscetibilidade

de Catongo, a *P. citrophthora*, os clones parentais não diferiram entre si, embora o CCN-51 também não haja diferido das médias de níveis de infecção obtidas para os discos de folhas inoculados com Sca-6. Os parentais e os controles não diferiram entre si com relação à reação à infecção com *P. palmivora*. Pode-se inferir portanto que os clones parentais TSH-1188 e CCN-51 não diferiram entre si quanto ao nível de resistência às duas espécies de *Phytophthora* testadas, embora para *P. citrophthora* as plantas de CCN-51 tenham demonstrado um comportamento ligeiramente mais resistente que as de TSH-1188. Dada a maior prioridade atribuída aos níveis de infecção deste parental em relação às do clone Sca-6, que é considerado resistente a esta espécie (PAIM et al., 2003) o que também foi comprovado neste estudo. Porém, de um modo geral as médias de infecção às duas espécies obtidas para o clone CCN51 foi o dobro daquelas obtidas para o Sca 6 (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação estatística entre as média dos níveis de infecção obtidos para inoculação com as duas espécies *P. citrophthora* e *P. palmivora* em discos de folhas dos parentais (TSH1188 e CCN51) e dos padrões de resistência (Sca 6) e suscetibilidade (Catongo)

Clones	<i>P. citrophthora</i>	<i>P. palmivora</i>	Média
Catongo	3,20 a	1,00 a	2,10
TSH-1188	1,83 b	0,70 ab	1,26
CCN-51	1,53 bc	0,83 a	1,18
SCA 6	0,85 c	0,33 b	0,59
Média	1,85	0,71	

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Comparando-se as médias obtidas pelos 4 clones em relação as duas espécies de *Phytophthora* testadas, observa-se, embora sem comparação estatística, que a média dos níveis de infecções obtida para *P. palmivora* no clone CCN51 foi o dobro daquela obtida para o Sca-6 (Tabela 2). Comparando-se as médias obtidas pelos 4 clones em relação as duas espécies de *Phytophthora* testadas, observa-se, embora, sem comparação estatística, que a média dos níveis de infecções obtida para *P. citrophthora* (1,81) é maior que o dobro daquela obtida para *P. palmivora* (0,71), demonstrando ser a espécie *P. citrophthora* mais agressiva a estes clones que *P. palmivora*. LUZ e YAMADA (1985) comprovaram esta mesma relação ao estabelecerem uma escala de notas para comparação das reações de diferentes clones de cacauero às espécies de

Phytophthora, através de inoculação de frutos. Outros autores (CAMPELO e LUZ, 1981, LAWRENCE et al, 1983 e LUZ, 1989) já haviam também relatado a maior virulência de *P. citrophthora* em relação as outras espécies que atacam o cacauero na Bahia, *P. palmivora* e *P. capsici*, sendo este o motivo principal de terem sido escolhidas as duas espécies *P. palmivora* e *P. citrophthora* para a realização deste trabalho. *Phytophthora palmivora* é uma espécie cosmopolita e *P. citrophthora* de acordo com os testes realizados por LUZ (1989) é a mais agressiva. Além disso, os dados de LUZ et al (2003), demonstraram o crescimento das populações destas duas espécies nos últimos anos no estado da Bahia e o declínio de *P. capsici*.

As reações das 282 plantas avaliadas quanto às duas espécies de *Phytophthora* testadas foi estratificada em 3 categorias de acordo com o nível dos sintomas apresentados, representando a severidade da doença (Tabela 3). As categorias criadas para as duas espécies foram diferentes em função do grau de agressividade das mesmas ser diferenciado. As reações das categorias foram comparadas aos controles Catongo e Sca 6. Não houve diferença estatística pelo teste Dunnett ($p \leq 0.5$) entre os valores das categorias que apresentaram menor nível médio de sintomas (0,0 a 2,00) para *P. citrophthora* e (0,00 a 1,50) para *P. palmivora*.

Tabela 3. Freqüência de distribuição das médias de severidade obtidas para as plantas da progênie TSH1188 X CCN51, comparando-as com as médias de severidade dos controles de resistência (Sca 6) e de suscetibilidade (Catongo), inoculadas com *P. citrophthora* e *P. palmivora*

Espécie	Severidade de Doença (Nota)	Números de Indivíduos	Diferença de Sca-6	Diferença de Catongo
<i>P. citrophthora</i>	0,00 – 2,00	159	ns	*
	2,10 – 4,35	92	*	ns
	4,40 – 5,00	31	*	*
<i>P. palmivora</i>	0,00 – 1,50	130	ns	ns
	1,60 – 2,20	35	*	ns
	2,25 – 5,00	117	*	*

* Significativamente diferente do Sca-6 e (Catongo) pelo teste de Dunnett (5% de significância)

** Não significativamente diferente do Sca-6 (Catongo) pelo teste de Dunnett

Em relação à reação do clone Sca-6, padrão de resistência. Deste modo, 159 das plantas da progênie apresentaram reação de resistência a *P. citrophthora* e 130 a *P. palmivora* (categorias I), isto representa pouco mais de metade das

plantas da progênie testada equivalente em resistência ao clone Sca 6 para *P. citrophthora* e pouco menos desta metade com reação equiparável ao clone padrão de resistência para *P. palmivora*. Entretanto, os valores de severidade de doença para reação das plantas a *P. palmivora* na 1ª categoria também não diferiram da reação do clone Catongo, que portanto, não é tão suscetível a esta espécie como deveria ser um padrão de suscetibilidade. Observa-se que as duas primeiras categorias selecionadas, no tocante às reações de *P. palmivora* não diferiram do Catongo, o que faz sentido ao ver-se na Tabela 2 que a média de níveis de infecção obtida para este clone quando inoculado com esta espécie foi 1,00, enquanto para *P. citrophthora* foi 3,20. As plantas que ficaram na última categoria para as duas espécies (31 para *P. citrophthora* e 117 para *P. palmivora*) foram mais suscetíveis que o padrão de suscetibilidade, Catongo. O que demonstra a segregação existente entre as plantas da progênie para o caráter resistência a *P. palmivora* e *P. citrophthora*. Considerando ainda a Tabela 3, infere-se que estatisticamente é possível afirmar que as plantas da progênie F1 que apresentaram um nível de infecção superior a 2,10 para *P. citrophthora* e 1,60 para *P. palmivora*, podem ser considerados como suscetíveis pois diferem do padrão de resistência Sca 6.

A segregação das plantas da progênie F₁ do cruzamento entre TSH1188 E CCN51 pode ser observada melhor na Figura 3. Houve uma alta freqüência de plantas com o nível mais baixo de infecção (0,81) em relação aos demais níveis para as duas espécies. A distribuição pelos demais níveis (múltiplos do primeiro) foi mais ou menos similar para as duas espécies. Se uma curva fosse traçada ligando as freqüências de plantas para os diferentes níveis ela seria destorcida (“shewed”) no sentido de maior resistência para as duas espécies, sugerindo que poucos genes estejam envolvidos no controle da resistência às duas espécies e que, embora os genes sejam diferentes, eles devem ser fortemente ligados.

Vários autores (BLAHA e LATODÉ, 1976; ENRIQUEZ e SALAZAR, 1980; RODRIGUEZ et al., 1985) sugerem que há um controle poligênico para resistência à *P. palmivora*. Mais recentemente, RISTERUCCI et al. (2000) detectaram oito QTLs associados à resistência a *P. palmivora*, *P. capsici* e *P. megakarya*. Três deles foram significativos para mais de uma espécie de *Phytophthora*, sendo isso de grande interesse para a aplicação de testes de

resistência em diferentes países (DIAS, 2001). A avaliação de resistência a vários isolados e espécies de *Phytophthora* por inoculação de discos foliares foi conduzida na França, envolvendo 154 indivíduos da progênie [(‘Sca-6 x GS 36’) x IFC 5’)] (PAULIN et al., 2000).

Segundo PHILLIPS-MORA, (1996), foram identificados seis QTLs na população Catongo x Pound-12, explicando quase 65% da resistência a *P. palmivora*. Estes resultados confirmam a nível molecular que o cacau possui resistência poligênica a essa espécie. Isto foi sugerido por diferentes autores como (PARTIOT 1975, PHILIPS-MORA e GALIND, 1989).

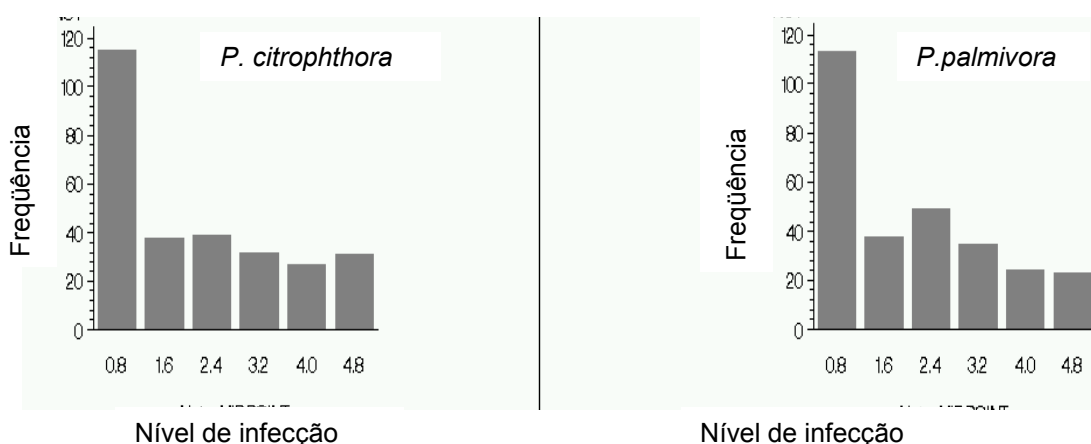


Figura 3. Distribuição da frequência de 282 plantas F1 do cruzamento TSH-1188 X CCN-51, relativa ao nível de infecção às espécies *P. citrophthora* e *P. palmivora*.

4.2. Número de óvulos por ovário

A população estudada foi plantada em 2002, estando, pois, de acordo com o padrão produtivo do cacaueiro, em sua primeira safra. Desta forma, o padrão de floração das plantas foi afetado pela idade das mesmas, havendo variação quanto ao número de flores produzidas por planta. Assim, das 209 plantas que compõem a população, em 38 delas, não foi possível fazer a caracterização, o que representa pouco mais de 15% do número total de plantas. Trinta plantas apresentaram um número menor que 10 flores, número de repetições

estabelecido na metodologia. Portanto, os indivíduos que apresentaram floração foram agrupados em 6 classes fenotípicas, com intervalos de 5 óvulos entre estas. Considerando-se como classe I, os indivíduos que apresentavam entre 40 e 44 óvulos/flor e como classe VI, os que apresentavam entre 65 e 69 óvulos/flor, correspondendo aos limites de variação deste caráter observados na população em estudo (Figura 4). Os números de plantas/classe variaram de 1 a 112, sendo observado para as classes I e III (50-54 óvulos por ovário), respectivamente. A classe III foi aquela onde se caracterizou a média da população 54,2 óvulos/ovário. Os indivíduos da população concentraram-se basicamente nas classes III (50-54) e IV (55-59), com 112 e 56 indivíduos respectivamente.

Os números médios de óvulos/ovário para cada planta da progênie são apresentados na Tabela 4, juntamente com os desvios padrões da média. Observa-se de modo geral um comportamento mais ou menos uniforme da progênie em torno da média calculada com pequenas variações para mais ou para menos.

É possível também notar que as 21 plantas que apresentaram números médios de óvulos/ovário superior a 60, classe 5 e 6 (Figura 4), podem representar a elite, em termos de produção da população. São elas as plantas: 6/21, 8/38, 8/11, 14/34, 2/25, 8/37, 9/33, 22/10, 15/33, 20/16, 4/01, 20/28, 19/35, 21/07, 19/02, 18/04, 18/01, 19/13, 14/09, 10/13, 4/28.

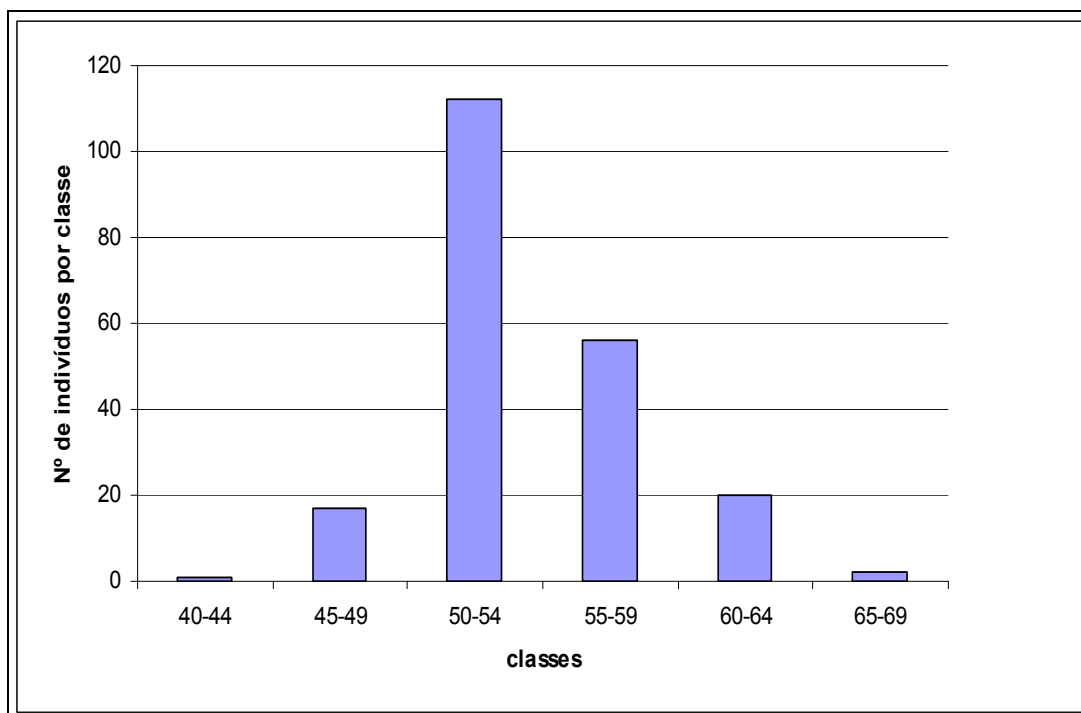


Figura 4. Número de indivíduos em cada classe de número de óvulos da progênie oriunda do cruzamento TSH-1188 X CCN-51.

Convém destacar que a planta 20/28, que apresentou um número de óvulos por ovário que variou de 63 a um máximo de 72, com uma média de 67,5, superior a todas as demais, e um desvio médio de 3,35 (Tabela 4). De acordo com Nepi & Pacini (1993), o número máximo de sementes de um fruto é determinado pelo número de óvulos no ovário da flor feminina. Os parentais da população estudada, que teve como genitor masculino o clone TSH1188 e como genitor feminino o clone CCN51 apresentaram, respectivamente, 53,2 e 58,6 óvulos por ovário em média. Além disso, de acordo com Lachenaud (1991), o número de óvulos por ovário é variável entre os diferentes grupos genéticos do cacauero. Entre os descritores morfológicos do cacauero, aqueles relativos às flores são considerados ser os mais numerosos e podem ser usados tanto para caracterização dos materiais genéticos, quanto para estudar a variabilidade das populações (LACHENAUD et al., 1999). Falque et al. (1995), estudando as relações funcionais entre a intensidade de polinização e sobrevivência de frutos, bem como com o número de sementes por fruto, em clones Forasteiros Alto Amazônicos, na Costa do Marfim, verificou uma estreita correlação entre a intensidade da polinização (IP) e o número de sementes por frutos (NSF) e

modelando esta relação, verificou que os resultados foram consistentes com a hipótese de que os óvulos atraem os tubos polínicos de modo similar, independentemente de já ter sido alcançado por um outro tubo. Clément et al. (2003) mapearam quatro QTLs para o número de óvulos por ovário, em três populações segregantes resultantes do cruzamento entre um clone Forasteiro Alto Amazônico (IMC67) e dois materiais Trinitários (DR1 e S52). Entretanto, as correlações entre o tamanho da amêndoa e o número de óvulos não foram significativas, exceto na progênie S52.

Nenhuma correlação significativa foi encontrada entre o índice da forma do fruto, características da amêndoa e o número de óvulos por ovário. Os QTLs identificados explicaram individualmente entre 5 e 24% da variação fenotípica encontrada. Como as plantas analisadas ainda não foram submetidas a análises moleculares visando o mapeamento de QTLs, não foi possível estabelecer relações entre as populações estudadas.

TABELA 4: Média e Desvio Padrão das plantas da progênie em relação ao número de ovulos por ovario, oriundo do cruzamento TSH-1188 e CCN-51

N ^a	PROGENIE	MEDIA	DESVIO	N ^a	PROGENIE	MEDIA	DESVIO	N ^a	PROGENIE	MEDIA	DESVIO
1	6/10 L02	50,0	1,55	71	13/03 L10	58,4	1,62	141	19/04 L22	50,3	2,42
2	1/18 L02	50,6	1,43	72	1/04 L10	58,3	1,42	142	21/40 L22	55,5	2,12
3	6/41 L02	49,6	1,02	73	23/12 L10	52	2,19	143	22/18 L22	57,6	2,96
4	6/03 L02	52,5	1,91	74	9/12 L10	53,4	2,42	144	13/05 L22	52,1	0,80
5	8/30 L02	50,2	1,40	75	13/04 L10	48	1,34	145	14/30 L22	55,8	2,11
6	8/13 L02	51,9	1,30	76	9/09 L10	58,8	1,89	146	15/11 L23	49,6	1,7
7	4/03 L02	50,3	1,85	77	22/09 L10	57,5	1,50	147	22/10 L23	60,5	2,06
8	8/15 L02	54,9	1,97	78	21/05 L10	52,9	1,58	148	11/07 L 23	50,4	1,26
9	23/24 L03	52,1	1,87	79	22/09 L10	50,6	0,80	149	2/15 L23	52,6	2,24
10	10/20 L03	44,1	2,02	80	22/13 L12	57,5	1,50	150	12/33 L23	51,5	1,56
11	15/18 L03	51,8	0,87	81	23/15 L12	50,3	2,10	151	9/03 L23	53,7	3,49
12	12/35 L03	54,9	2,26	82	15/05 L12	57,8	1,27	152	8/36 L 24	51,4	1,73
13	15/20 L03	54,8	1,99	83	22/21 L12	51,4	1,78	153	14/16 L24	56	2,34
14	8/09 L03	49,8	0,87	84	8/11 L12	62,4	1,96	154	8/31 L24	52,3	1,55
15	8/41 L03	54,4	1,50	85	12/25 L12	52,8	1,74	155	6/40 L24	57,375	1,08
16	23/06 L03	51,5	1,36	86	8/24 L12	56,25	1,25	156	20/11 L 24	54	1,41
17	8/22 L03	58,5	2,29	87	10/01 L12	54,6	0,43	157	23/30 L24	51,2	1,69
18	9/42 L03	54,1	2,05	88	9/08 L13	49,7	1,85	158	15/33 L25	63	2,24
19	6/21 L03	60,2	0,98	89	12/26 L13	55	0,90	159	20/16 L 25	63,5	2,33
20	1/22 L03	53,7	1,95	90	14/34 L13	62,2	2,32	160	5/03 L 25	52,6	2,05
21	7/02 L03	51,6	1,36	91	9/22 L13	53,4	1,94	161	17/04 L25	52,7	2,57
22	23/07 L03	56,4	2,11	92	6/07 L13	54,9	1,36	162	4/01 L25	60,3	3,35
23	1/24 L04	51,5	2,11	93	1/01 L13	58,2	2,04	163	4/01 L25	61,3	4,02
24	8/38 L04	61,3	2,00	94	24/22 L13	53,7	1,00	164	20/28 L 27	67,5	1,49
25	21/22 L04	50,8	0,98	95	22/04 L13	50,3	1,73	165	20/03 L27	52,4	1,91
26	1/10 L04	51,9	1,70	96	21/18 L14	58,8	1,72	166	19/40 L27	52,3	1,30
27	14/27 L04	52	1,00	97	9/40 L14	52,1	1,14	167	19/35 L27	62,4	1,60
28	14/15 L04	53,2	1,94	98	18/12 L14	58	2,37	168	23/31 L27	52,1	1,66
29	12/20 L4	49	1,18	99	2/25 L14	64,5	1,36	169	19/07 L28	59,2	2,37
30	23/01 L04	52,1	0,94	100	24/09 L 14	50,1	0,30	170	20/21 L28	55,9	1,70
31	1/27 L04	51,3	1,10	101	8/01 L14	57,7	1,79	171	19/41 L28	54,4	1,33
32	8/10 L04	51,6	2,06	102	23/18 L14	50,6	2,11	172	19/32 L28	50,1	2,46
33	10/06 L05	52,8	1,72	103	11/01 L14	49,8	1,33	173	21/07 L28	60,2	0,99
34	12/05 L05	52,4	1,91	104	12/41 L14	57,9	1,14	174	19/15 L28	52,5	0,47
35	4/10 L05	51,6	1,69	105	3/16 L15	56,5	1,69	175	19/20 L29	49,9	1,87
36	6/08 L05	50,5	1,12	106	7/33 L15	50,1	0,94	176	21/10 L29	58,7	0,37
37	6/04 L05	50,8	1,89	107	6/19 L15	58,2	1,47	177	20/27 L30	52,625	1,50
38	9/31 L05	51,4	1,20	108	15/07 L15	48,5	2,05	178	19/25 L30	57,7	1,50
39	9/35 L05	52,6	2,11	109	13/01 L15	58,1	2,47	179	16/07 L30	55,6	0,47
40	8/45 L05	50,6	1,20	110	7/43 L15	51,8	1,85	180	17/07 L30	55,6	0,00
41	6/01 L05	59,3	1,68	111	7/23 L15	55,3	2,03	181	20/17 L32	58,7	1,04
42	8/33 L05	54	1,10	112	2/10 L15	52,9	2,16	182	23/11 L33	50	2,14
43	8/21 L07	52,1	1,64	113	22/23 L17	47,7	0,92	183	19/02 L33	61,9	0,82
44	20/20 L07	50,6	1,28	114	9/36 L17	49,9	1,86	184	25/08 L34	59	0,92
45	5/20 L07	51,8	1,54	115	3/12 L17	54,5	1,17	185	17/24 L34	53	1,96
46	23/05 L07	49,4	1,91	116	8/06 L17	51,6	1,58	186	17/14 L34	50,6	1,50
47	23/08 L07	48	1,10	117	6/11 L17	56,5	2,06	187	18/04 L35	62,4	2,28
48	14/46 L07	50	0,89	118	oct-15	49,2	1,17	188	18/01 L35	60,4	1,12
49	14/36 L07	55,5	2,20	119	14/33 L17	49,2	1,80	189	19/36 L35	58	2,18
50	6/02 L07	54,9	1,70	120	4/23 L18	52,1	1,89	190	21/38 L37	54,5	1,72
51	9/11 L08	55,9	3,51	121	12/15 L18	50,4	2,23	191	19/13 L37	63,8	1,45
52	23/23 L08	50,6	1,11	122	15/08 L18	53,2	1,62	192	20/10 L37	48,2	0,63
53	5/22 L08	48,6	2,80	123	8/32 L18	55,1	1,91	193	3/22 L38	52,9	2,18
54	5/16 L08	52	2,10	124	6/27 L18	57,4	1,45	194	23/16 L38	50	1,33
55	23/25 L08	51,7	1,56	125	3/06 L18	57,5	1,43	195	21/27 L38	53,2	1,33
56	21/36 L08	48,8	2,23	126	7/16 L 18	59,1	2,01	196	16/18 L38	59,8	2,05
57	12/01 L08	51,3	1,95	127	8/37 L 19	60,6	1,40	197	14/09 L39	60,8	2,20
58	3/18 L08	50,4	1,20	128	12/07 L19	56,6	1,15	198	15/23 L39	57,7	1,17
59	6/18 L08	54	2,41	129	21/08 L19	51,2	0,94	199	10/13 L39	64,5	1,90
60	20/13 L08	54	3,16	130	9/33 L19	60	1,64	200	16/02 L40	58,2	1,41
61	7/48 L09	55,2	1,94	131	14/29 L19	50,7	1,51	201	14/04 L40	55,7	2,01
62	19/39 L09	50,3	1,55	132	9/07 L19	54,9	1,43	202	21/11 L42	50,625	1,62
63	22/20 L09	55,7	2,37	133	14/06 L19	56,1	0,94	203	1/16 L42	51,5	2,39
64	21/33 L09	55,5	1,1	134	7/49 L19	57,6	1,34	204	1/03 L42	57,3	1,64
65	9/20 L09	52,8	2,32	135	7/27 L20	50,3	0,83	205	21/16 L43	57,8	1,50
66	9/17 L09	52,2	2,52	136	24/24 L20	52	1,43	206	19/38 L43	49,1	2,47
67	23/22 L09	52,2	1,54	137	19/26 L20	50,1	1,45	207	5/07 L48	54,5	2,53
68	4/11 L09	52,3	1,85	138	21/03 L20	55,5	2,06	208	4/28 L48	61,9	2,47
69	22/06 L09	54,6	2,50	139	15/25 L22	56,1	1,42	209	22/03 L49	55	2,53
70	2/05 L09	51,2	1,47	140	14/37 L22	53,6	1,75				

Normalmente, a polinização com maior quantidade de pólen resulta em frutos com maior número de sementes e menor possibilidade de aborto (STEPHENSON et al., 1988). Esse processo de abortamento pode ser considerado um mecanismo pelo qual as plantas podem influenciar a qualidade de suas sementes (LEE, 1984). Como não foram efetuados estudos de efeito de intensidade de polinização na população, não é possível fazer qualquer afirmação quanto ao potencial produtivo da população. A Tabela 5, apresenta as estatísticas descritivas da variável número de óvulo por ovário de 209 plantas da progênie. O número de óvulos por ovário variou de um mínimo de 44,1 e máximo de 67,5 mostrando que há uma variação na progênie, confirmando a ocorrência de segregação da característica na população em estudo. Os quartis dividem um conjunto de dados em quatro partes iguais, 40 plantas encontra-se no primeiro quartil e 49 plantas estão no terceiro quartil, indicando que a população tem uma tendência para um maior número de óvulos por ovário, demonstrando uma maior proximidade com o parental CCN-51.

A população possui uma distribuição assimétrica positiva (0,7), onde o valor da média (54,2) é superior ao da mediana (53,2). O grau de achatamento da distribuição originou uma curva leptocúrtica, observa-se também desvio padrão (3,98) e coeficiente de variação baixos, indicando que a dispersão em torno da média é baixa, e os indivíduos tendem a se concentrar próximos da média (Tabela 5).

Calculou-se a variância da progênie oriunda do cruzamento TSH1188 e CCN51 para verificar a existência da diferença significativa entre os indivíduos da população e dos parentais, e pode-se notar que há diferença altamente significativa, conforme demonstrado na Tabela 6. Posteriormente, realizou-se um Teste de Duncan, para avaliar as médias de número de óvulos em três genótipos onde se notou que o parental CCN51 difere da progênie e do parental TSH1188, e estes não diferem um do outro (Tabela 7).

Tabela 5 - Estatísticas descritivas para a variável número de óvulos por ovário em indivíduos da população TSH-1188 x CCN-51 e parentais

Estatística	Estimativa
Nº de Plantas	209
Mínimo	44,1
Máximo	67,5
Amplitude Total	23,4
Mediana	53,2
Primeiro Quartil (25%)	51,2
Terceiro Quartil (75%)	57,2
Desvio Interquartilico	6,0
Variância	15,9
Desvio Padrão	3,98
Erro Padrão	0,3
Coefficiente de Variação	0,1
Assimetria	0,7
Curtose	0,1

Tabela 6. Análise de variância da progênie TSH-1188 e CCN-51.

Fonte da Variação	GL	SQ	QM	F	P- value
Genótipos	2	153,86	76,93	17,73	<.0001
Erro	27	117,14	4,34		
CV(%)	3,78				

Tabela 7. Médias de número de óvulos por ovário em três genótipos

Genótipos	Média de número de óvulos por ovário
CCN-51	58,6 ^a
Progênie	54,2 ^b
TSH-1188	53,5 ^b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Entretanto, pode-se inferir que, de acordo com o número médio de óvulos encontrados e a alta taxa de fertilização que ocorre em cacau e com os dados de produção dos parentais, esta é uma progênie promissora quanto ao caráter produção. Embora esta seja o resultado de um grande número de fatores, certamente o fator genético é decisivo quanto ao potencial produtivo de um cruzamento.

4.3. Identificação de locos SSR polimórficos

A Figura 5 ilustra o DNA genômico extraído dos parentais (TSH-1188 e CCN-51) e das quatorze plantas selecionadas com base nos dados fenotípicos. As amostras apresentam-se íntegra e de boa qualidade. A relação entre absorvância a 260 nm (A_{260}) e a 280 nm (A_{280}) variou de 1,5127 a 2,0905 com média de 1,8016, confirmando que o DNA está livre de proteínas e contaminação com fenóis, clorofórmio ou RNA, indicando que esta adequado para as análises moleculares. As amostras de DNA foram obtidas em quantidade satisfatória para as análises, variando de 822,50 a 1.489,50 ng/ μ L, com média de 411,99 ng/ μ L.

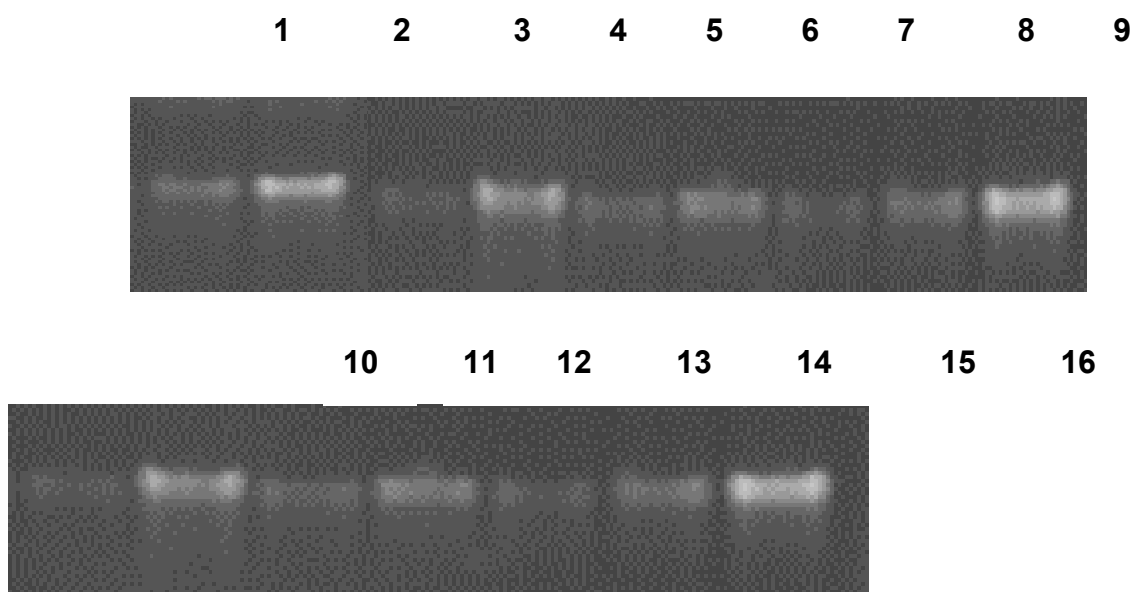


Figura 5 – Padrões de bandas de DNA genômico dos parentais TSH-1188 e CCN-51 e das quatorze plantas selecionadas para a amplificação via marcador SSR, obtidas em gel de agarose a 0,8%.

O resultado obtido no *screening* dos 47 *primers* (Tabela 8) para microssatélites em gel de agarose a 3% (Figura 6), permitiu a seleção de oito *primers* polimórficos que serão utilizados na amplificação de amostras de DNA dos parentais TSH-1188 e CCN-51 e das plantas resistentes e suscetíveis.

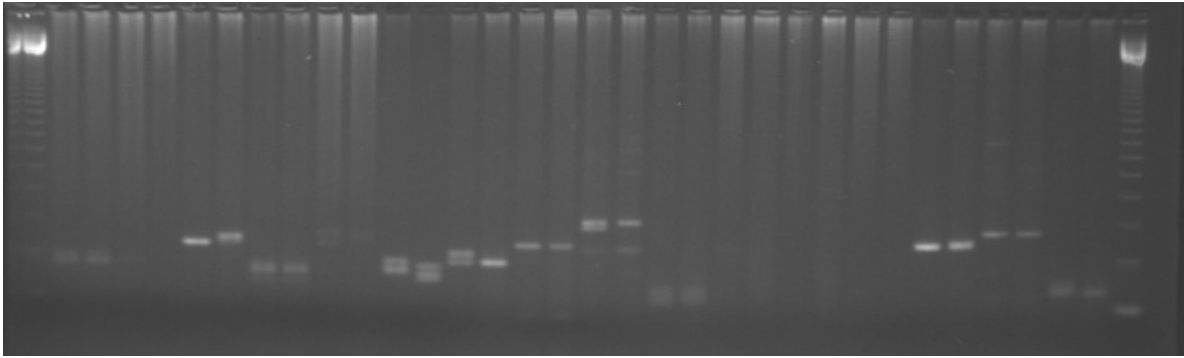


Figura 6 – Padrões de bandas polimórficas em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio, obtidas das ampliações dos genitores (TSH-1188 e CCN-51). A primeira canaleta corresponde ao padrão de tamanho de fragmento de 123 pb. A numeração corresponde aos seguintes *primers*: (1) mTcCIR43, (2) mTcCIR44, (3) mTcCIR45, (4) mTcCIR46, (5) mTcCIR47, (6) mTcCIR48, (7) mTcCIR49, (8) mTcCIR53, (9) mTcCIR54, (10) mTcCIR55, (11) mTcCIR56, (12) mTcCIR57, (13) mTcCIR58, (14) mTcCIR60, (15) mTcCIR61, (16) mTcCIR62

Nessa avaliação foi detectado os seguintes *primers* polimórficos para os parentais dessa população: mTcCIR24, mTcCIR28, mTcCIR45, mTcCIR48, mTcCIR49, mTcCIR54, mTcCIR61 e mTcCIR62. DANTAS NETO, (2004); através de gel de poliacrilamida fixado com prata selecionou os *primers* mTcCIR24, mTcCIR28, mTcCIR45, mTcCIR54 sendo polimorfismo para o parental CCN-51. Verificando que a maioria dos locos (81,25%) apresenta dois alelos em cada indivíduo, confirmando a natureza heterozigota.

Os resultados obtidos dos dados moleculares constituem-se em elementos preliminares para a realização de novas etapas do projeto de pesquisa “Mapeamento genético molecular do cacauero visando resistência à *Phytophthora* spp” buscando novas fontes de resistência do cacauero (*Theobroma cacao* L.) à podridão-parda, avaliando o número de óvulos por ovário e identificando marcadores SSR.

Tabela 8. *Primers SSR utilizados no screening dos parentais da população*

Marcador	Upper	Lower	Motif
mTcCIR1	GCA GGG CAG GCT CAG TGA AGC A	TGG GCA ACC AGA AAA CGA T	(CT)14
mTcCIR2	CAG GGA GCT GTG TTA TTG GTC A	AGT TAT TGT CGG CAA GGA GGA T	(GA)3 N5 (AG)2 GG (AG)4
mTcCIR3	CAT CCC AGT ATC TCA TCC ATT CA	CTG CTC ATT TCT TTC ATA TCA	(CT)20 (TA)21
mTcCIR4	CGA CTA AAA CCC AAA CCA TCA A	AAT TAT TAG GCA ACC CGA ACT	(TCTCTG)2 (TC)8
MTcCIR6	TTC CCT CTA AAC TAC CCT AAA T	TAA AGC AAA GCA ATC TAA CAT A	(TG)7 (GA)13
mTcCIR7	ATG CGA ATG ACA ACT GGT	GCT TTC AGT CCT TTG CTT	(GA)11
mTcCIR8	CTA GTT TCC CAT TTA CCA	TCC TCA GCA TTT TCT TTC	(TC)5 TT (TC)17 TTT (CT)4
mTcCIR9	ACC ATG CTT CCT CCT TCA	ACA TTT ATA CCC CAA CCA	(CT)8 N15 (CT)5 N9 (TC)10
mTcCIR10	ACA GAT GGC CTA CAC ACT	CAA GCA AGC CTC ATA CTC	(TG)13
mTcCIR11	TTT GGT GAT TAT TAG CAG	GAT TCG ATT TGA TGT GAG	(TC)13
mTcCIR12	TCT GAC CCC AAA CCT GTA	ATT CCA GTT AAA GCA CAT	(CATA)4 N18 (TG)6
mTcCIR13	CAG TCT AAC AAA GGT GAG	TGC CCC ACT TGA CAA CTA	(AG)13
mTcCIR15	CAG CCG CCT CTT GTT AG	TAT TTG GGA TTC TTG ATG	(TC)19
mTcCIR16	ACC TTC ACC AGC TCA CC	TAA ATT CTA CTA GCA AAT TAC C	(TC)9 N37 (TC)13
mTcCIR17	AAG GAT GAA GGA TGT AAG AGA G	CCC ATA CGA GCT GTG AGT	(GT)7 N4 (GA)12
mTcCIR18	GAT AGC TAA GGG GAT TGA GGA	GGT AAT TCA ATC ATT TGA GGA TA	(GA)12
mTcCIR19	CAC AAC CCG TGC TGA TTA	GTT GTT GAG GTT GTT AGG AG	(CT)28
mTcCIR21	GTC GTT GTT GAT GTC GGT	GGT GAG TGT GTG TGT TTG TCT	(TC)11 N5 (CA)12
mTcCIR22	ATT CTC GCA AAA ACT TAG	GAT GGA ACG AGT GTA AAT AG	(TC)12 N146 (CT)10
mTcCIR24	TTT GGG GTG ATT TCT TCT GA	TCT GTC TCG TCT TTT GGT GA	(AG)13
mTcCIR25	CTT CGT AGT GAA TGT AGG AG	TTA GGT AGG TAG GGT TAT CT	(CT)21
mTcCIR26	GCA TTC ATC AAT ACA TTC	GCA CTC AAA GTT CAT ACT AC	(TC)9 C (CT)4 TT (CT)11
mTcCIR28	GAT CAA TCA GAA GCA AAC ACA T	TAA AGC AGC CTA CCA AGA AAA G	(TC)8
mTcCIR29	CGA CAT TTC GAC TTT CAT C	TTT TGT TTC TTT CTT TTT CAT T	(CA)10
mTcCIR30	TGA AGA TCC TAC TGT TGA G	TGA TAA TAA CTG CTT AGT GG	(CA)11
mTcCIR31	GCA TGC TTC TTT ACT CCA	TTA CCT GCC AAT GAC TTA C	(GT)12
mTcCIR32	GAC TTA CTC CCA TCC TAC	TGA TTG GCA CAC TTT T	(CA)10

Continua...

Tabela 8. Cont.

Marcador	Upper	Lower	Motif
mTcCIR33	TGG GTT GAA GAT TTG GT	CAA CAA TGA AAA TAG GCA	(TG)11
mTcCIR34	GAA ATT GAT ACA AGA GAC A	ACA TAA TCT TCG CAC AT	(GT)16
mTcCIR35	TTT CCT TGT ATT GAC CTA	ATA TAA ACA CAC TTC AGA GAT	(GT)11
mTcCIR37	CTG GGT GCT GAT AGA TAA	AAT ACC CTC CAC ACA AAT	(GT)15
mTcCIR40	AAT CCG ACA GTC TTT AAT C	CCT AGG CCA GAG AAT TGA	(AC)15
mTcCIR42	TTG CTG AAG TAT CTT TTG AC	GCT CCA CCC CTA TTT G	(CA)21
mTcCIR43	TCA TGA GAA TGC ATG TG	CTG GAC ATG AAG AAG TTA T	(TG)5 (TA) (GA)15
mTcCIR44	CCC ATC AAA AGT ATT AGA AG	ATC AAG CAA TGG TCA AC	(GT)10
mTcCIR45	GTC ATT GCT GTG TG	CAT AGC ATT AAC TGT GTC TG	(GT)9
mTcCIR46	TAT GCT CTC TCT CGT ATA AT	CAA GAA TGT TTT GAT ACT GA	(CT)15 (CA)13
mTcCIR47	TTT GCT TTC ACA TAT TGA G	CTC CAA GTG TTT TCA CCA	(CA)10
mTcCIR48	CAG ACT GCC GCA CAC TTA G	TCC ATC CAC TCC TCT CAC TC	(GT)10
mTcCIR49	GTA AAG CAC ATA TAC TAA ATG TCA	TTT AAC CTT TGT AAG AAG TAT TCA	(TG)8
mTcCIR53	TTG ACT GAA ATG GTG GTA A	CAG TTG ACT GTT GAC TTG AA	(GT)26
mTcCIR54	AAC CTC TTG TCA CGT TA	GAA GGC ATA CTT ACT ACT GT	(CA)15
mTcCIR55	GAT ATT GTC CCA TTA TTT G	TTC CGC CTT GTT CTC	(CA)6 (GCACAC)5
mTcCIR56	ATA CTT TTA CTT CCT TTT G	TCT TAT TTT TCT TTA CCA G	(TC)14 N (TG)15
mTcCIR57	TGT AGA TGT GAT TTT ATA GTT TG	GGA GGG ATA AGA AGC AG	(AC)13
mTcCIR58	TTT TTG GTG ATG GAA CTA T	TGG TTA AGC AAC ACT AAA CT	(GT)40
mTcCIR60	CGC TAC TAA CAA ACA TCA AA	AGA GCA ACC ATC ACT AAT CA	(CT)7 (CA)20
mTcCIR61	GCA GTC TGA AAC AAG ATA A	TGA CTA TAA TAT AAG GCG AA	(CA)18
mTcCIR62	GTT ATG TGT ATG CTT AGG C	AAA TCA CAC AAA CAC AAA T	(GT)20

5. CONCLUSÕES

As inoculações em disco de folhas evidenciaram o caráter segregante desta progênie para resistência à doença podridão-parda, causada por *Phytophthora citrophthora* e *P. palmivora*, sendo essa primeira espécie mais agressiva, por este método. Além disso, confirmou-se que o clone Sca-6 é um material genético que apresenta padrão de resistência à podridão-parda, causada por *Phytophthora spp*, o que valida a metodologia desenvolvida por Nyassé (1995) para avaliação da resistência a essa doença.

O número de óvulos por ovário apresentou variação significativa entre os indivíduos avaliados, de modo que esta característica é adequada para mapeamento com base nesta população. Das 209 plantas analisadas, a progênie 20/28 apresentou um número de óvulos por ovário que variou de 63 a 72, com média de 67,5, superior a todas as demais, e um desvio médio de 3,35. Outras 21 plantas tiveram número de óvulos acima de 60, acima da média da população. Pode-se inferir que, de acordo com o número médio de óvulos encontrados, e a alta taxa de fertilização que ocorre em cacau, esta é uma progênie promissora quanto ao caráter produção.

A identificação de oito *primers* polimórficos entre os genitores e a demonstração do caráter segregante da população evidenciam o grande potencial desse material genético para a realização de estudos em nível molecular, justificando o seu uso para a construção de um mapa genético, com base em marcadores microssatélites, visando identificação de genes de resistência do cacauero à podridão-parda, bem como número de óvulos por ovário.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVERSON, W. S., WHITLOCK, B.A., NYFFELER, R., BAYER, C. & BAUM, D. A. Phylogeny of the core *Malvales*: Evidence from ndhF sequence data. **American Journal of Botany**, 86:1474 – 1486. 1999.

ARAÚJO, I.S. **Mapeamento genético e identificação de QTLs associados ao teor de manteiga na amêndoa do cacau (Theobroma cacao L.)**. 2002. 52 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Rio de Janeiro, 2002.

BAHIA, R. C. S. ; PIRES, J. L. ; LOPES, Uilson Vanderlei ; YAMADA, Milton Macoto ; FLORES, Acassi Batista . Viabilidade do uso de marcador molecular RAPD AV-14 para seleção assistida em *Theobroma cacao L.* para resistência à vassoura-de-bruxa.. In: **49º Congresso Brasileiro de Genética**, 2003, Águas de Lindoia. Resumo. CD

BLAHA, G.; LOTODÉ, R. (1976). Un critère primordial de sélection du cacaoyer au Cameroun: la resistance à la pourriture brune des cabosses. Variations des réactions à la maladie en liaison avec les dones écologiques et l'état physiologique des fruits. **Café Cacao Thé** 20 (2): 97-116

BOTTIN A., LARCHE L., VILLALBA F., GAULIN E., ESQUERRÉ-TUGAYÉ and RICKAUER M. (1999) Green fluorescent protein (GFP) as gene expression reporter and vital marker for studying development and microbe-plant interaction in the tobacco pathogen *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. **FEMS letters** **176**, 51-56.

CAMPELO, A.M.F.L; LUZ, E.D.M.N. (1981). Virulência de *Phytophthora spp.* em frutos destacados de cacau da cultivar comum.. In: XIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 1981, Porto Alegre. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, v. 6. p. 587-587.

CAMPO, E.C. & ANDÍA, F.C. **Cultivo y Beneficio del Cacao CCN-51**. Quito. El Conejo. 1997.

CASTRO, G.C.T.; BARTLEY, B.G.D. Caracterização de recursos genéticos do cacau. 1. Folha, fruto e semente de seleções da Bahia das séries SIC e SIAL. **Theobroma**, Itabuna, v. 13, n. 3, p. 263-273, jul./set. 1983.

CLEMENT, D.; RISTERUCCI, A.M.; MOTAMAYOR, J.C.; N'GORAN, J.; LANAUD, C. Mapping quantitative trait loci for bean traits and ovule number in *Theobroma cacao* L. **Genome** 46: 103–111, 2003.

CHOWDAPPA, P.; MOHANAN, R.C. Taxonomy os *Phytophthora* Spp. causing black pod disease of cocoa (*Theobroma cacao* L). **Journal of Plantation Crops**, v.25,n.2, p.127-145, 1997.

CILAS, C.; NDOUMBÉ, M.; NOMO, B.; N'GORAN, J. Disease incidence and field resistance. In: CILAS, C.; DESPRÉAUX, D. (Eds.). **Improvement of cocoa tree resistance to *Phytophthora* diseases**. CIRAD, p.77-102, 2004.

COSTA, J.L.S.; MENGE, J.A.; CASALE, W.L. Biological control of *Phytophthora* root rot of avocado with microorganisms grown in organic mulches. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.31, p.239-246, 2000.

CROUZILLAT, D., PHILLIPS, W.; FRITZ, P..J. & P'ETIARD, V. Quantitative trait loci analysis in *Theobroma cacao* using molecular markers. Inheritance of polygenic resistance to *Phytophthora palmivora* in two related cacao populations. **Euphytica** 114: 25–36, 2000.

DANTAS NETO, A. **Mapeamento de novos genes de resistência do cacauero à vassoura-de-bruxa e à podridão-parda: caracterização quantitativa da população segregante e identificação de marcadores microssatélites**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Santa Cruz. p-59., 2004.

DESPRÉAUX, D. *Phytophthora* diseases of *Theobroma cacao*. In: CILAS, C.; DESPRÉAUX, D. (Eds.). **Improvement of cocoa tree resistance to *Phytophthora* diseases**. CIRAD, p.15-44, 2004.

DIAS, L.A.S. **Melhoramento Genético do Cacauero**. 1 ed. Viçosa Editora Folha de Viçosa Ltda, 578 p. 2001

DIAS, L.A.S. **Novos rumos do melhoramento genético do cacauero**. In. AGUIAR, A.M.; ROSAL, C.J.S.; MENEZES, C.B.; RAPOSO, F.V.; CORTE, H.R.; FUZATTO, S.R. II simpósio sobre atualização em genética e melhoramento de plantas. Lavras, p. 9-28, 1998.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. *Focus*, Rochester, v.12, n.1, p.13-15, Jan.1990.

DUCHAMP, M.; NYASSÉ, S. GRIVET, L.; THÉVENIN, J.-M.; BLAHA, G.; DESPRÉAUX, D. CILAS, C. Genetic diversity of cocoa tree *Phytophthora* pathogens. In: CILAS, C.; DESPRÉAUX, D. (Eds.). **Improvement of cocoa tree resistance to *Phytophthora* diseases**. CIRAD, p.45-76, 2004.

EFOMBAGN, M. I. B.; MARELLI, J. P.; DUCAMP, M.; CILAS, C.; NYASSE', S.; VEFONGE, D. Effect of Fruiting Traits on the Field Resistance of Cocoa

(*Theobroma cacao* L.) Clones to *Phytophthora megakarya*. J. **Phytopathology**, n.152, p.557–562, 2004.

ENRIQUEZ, G.A; SALAZAR, L.G. (1980). Cocoa varietal resistance to *Phytophthora palmivora* and its inheritance at Turrialba, Costa Rica. Turrialba, Costa Rica, 13 p.

FALCÃO, M.A.; LLERAS, E. Aspectos fenológicos, ecológicos e de produtividade do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schum). **Acta Amazônica**, Manaus, v.13, n.5/6, p.725-735, out. 1983.

FALEIRO, Fábio Gelape ; ARAÚJO, Ioná Santos ; BAHIA, R. C. S. ; SANTOS, Reinaldo Figueiredo dos ; YAMADA, Milton Macoto ; AHNERT, Dario . Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando obtenção de marcadores RAPD . **Agrotropica**, Ilhéus, v. 14, n. 2, p. 31-34 2002.

FALEIRO, F.G.; QUEIROZ, V.T.; LOPES, U.V.; GUIMARÃES, C.T.; PIRES, J.L.; YAMADA, M.M.; ARAÚJO, I.S.; PEREIRA, M.G.; SOUZA FILHO, G.A.; BROWN, J.S.; SCHNELL, R.; FERREIRA, C.F.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Mapping QTLs for witches'broom (*Crinipellis perniciosa*) resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). **Euphytica**, 2006. No prelo.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Documento. Embrapa – Cenargen, Brasília, n.20, 220p., 1998.

FALEIRO, F.G. et al. Mapping QTLs for witches' broom (*Crinipellis perniciosa*) esistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). **Euphytica** (submetido). 2004.

FALEIRO, F.G.; LUZ, E.D.M.N.; CERQUEIRA, A.O.; ROCHA, C.S.S.; NETO, A.D.; FLORES, A.B.; BAHIA, R.C.S.; FALEIRO, A.S.G. Caracterização e diversidade de isolados de *Phytophthora spp* do cacauero com base em marcadores moleculares RAPD. **Fitop. Bras.**, n.29, v.3, p.303-306, 2004.

FALQUE, M.; VINCENT, A. VAISSIERE, B.E.; ESKES, A.B. Effect of pollination intensity on fruit and seed set in cacao (*Theobroma cacao* L.). Sex. **Plant Reprod.**, v.8, n.6, p. 354-360, 1995.

FIGUEIRA, A., JANICK, J., GOLDSBURG, P. (1992) Genome size and DNA Polymorphism in *Theobrom cacao* L. **Journal American from Society Horticultural Science**, 117:673-677.

FLAMENT, M.H.; KEBE, I.; CLÉMENT, D.; PIERETTI, I.; RISTERUCCI, A.M.; N'GORAN, J.A.K.; CILAS, C.; DESPRÉAUX, D.; LANAUD, C. Genetic mapping of resistance to *Phytophthora palmivora* in cocoa. **Genome**, Ottawa, v.44, n.1, p.79-85, Feb. 2001.

FONSECA, C.E.L. da; ESCOBAR, J.R.; BUENO, D.M. Variabilidade de alguns caracteres físicos e químicos do fruto do cupuaçuzeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.25, n.7, p.1079-1084, jul. 1990.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers, **Genetics**, New York, v.137, p.170-177. 1994.

JUDELSON H.S., TYLER B.M., and MICHELMORE R.W. (1991). Transformation of the oomycete pathogen, *Phytophthora infestans*. **Mol. Plant Microbe Interact.** **4**, 602-607.

KAMOUN S., VAN West P., DE JONG A.J., de GROOT K.E., VLEESHOUWERS V.G.A.A. and GOVERS F. (1997) A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is downregulated during infection of potato. **Mol. Plant Microbe Interact** **10**, 13-20.

KAMOUN S., VAN West P. and GOVERS F. (1998) Quantification of late blight resistance of potato using transgenic *Phytophthora infestans* expressing β -glucuronidase. **Eur. J. Plant Pathol.** **104**, 521-525.

KAMOUN S., HUITEMA E. and VLEESHOUWERS G.A.A. (1999) Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response ? **Trends in plant science** **4**, 196-200.

KAMOUN S. (2001) Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. **Curr. Opin. Plant Biol.** **4**, 295-300.

KELLAM, M.K. & ZENTMYER, G.A. 1981. Isolation of *Phytophthora citrophthora* from cocoa in Brazil. **Phytopathology**, 71, 230.

KELLAM, M.K & ZENTMYER, G.A. Natural occurrence of oospores of "*Phytophthora palmivora* MF4" (*P. capsici*) in cacao pods in Brasil. **Phytopathology**. 72: 865. 1982

KNIGHT, C. 2000. Cocoa review: supply and demand trends. American Cocoa Research Institute. <http://www.acri-cocoa.org/acri/index.cfm?item=publications>.

KONCZ C., CHUA N.M. and SCHELL J. (1992) Methods in Arabidopsis research. **World Scientific Publishing Co.** Pte Ltd.

LACHENAUD, P.; BONNOT. F.; OLIVER, G. Use of floral descriptors to study variability in wild cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) in French Guiana. **Gen.Res. and Crop Evol.**, n.46: 491-500, 1999.

- LACHENAUD, P. 1991. **Facteurs de la fructification chez le cacaoyer *Theobroma cacao* L.** Tese de doutorado, Ecole Nationale Supérieure Agronomique Paris–Grignon, France.
- LAWRENCE, J.S. & LUZ, E.D.M.N. The influence of light on in vitro zoospores production by *Phytophthora capsici*, *P. palmivora* and *P. citrophthora* isolates from cação. **Theobroma**, 13: 199-202. 1982.
- LAWRENCE, J.S. (1983). Virulência relativa das espécies de *Phytophthora* que causam podridão-parda na Bahia. In: XV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Belém, Pará. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília : Sociedade Brasileira de Fitopatologia, v. 8. p. 595-595.
- LAWRENCE, J.S. Studies on the resistance of cacao to *Phytophthora* spp. Causing *Phytophthora* pod rot disease in Bahia, Brazil. **Relatório Técnico**, CEPLAC/CEPEC, 63p., 1984.
- LANAUD, C. et al. A Genetic Linkage Map of *Theobroma cacao* L. **Theoretical Applied Genetics**, v. 91, p. 987 – 993. 1995.
- LANAUD, C.; CLÉMENT, D.; FLAMENT, M.-H.; RISTERUCCI, A.M.; KÉBÉ, I.; NYASSÉ, S.; SOUNIGO, O.; MOTILAL, L.A.; THÉVENIN, J.-M.; PAULIN, D.; DUCHAMP, M.; N'GORAN, J.; FARGEAS, D.; CILAS, C. Genetic mapping of quantitative trait loci for black pod resistance in cocoa. In: CILAS, C.; DESPRÉAUX, D. (Eds.). **Improvement of cocoa tree resistance to *Phytophthora* diseases**. CIRAD, p.147-164, 2004.
- LEE, T.D. Patterns of fruit maturation: a gametophyte competition hypothesis. **American Nature**, n.123, p.427-432, 1984.
- LÓPEZ, O.; ENRÍQUEZ, G.A.; SORIA, J. Herencia del número de óvulos por ovario en *Theobroma cacao* L. **Turrialba**, v.38, n.3, p. 163-167, 1988.
- LUZ, E.D.M.N.; YAMADA, M.M. (1984). Índice para avaliar a reação de cultivares de cacau a *Phytophthora* spp. **Theobroma** 14(3): 181-188.
- LUZ, E.D.M.N. (1989) **The roles of five species of *Phytophthora* in infection and disease of roots, stems, and pods of *Theobroma cacao* L.** Tese de Doutorado. Universidade da Flórida, Estados Unidos. 184p.
- LUZ, E.D.M.N. & MATSUOKA, K. Taxonomia e sistemática do gênero *Phytophthora*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas** 4:297-328. 1996.
- LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S. D. V. M.; YAMADA, M. M.; LOPES, U. V.; BRAGA, M. C. T.; BRUGNEROTTO, M. I. B. 1996. Selection of cação genotypes resistant to *Phytophthora capsici*, *P. palmivora* and *P. citrophthora* in Bahia, Brasil. **Fitopatologia Brasileira** 21: 71-79.

LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L.; RESENDE, M. L. V.; OLIVEIRA, M. L. 1997. Cacau – controle de doenças. In Vale, F. X. R & Zambolim, L. eds. **Controle de Doenças de Plantas** – Grandes Culturas Vol. II. Viçosa, MG, UFV. Pp. 611-649

LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M. (2001) Podridão-parda dos frutos, cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacauero. In: Edna Dora Martins Newman Luz; Álvaro Figueredo dos Santos; Kiyoshi Matsuoka; José Luiz Bezerra. (Org.). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. 1 ed. Campinas: Livraria Editora Rural, v. 1, p. 175-265.

LUZ, E.D.M.N.; RAM, A.; ROCHA, C.S.S.; FREITAS, D.B. (2003). Aumento da frequência de ocorrência de *Phytophthora citrophthora* em cacaueros no sul da Bahia. **Fitopatologia Brasileira** 28:214-215.

MEDEIROS, A.G. **Sporulation of *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. in relation to epidemiology and chemical control of black pod disease**. Tese de Doutorado. Universidade da Califórnia, Riverside, 220p., 1977.

MEDEIROS, A.G.; MELO, J.W.; SANTANA, J.B. Incidência e disseminação da “podridão-parda” em cacaueros na Bahia. **Informe técnico**, CEPEC, p. 68-69, 1969.

MANÇO, G.R. ***Phytophthora palmivora* um flower cushions, old infected pods and leaves of cacao plants**. Dissertação de Mestrado. IICA, Turrialba, 25p., 1965

MCMAHON, P.; PURWANTARA, A. *Phytophthora* on Cocoa. In: DRENTH, A.; GUEST, D. I. (Eds.). **Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asia**. ACIAR Monograph, n.114, p. 104-115, 2004.

NDOUMBE-NKENG, M.; CILAS, C.; NYEMB, E.; NYASSE, S.; BIEYSSE, D.; FLORI, A.; SACHE, I. Impact of removing diseased pods on cocoa black pod caused by *Phytophthora megakarya* and on cocoa production in Cameroon. **Crop Protection**, n.23, p.415–424, 2004.

NEPI, M.; PACINI, E. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in Cucurbita pepo. **Annals of Botany**, v.72, p.527-536, 1993.

NSEMWA, L.T.H; MAYONA, C.M. Evaluation of metalaxyl/mancozeb “ridomil gold” fungicide for the control of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary cause of late blight disease in potato. DISPONÍVEL EM: <
http://www.asareca.org/prapace/research/pubs/postharv_procs/Potfungicide_TZ.PDF>. Acesso em: 30/05/2006.

NYASSE, S. 1997. **Etude de la diversité de *Phytophthora megakarya* et caractérisation de la résistance du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) a cet agent pathogene**. PhD thesis, Institut National Polytechnique of Toulouse France.

NYASSÉ, S. et al. (1999). Early screening of resistance to *Phytophthora* spp. by leaf disc inoculation. In **Working procedures and recording sheets for the CFC/ICCO/IPGRI** Project. Pp. 92-97.

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

OKAISADOR, E.K. Phytophthora pod rot infections from soil. In: GREGORY, P.H. (Ed.). **Phytophthora disease of cocoa**. Longman Group Limited. Londres, p.161-169,1974.

PARTIOT, M. La résistance horizontale du cacaoyer au *Phytophthora* sp. Méthodes d'évaluation précoce. **Café, Cacao, Thé** 19 (2): 123-136.1975

PAIM, M. **Diversidade genética, taxonomia e patogenicidade de *Phytophthora citrophthora* e *P. palmivora* na Bahia**. Universidade Estadual de Santa Cruz. 2005.

PEREIRA, J. L. M. et al. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotropica**, v. 1(1), p. 79 – 81. 1991.

PEREIRA, M.G.; MELO, G.R.P. de; PIRES, J.L.; RIBEIRO, N.C. de A. Influência do progenitor materno sobre os caracteres físicos e químicos da semente F1 relacionados com a qualidade do cacau. **Agrotropica**, Itabuna, v.6, n.2, p.31-40, 1994.

PHILLIPS, W & GALINDO, J.J. Effect of temperature and type of inoculum on zoospore production by *Phytophthora*. 80: 516.1989

PIRES, J.L. et al.(1996). Resistance to witches'broom: evaluation of genotypes from different origins. In: XII International Cocoa Research Conference, 1999, Salvador. **Proceedings of the XII International Cocoa Research Conference**. Lagos - Nigéria: Cocoa Producers'Alliance, p. 389-398.

PIRES, J.L. **Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento do cacauero com ênfase na produtividade, qualidade de frutos e resistência a doenças**. (Tese de Doutorado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 2003.

QUEIRÓZ, V.T.; GUIMARÃES, C.T.; AHNERT, D.; SCHUSTER, I.; DAHER, R.T.; PEREIRA, M.G.; MIRANDA, V.R.M.; LOGUÉRCIO, L.L.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. **Plant Breeding**, v.122, p.268-272, 2003.

ROCHA, H.M. **La importancia de las sustancias polifenolicas en el mecanismo fisiologico de la resistencia de cação (*Theobroma cacao* L.) a**

***Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl.** Dissertação de mestrado. IICA, Turrialba, 45p., 1966.

RODRIGUEZ, R. et al. (1985). Herencia de la reacción del cacao a la pudrición de la mazorca causada por *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. In: **Workshop, Grupo Internacional de *Phytophthora***, Ilhéus, Bahia, Brasil, 35 p.

SANSOME, E.; BRASIER, C.M & GRIFFIN, M.J. Chromosome size differences in *Phytophthora palmivora*, a pathogen of cocoa. **Nature** (London) 255:704-705. 1979

SAMBROOK, J; FRITSCH, , EF & MANIATIS, T. 1989. **Molecular cloning: laboratory manual**, 2nd edition CSHL, Cold Spring Harbor, NY. Sereno, ML. 2001. Estimación de la diversidad genética de poblaciones.

SAOUL-MAORA, J.; NAMALIU, Y.; CILAS, C.; BLAHA, G. Durability of Field Resistance to Black Pod Disease of Cacao in Papua New Guinea. **Plant Disease**, v.87, n.12, p.1123-1125, 2003.

SHAW D.S. (1983) The *Peronosporales*. A fungal geneticist's nightmare. In *Zoosporic plant pathogens, a modern perspective* (S.T. Buczacki ed.) pp 85-121. Academic Press, London.

SI-AMMOUR, A. Molecular analysis of the Arabidopsis-*Phytophthora* pathosystem. Tese de Doutorado. Disponível em:<http://ethesis.unifr.ch/theses/downloads.php?file=SiAmmourA.pdf>. Acesso em: 10/06/2006.

SILVA, R.M. da. **Estudo do sistema reprodutivo e divergência genética do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Willd ex Spreng Schum)**. 1996. 173 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SORIA, V.J.; OCAMPO, O.F.; PAEZ, G. **Parental influence of some cacao clones on the yield performance of their progenies**. Turrialba, San Jose, v.24, n.1, p.58-65, ene./mar. 1974.

SOUZA, D.A.S.; LENZI, M.; ORTH, A.I. Contribuição à ecologia da polinização de *Tabebuia pulcherrima* (Bignoniaceae) em área de restinga, no sul de Santa Catarina. **Biotemas**, n.17, v.2, p.47-66, 2004.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM – SAS. (1989). SAS/STAT user's guide. Version 6.4 ed., **Cary: SAS institute Inc.**, v.2, 846 p.

STEPHENSON, A.G.; WINSOR, J.A. Pollen competition and offspring variance. **Evolutionary Trends in Plants**, v.1, n.1, p.35-39, 1987.

TANKSLEY, S.D. Mapping poligenes. Annual Review of Genetics. London, v.27, p.205-233, 1993. YOUNG, N.D. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. **Annual Review Phytopathology**, Gainsville, v.34, p.479-501. 1996.

THÉVENIN, J.-M.; DUCHAMP, M.; ESKES, A.; KÉBÉ, I.; TAHI, M.; NYASSÉ, S. Planting material screening by controlled inoculation. In: CILAS, C.; DESPRÉAUX, D. (Eds.). **Improvement of cocoa tree resistance to *Phytophthora* diseases**. CIRAD, p.77-102, 2004.

TORREND, C. Les maladies du cacaoyer de L'Etat de Bahia. **Brotéria Série Botânica** (Portugal), 15: 107-127. 1917.

TURNER, P.D. **Strains of *Phytophthora palmivora* Butl. (Butl.) from *Theobroma cacao*: II Isolates from non-African countries**. Transactions of the British Mycological Society, 44, 409–416. 1961

VAN WEST P., DE JONG A.J., JUDELSON H.S., EMONS A.M.C. and GOVERS F. (1998) The *ipiO* gene of *Phytophthora infestans* is highly expressed in invading hyphae during infection. **Fungal Genet. Biol.** 23, 126-138.

VAN West P., KAMOUN S., VAN'T KLOOSTER J.W. and GOVERS F. (1999) Internuclear gene silencing in *Phytophthora infestans*. **Molecular Cell** 3, 339-348.

VAN WEST P., REID B., CAMPBELL T.A., SANDROCK R.W., FRY W.E., KAMOUN S. and GOW N.A.R. (1999a) Green fluorescent protein (GFP) as a reporter gene for the plant pathogenic oomycete *Phytophthora palmivora*. **FEMS letters** 178, 71-80.

VELLO, F.; GARCIA, J. R. Características das principais variedades de cacau cultivadas na Bahia. **Revista Theobroma**, Ilhéus, v. 1(2), p. 3 – 10. 1971.

VENTURIERI, G.A. **Variabilidade em plantas jovens de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann) estimada por descritores morfológicos e isoenzimáticos e sua utilização em caracterização de germoplasma**. 1990. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

WARD, M.R. & GRIFFIN, M.J. 1981. **Soil phase of Cocoa *Phytophthora***. In: Gregory, P.H. and Maddison, A.C., ed., Epidemiology of *Phytophthora* on cocoa in Nigeria. Kew, England, Commonwealth Mycological Institute.

WATERHOUSE, G. M. The genus *Phytophthora* de Bary. Diagnoses (or descriptions) and figures from the original papers. 2 ec. Kew, Commonwealth Mycological Institute. 59p. **Mycological Papers** 122. 1970

ZADOKS, J.C. Phytopathological aspects of disease resistance and resistance breeding in cocoa: an external overview. In: **International Workshop on the contrigution of disease resistance to cocoa varieties improvement**. Salvador, BA, Brazil, p.6-7, 1996.

ZENTMYER, G. A. Biological control of *Phytophthora* root rot of avocado with alfalfa meal. **Phytopathology**. n.53, p.1383-1387, 1963.

ZEHNTNER, L. **Le cacaoyer dans L'Etat de Bahia**. Berlim, Verlag. 118p. 1914.