

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR**



**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS AO ALAGAMENTO DO  
SUBSTRATO E DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR DE  
CLONES DE *Theobroma cacao* L.**

**Fabiana Zanelato Bertolde**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Março de 2007**

FABIANA ZANELATO BERTOLDE

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS AO ALAGAMENTO DO  
SUBSTRATO E DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR DE  
CLONES DE *Theobroma cacao* L.

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Santa Cruz,  
como parte das exigências para obtenção  
do título de Mestre em Genética e  
Biologia Molecular.

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Março de 2007**

FABIANA ZANELATO BERTOLDE

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS AO ALAGAMENTO DO  
SUBSTRATO E DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR DE  
CLONES DE *Theobroma cacao* L.

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Santa Cruz,  
como parte das exigências para obtenção  
do título de Mestre em Genética e  
Biologia Molecular.

APROVADA: 26 de março de 2007

Prof. Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida  
UESC – Orientador

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa  
UESC – Co-orientador

Prof. Dr. Fábio Pinto Gomes  
UESC

Dr. Milton Macoto Yamada  
CEPEC/CEPLAC

## **Dedicatória**

Ao meu esposo Lucimar, e a minha filha Anna Beatriz, por toda compreensão, incentivo, amor e carinho, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por toda luz e proteção para cumprir mais esta etapa em minha vida.

À Universidade Estadual de Santa Cruz, pela oportunidade da realização do curso.

Ao meu orientador, Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida, por todos os ensinamentos, amizade e incentivo.

Aos meus co-orientadores Dr. Ronan Xavier Corrêa e Dr<sup>a</sup>. Fernanda Amato Gaiotto, pelo valioso apoio em todas as etapas deste trabalho.

Aos colegas e amigos de turma Vânia, Heliana, Cristiano, Carlos Eduardo, Marcelo, Nadia, Brenna, Lívia, pelo auxílio e companheirismo.

Aos meus amigos Bruna, Alberto, Adeilson, Marayana, pelo incentivo e força.

À Jeiza e à bolsista de iniciação científica Fernanda Sousa, pela ajuda na execução das atividades laboratoriais.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Curso de Mestrado, pelos ensinamentos.

À coordenação e aos funcionários do colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pelo grande apoio.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

À FAPESB, pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro ao projeto PADCT.

## EXTRATO

BERTOLDE, Fabiana Zanelato, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, março de 2007. **Respostas fisiológicas ao alagamento do substrato e diversidade genética molecular de clones de *Theobroma cacao* L.** Orientador: Alex-Alan Furtado de Almeida. Co-orientador: Ronan Xavier Corrêa. Colaborador: Fernanda Amato Gaiotto.

A doença vassoura-de-bruxa, constatada em 1989 na região cacauceira da Bahia, causou grande crise na lavoura, aumentando a miséria e as diferenças sócio-econômicas. Para o resgate da cacauicultura adotou-se a estratégia de clonagem de variedades tolerantes às doenças, recomendadas pela CEPLAC e multiplicadas pela técnica de estaquia no Instituto Biofábrica de Cacau (IBC). A fase inicial de enraizamento das estacas de caule depende, além de outros fatores, de alta umidade relativa do ar, mantida pela lâmina de água aplicada por microaspersão. Esse processo promove o alagamento do substrato que, associado à precipitação pluviométrica, induz à deficiência de O<sub>2</sub> no seu interior e provoca um alto índice de mortalidade, inviabilizando a multiplicação vegetativa de alguns clones no IBC. O alagamento do substrato afeta diferentes processos genéticos e morfo-fisiológicos das plantas, altera o crescimento e o desenvolvimento e gera uma condição de estresse. Objetivou-se, com o presente trabalho, estudar as variáveis fisiológicas de tolerância à deficiência de O<sub>2</sub> no substrato e suas interrelações com a diversidade genética de diversos clones de *T. cacao*, de alta produtividade, tolerantes à vassoura-de-bruxa e outras enfermidades. Os índices de sobrevivência de 14 clones foram acompanhados

durante três anos no IBC e associados à lâmina de água aplicada e à precipitação pluviométrica no período. Conduziu-se um experimento em casa de vegetação, com duração de 45 dias, contendo 35 clones submetidos a dois regimes hídricos (alagado e controle), com 50 mudas clonais por tratamento. Efetuaram-se, aos 45 dias de alagamento, medições de trocas gasosas e de emissão de fluorescência da clorofila, em folhas totalmente expandidas e maduras. Estimaram-se a área foliar (AF) e a biomassa seca de raiz (BR), caule (BC), folha (BF) e total (BT) das mudas clonais. Para a análise molecular foram extraídas amostras de DNA de folhas de 46 clones de *T. cacao* pelo método CTAB, com algumas modificações, e amplificadas utilizando 18 *primers* microssatélites (SSR). Observaram-se diferenças interclonais significativas ( $P < 0,01$ ) em relação ao alagamento, quando comparado ao controle, principalmente para a fotossíntese líquida ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ), rendimento quântico potencial máximo ( $F_v/F_m$ ), BR e razão entre a biomassa seca de raiz e da parte aérea (R/PA). Dentre os clones avaliados, o CCN-10, o CCN-51, o PH-17 e o TSA-792 demonstraram alta tolerância ao alagamento do substrato, ao passo que os clones CEPEC-2010, CEPEC-42, HW-25, PH-15, TSA-656, TSH-774 e VB-903 foram os menos tolerantes. A diversidade genética foi inferida com base nos coeficientes de similaridade genética, calculados a partir dos 291 alelos amplificados com os *primers* SSR. Verificou-se, por meio da análise de agrupamento a formação de três grupos, sendo que um dos grupos apresentou apenas dois dos acessos (TSA-654 e TSA-656) e os outros dois 50 e 45 % dos acessos. Em geral, os clones apresentaram alta heterozigose quando comparados a clones sabidamente pouco heterozigotos. Não foram observadas relações significativas entre as variáveis fisiológicas em resposta ao alagamento do substrato e os dados moleculares nos clones de *T. cacao* estudados.

**Palavras-chave:** cacau, crescimento, estresse abiótico, fotossíntese, marcadores microssatélites, variabilidade genética.

## ABSTRACT

BERTOLDE, Fabiana Zanelato, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, March of 2007. **Physiological responses to substrat flooding and molecular genetic diversity of *Theobroma cacao* L. clones.** Advisor: Alex-Alan Furtado de Almeida. Advisory Committee Members: Ronan Xavier Corrêa and Fernanda Amato Gaiotto.

The witch's broom disease, introduced in 1989 in the cocoa-growing region of the Bahia, caused a great crisis in the cocoa farming, increasing the misery and the social and economic differences. For the recovery of the cocoa farming it was adopted the strategy of cloning resistant varieties to the disease, which were recommended by CEPLAC and multiplied by the technique of cutting rooting in the Instituto Biofábrica de Cacau (IBC). The initial rooting phase of the stem-cutting depends, beyond other factors, on high relative humidity of the air, kept by the water blade applied by microaspersion. This process promotes the substrate flooding, which associated to the rainfall induces to the deficiency of O<sub>2</sub> in its interior and causes a high level of plant mortality, making impracticable the vegetative multiplication of some clones in the IBC. The substrate flooding affects different genetic and morfo-physiological processes of the plants, which modifies their growth and development, thereby generating a stress condition. The objectives of the present work was to study physiological variables related to the tolerance to O<sub>2</sub>-deficiency in the substrate, as well as their inter-relationship with the genetic diversity of several *T. cacao* clones of high productivity and tolerance to the witch's broom and other diseases. The survival indexes of 14 clones had been followed during three years in the IBC and the results indicated a direct

association to the amount of applied water and the rainfall in the period. Greenhouse experiment was conducted during 45 days, with 35 clones submitted to two water regimes (flooded and non-flooded), with 50 clonal seedlings per treatment. After the 45 days of flooding, measurements of gas exchange and chlorophyll fluorescence emission in mature and fully expanded leaves were performed. Also, the leaf area and the root, stem, leaf and total dry biomasses of the clonal seedlings were estimated. For the molecular analysis, samples of DNA were extracted from leaves of 46 *T. cacao* clones by the CTAB method, with some modifications, and PCR-amplified using 18 specific microsatellites (SSR) primers. When compared with controls, statistically significant differences ( $P < 0,01$ ) among clones in relation to flooding were observed, mainly for the net photosynthetic rate ( $A$ ), stomatal conductance ( $g_s$ ), transpiration ( $E$ ), maximum potential quantum efficiency ( $F_v/F_m$ ), root biomass and root:shoot ratio ( $R/PA$ ). Among the clones evaluated, CCN-10, CCN-51, PH-17 and TSA-792 demonstrated high tolerance to the substrate flooding, whereas the clones CEPEC-2010, CEPEC-42, HW-25, PH-15, TSA-656, TSH-774 and VB-903 were the least tolerant. The genetic diversity was inferred on the basis of the genetic similarity coefficients, calculated from the 291 alleles amplified by the SSR primers. The formation of three major groups was verified by means of cluster analysis, with one of the groups represented by only two of the accesses (TSA-654 and TSA-656), and the other two by 50 and 45 % of the accesses, respectively. In general, the clones assessed in this work presented a high heterozygosity levels when compared to others known to be less heterozygous. In the *T. cacao* clones studied, no clear relationship was observed between the clusters obtained based on the physiological variables and those based on the molecular data.

**Key words:** cacao, growth, abiotic stress, photosynthesis, microsatellites markers, genetic variability.

## ÍNDICE

<b>EXTRATO.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
2.1. Estresse por alagamento.....	5
2.1.1. Efeitos do alagamento no solo.....	5
2.1.2. Respostas das plantas ao alagamento do solo.....	6
2.2. Estudos de diversidade genética de <i>Theobroma cacao</i> L. com marcadores moleculares.....	11
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1. Multiplicação de mudas clonais de <i>T. cacao</i> nos viveiros do IBC.....	15
3.1.1. Material vegetal e condições de cultivo.....	15
3.1.2. Avaliação do índice de sobrevivência.....	16
3.2. Variáveis fisiológicas de clones de <i>T. cacao</i> ao alagamento do substrato.....	16
3.2.1. Material vegetal e condições de cultivo.....	16
3.2.2. Avaliação das trocas gasosas e da emissão de fluorescência da clorofila em nível foliar.....	17
3.2.3. Obtenção da biomassa seca e da área foliar.....	18
3.2.4. Análise de agrupamento por similaridade entre as variáveis fisiológicas.....	18
3.3. Análise estatística.....	19

3.4. Material genético .....	19
3.5. Obtenção de dados moleculares.....	20
3.5.1. Extração de DNA.....	20
3.5.2. Amplificação de DNA utilizando <i>primers</i> microssatélites.....	22
3.6. Análises genético-estatísticas de dados moleculares.....	23
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
4.1. Multiplicação e índice de sobrevivência de mudas clonais de <i>T. cacao</i> no viveiro do IBC.....	24
4.2. Respostas fisiológicas de clones de <i>T. cacao</i> ao alagamento do substrato.....	28
4.2.1. Índice de sobrevivência e respostas morfológicas.....	28
4.2.2. Trocas gasosas em nível foliar.....	30
4.2.3. Emissão de fluorescência da clorofila em nível foliar.....	40
4.3. Variáveis de crescimento.....	45
4.4. Análise de agrupamento por similaridade entre as variáveis fisiológicas.....	59
4.5. Análise de diversidade genética.....	63
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>71</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Índice de sobrevivência (IS) de mudas dos clones CA-1.4, CCN-10, CCN-51, CEPEC-2002, CEPEC-2004, CEPEC-2005, CEPEC-2006, CEPEC-2007, CEPEC-2008, CP-06, PH-16, PS-13.19, TSA-792 e TSH-1188, obtidas a partir de estacas de caule e enraizadas no IBC nos anos de 2003, 2004 e 2005. Cada mês representa a valor médio de 420.000 mudas clonais de *T. cacao*..... 25
- Figura 2. Precipitação pluviométrica média, temperatura e umidade relativa médias do ar nos anos de 2003, 2004 e 2005 no IBC, localizado no Distrito Banco do Pedro, Município de Ilhéus, BA..... 26
- Figura 3. Índice de sobrevivência (IS) de mudas do clone CEPEC-2007, obtidas a partir de estacas de caule e enraizadas no IBC nos anos de 2003, 2004 e 2005; e precipitação pluviométrica média para o mesmo período no IBC, localizado no Distrito Banco do Pedro, Município de Ilhéus, BA. Cada ponto representa a valor médio de 30.000 mudas clonais de *T. cacao*. ..... 27
- Figura 4. Índice de sobrevivência (IS) de mudas do clone CEPEC-2008, obtidas a partir de estacas de caule e enraizadas no IBC nos anos de 2003, 2004 e 2005; e precipitação pluviométrica média para o mesmo período no IBC, localizado no Distrito Banco do Pedro, Município de Ilhéus, BA. Cada ponto representa a valor médio de 30.000 mudas clonais de *T. cacao*..... 27

Figura 5. Taxa fotossintética líquida por unidade de área foliar ( $A$ ) de 35 clones de <i>T. cacao</i> submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias, em irradiância fotossinteticamente ativa de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (*P < 0,10; **P < 0,05; ***P < 0,01).....	32
Figura 6. Condutância estomática ao vapor de água ( $g_s$ ) de 35 clones de <i>T. cacao</i> submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias, em irradiância fotossinteticamente ativa de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (*P < 0,10; **P < 0,05; ***P < 0,01).....	33
Figura 7. Taxa transpiratória foliar ( $E$ ) de 35 clones de <i>T. cacao</i> submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias, em irradiância fotossinteticamente ativa de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (*P < 0,10; **P < 0,05; ***P < 0,01).....	34
Figura 8. Razão entre as concentrações interna ( $C_i$ ) e atmosférica ( $C_a$ ) de $\text{CO}_2$ ( $C_i/C_a$ ) em folhas de 35 clones de <i>T. cacao</i> submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias, em irradiância fotossinteticamente ativa de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (*P < 0,10; **P < 0,05; ***P < 0,01).....	36
Figura 9. Eficiência instantânea do uso da água ( $WUE$ ) em folhas de 35 clones de <i>T. cacao</i> submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias, em irradiância fotossinteticamente ativa de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (*P < 0,10; **P < 0,05; ***P < 0,01).....	38
Figura 10. Eficiência intrínseca do uso da água ( $A/g_s$ ) em folhas de 35 clones de <i>T. cacao</i> submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias, em irradiância fotossinteticamente ativa de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A significância	

estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (*P < 0,10; **P < 0,05; ***P < 0,01).....	39
Figura 11. Fluorescência inicial ( $F_o$ ) em folhas de 35 clones de <i>T. cacao</i> submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (*P < 0,10; **P < 0,05; ***P < 0,01).....	42
Figura 12. Fluorescência máxima ( $F_m$ ) em folhas de 35 clones de <i>T. cacao</i> submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (*P < 0,10; **P < 0,05; ***P < 0,01).....	43
Figura 13. Rendimento quântico potencial máximo do PS-2 ( $F_v/F_m$ ) em folhas de 35 clones de <i>T. cacao</i> submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (*P < 0,10; **P < 0,05; ***P < 0,01).....	44
Figura 14. Biomassa seca foliar (BF) de 35 clones de <i>T. cacao</i> submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (*P < 0,10; **P < 0,05; ***P < 0,01). .....	47
Figura 15. Biomassa seca caulinar (BC) de 35 clones de <i>T. cacao</i> submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (*P < 0,10; **P < 0,05; ***P < 0,01). .....	48
Figura 16. Biomassa seca radicular (BR) de 35 clones de <i>T. cacao</i> submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (*P < 0,10; **P < 0,05; ***P < 0,01).....	49

Figura 17. Biomassa seca total (BT) de 35 clones de <i>T. cacao</i> submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (*P < 0,10; **P < 0,05; ***P < 0,01).....	50
Figura 18. Razão entre biomassa seca radicular e biomassa seca da parte aérea (R/PA) de 35 clones de <i>T. cacao</i> submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (*P < 0,10; **P < 0,05; ***P < 0,01).....	52
Figura 19. Número médio de folhas (NF) por muda de 35 clones de <i>T. cacao</i> submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (*P < 0,10; **P < 0,05; ***P < 0,01). .....	54
Figura 20. Área foliar média por muda (AF) de 35 clones de <i>T. cacao</i> submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (*P < 0,10; **P < 0,05; ***P < 0,01). .....	56
Figura 21. Área foliar média individual (AFI) de 35 clones de <i>T. cacao</i> submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (*P < 0,10; **P < 0,05; ***P < 0,01). .....	57
Figura 22. Massa foliar específica (MFE) de 35 clones de <i>T. cacao</i> submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (*P < 0,10; **P < 0,05; ***P < 0,01).....	58
Figura 23. Análise de agrupamento de 35 clones de <i>T. cacao</i> submetidos ao alagamento do substrato durante 45 dias, baseada na distância Euclidiana, a partir da razão entre os tratamentos alagado e controle para as variáveis	

fisiológicas avaliadas (*A*, *gs*, *E*, *Ci/Ca*, *WUE*, *A/gs*, *F<sub>o</sub>*, *F<sub>m</sub>*, *F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>*, *BF*, *BC*, *BR*, *BT*, *R/PA*, *NF*, *AF*, *AFI*, *MFE*), utilizando o método UPGMA..... 62

Figura 24. Análise de agrupamento de 46 clones de *T. cacao* baseado no coeficiente de similaridade de Dice (1945), a partir de marcadores microssatélites, utilizando o método UPGMA..... 66

Figura 25. Heterozigose observada para os 46 clones de *T. cacao*, calculada com base em 18 locos microssatélites. (+: alta heterozigose; -: baixa heterozigose; outros: média heterozigose)..... 69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Respostas morfológicas e índice de sobrevivência de 35 clones de *T. cacao* aos 45 de alagamento do substrato. Intensidades baixa (+), média (++) , alta (+++) e ausência (0) de clorose, formação de lenticelas e de emissão de raízes adventícias ..... 29

Tabela 2. Valores percentuais médios de fotossíntese líquida por unidade de área foliar ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), condutância estomática ao vapor de água ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), transpiração foliar ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), eficiência intrínseca do uso da água ( $A/g_s$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ ), eficiência instantânea do uso de água ( $WUE$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O}$ ), razão entre as concentrações interna ( $C_i$ ) e atmosférica ( $C_a$ ) de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ), fluorescência inicial ( $F_0$ , unidade relativa), fluorescência máxima ( $F_m$ , unidade relativa) e rendimento quântico potencial máximo ( $F_v/F_m$ ) das mudas alagadas em relação ao controle, de 23 clones de *T. cacao*..... 60

Tabela 3. Valores percentuais médios de biomassa seca de folha (BF, g), caule (BC, g), raiz (BR, g) e total (BT, g), razão entre a biomassa seca de raiz e da parte aérea (R/PA), número de folhas (NF), área foliar (AF,  $\text{m}^2 \text{ muda}^{-1}$ ), área foliar individual (AFI,  $\text{m}^2$ ) e massa foliar específica (MFE,  $\text{g m}^{-2}$ ) das mudas alagadas em relação ao controle, de 23 clones de *T. cacao*..... 61

Tabela 4. Padrão por *primer* microssatélite, número de alelos e classificação do tamanho dos alelos em pares de bases amplificados em amostras de DNA

dos 46 clones de *T. cacao*..... 64

Tabela 5. Valores mínimos e máximos de heterozigose observada em *T. cacao*, com base em marcadores microssatélites, por autores que incluíram pelo menos um dos clones analisados neste trabalho..... 67

## 1. INTRODUÇÃO

*Theobroma cacao* L. é uma espécie alógama e perene de grande importância sócio-econômica e ecológica nas regiões produtoras do Brasil. O país é o quarto produtor mundial de cacau e tem o quinto maior parque industrial chocolateiro do mundo. A cadeia produtiva do cacau no Brasil envolve investimentos da ordem de 2,3 bilhões de reais e é responsável por aproximadamente três milhões de empregos e, destes, 300 mil diretos. O sul da Bahia é a principal região produtora de cacau do Brasil, onde praticamente 100 municípios são economicamente baseados no cacau, o qual é cultivado em aproximadamente 29 mil propriedades, em área superior a 700 mil hectares (SOUZA; DIAS, 2001).

A doença vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, reclassificado atualmente como *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Philips-Mora, foi introduzida em 1989 (PEREIRA et al., 1989) na região cacauzeira da Bahia. Essa doença causou 100% de perdas em algumas fazendas, gerando um dramático impacto sócio-econômico e ecológico na região e no Brasil em geral nos últimos anos. Os baixos preços do cacau, praticado no mercado internacional, associado com essa doença, levaram pequenos produtores e trabalhadores rurais a abandonarem as propriedades e migrarem para favelas das cidades da região e das capitais do país, aumentando a miséria e as diferenças sócio-econômicas.

A partir da década de 90, a clonagem tornou-se estratégica para o resgate da cacauicultura nacional (SOUZA; DIAS, 2001). Novos clones tolerantes ao *M.*

*perniciosa* foram recomendados aos produtores da região sul da Bahia, pelo Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), unidade de geração de tecnologia da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), tanto para implantação de novos plantios mais produtivos e uniformes, como para substituição de copas de plantas suscetíveis das atuais plantações. Esses clones tolerantes são multiplicados em jardins clonais instalados no CEPEC e em outras regiões do sul da Bahia. Dessas plantas matrizes são retiradas extremidades de ramos plagiotrópicos para a produção de mudas clonais no Instituto Biofábrica de Cacau (IBC), instituição do governo do Estado da Bahia.

Os clones de *T. cacao* são multiplicados pela técnica de estaquia no IBC, cujo sistema de produção de mudas foi adaptado do sistema de multiplicação de eucalipto em grande escala, utilizado pelas empresas de reflorestamento e celulose. Nessa técnica a formação de raízes adventícias nas estacas depende da manutenção da umidade relativa do ar em torno de 100% na fase inicial do enraizamento, controlada pela lâmina de água aplicada durante o processo de nebulização por microaspersão. O grande volume de água, necessário para manter essa umidade relativa do ar, associado com a alta precipitação pluviométrica na região, em certas épocas do ano, provocam a saturação do substrato com água. Esse sistema propicia uma condição de hipoxia ou anoxia no interior do substrato, e, conseqüentemente promove a morte das mudas clonais, atingindo, em muitos casos, cerca de 70%, inviabilizando a multiplicação de alguns clones no IBC.

As condições de hipoxia ou anoxia promovida pelo alagamento provoca mudanças físico-químicas no substrato, resultantes da depleção de oxigênio (O<sub>2</sub>), incluindo o acúmulo de compostos potencialmente fitotóxicos oriundos do metabolismo anaeróbico de microorganismos e das plantas (PEZESHKI, 2001; PROBERT; KEATING, 2000; GRICHKO; GLICK, 2001). Porém, um dos principais efeitos do alagamento é a privação de O<sub>2</sub> na zona radicular (anoxia), pois o O<sub>2</sub> é necessário na respiração aeróbia, para produção de energia para a planta, e em outras rotas biossintéticas cruciais, a exemplo da síntese de clorofila (DENNIS et al., 2000). As plantas, por sua vez, apresentam diferentes processos genéticos e morfo-fisiológicos afetados em resposta ao alagamento do substrato. Algumas das principais respostas das plantas a este tipo de estresse são: (i) fechamento

de estômatos, seguido de diminuição na fotossíntese; (ii) desenvolvimento de aerênquimas e lenticelas hipertrofiadas; (iii) alterações na produção de biomassa; (iv) alterações na expressão gênica em plantas, com síntese de proteínas anaeróbicas (ANPs) (SACHS et al., 1980; KOZLOWSKI, 1997).

Interações de várias adaptações morfo-fisiológicas, direcionadas por uma expressão gênica diferenciada, conferem tolerância ao alagamento em certas plantas lenhosas (KOZLOWSKI, 1997, 2002). Em *T. cacao*, a diferença interclonal, quanto à característica tolerância a deficiência de O<sub>2</sub> no substrato, pode ser observada durante a multiplicação de mudas no IBC, que apresentam diferentes índices de sobrevivência. Desta forma, torna-se necessário a análise de diversidade genética interclonal do *T. cacao*, empregando diferentes marcadores moleculares como estratégia mais utilizada para esse fim. Os marcadores têm facilitado tais estudos, pois permitem, em um curto espaço de tempo, analisar um número praticamente ilimitado de marcas polimórficas em nível de DNA, sem influência do ambiente (LANAUD, 1987; LAURENT et al., 1993, 1994; LERCETEAU et al., 1997; N'GORAN et al., 1994; MARITA, 1988; PIRES et al., 2000; RISTERUCCI et al., 2000; FALEIRO et al., 2001).

Os resultados do presente trabalho possibilitaram o agrupamento de clones mais e menos tolerantes à deficiência de O<sub>2</sub> no substrato, baseado na diversidade genética e nas variáveis fisiológicas e de crescimento, permitindo a otimização do sistema de irrigação com a aplicação de lâminas de água diferenciadas, durante o processo de enraizamento das estacas de caules dos clones de *T. cacao* tolerantes à vassoura-de-bruxa e a outras enfermidades. Isso implicará em (i) diminuição da quantidade de nutrientes minerais aplicados por fertirrigação, minimizando os impactos ambientais ora observados, decorrentes da lixiviação de nutrientes; (ii) redução dos custos de produção pelo aumento da eficiência, diminuição do consumo de água e de energia elétrica, eliminação das tarefas de replantio da mudas em viveiros e, conseqüentemente, redução do preço final das mudas adquiridas pelos cacauicultores.

O presente trabalho teve como objetivo principal estudar as respostas fisiológicas de diversos clones de *T. cacao*, de alta produtividade e tolerantes à vassoura-de-bruxa, ao alagamento do substrato e suas interrelações com a diversidade genética, visando selecionar e agrupar os clones de acordo com a

tolerância à deficiência de  $O_2$  no substrato; subsidiar a aplicação de lâminas diferenciadas de água por microaspersão, durante o processo de enraizamento de estacas de caule; e otimizar a produção de mudas clonais no IBC.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Estresse por alagamento**

#### **2.1.1. Efeitos do alagamento no solo**

O alagamento temporário ou contínuo do solo resulta de elevados índices pluviométricos, de prática intensiva e em larga escala de irrigação nas fazendas ou de solos com drenagem inadequada (KOZLOWSKI, 1997). Em condições normais de drenagem, o solo contém poros preenchidos com ar que apresenta conteúdo de oxigênio similar ao da atmosfera (cerca de 20%) (PEZESHKI, 1994). A água em excesso substitui o ar presente nesses poros, restringindo extremamente o fluxo de oxigênio no interior do solo, gerando uma condição de hipoxia (baixa disponibilidade de  $O_2$ ) ou, em situações mais severas, a anoxia (ausência de  $O_2$ ) (PENG et al., 2005). A difusão de gás torna-se extremamente lenta em solos saturados com água, cerca de 10.000 vezes mais lenta que no ar (ARMSTRONG, 1979).

Em condições naturais, o alagamento altera inúmeras propriedades físico-químicas do solo por meio de processos de redução biológica, resultantes da depleção de oxigênio ( $O_2$ ) disponível, do aumento da disponibilidade de P, Mn e Fe, e diminuição de disponibilidade de Zn e Cu e da formação de ácido sulfídrico e de ácidos orgânicos (CAMARGO et al., 1999). Esse solo também se caracteriza

por acumular uma maior quantidade de CO<sub>2</sub> (JACKSON, 2004) e estimular a decomposição da matéria orgânica (KOZLOWSKI, 1997; PEZESHKI, 2001; PROBERT; KEATING, 2000). Os compostos fitotóxicos que se acumulam em solos alagados podem ser produzidos tanto pelas raízes das plantas (etanol e acetaldeído), como pelo metabolismo de microrganismos anaeróbicos (metano, etano, ácidos insaturados, aldeídos, cetonas), sendo que o etileno pode ser produzido pelas plantas e pelos microrganismos (KOZLOWSKI, 1997).

### **2.1.2. Respostas das plantas ao alagamento do solo**

Sabe-se que água, temperatura, luz, disponibilidades de O<sub>2</sub> e nutrientes são os principais fatores abióticos que controlam o crescimento das plantas lenhosas (KOZLOWSKI et al., 1991). O excesso ou a falta de algum desses fatores, como a água, ocasiona desvios significativos nas condições ótimas de crescimento para uma dada espécie, gerando uma condição de estresse. Tal condição, dependendo do nível de especialização do organismo, da amplitude e da duração do estresse, pode ser reversível ou tornar-se permanente (LICHTENTHALER, 1996). O excesso de água na zona radicular de plantas terrestres pode ser prejudicial ou mesmo letal, pois bloqueia a transferência de O<sub>2</sub> e outros gases entre o solo e a atmosfera (DREW, 1997). As respostas das plantas ao alagamento do solo variam de acordo com vários fatores, dentre os quais podem incluir a espécie, o genótipo e a idade da planta, as propriedades da água e o tempo de duração do alagamento (KOZLOWSKI, 1997).

Um dos principais efeitos do alagamento é a privação de O<sub>2</sub> na zona radicular, atribuída à lenta difusão de gás em solos saturados com água e do consumo de O<sub>2</sub> por microrganismos (FOLZER et al., 2005). O O<sub>2</sub> participa da respiração aeróbica comoceptor final de elétrons na fosforilação oxidativa, na geração de ATP e regeneração de NAD<sup>+</sup>, e em várias rotas biossintéticas cruciais como a síntese de clorofila, ácidos graxos e esteróis (DENNIS et al., 2000). Sob hipoxia, a glicólise e a fermentação podem exceder o metabolismo aeróbico e tornarem-se o único caminho para a produção de energia (SOUSA; SODEK, 2002). Os principais produtos da fermentação nos tecidos vegetais são o lactato,

o etanol e a alanina, derivados do piruvato, o produto final da glicólise (DREW, 1997).

As respostas iniciais de muitas plantas ao alagamento do solo correspondem à murcha e ao fechamento estomático, iniciando a partir de um ou dois dias de exposição das raízes a esse estresse, acompanhado de diminuições na taxa fotossintética (CHEN et al., 2002). Essas mudanças promovem decréscimos no crescimento de ramos e raízes, podendo causar danos nas raízes e morte de muitas espécies de vegetais (KOZLOWSKI, 1997). A saturação do solo provoca significativas diminuições na biomassa total das plantas, bem como na alocação de biomassa para as raízes e nas mudanças no padrão de alocação de biomassa em muitas espécies lenhosas e herbáceas (PEZESHKI, 1993; RUBIO et al., 1995).

O alagamento do solo afeta o crescimento da parte aérea de inúmeras espécies lenhosas, suprimindo a formação foliar e a expansão de folhas e entrenós, e causando a senescência e abscisão prematura das folhas (KOZLOWSKI, 1997). Já na porção submersa da planta verifica-se a morte de raízes e a produção de raízes adventícias no sistema radicular original e nas porções de caule. Essas raízes, induzidas por alagamento, usualmente são espessadas e exibem mais espaços intercelulares do que as raízes crescendo em solos bem drenados (HOOK et al., 1971). A indução de raízes adventícias tem sido relatada em uma grande variedade de espécies de plantas tolerantes e não-tolerantes, porém ocorre usualmente em espécies tolerantes ao alagamento do solo (KOZLOWSKI; PALLARDY, 1997).

Os danos nas plantas, induzidos por hipoxia, têm sido atribuídos às disfunções fisiológicas, que incluem a alteração nas relações entre carboidratos, minerais, água e hormônios, bem como a redução ou alteração de várias rotas metabólicas (KENNEDY et al., 1992). Inicialmente, a planta submetida ao estresse por hipoxia apresenta decréscimo na taxa fotossintética, que pode estar relacionada ao fechamento estomático, resultando em diminuições na absorção de CO<sub>2</sub> pelas folhas (KOZLOWSKI, 1991). Alguns autores sugerem que esse fechamento estomático pode estar associado com um decréscimo na condutividade hidráulica das raízes (DAVIES; FLORE, 1986; KOZLOWSKI, 1997), como também à transmissão de sinais hormonais das raízes para a parte aérea.

Dentre os hormônios envolvidos na transmissão de sinais estão o ABA e a citocinina (ELSE et al., 1996).

A diminuição na taxa fotossintética das plantas, que ocorre nos momentos iniciais de alagamento do solo, tem sido explicada pelo fechamento estomático. Contudo, durante estágios prolongados de alagamento, o decréscimo progressivo na taxa fotossintética é atribuído aos efeitos inibitórios nos processos fotossintéticos, que envolvem mudanças em enzimas carboxilativas e perda de clorofila (DREW, 1997; KOZLOWSKI, 1997). A diminuição na atividade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (RUBISCO), enzima responsável pela assimilação de CO<sub>2</sub> na fase bioquímica da fotossíntese, contribui para perdas na capacidade fotossintética (PEZESHKI, 1994).

A diminuição da disponibilidade de O<sub>2</sub> afeta também diferentes processos morfo-fisiológicos e genéticos das plantas (BLOM; VOESENEK, 1996; KOZLOWSKI, 1997, 2002; DREW, 1997). Algumas das principais respostas das plantas ao alagamento incluem: (i) a diminuição da permeabilidade da raiz e da absorção de água e nutrientes minerais, pela morte e supressão do metabolismo radicular; (ii) as alterações no balanço hormonal, com aumento na produção de etileno; (iii) a inibição do crescimento de caule e de raiz; (iv) o desenvolvimento de aerênquima, de raízes adventícias e de lenticelas hipertrofiadas; (v) a epinastia, clorose, necrose e abscisão foliar; e (vi) a interrupção de crescimento e decréscimo na produção de frutos, bem como a queda de frutos prematuros. Por outro lado, as diversas respostas morfo-fisiológicas são direcionadas pela expressão diferenciada de um grande número de genes induzidos por condições de hipoxia ou anoxia (VARTAPETIAN; JACKSON, 1997; KOZLOWSKI, 1997; HOLMBERG; BÜLLOW, 1998; VANTOAI et al., 1994; KLOK et al., 2002).

Alterações morfológicas, como a formação de lenticelas hipertrofiadas, aerênquima e raízes adventícias, observadas durante a deficiência de O<sub>2</sub> no solo, são fundamentais para aumentar a disponibilidade de O<sub>2</sub> nos tecidos das plantas. A formação de lenticelas hipertrofiadas ocorre em porções submersas de caules e raízes de diversas angiospermas e gimnospermas lenhosas (KOZLOWSKI, 1997), e envolve tanto o aumento da atividade felogênica como o alongamento de células corticais (KLOK et al., 2002). Além disso, participam da captação e difusão

de O<sub>2</sub> para o sistema radicular e liberam produtos voláteis potencialmente tóxicos como etanol, acetaldeído e etileno (MEDRI, 1998).

Observa-se a formação de aerênquima em caules e raízes de espécies aquáticas e tolerantes ao alagamento, que normalmente ocorre por separação celular durante o desenvolvimento (esquisogenia) ou por lise de células corticais e morte celular (lisogenia) (HE et al., 1994; DREW, 1997). Do ponto de vista adaptativo, o aerênquima fornece baixa resistência à difusão do ar no interior de tecidos submersos, promovendo sobrevivência das plantas ao alagamento do solo (DREW, 1997). A formação de aerênquima, verificada durante o estresse por deficiência de O<sub>2</sub> no solo, está associada ao acúmulo de etileno. Raízes sob alagamento do solo contêm concentrações elevadas de etileno, em comparação com raízes em condições normais, e de seu precursor (ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico – ACC), e grande atividade da sintase do ACC e da oxidase do ACC (He et al., 1994; HE et al., 1996). O etileno induz a atividade de diferentes enzimas como celulasas, hidrolases e xiloglucanases, enzimas de afrouxamento de parede celular relacionadas com a formação de aerênquima (HE et al., 1994; DREW, 1997).

Saab e Sachs (1995) observaram em milho, sob condições de alagamento, a indução do gene *1005* que codifica um homólogo de endotransglicosilase do xiloglucano (XET), uma enzima potencialmente envolvida no afrouxamento de parede celular (PESCHKE; SACHS, 1994). Esse gene, que está entre os primeiros a serem induzidos por alagamento, não codifica enzimas do metabolismo da glicose. Acredita-se que esteja associado ao início das modificações estruturais induzidas por alagamento (SAAB; SACHS 1995), pois o substrato das XET são os xiloglucanos que fazem parte da estrutura da parede celular. Saab e Sachs (1996) verificaram a indução desse gene em regiões de raízes primárias e de mesocótilo que exibiam sinais de desenvolvimento de aerênquima sob alagamento do solo, indicando associação entre essa enzima e as modificações estruturais induzidas por este tipo de estresse.

As plantas, sob condições de anoxia, substituem o metabolismo aeróbico pelo anaeróbico (DREW, 1997). Contudo, antes que os ajustes metabólicos sejam realizados, o estresse pode ser percebido e sinalizado para induzir as apropriadas respostas moleculares e celulares (DAT et al., 2004). Estudos com plantas sob

condições de deficiência de O<sub>2</sub> no solo têm focado o papel do cálcio (Ca<sup>2+</sup>) como sinalizador (SUBBAIAH et al. 1998; SUBBAIAH et al., 2000). Processos moleculares são modulados pelo Ca<sup>2+</sup> via proteínas de alta afinidade, como as calmodulinas (CaM) e suas isoformas presentes nas plantas (ZIELINSKI, 1998). O complexo Ca<sup>2+</sup>-CaM ativo pode regular a atividade de muitas moléculas alvo associadas com as respostas das plantas ao estresse (SNEDDEN; FROMM, 2001). Muitas CaM têm sido identificadas em plantas herbáceas, porém para as plantas lenhosas têm-se poucas informações. Folzer et al. (2005) foram os primeiros a identificar uma família de CaM em planta lenhosa, *Quercus petraea* Liebl. (carvalho), demonstrando que as isoformas isoladas apresentam distribuição órgão-específica na planta e expressão diferenciada quando a planta é submetida ao alagamento do solo, sugerindo que cada isoforma desempenha um papel específico na ativação e, ou modulação de enzimas-alvo associadas diretamente com a resposta ao estresse (SUBBAIAH et al., 2000).

As alterações na expressão gênica em plantas, induzidas pela deficiência de O<sub>2</sub> no solo, ocorrem em níveis transcricional, traducional e pós-traducional (SACHS et al., 1980). Essas alterações resultam em repressão imediata da síntese de proteínas pré-existentes, com simultânea síntese seletiva de polipeptídeos de transição (TPs, 33 kDa) e, após exposição prolongada da planta a essa condição, síntese seletiva de proteínas anaeróbicas (ANPs) (SACHS et al., 1980). As ANPs têm sido extensivamente estudadas, dentre as quais se encontram as enzimas envolvidas no consumo de sacarose, na glicólise e nas fermentações etanólica, láctica e da alanina (DREW, 1997; VARTAPETIAN; JACKSON, 1997; DENNIS et al., 2000). Por outro lado, pouco se sabe sobre os TPs ou genes de indução rápida (1-2 h de anoxia). Segundo Dennis et al. (2000), o primeiro estágio (0-4 h) das respostas das plantas à deficiência de O<sub>2</sub> consiste na rápida indução ou ativação de componentes sinalizadores da transdução, que promovem no segundo estágio (4-24 h) as adaptações metabólica e estrutural, incluindo a indução de genes necessários para manter uma contínua produção de energia. No terceiro estágio (24 – 48 h), crítico para a sobrevivência à tensão de O<sub>2</sub>, ocorre a formação de aerênquima nas raízes, ativada por genes do estágio 1 e, ou 2 e acúmulo do hormônio etileno (DREW, 1997). Assim os TPs estariam

associados com a sinalização inicial, que possibilitaria a sobrevivência da planta à anoxia.

## **2.2. Estudos de diversidade genética de *T. cacao* com marcadores moleculares**

O estudo da diversidade genética por meio de marcadores moleculares tem sido aplicado principalmente na análise de coleções de germoplasma, na identificação de regiões geográficas de maior diversidade para coleta de germoplasma, nos estudos de classificação de variedades e na caracterização da diversidade dos principais patógenos e pragas que afetam a cultura, de forma a estabelecer estratégias adequadas para a seleção de cultivares de *T. cacao* resistentes (FIGUEIRA; CASCARDO, 2001). Diversos marcadores moleculares foram desenvolvidos baseados em polimorfismos em nível de tamanho dos fragmentos de DNA, possibilitando a construção de mapas genômicos que permitem a localização de genes que afetam caracteres simples e quantitativos, a exemplo de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorfism*) e SSR (*Single Sequence Repeats*) (FIGUEIRA; CASCARDO, 2001).

Marcadores do tipo microsatélite são uma ferramenta valiosa para análise da variabilidade genética presente em germoplasma de espécies vegetais e conseqüentemente para a sua manutenção. Esses marcadores podem contribuir também para a conservação, já que permitem a obtenção de informações cruciais sobre a biologia de populações naturais, tais como, fluxo gênico, migração, tamanho efetivo, sistema de cruzamento, entre outros (HOSBINO et al., 2002). Do mesmo modo que as isoenzimas, que foram utilizadas amplamente no estudo de populações naturais, locos de microsatélites possuem alelos codominantes, porém estes parecem sofrer menor pressão de seleção, por serem localizados, em geral, em regiões não codificantes. Portanto, microsatélites podem ser considerados marcadores moleculares de segunda geração no estudo de populações naturais (HOSBINO et al., 2002).

Com o desenvolvimento dos marcadores moleculares, acreditou-se na possibilidade de identificar e classificar os genótipos das raças ou variedades hortícolas de *T. cacao* de forma clara e definitiva. Com esse enfoque, Figueira et al. (1994) e Lercetau et al. (1997) concluíram ser impossível separar claramente as raças de acordo com a classificação convencional (Crioulo, Forasteiro e Trinitário)\*. Figueira et al. (1994) propuseram classificar os cacaeiros em dois grupos: os silvestres, que englobariam os Forasteiros Alto amazônicos; e os domesticados que seriam todos os outros tipos, considerando a grande influência humana no cultivo do *T. cacao*. Vários estudos usando marcadores moleculares corroboram essa classificação em silvestres e domesticados (LAURENT et al., 1994; N'GORAN et al., 1994; MARITA, 1988).

Os marcadores moleculares têm sido empregados na análise de diversidade genética de cacaeiros provenientes de diferentes regiões geográficas. Whitkus et al. (1998), usando marcadores RAPD em um estudo preliminar com amostras de cacaeiros de populações naturais do sul do México, verificaram que estas diferem de todas as outras variedades de cacau, inclusive a variedade Crioulo, seu grupo morfológico e geográfico, e que representam um segmento único de diversidade genética. Alguns acessos de *T. cacao* Alto Amazônicos apresentaram alta diversidade genética em estudos realizados com marcadores moleculares baseados em isoenzimas, RAPD e RFLP (LAURENT et al. 1993; 1994; N'GORAN et al. 1994; MARITA et al. 2001). Em outros acessos clonais de *T. cacao*, oriundos das amazônias brasileira, equatoriana e peruana, Faleiro et al. (2004b) observaram a formação de grupos contendo materiais provenientes das diferentes origens sem uma tendência de regionalização da variabilidade genética, por associação de marcadores RAPD e microssatélites. Portanto, essa alta variabilidade genética, verificada nos diferentes acessos de cacaeiros, justifica o estudo da diversidade genética de materiais provenientes das diferentes regiões em que o *T. cacao* ocorre.

---

\* Na classificação tradicional o *T. cacao* é agrupado em três tipos principais ou raças hortícolas: (i) Crioulo, que representa o *T. cacao* nativo cultivado na Venezuela; (ii) Forasteiro, inclui todos os cacaeiros não Crioulos e subdividem-se em Alto Amazônicos e Baixo Amazônicos, sendo este último o tipo principal cultivado hoje em dia; (iii) Trinitários, são considerados híbridos entre os dois primeiros grupos (CHEESMAN, 1944).

O uso de marcadores moleculares também tem possibilitado avaliar a variabilidade genética de genótipos de *T. cacao* usados como parentais de híbridos (YAMADA et al., 2001; LEAL, 2004) e de acessos tolerantes à doença vassoura-de-bruxa em plantações comerciais (FALEIRO et al., 2004a); bem como analisar a identidade genética de acessos mantidos em coleções de germoplasma (FALEIRO et al., 2001; FALEIRO et al., 2002; SANTOS et al., 2005), buscando, de um modo geral, a identificação de diferentes genótipos com alta resistência à vassoura-de-bruxa; pois para culturas perenes, a recomendação de variedades resistentes com alta diversidade genética e presença de diferentes genes de resistência é essencial para diminuir a pressão de inóculo do patógeno e aumentar a durabilidade da resistência (FALEIRO et al., 2001). Os bancos internacionais de germoplasma, também foram caracterizados quanto à diversidade genética por meio de marcadores SSR, evidenciando pequena diversidade segundo as diferentes origens do germoplasma (Dapeng Zhang, 2007, informação pessoal).

Faleiro et al. (2001), utilizando marcadores moleculares RAPD, AFLP e microssatélites, caracterizaram a diversidade genética de nove variedades clonais *T. cacao* recomendadas aos produtores pelo CEPEC/CEPLAC (TSH-516, TSH-565, TSH-1188, CEPEC-42, EET-397, TSA-654, TSA-656, TSA-792; TSH-774) e do acesso SCA-6 (padrão de resistência à vassoura-de-bruxa). O clone CEPEC-42 apresentou maior distância genética em relação ao padrão de resistência (SCA-6). As variedades EET-397 e as séries TSH e TSA formaram um grupo principal. O interrelacionamento genético das variedades clonais recomendadas pelo CEPEC/CEPLAC evidencia a necessidade de buscar novas e distintas fontes de resistência à vassoura-de-bruxa, para ampliar a base genética do programa de melhoramento do cacauero, visando resistência (FALEIRO et al., 2001).

Faleiro et al. (2004a), usando marcadores microssatélites para estudar 30 acessos de *T. cacao* selecionados em plantações comerciais do sul da Bahia, encontraram alta variabilidade genética. Pela análise de agrupamento, 18 acessos (60%) agruparam-se ao SCA-6 (principal fonte de resistência à vassoura-de-bruxa), dentre eles o PH-92. O não agrupamento dos outros 12 acessos ao SCA-6, a exemplo do PH-16, PS-13.19 e SJ-02 sugere a possibilidade da existência de outras fontes de resistência à vassoura-de-bruxa.

Leal (2004) estudou, por meio de marcadores RAPD, 120 acessos de cacauzeiros, objetivando analisar a diversidade genética entre as seleções resistentes à vassoura-de-bruxa e as suas interrelações com os seus possíveis progenitores. Os 120 acessos agruparam-se em quatro grupos formados pelo método centróide a partir dos coeficientes de dissimilaridade genética, sendo um dos grupos possuidor de 91,7% dos acessos, inclusive possíveis genitores, a exemplo TSH-516, TSH-565, TSH-1188, CEPEC-42, EET-397 e SCA-6.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Multiplicação de mudas clonais de *T. cacao* nos viveiros do IBC**

##### **3.1.1. Material vegetal e condições de cultivo**

Os clones CA-1.4, CCN-10, CCN-51, CEPEC-2002, CEPEC-2004, CEPEC-2005, CEPEC-2006, CEPEC-2007, CEPEC-2008, CP-06, PH-16, PS-13.19, TSA-792 e TSH-1188 resistentes à vassoura-de-bruxa, provenientes do Banco Germoplasma de Cacau do CEPEC/CEPLAC, Ilhéus, Bahia (14°47'S, 39°16'W, 55m a.s.l.), foram multiplicados no Instituto Biofábrica de Cacau (IBC), instituição do governo do Estado da Bahia, localizado do Distrito Banco do Pedro, município de Ilhéus, BA, nos anos de 2003, 2004 e 2005 com uma média de 10.000 mudas por mês de cada clone, de forma que pudéssemos obter mensalmente aos percentuais de sobrevivência.

O processo de clonagem foi feito por meio de estacas de caule semi-lenhosas, obtidas de extremidades de ramos plagiotrópicos, contendo quatro gemas axilares, das quais três permaneceram na superfície acima do substrato de enraizamento com três folhas, cujos comprimentos foram reduzidos a  $\frac{1}{4}$ , e a gema axilar remanescente na base da estaca, cujo entrenó logo abaixo foi cortado em forma de bisel, permaneceu no interior do substrato. Momento antes do estaqueamento, as bases das estacas (cerca de 30 mm) foram imersas em

talco (pó inerte) contendo auxina sintética (Ácido Indol-3-butírico – AIB) na concentração de 4 g kg<sup>-1</sup>. Logo em seguida, foram colocadas para enraizar em tubetes plásticos pretos com capacidade de 288 cm<sup>3</sup>, tendo como substrato artificial [Plantmax<sup>®</sup> [(turfa + cascas de *Pinnus* trituradas) + fibra de coco triturada (1:1), enriquecido com Osmocote<sup>®</sup> (19-06-20) e PGmix<sup>®</sup> (14-16-18)] na proporção de 300g de cada produto para 120dm<sup>3</sup> do substrato. Estes tubetes foram colocados em bandejas plásticas perfuradas, utilizadas como suporte, com capacidade para 54 unidades, que foram mantidas no viveiro de enraizamento do IBC, coberto com telas plásticas pretas ‘sombrite’ (que permitiu a redução de 50% da radiação global logo abaixo de sua superfície), e com sistema de irrigação por microaspersão.

Na fase inicial de enraizamento, no período correspondente aos 60 dias após o estaqueamento, para garantir a formação de raízes adventícias, foi necessária a manutenção da umidade relativa do ar em torno de 100%, controlada pela lâmina de água aplicada durante o processo de nebulização por microaspersão. Nessa fase, os aspersores permaneceram ligados por 30 s a cada 5 min., perfazendo um total de 40 L h<sup>-1</sup>.

### **3.1.2. Avaliação do índice de sobrevivência**

As avaliações do índice de sobrevivência (IS) das mudas clonais foram realizadas após 60 dias do estaqueamento, período em que todos os clones haviam enraizados.

## **3.2. Variáveis fisiológicas de clones de *T. cacao* ao alagamento do substrato**

### **3.2.1. Material vegetal e condições de cultivo**

Foram avaliados 35 clones de *T. cacao* (BE-07; CA-1.4; CA-7.1; CCN-10; CCN-51; CEPEC-42; CEPEC-2001; CEPEC-2002; CEPEC-2004; CEPEC-2005;

CEPEC-2006; CEPEC-2007; CEPEC-2008; CEPEC-2009; CEPEC-2010; CEPEC-2011; CP-06; CP-49; CP-53; HW-25; PH-15; PH-16; PH-17; PH-92; PS-13.19; SJ-02; TSA-654; TSA-656; TSA-792; TSH-774; TSH-1188; VB-276; VB-679; VB-902; VB-903) multiplicados também no IBC a semelhança dos clones anteriores. Entretanto, aos 60 dias após o estaqueamento, procedeu-se a otimização do turno de rega. Nesta ocasião, os aspersores permaneceram ligados por 30 s a cada 10 min., perfazendo um total de 20 L h<sup>-1</sup>, até 5 meses, época em que as mudas clonais foram transportadas para a casa de vegetação da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC).

O alagamento do substrato foi obtido colocando-se 50 mudas de cada clone em bandejas plásticas com capacidade de 30 L, cheios com água até 20 mm acima do nível do substrato (tratamento alagado) por um período de 45 dias. No tratamento controle, as mudas foram colocadas em bandejas plásticas com a mesma capacidade, mas com fundos perfurados para escoamento do excesso da água de irrigação.

### **3.2.2. Avaliação das trocas gasosas e da emissão de fluorescência da clorofila em nível foliar**

Avaliações das variáveis fotossintéticas foram realizadas após 45 dias de aplicação dos tratamentos, em oito mudas de cada clone de *T. cacao* (quatro do tratamento alagado e quatro do controle), sempre entre 7h:30min. e 13h:30min.. As medições de trocas gasosas foliares foram efetuadas em folhas maduras, usando um IRGA (Li-Cor Nebraska, USA) modelo LI-6400, com câmara 6400-40 para medições simultâneas de trocas gasosas foliares e de emissão de fluorescência. Nas medições pontuais, a irradiância foi mantida em 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , acima da irradiância de saturação de luz das plantas controle. As taxas de fotossíntese líquida por unidade de área foliar ( $A$ ), a condutância estomática ao vapor de água ( $gs$ ), a taxa transpiratória foliar ( $E$ ) foram estimadas a partir dos valores da variação de  $\text{CO}_2$  e da umidade do ar no interior da câmara, determinados pelo analisador de gases a infravermelho do referido aparelho. A concentração de  $\text{CO}_2$  intercelular ( $C_i$ ) foi calculada pelo equipamento a partir dos valores de  $A$ ,  $gs$  e  $E$  (von CAEMMERER; FARQUHAR, 1981). Foram estimados

também a razão entre  $C_i$  e a concentração de  $\text{CO}_2$  atmosférico ( $C_a$ ) ( $C_i/C_a$ ); a eficiência intrínseca ( $A/g_s$ ) e instantânea do uso da água ( $A/E - WUE$ ) em PPFD igual a  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

As medições de emissão de fluorescência da clorofila em folhas adaptadas ao escuro foram efetuadas imediatamente após as medições de trocas gasosas foliares, utilizando também o medidor portátil LI-6400 (Li-Cor Inc., Nebraska, USA). Em cada medição, um “clip” foliar foi colocado na folha por 30 min para a reflexão da radiação solar, o decréscimo da temperatura foliar e a oxidação de todo o sistema de transporte fotossintético de elétrons. Os sinais de fluorescência foram registrados no sistema de aquisição de dados do LI-6400 que calculou automaticamente as fluorescências mínima ( $F_o$ ), máxima ( $F_m$ ), variável ( $F_v$ ) e o rendimento quântico potencial máximo ( $F_v/F_m$ ).

### **3.2.3. Obtenção da biomassa seca e da área foliar**

Ao final do experimento foram coletadas 16 mudas de cada clone (oito do tratamento alagado e oito do controle); as mudas foram divididas em partes (raiz, caule e folha) e armazenadas, isoladamente, em sacos de papel e colocadas imediatamente para secar em estufa de circulação forçada de ar a  $75^\circ\text{C}$  até massa constante, para obtenção da biomassa seca total da muda e de suas partes. A área foliar foi estimada utilizando um medidor de área foliar automático Li-3100 (Li-Cor, inc. Lincoln, Nebraska, USA). A partir da biomassa seca das diferentes partes das mudas clonais (raiz – BR, caule – BC e folhas – BF), da biomassa total (BT) e da área foliar total por muda (AF), determinou-se a área foliar individual ( $AFI = AF/ n^\circ$  de folhas), a massa foliar específica ( $MFE = BF/AF$ ) e a razão raiz e parte aérea ( $R/PA = BR/(BF + BC)$ ) de acordo com as metodologias descritas por Radford (1967) e Richards (1969).

### **3.2.4. Análise de agrupamento por similaridade entre as variáveis fisiológicas**

Os valores obtidos para as variáveis fisiológicas ( $A$ ,  $gs$ ,  $E$ ,  $Ci/Ca$ ,  $WUE$ ,  $A/gs$ ,  $F_o$ ,  $F_m$ ,  $F_v/F_m$ ,  $BF$ ,  $BC$ ,  $BR$ ,  $BT$ ,  $R/PA$ ,  $NF$ ,  $AF$ ,  $AFI$ ,  $MFE$ ) foram utilizados para o cálculo da razão entre os tratamentos alagado e controle, a partir da qual foram calculadas distâncias entre os materiais e realizadas análise de agrupamento. A matriz de distâncias foi calculada baseando-se na distância Euclidiana e utilizada posteriormente nas análises de agrupamento via dendrograma, usando o método não ponderado por médias aritméticas (UPGMA - *Unweighted Pair Group with Arithmetic Mean*) como critério de agrupamento.

### **3.3. Análise estatística**

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com 70 tratamentos, referentes aos 35 clones e aos dois regimes hídricos (controle e alagado). Cada tratamento foi composto por 50 mudas por unidade experimental. Os resultados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Foram feitas comparações entre as médias dos tratamentos alagado e controle por meio do teste-t ( $P < 0,05$ ) e comparação entre 23 clones, selecionados com base na análise de agrupamento a partir da razão entre os tratamentos alagado e controle para as variáveis fisiológicas avaliadas, por meio do teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

### **3.4. Material genético**

Foram analisados, além dos 35 clones avaliados fisiologicamente, mais 11 clones de *T. cacao*, perfazendo um total de 46 (BE-07; CA-1.4; CA-7.1; CCN-10; CCN-51; CEPEC-2001; CEPEC-2002; CEPEC-2003; CEPEC-2004; CEPEC-2005; CEPEC-2006; CEPEC-2007; CEPEC-2008; CEPEC-2009; CEPEC-2010; CEPEC-2011; CEPEC-42; CP-06; CP-38; CP-41; CP-49; CP-53; EET-397; FL-57; HW-25; OURICO-428; PH-15; PH-16; PH-17; PH-92; PS-57.01; PS-13.19; SJ-02;

TSA-654; TSA-656; TSA-792; TSH-1188; TSH-516; TSH-565; TSH-774; VB-276; VB-430; VB-515; VB-679; VB-902; VB-903), recomendados pelo Cepec/Ceplac, de alta produtividade, tolerantes à vassoura-de-bruxa e com variabilidade genética para caracteres de interesse agrônomo como a tolerância à deficiência de O<sub>2</sub> no solo. Esses clones foram obtidos por meio de enraizamento de extremidades de ramos plagiotrópicos, oriundos de plantas matrizes com 5 a 10 anos de idade, no IBC.

### **3.5. Obtenção de dados moleculares**

#### **3.5.1. Extração de DNA**

O DNA foi extraído de tecido foliar fresco de mudas clonais com três a quatro meses após o estaqueamento, pelo método de CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), modificado por Corrêa et al. (1999) conforme descrito abaixo:

##### **3.5.1.1. Maceração da amostra**

- Cerca de 300 mg de folha foram maceradas em nitrogênio líquido;
- O pó (0,5 mL) foi transferido para tubos congelados com capacidade de 1,5 mL e, em seguida, adicionou-se 700 µL de tampão de extração;
- Cada amostra foi agitada suavemente no vórtex e incubadas em banho-maria a 65°C por cerca de 40 min. e a cada 10 min. os tubos foram agitados suavemente.

##### **3.5.1.2. Purificação de ácidos nucleicos**

###### **I – Eliminação de proteínas**

- Depois de atingirem a temperatura ambiente (26°C) foi adicionado 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) em cada amostra, as quais foram agitadas por inversões suaves, por aproximadamente 5 min.;

- Posteriormente, foram centrifugadas por 5 min., a 22°C e a 17.530 x g, e a fase superior transferida para um novo tubo. Logo após, adicionou-se 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), e novamente procedeu-se a centrifugação por 5 min., seguida da transferência do sobrenadante para novos tubos.

## II – Precipitação de ácidos nucléicos

- Adicionou-se isopropanol gelado na proporção de 1:1 (isopropanol: sobrenadante), e as amostras, após agitação leve, foram incubadas a -20°C por 3 h;
- Em seguida, foram centrifugadas por 10 min., a 4°C e a 17.530 x g, e o sobrenadante removido;
- O precipitado branco formado no fundo do tubo foi lavado duas vezes com etanol 70 % e uma vez com etanol 95 % e seco à temperatura ambiente (26°C).

### 3.5.1.3. Ressuspensão de ácidos nucléicos e eliminação de RNA

- O precipitado foi ressuspenso em 50 µL de TE-RNase na concentração de 40 µg/mL e incubados em banho-maria a 37°C por 30 min..

### 3.5.1.4. Teste de qualidade e quantificação de DNA

- O teste foi feito em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio na concentração de 25 µg/µL, no qual foi aplicada uma amostra de cada DNA (5 µL de DNA + 3 µL de corante tipo IV) e submetidas à eletroforese a 110 Volts. No mesmo gel também se aplicou três amostras de DNA λ nas concentrações 50, 100 e 200 ng/µL, respectivamente, e, por comparação, foi estimado a concentração das bandas obtidas do DNA;
- O DNA obtido foi diluído na concentração de 10ng/µL e armazenado em freezer -20°C, para posterior amplificação.

### 3.5.2. Amplificação de DNA utilizando *primers* microssatélites

Utilizou-se nas análises 18 *primers* específicos para microssatélites, como listados abaixo:

Nº de acesso*	Nome do marcador	T (°C) anelamento	Tamanho (pb)	Motif
AJ271827	mTcCIR 35	46 °C	235	(GT) <sub>11</sub>
AJ271942	mTcCIR 37	46 °C	150	(GT) <sub>15</sub>
AJ271944	mTcCIR 42	46 °C	232	(CA) <sub>21</sub>
AJ271945	mTcCIR 43	46 °C	206	(TG) <sub>5</sub> (TA)
AJ271946	mTcCIR 44	51 °C	178	(GT) <sub>10</sub>
AJ271953	mTcCIR 54	46 °C	165	(CA) <sub>15</sub>
AJ271956	mTcCIR 57	46 °C	253	(AC) <sub>13</sub>
Y16883	mTcCIR 1	51 °C	143	(CT) <sub>14</sub>
Y16977	mTcCIR 3	46 °C	249	(CT) <sub>20</sub> (TA) <sub>21</sub>
Y16978	mTcCIR 2	51 °C	254	(GA) <sub>3</sub> N <sub>5</sub> (AG) <sub>2</sub> GG(AG) <sub>4</sub>
Y16980	mTcCIR 6	46 °C	231	(TG) <sub>7</sub> (GA) <sub>13</sub>
Y16981	mTcCIR 7	51 °C	160	(GA) <sub>11</sub>
Y16982	mTcCIR 8	46 °C	301	(TC) <sub>5</sub> TT(TC) <sub>17</sub> TTT(CT) <sub>4</sub>
Y16983	mTcCIR 9	51 °C	274	(CT) <sub>8</sub> N <sub>15</sub> (CT) <sub>5</sub> N <sub>9</sub> (TC) <sub>10</sub>
Y16984	mTcCIR 10	46 °C	208	(TG) <sub>13</sub>
Y16985	mTcCIR 11	46 °C	298	(TC) <sub>13</sub>
Y16986	mTcCIR 12	46 °C	188	(CATA) <sub>4</sub> N <sub>18</sub> (TG) <sub>6</sub>
Y16987	mTcCIR 13	46 °C	258	(AG) <sub>13</sub>

\*Número de acesso no [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

A amplificação foi feita em termociclador GeneAmp ®PCR System 9700 da PerkinElmer num volume total de 13 µL contendo:

- 5,25 µL de H<sub>2</sub>O Mili-Q autoclavada;
- 0,39 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mmol.L<sup>-1</sup>;
- 1,3 µL de tampão 10x;
- 1,3 µL de dNTP 2,5 mmol.L<sup>-1</sup>;
- 0,26 µL de *primer* 10 µmol.L<sup>-1</sup>;
- 1,3 µL de BSA 2,5 mg/µL;
- 0,2 µL de *taq* polimerase 5u/µL;
- 3,0 µL de DNA 10ng/µL.

Os fragmentos foram amplificados por 30 ciclos, utilizando as seguintes temperaturas:

- 94° C por 2 min. para desnaturação do DNA;
- 46°C ou 51°C (conforme *primer* usado) por 1 min. para anelamento do *primer*,

- 72°C por 1 min. para extensão do *primer*;
- 72°C por 7 min. para um passo único de extensão final após os 30 ciclos.

Os produtos das ampliações foram separados em gel de poliacrilamida a 5% no seqüenciador automático ABI 377, utilizando os programas Genescan e Genotyper na caracterização de microssatélites amplificados a partir de *primers* marcados com fluorocromos e analisados por meio do sistema de detecção de fluorescência no seqüenciador de DNA ABI 377.

### 3.6. Análises genético-estatísticas de dados moleculares

Os marcadores microssatélites foram convertidos em matrizes numéricas codificadas, a partir da qual foram calculados os coeficientes de similaridade genética entre os materiais genéticos e realizadas análise de agrupamento. A codificação foi 1 para presença, 0 para ausência do alelo e 9 para dado perdido.

A matriz de coeficientes de similaridade genética de Nei e Li (DICE, 1945; NEI; LI, 1979) foi calculado por:

$$S_{ij} = 1 - [2a / (2a + b + c)], \text{ sendo:}$$

$S_{ij}$  = coeficiente de similaridade genética entre as variedades  $i$  e  $j$ ;

$a$  = número de encontros (1 1);

$b$  = número de encontros (1 0); e

$c$  = número de encontros (0 1) entre as variedades  $i$  e  $j$ .

A matriz de coeficientes de similaridade genética foi usada para realizar as análises de agrupamento via dendrograma, usando o método não ponderado por médias aritméticas (UPGMA - *Unweighted Pair Group with Arithmetic Mean*) como critério de agrupamento. O nível de heterozigose foi calculado baseado na relação entre o número de locos em heterozigose e o número total de locos analisados.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Multiplicação e índice de sobrevivência de mudas clonais de *T. cacao* no viveiro do IBC

Após 60 dias de estaqueamento observou-se a formação de raízes adventícias na estacas e realizou-se o levantamento do índice de sobrevivência (IS) das mudas clonais. Verificou-se para os clones CA-1.4, CCN-10, CCN-51, CEPEC-2002, CEPEC-2004, CEPEC-2005, CEPEC-2006, CEPEC-2007, CEPEC-2008, CP-06, PH-16, PS-13.19, TSA-792 e TSH-1188 que nos anos de 2003, 2004 e 2005 o IS apresentou os menores valores para os meses de maio a outubro (Figura 1). Nesse mesmo período foram registradas as maiores precipitações médias, as menores temperaturas médias e elevada umidade relativa média do ar (Figura 2). Pode-se observar também, nesse mesmo período que o declínio no IS das mudas dos clones CEPEC-2007 (Figura 3) e CEPEC-2008 (Figura 4) coincidiu com o período de maior precipitação na região. Essa alta precipitação, associada com o excesso de água aplicada na irrigação por microaspersão, para manter alta umidade no interior dos viveiros, provocaram a saturação do substrato nos tubetes, gerando uma condição de hipoxia ou mesmo anoxia. A deficiência de O<sub>2</sub> no substrato provocou a morte das mudas clonais, atingindo por exemplo cerca de 80% para o clone CEPEC-2008 (Figura 4), inviabilizando a multiplicação desse clone no IBC.

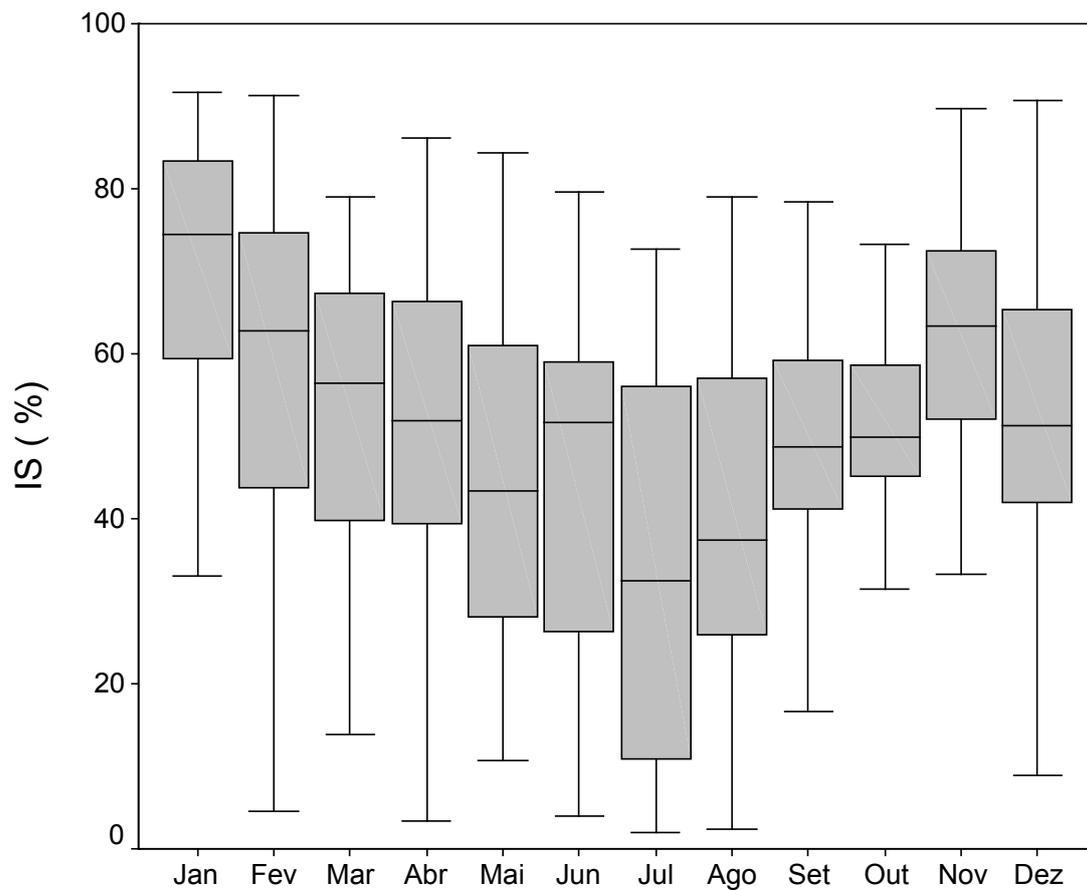


Figura 1. Índice de sobrevivência (IS) de mudas dos clones CA-1.4, CCN-10, CCN-51, CEPEC-2002, CEPEC-2004, CEPEC-2005, CEPEC-2006, CEPEC-2007, CEPEC-2008, CP-06, PH-16, PS-13.19, TSA-792 e TSH-1188, obtidas a partir de estacas de caule e enraizadas no IBC nos anos de 2003, 2004 e 2005. Cada mês representa a valor médio de 420.000 mudas clonais de *T. cacao*.

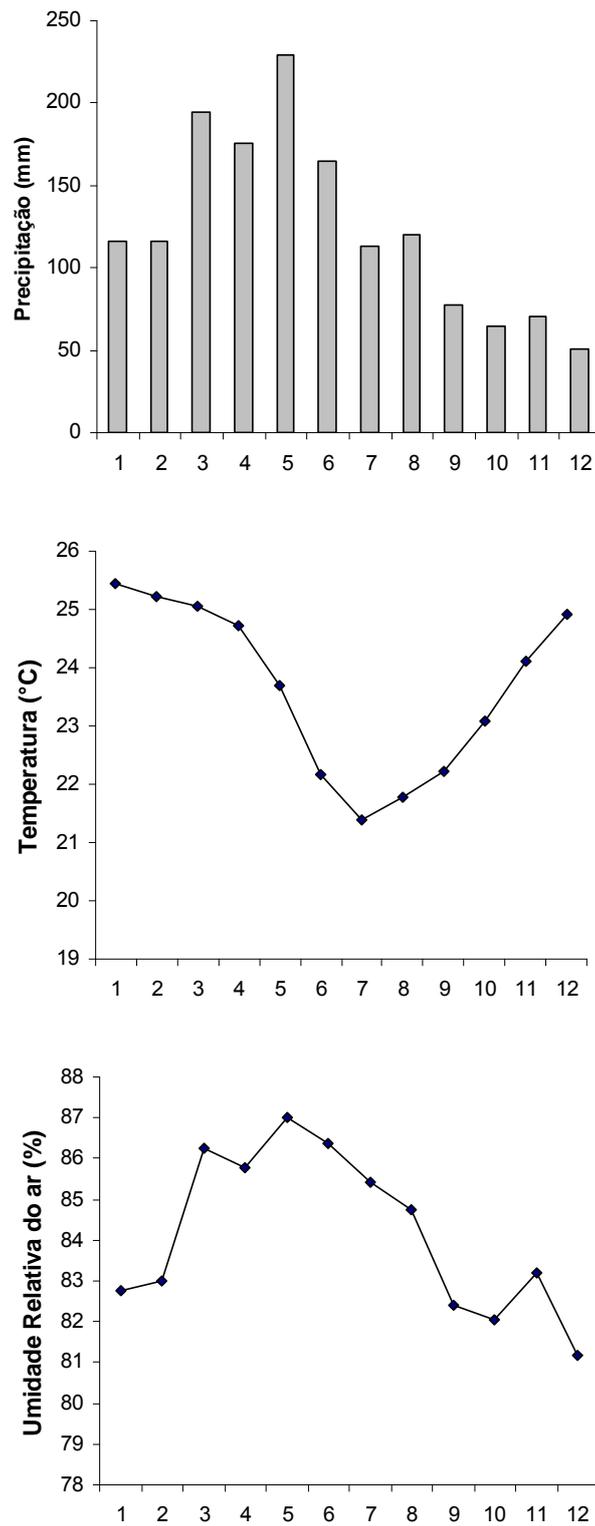


Figura 2. Precipitação pluviométrica média, temperatura e umidade relativa médias do ar nos anos de 2003, 2004 e 2005 no IBC, localizado no Distrito Banco do Pedro, Município de Ilhéus, BA.

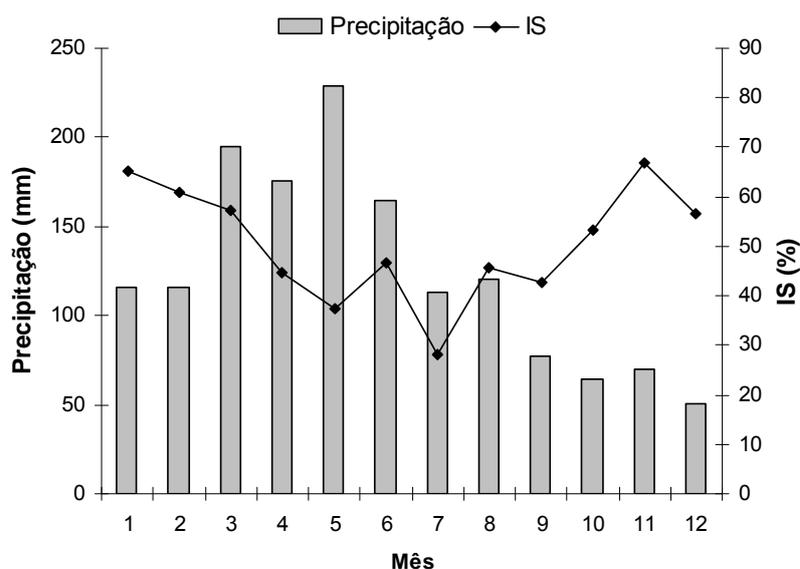


Figura 3. Índice de sobrevivência (IS) de mudas do clone CEPEC-2007, obtidas a partir de estacas de caule e enraizadas no IBC nos anos de 2003, 2004 e 2005; e precipitação pluviométrica média para o mesmo período no IBC, localizado no Distrito Banco do Pedro, Município de Ilhéus, BA. Cada ponto representa a valor médio de 30.000 mudas clonais de *T. cacao*.

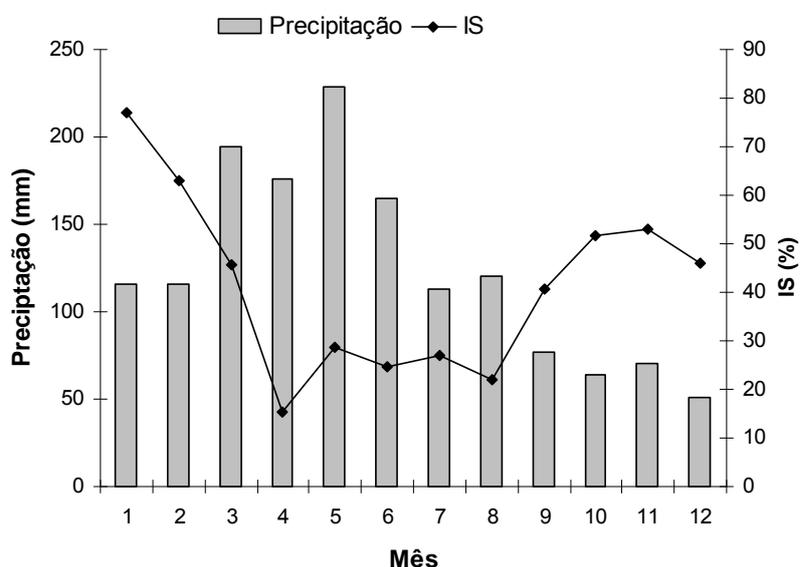


Figura 4. Índice de sobrevivência (IS) de mudas do clone CEPEC-2008, obtidas a partir de estacas de caule e enraizadas no IBC nos anos de 2003, 2004 e 2005; e precipitação pluviométrica média para o mesmo período no IBC, localizado no Distrito Banco do Pedro, Município de Ilhéus, BA. Cada ponto representa a valor médio de 30.000 mudas clonais *T. cacao*.

## **4.2. Respostas fisiológicas de clones de *T. cacao* ao alagamento do substrato**

### **4.2.1. Índice de sobrevivência e respostas morfológicas**

O índice de sobrevivência (IS) das mudas de *T. cacao*, durante os 45 dias de alagamento do substrato, foi acima de 80% para 27 dos 35 clones avaliados, sendo que o VB-903 foi o que apresentou menor IS (30%) (Tabela 1). Sintomas típicos de estresse por alagamento do substrato, dentre os quais se incluem clorose foliar, formação de lenticelas e emissão de raízes adventícias, foram verificados em todos os clones, com exceção do CCN-10, CCN-51, PH-17 e TSA-792 que não apresentaram clorose foliar (Tabela 1).

A clorose foliar, também observada em outras espécies, pode ser atribuída a vários fatores, tais como o acúmulo de substâncias tóxicas, disfunção hormonal levando à senescência, aumento da concentração de radicais livres de oxigênio ou mesmo a carência de nutrientes (PEZESHKI et al., 1996; KOZLOWSKI, 1997; DREW, 1997). Em espécies sensíveis à hipoxia, geralmente a diminuição nos teores foliares de N, P e K, provocada pelo alagamento do solo, coincide com o surgimento de clorose, normalmente atribuída à deficiência de N (DREW, 1997).

Diversos estudos sobre o efeito do alagamento do solo em plantas lenhosas têm demonstrado que o desenvolvimento de lenticelas hipertrofiadas, na base dos caules e porções de raízes submersas, contribui para a tolerância ao alagamento (PEZESHKI et al., 1994; KOZLOWSKI, 1997; DREW, 1997). A presença de lenticelas em espécies tolerantes ao alagamento, geralmente está associada com aerênquima, ambos relacionados a mecanismos que permitem o influxo de O<sub>2</sub> e a sua difusão para raízes submersas (TOPA; MCLEOD, 1986). Semelhante a outras espécies de plantas lenhosas, as lenticelas hipertrofiadas em mudas clonais de *T. cacao* provavelmente acentua a difusão de O<sub>2</sub> para as raízes (KOZLOWSKI, 1997). Outro mecanismo adaptativo à hipoxia ou anoxia é a emissão de raízes adventícias, substituindo as raízes originais que morreram ou perderam a função em resposta ao estresse (VARTAPETIAN; JACKSON, 1997).

Esta substituição de raízes, normalmente ocorre na base de caules submersos e alcança a superfície da água acima da linha do solo alagado, onde existe um conteúdo substancial de oxigênio disponível. Segundo Kozlowski (1997), é provável que as raízes adventícias facilitem a absorção e translocação de O<sub>2</sub> para raízes submersas, podendo assim manter o crescimento da parte aérea durante períodos prolongados de alagamento do solo (CHEN et al., 2002).

Tabela 1. Respostas morfológicas e índice de sobrevivência de 35 clones de *T. cacao* aos 45 de alagamento do substrato. Intensidades baixa (+), média (++), alta (+++) e ausência (0) de clorose, formação de lenticelas e de emissão de raízes adventícias

Clone	Clorose	Lenticela	Emissão de raiz adventícia	IS%
BE-07	+	+	++	88
CA-1.4	+	+++	++	96
CA-7.1	+	+++	+++	44
CCN-10	0	++	+	82
CCN-51	0	+	+	82
CEPEC-2001	++	+	+	88
CEPEC-2002	++	++	++	56
CEPEC-2004	+	+	+	88
CEPEC-2005	+	+	+	80
CEPEC-2006	+	+	+	82
CEPEC-2007	+	++	+	82
CEPEC-2008	+++	++	+	86
CEPEC-2009	+++	+	+	94
CEPEC-2010	+	++	+++	54
CEPEC-2011	+++	+	+	84
CEPEC-42	+++	+	++	86
CP-06	+	+++	+++	84
CP-49	+	++	+++	84
CP-53	++	+	++	76
HW-25	+	+++	+++	76
PH-15	++	+++	++	66
PH-16	+	++	++	88
PH-17	0	+	+	94
PH-92	+	+	+	90
PS-13.19	+	++	++	64
SJ-02	+	+++	++	82
TSA-654	++	+	++	96
TSA-656	+	+	+	96
TSA-792	0	+	++	96
TSH-1188	++	+	+	86
TSH-774	+	+	+	72
VB-276	++	+	+	86
VB-679	+	++	++	84
VB-902	++	+++	+++	68
VB-903	+++	++	+	30

#### 4.2.2. Trocas gasosas em nível foliar

Aos 45 dias de alagamento do substrato, observaram-se nos 35 clones estudados diminuições significativas na taxa de fotossíntese líquida por unidade de área foliar ( $A$ ) (Figura 5), na condutância estomática ao vapor de água ( $g_s$ ) (Figura 6) e na taxa transpiratória foliar ( $E$ ) (Figura 7) para as mudas alagadas em relação ao controle, com exceção do CCN-10, PH-17 e TSA-792, e o CEPEC-2002 que não apresentou reduções significativas para  $g_s$  e  $E$ . O alagamento do solo geralmente é seguido de rápido decréscimo na taxa fotossintética em muitas angiospermas e gimnospermas (KOZLOWISKI, 1997). A redução nos valores de  $A$  ocorre, inicialmente, devido ao fechamento dos estômatos, resultando no decréscimo na absorção de  $CO_2$  pelas folhas (KOZLOWISKI, 1997; PEZESHKI, 1993). Entretanto, num período de tempo relativamente longo de alagamento, há diminuição progressiva nos valores de  $A$  por efeitos inibitórios nos processos fotossintéticos. As limitações não-estomáticas da fotossíntese estão fortemente associadas às alterações nas enzimas do ciclo de Calvin e na degradação dos pigmentos fotossintéticos (PEZESHKI, 2001). O decréscimo na atividade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (RUBISCO) constitui um dos sintomas iniciais do estresse por hipoxia, que contribui para perdas na capacidade fotossintética (PEZESHKI, 1994).

Algumas pesquisas sugerem que o fechamento dos estômatos de plantas alagadas está associado ao decréscimo na condutividade hidráulica das raízes (ANDERSEN et al., 1984; DAVIES; FLORE, 1986). A diminuição da condutividade hidráulica da raiz pode aumentar o estresse hídrico interno, reduzindo a turgescência da folha e os valores de  $g_s$  (DAVIES; FLORE, 1986; PEZESHKI, 2001). Segundo Kozlowiski (1997), o decréscimo nos valores de  $g_s$  em plantas lenhosas tolerantes e não-tolerantes é considerado uma resposta comum ao alagamento do solo. Em algumas situações, normalmente poucas semanas após o alagamento, as espécies tolerantes demonstram uma tendência em recuperar os valores de  $g_s$  à semelhança das plantas controle (MIELKE et al., 2005). A reabertura estomática geralmente está relacionada com o desenvolvimento de lenticelas hipertrofiadas ou raízes adventícias (LOPEZ; KURSAR, 1999). Em árvores frutíferas, o declínio na taxa transpiratória em resposta ao alagamento do

solo ocorre provavelmente devido a diminuição na condutância estomática, já que a deficiência de  $O_2$  não diminui significativamente o potencial hídrico do xilema (SCHAFFER et al., 1992).

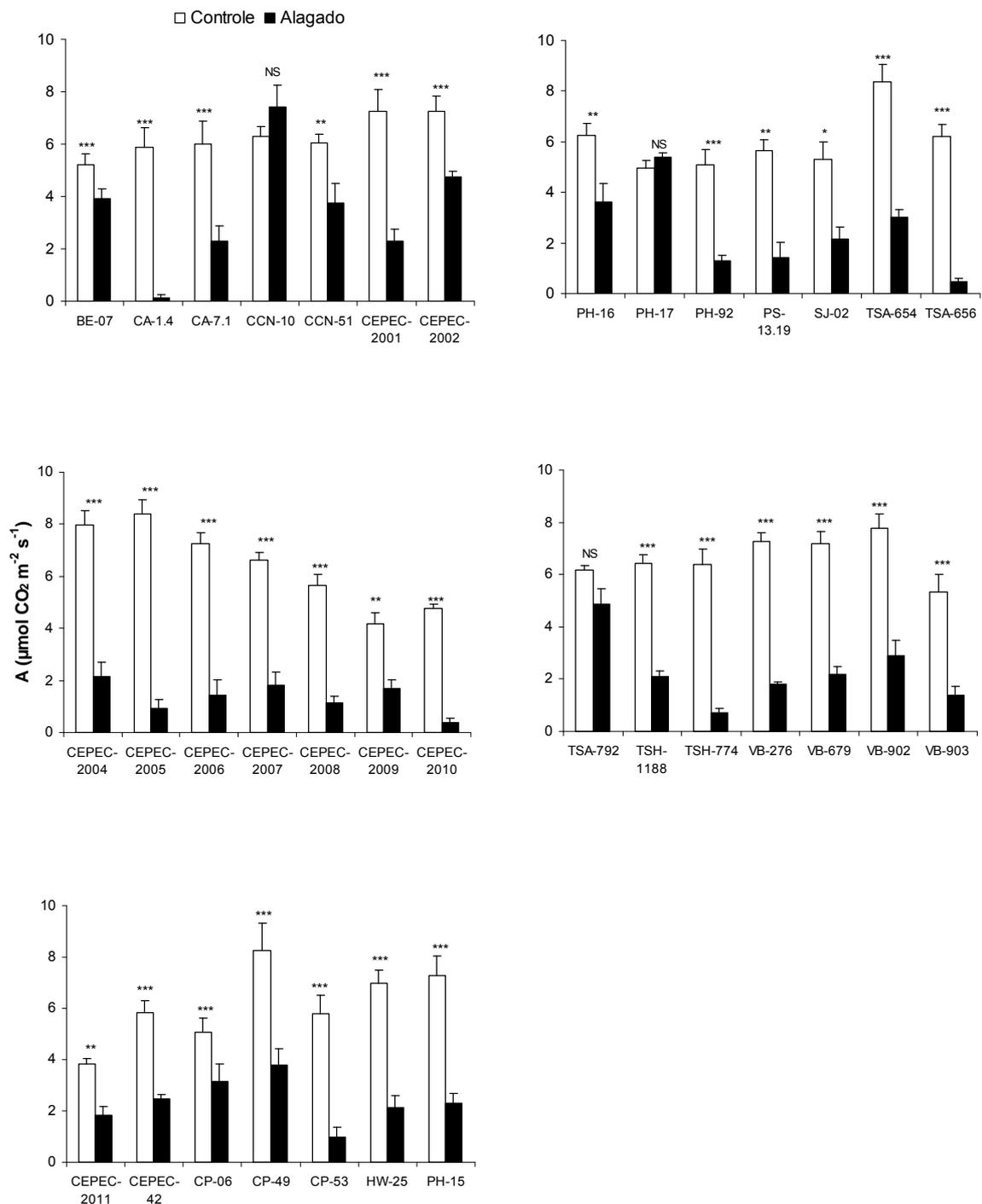


Figura 5. Taxa fotossintética líquida por unidade de área foliar (A) de 35 clones de *T. cacao* submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias, em irradiância fotossinteticamente ativa de  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (\*P < 0,10; \*\*P < 0,05; \*\*\*P < 0,01).

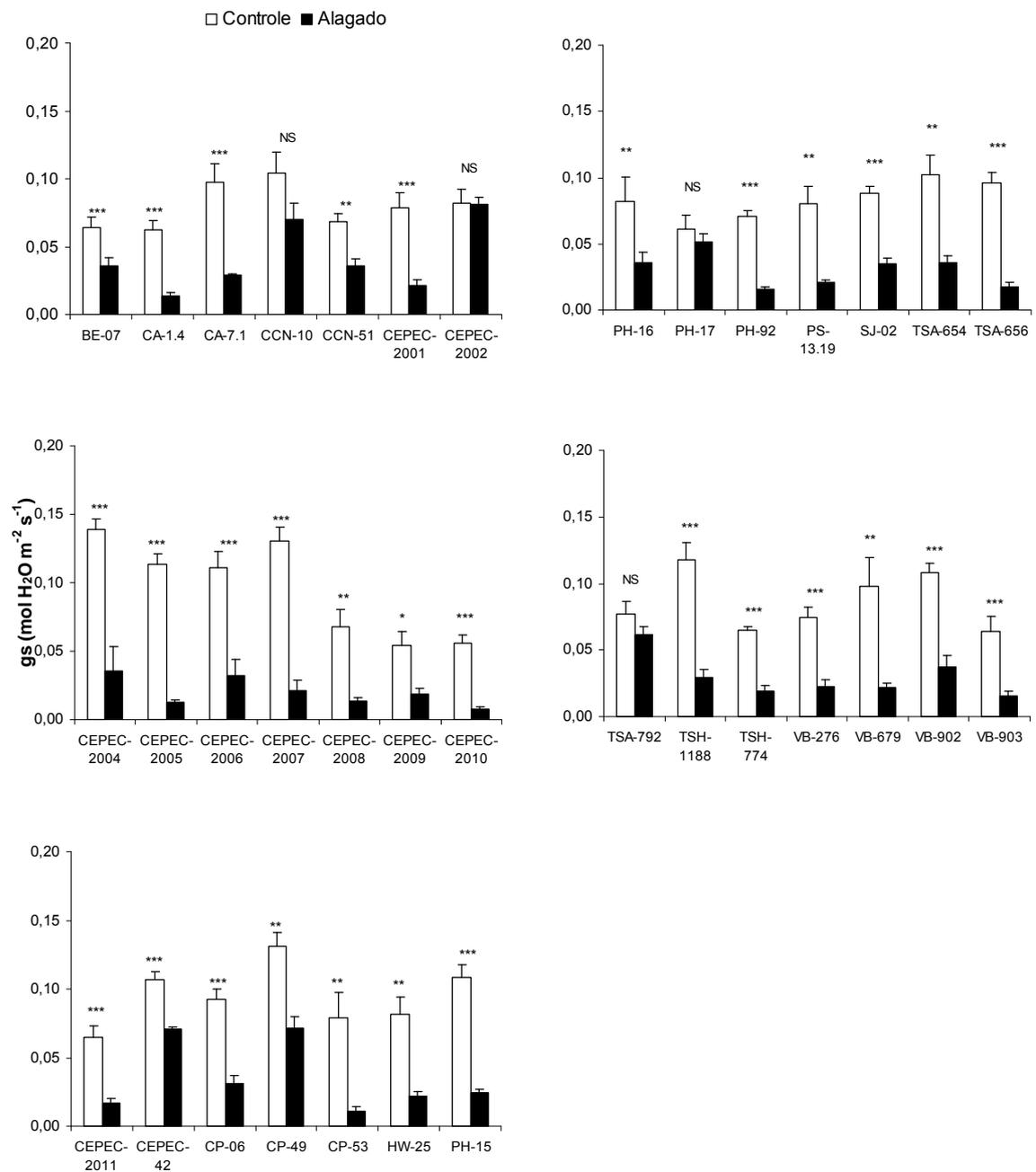


Figura 6. Condutância estomática ao vapor de água ( $gs$ ) de 35 clones de *T. cacao* submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias, em irradiância fotossinteticamente ativa de  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (\* $P < 0,10$ ; \*\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,01$ ).

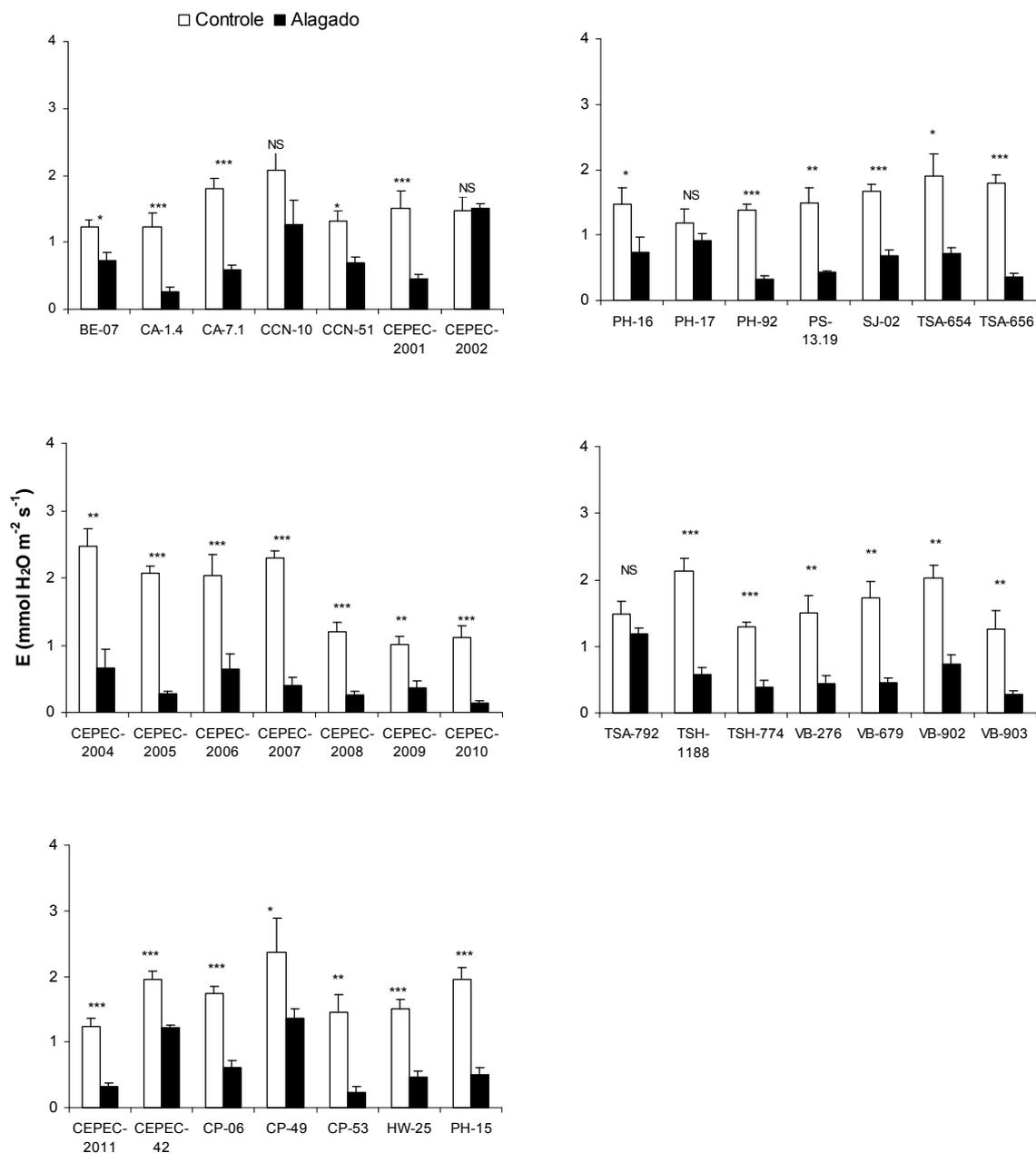


Figura 7. Taxa transpiratória foliar ( $E$ ) de 35 clones de *T. cacao* submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias, em irradiância fotossinteticamente ativa de  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (\* $P < 0,10$ ; \*\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,01$ ).

Os valores da razão entre as concentrações interna ( $C_i$ ) e atmosférica ( $C_a$ ) de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ) para cerca de 70% dos clones avaliados não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos após 45 dias de alagamento do substrato (Figura 8). A relação  $C_i/C_a$  tem sido considerada um apropriado indicador para a limitação estomática da fotossíntese (FARQUHAR; SHARKEY, 1982). Baixos valores de  $C_i/C_a$  implicam em grandes limitações estomáticas da fotossíntese e maior conservação da planta em relação ao uso de água. Esse fato foi observado para os clones BE-07, CCN-10, CCN-51, CEPEC-2007 e CP-06, que diminuíram os valores de  $C_i/C_a$  das mudas alagadas em relação ao controle cerca de 22, 34, 36, 23 e 30%, respectivamente (Figura 8). Isso indica que esses clones apresentam uma tendência em ser conservativos em relação ao uso da água, semelhante a outras espécies arbóreas (ASHRAF, 2003; MIELKE et al., 2005). Dentre os clones que apresentaram diferenças significativas para os valores de  $C_i/C_a$  (Figura 8), pôde-se observar para os clones CA-1.4, CEPEC-2010, CEPEC-42, TSA-656 e TSH-774 que os valores de  $C_i/C_a$  das mudas alagadas foram 68, 32, 11, 22 e 47 %, respectivamente, superiores aos das mudas controle, sugerindo a ocorrência adicional limitação não-estomática da fotossíntese para esses clones.

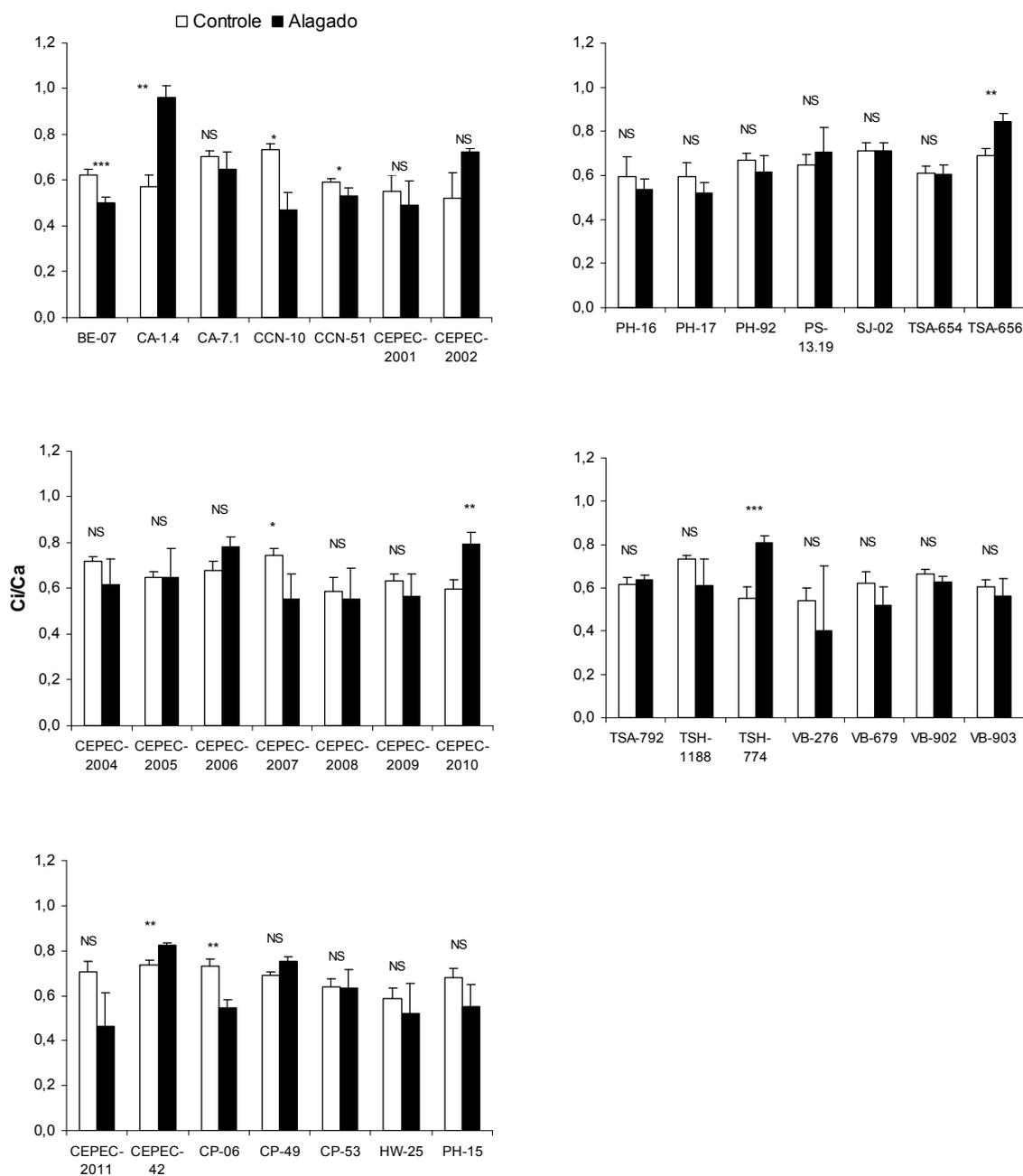


Figura 8. Razão entre as concentrações interna ( $C_i$ ) e atmosférica ( $C_a$ ) de  $CO_2$  ( $C_i/C_a$ ) em folhas de 35 clones de *T. cacao* submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias, em irradiância fotossinteticamente ativa de  $800 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ . A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (\* $P < 0,10$ ; \*\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,01$ ).

Em relação à eficiência instantânea do uso da água (*WUE*) (Figura 9) observaram-se diferenças significativas entre os tratamentos para os clones CA-1.4, CCN-10, CEPEC-2007, CEPEC-2010, CEPEC-42, CP-06, TSA-656 e TSH-774, sendo que os clones CCN-10, CEPEC-2007 e CP-06 apresentaram acréscimo de 145, 84 e 73 % nos valores de *WUE* das mudas alagadas em relação aos das mudas controle. Ashraf (2003) em seu estudo com espécies arbóreas, verificou em condições de alagamento do solo uma diminuição significativa nos valores de *WUE* para populações não-tolerantes, enquanto que populações tolerantes apresentaram os mesmos valores do controle. Mielke et al. (2003) não observaram para *Genipa americana* efeitos significativos do alagamento do solo nos valores de *WUE*, no entanto os valores de *WUE* permaneceram estáveis para o controle e oscilando para as mudas alagadas, indicando que o alagamento modificou a eficiência do uso da água nessa espécie.

Os valores da eficiência intrínseca do uso da água (*A/g<sub>s</sub>*) dos clones BE-07, CA-1.4, CCN-10, CEPEC-2007, CEPEC-2010, CEPEC-42, CP-06, TSA-656 e TSH-774 apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 10). Mielke et al. (2005) observaram em espécies arbóreas neotropicais incremento nos valores de *A/g<sub>s</sub>* para as plantas alagadas, indicando um alto grau de limitação estomática para essas espécies. No presente estudo, verificou-se condição semelhante para os clones BE-07, CCN-10, CEPEC-2007 e CP-06 que aumentaram 36, 118 e 90% dos valores de *A/g<sub>s</sub>* nas mudas alagadas em relação às do controle, respectivamente (Figura 10).

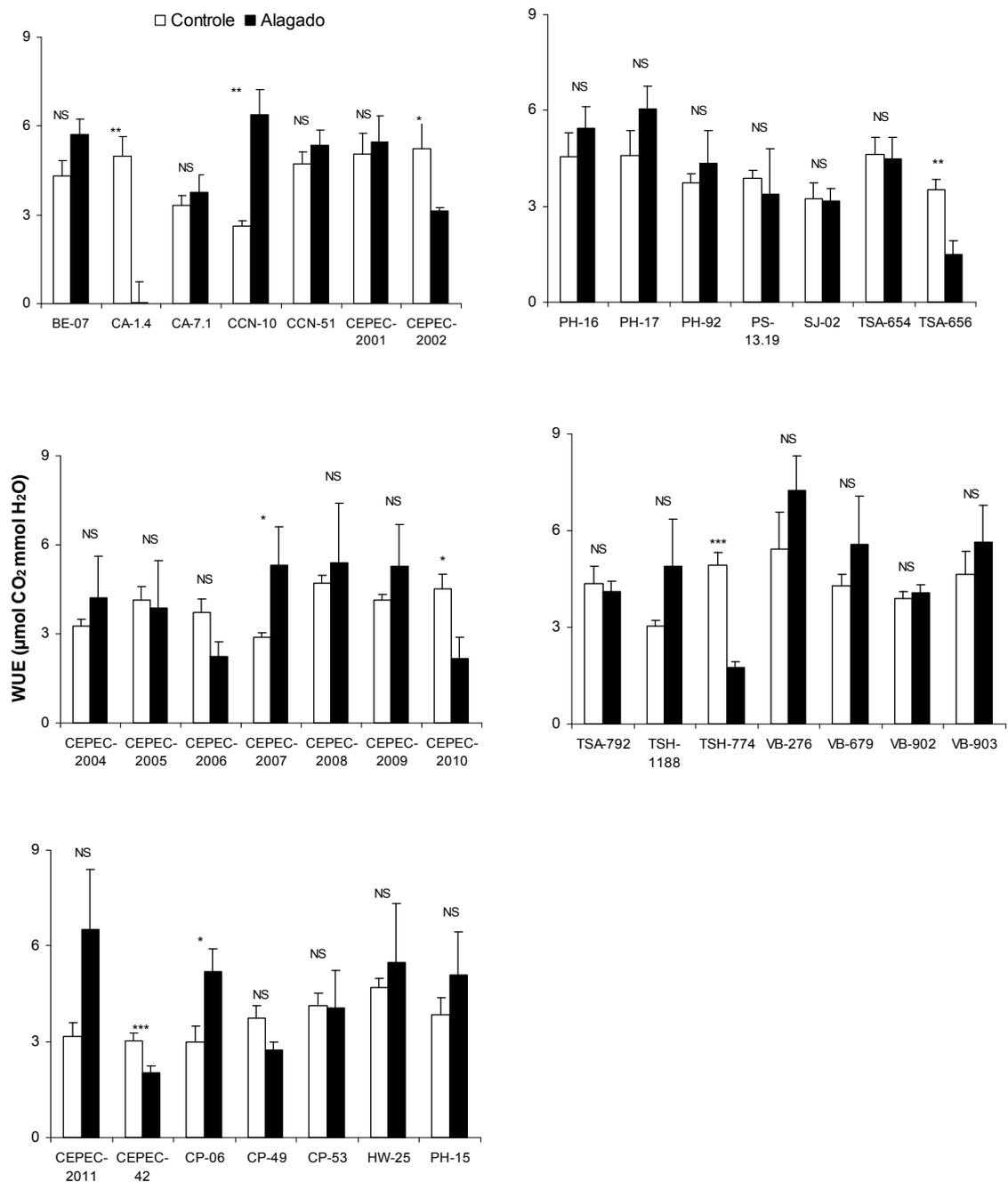


Figura 9. Eficiência instantânea do uso da água (*WUE*) em folhas de 35 clones de *T. cacao* submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias, em irradiância fotossinteticamente ativa de  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (\* $P < 0,10$ ; \*\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,01$ ).

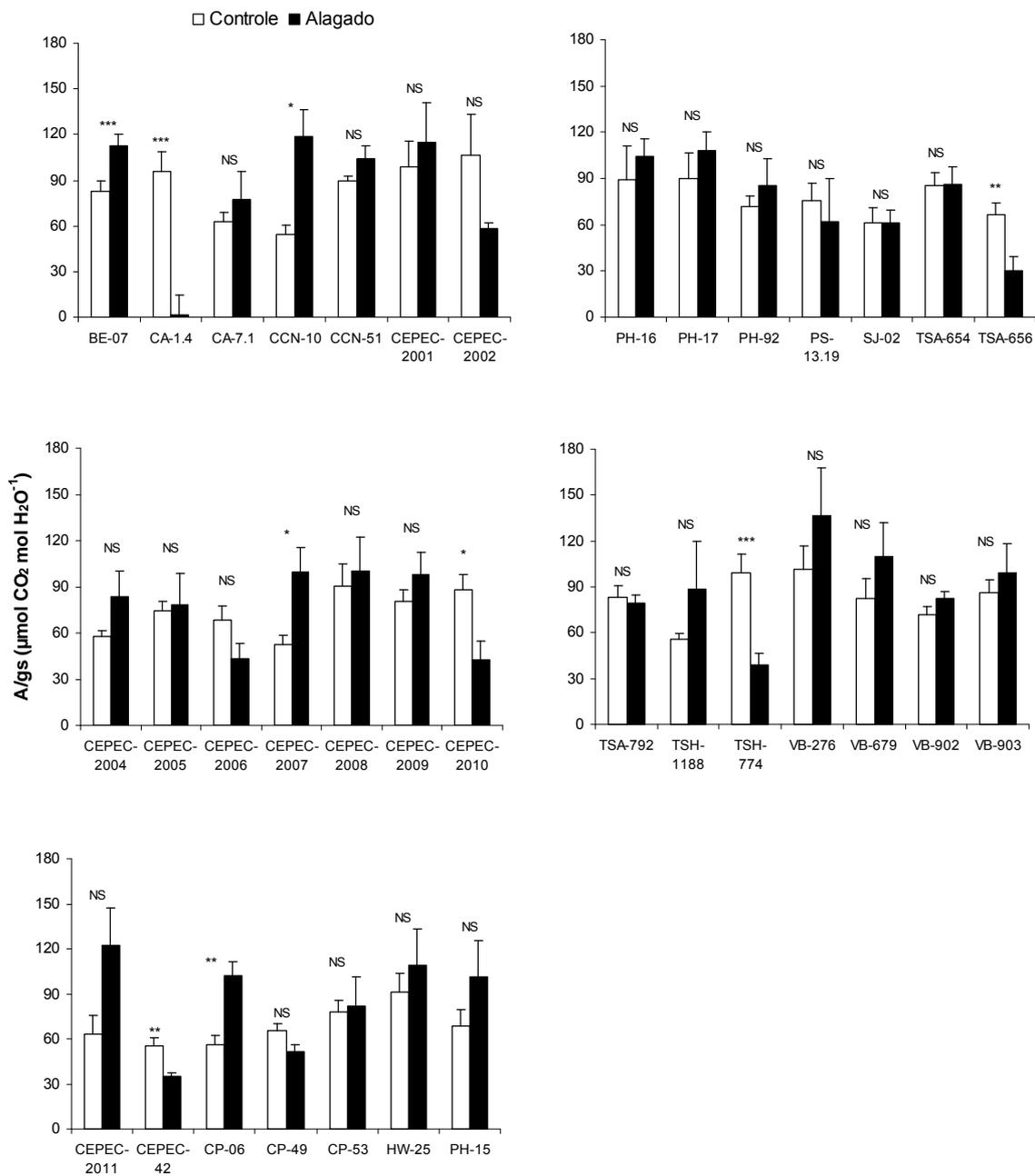


Figura 10. Eficiência intrínseca do uso da água ( $A/g_s$ ) em folhas de 35 clones de *T. cacao* submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias, em irradiância fotossinteticamente ativa de  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t ( $9^*P < 0,10$ ;  $**P < 0,05$ ;  $***P < 0,01$ ).

### 4.2.3. Emissão de fluorescência da clorofila em nível foliar

Alguns trabalhos têm utilizado a emissão de fluorescência da clorofila para avaliar as bases biofísicas relacionadas com as mudanças nas características fotossintéticas, sendo a relação  $F_v/F_m$  considerada como um importante indicador dos efeitos de estresses ambientais na fotossíntese (LICHTENTHALER et al., 1992; BALL et al., 1994; MAXWELL; JOHNSON, 2000; MIELKE et al., 2003). No presente trabalho observou-se diferenças significativas entre tratamentos para fluorescência inicial ( $F_o$ ) (Figura 11), fluorescência máxima ( $F_m$ ) (Figura 12) e rendimento quântico potencial máximo ( $F_v/F_m$ ) (Figura 13). Nos clones que apresentaram diferenças significativas para essas variáveis, pôde-se verificar incremento nos valores de  $F_o$  e decréscimo nos valores de  $F_m$  e  $F_v/F_m$  das mudas alagadas em relação ao controle. Incremento em  $F_o$  e decréscimo na relação  $F_v/F_m$  indicam a ocorrência de danos fotoinibitórios em resposta a estresse hídrico (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

As mudas controle dos 35 clones avaliados apresentaram valores de  $F_v/F_m$  próximos de 0,8, ao passo que as mudas alagadas dos clones BE-07, CA-7.1, CEPEC-2001, CEPEC-2002, CEPEC-2005, CEPEC-2006, CEPEC-2007, CEPEC-2008, CEPEC-2010, CEPEC-2011, CEPEC-42, CP-53, HW-25, PH-15, PH-92, SJ-02, TSA-654, TSA-656, TSA-792, TSH-1188, TSH-774, VB-276 e VB-903 apresentaram valores de  $F_v/F_m$  inferiores ao das mudas controle (Figura 13). Os valores de  $F_v/F_m$  refletem a eficiência quântica máxima do fotossistema 2 (PS-2) e são usados como um sensível indicador do rendimento fotossintético, com valores ótimos ao redor de 0,83 medidos para plantas de mesma espécie (BJÖRKMAN; DEMMIG, 1987). Valores abaixo deste indicam que as plantas tem sido submetidas a estresses ambientais, demonstrando o fenômeno de fotoinibição (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Observou-se que os clones que apresentaram as maiores diferenças para  $F_v/F_m$  (CEPEC-2010, CEPEC-42, TSA-656 e TSH-774) entre mudas alagadas e controle (Figura 13) correspondem aos clones com uma limitação não-estomática maior da fotossíntese, indicada por decréscimos na relação  $A/g_s$  (Figura 10). Esses dados sugerem que, para os clones que apresentaram diferenças significativas entre tratamentos para  $F_o$ ,  $F_m$  e  $F_v/F_m$ , o principal efeito do alagamento na fase fotoquímica da fotossíntese foi mudança no

rendimento quântico do PS-2, com conseqüente diminuição nos valores da taxa fotossintética, e não o fechamento estomático.

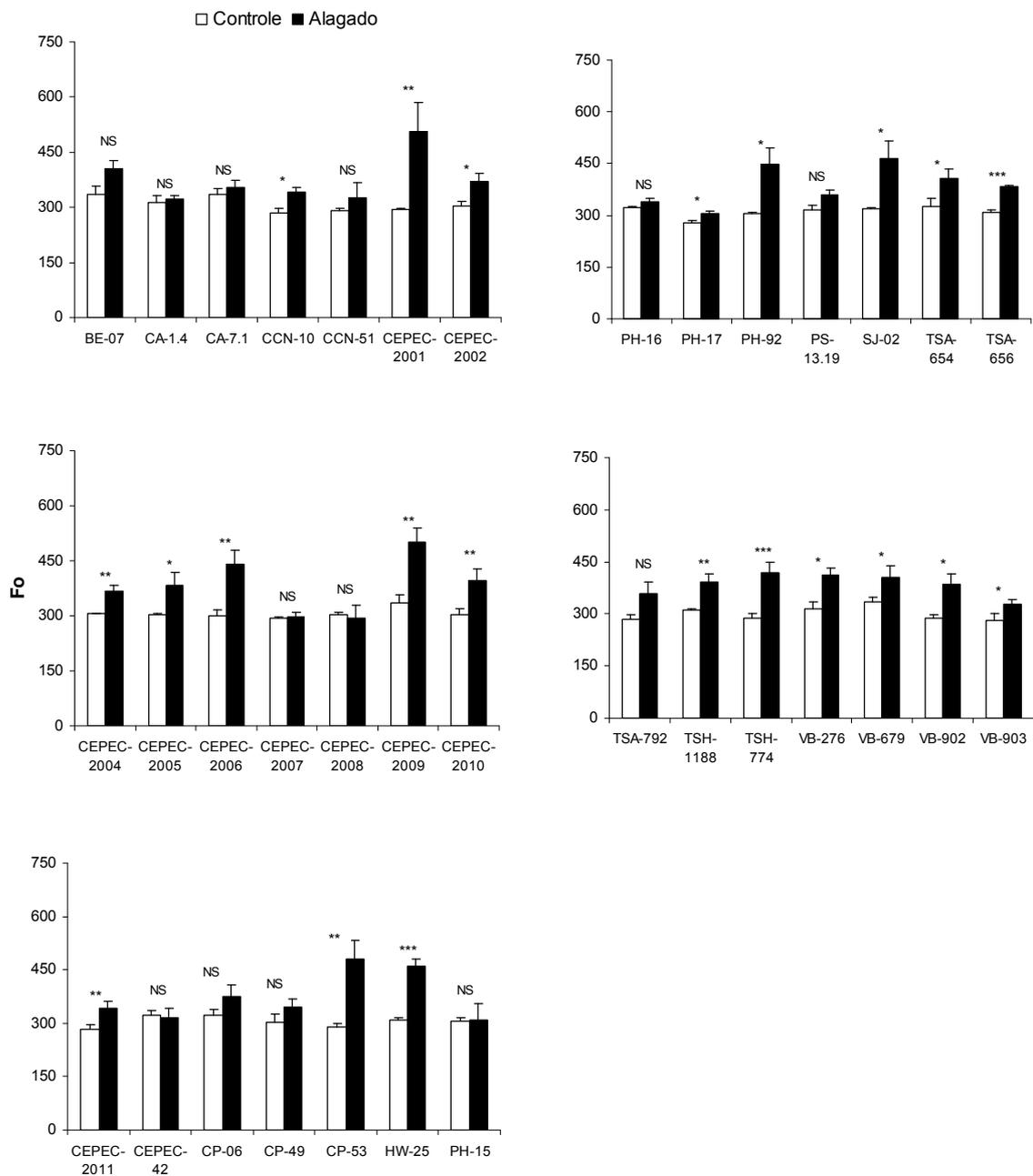


Figura 11. Fluorescência inicial ( $F_0$ ) em folhas de 35 clones de *T. cacao* submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (\* $P < 0,10$ ; \*\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,01$ ).

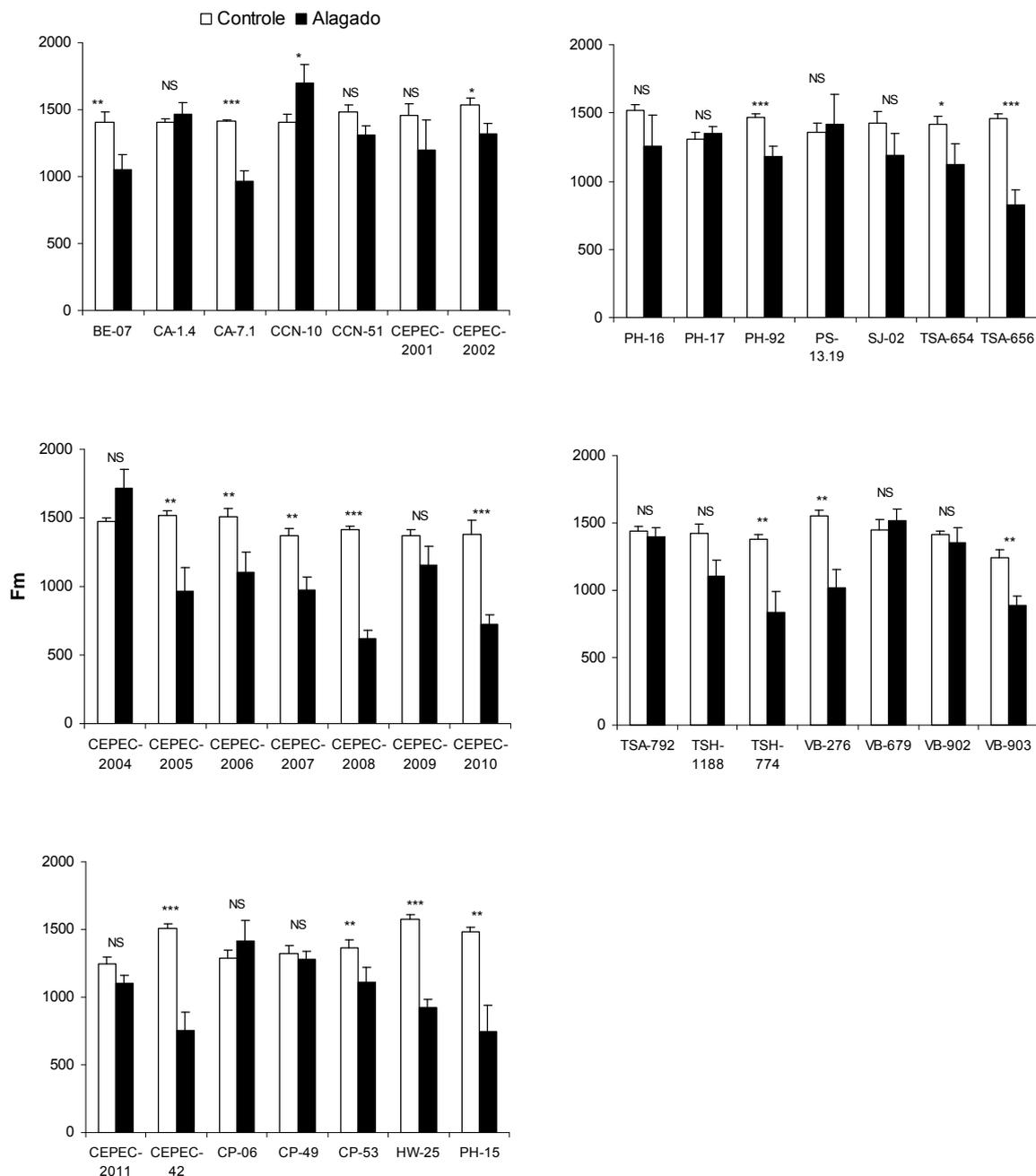


Figura 12. Fluorescência máxima ( $F_m$ ) em folhas de 35 clones de *T. cacao* submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (\* $P < 0,10$ ; \*\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,01$ ).

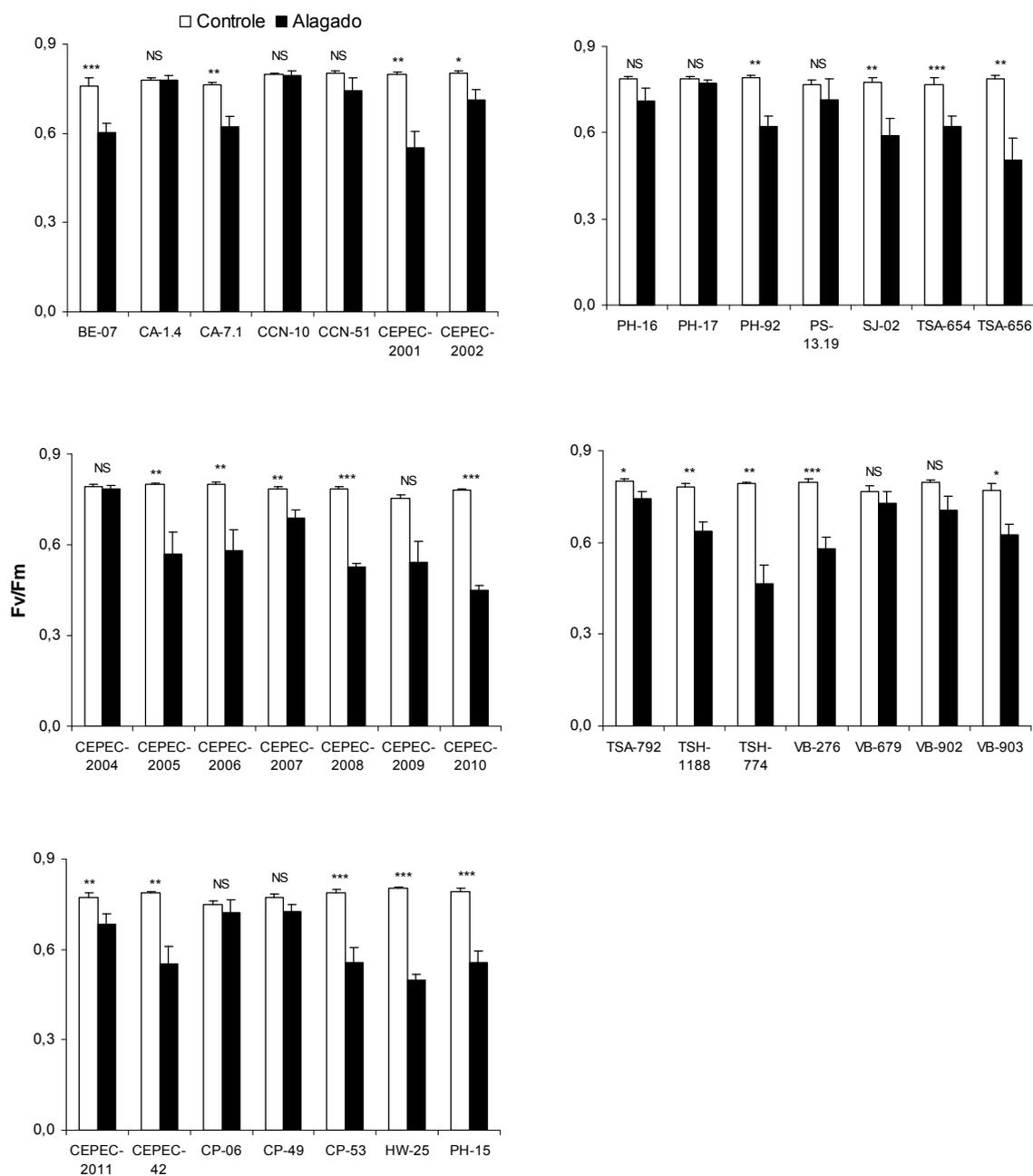


Figura 13. Rendimento quântico potencial máximo do PS-2 ( $F_v/F_m$ ) em folhas de 35 clones de *T. cacao* submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (\* $P < 0,10$ ; \*\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,01$ ).

### 4.3. Variáveis de crescimento

Aos 45 dias de alagamento do substrato observaram-se diferenças significativas entre tratamentos para biomassa seca foliar (BF), caulinar (BC), radicular (BR) e total (BT) para 29 (Figura 14), 8 (Figura 15), 66 (Figura 16) e 51% (Figura 17) dos clones de *T. cacao* estudados, respectivamente. Os menores valores de BF foram verificados para os clones, CEPEC-2007, CEPEC-2010 e VB-903 com reduções de 43, 32 e 35%, respectivamente, em relação ao controle, enquanto que para BR os menores valores foram observados para os clones CEPEC-2005, HW-25, PH-17 e TSH-774 com decréscimo de 64, 63, 60 e 61 %, respectivamente. Quanto para BT as mudas alagadas dos clones CEPEC-2004, CEPEC-2005 e HW-25 foram 30% inferiores ao controle e do TSH-774 foi 37%, sendo estes clones os que apresentaram os maiores decréscimos BT em relação ao controle. CHEN et al. (2002) verificaram que, após 50 dias de alagamento, a biomassa total, radicular e foliar em plantas alagadas de *Lepidium latifolium* L. decresceram 80, 85, e 85% em relação ao controle, respectivamente

A deficiência de O<sub>2</sub> no substrato diminui o crescimento das plantas em espécies tolerantes e não-tolerantes (PEZESHKI, 1993). Ashraf (2003), trabalhando com espécies arbóreas, constatou diminuições acentuadas na biomassa seca de folhas e raízes após 46 dias de alagamento do substrato. O decréscimo da biomassa da parte aérea em plantas submetidas a condições de anoxia, tem sido atribuído a muitos fatores, incluindo a morte de raízes com subsequente diminuição na capacidade de absorver água e nutrientes (PEZESHKI; SANTOS, 1998). Tais respostas podem ser atribuídas à redução ou mudanças no balanço hormonal entre reguladores de crescimento (CARMI; HEUER, 1981). Decréscimo na biomassa de raízes é considerado uma resposta comum ao alagamento em espécies arbóreas, que pode estar relacionado com a baixa atividade metabólica, acompanhado pela diminuição no crescimento sobre condições de anoxia (MIELKE et al., 2005). A condição de anoxia bloqueia a respiração mitocondrial, acentuando a glicólise, caracterizada pela baixa eficiência na produção de energia e pela produção de grande quantidade de piruvato, que é convertido em acetaldeído, etanol e ácido lático, compostos que

podem ser fitotóxicos em altas concentrações (DREW, 1997). Segundo Pezeshki (1994), o crescimento de raiz em certas espécies lenhosas é mais sensível à deficiência de O<sub>2</sub> no solo, do que outros órgãos da planta.

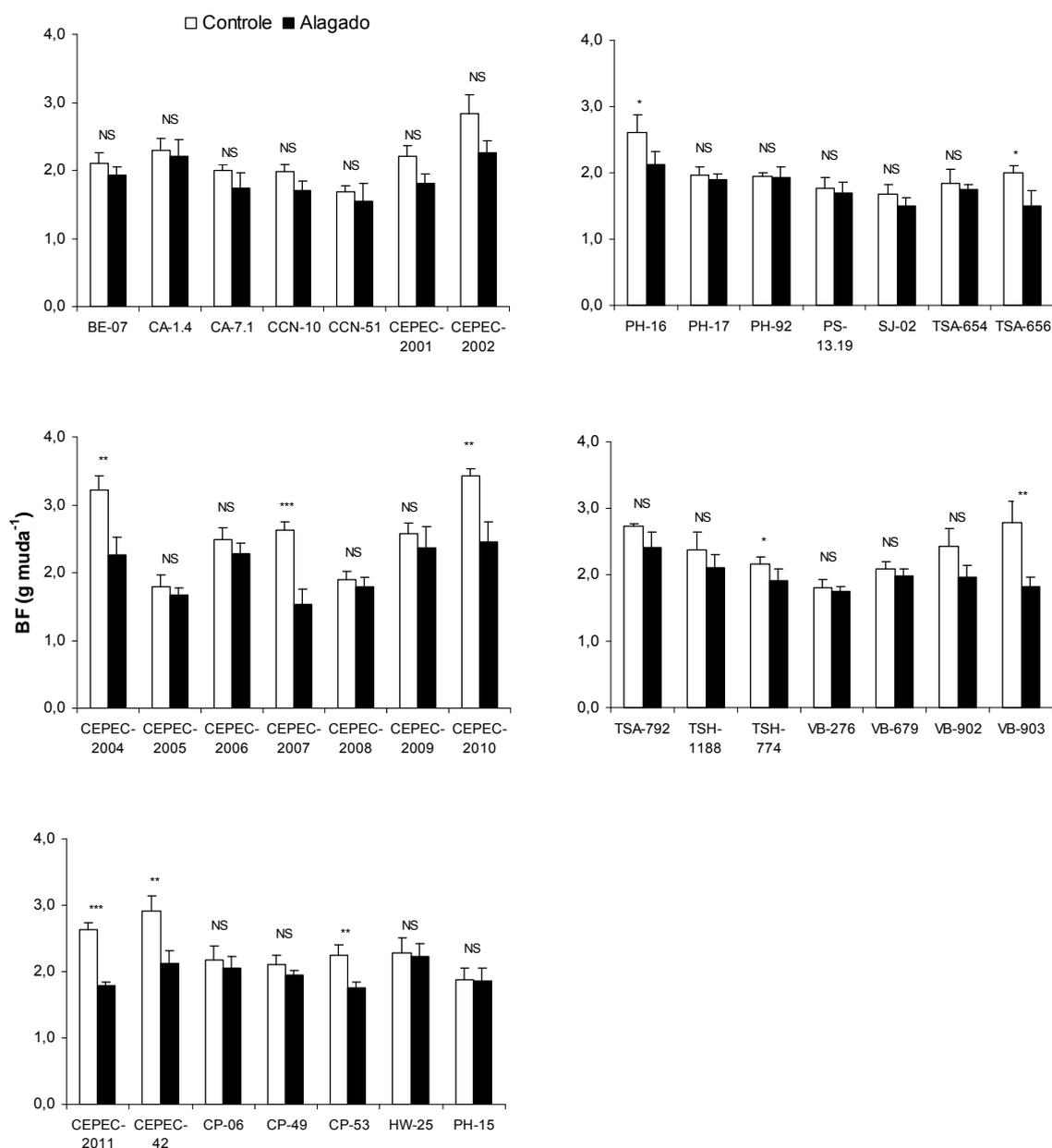


Figura 14. Biomassa seca foliar (BF) de 35 clones de *T. cacao* submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (\* $P < 0,10$ ; \*\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,01$ ).

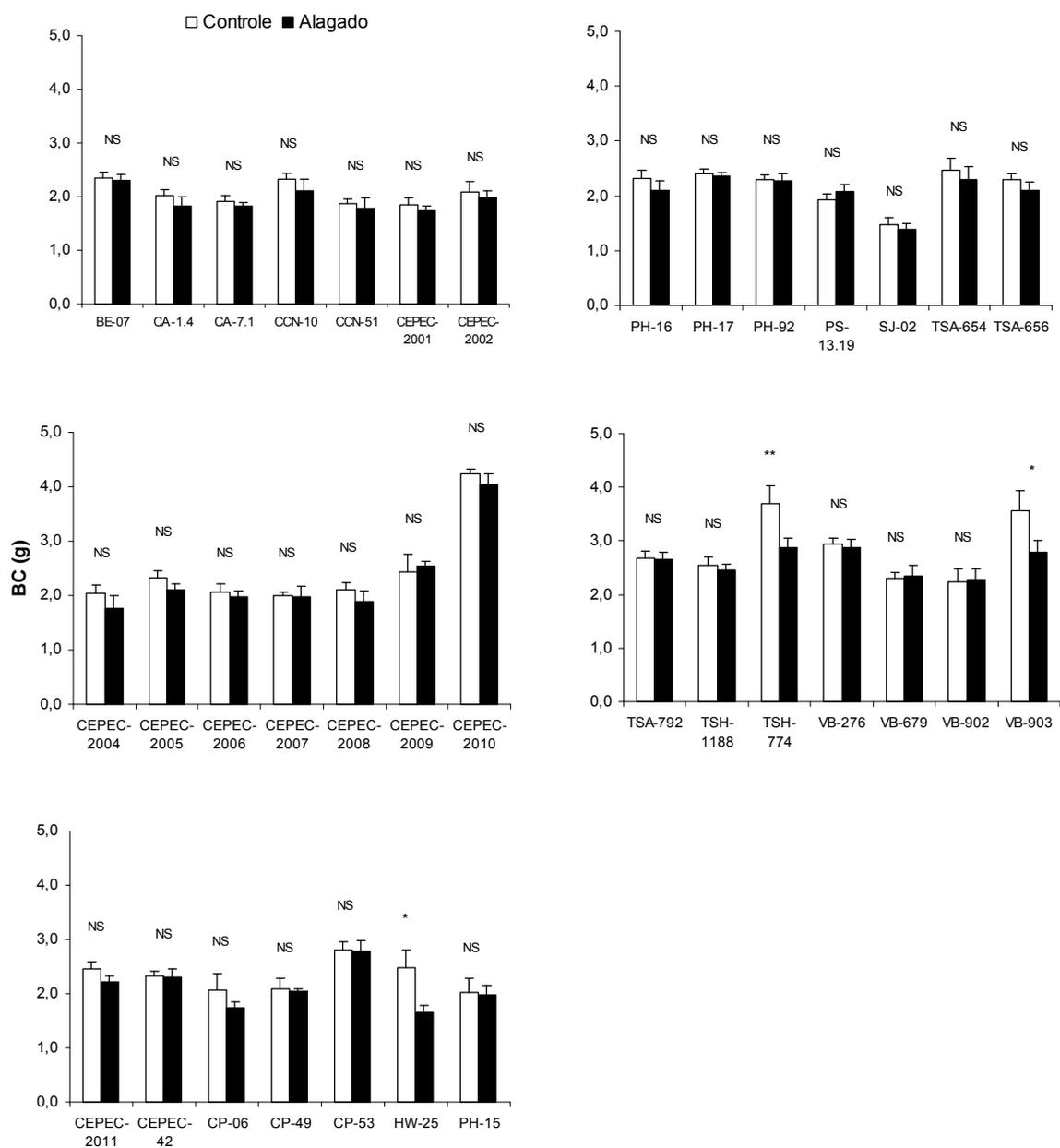


Figura 15. Biomassa seca caulinar (BC) de 35 clones de *T. cacao* submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (\* $P < 0,10$ ; \*\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,01$ ).

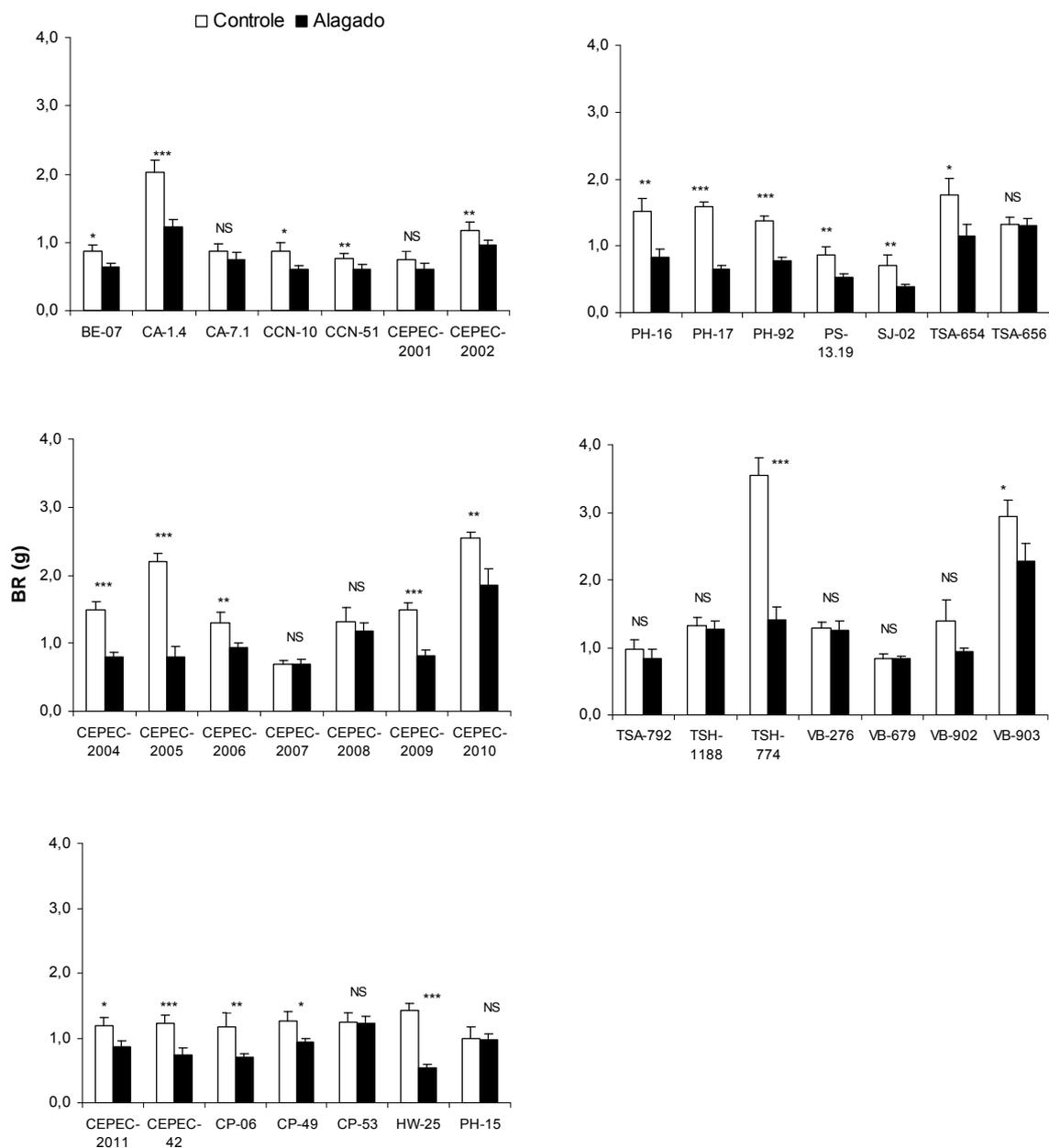


Figura 16. Biomassa seca radicular (BR) de 35 clones de *T. cacao* submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (\* $P < 0,10$ ; \*\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,01$ ).

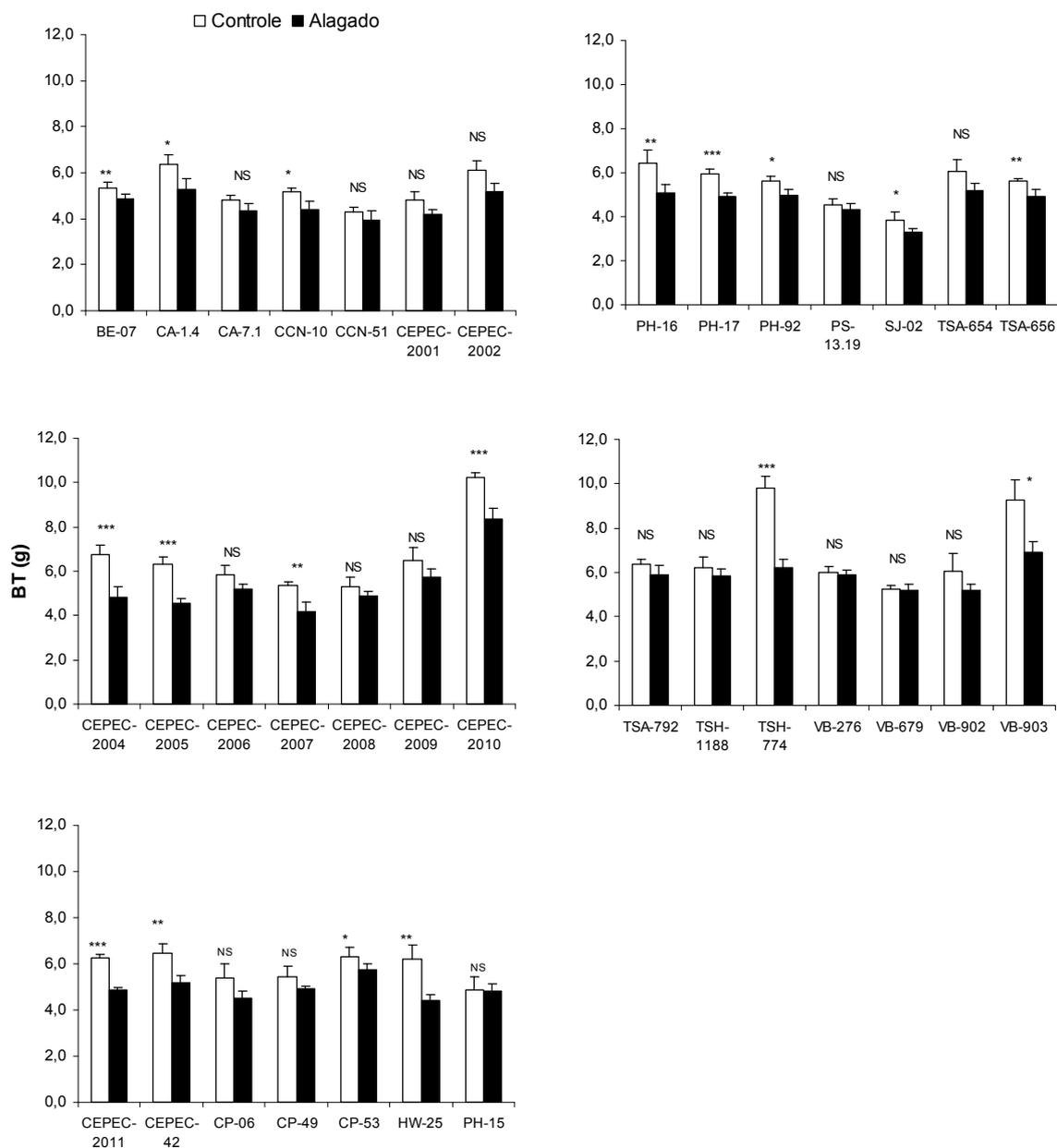


Figura 17. Biomassa seca total (BT) de 35 clones de *T. cacao* submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (\* $P < 0,10$ ; \*\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,01$ ).

O alagamento do substrato provocou mudanças no modelo de alocação de biomassa nas plantas para 48% dos clones avaliados (Figura 18). As maiores alterações na razão entre biomassa seca radicular e biomassa seca da parte aérea (R/PA) foram observadas para as plantas alagadas dos clones CEPEC-2005, HW-25, PH-17 e TSH-774, que apresentaram decréscimos de 62, 55, 60 e 58 %, respectivamente, em relação ao controle. Resultados semelhantes também foram verificados em outras espécies arbóreas (TANG; KOZLOWSKI, 1982a; PEZESHKI; SANTOS, 1998; CHEN et al., 2002). Em condições de anoxia, a modificação no modelo de alocação de biomassa corresponde a um mecanismo adaptativo a este tipo de estresse, pois o decréscimo na alocação de biomassa para raiz diminui o requerimento metabólico da mesma por O<sub>2</sub>, água e nutrientes (JOLY, 1994).

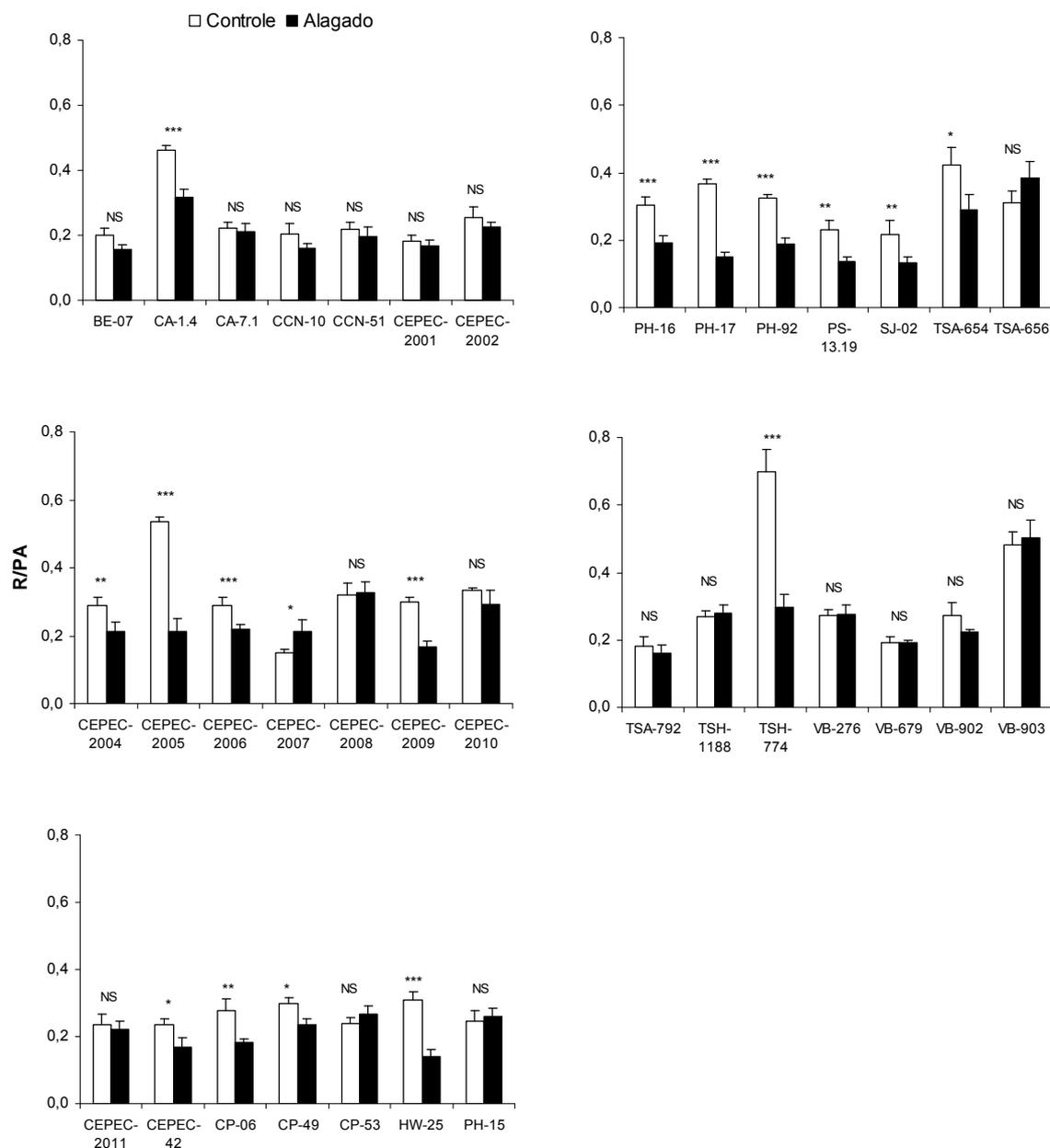


Figura 18. Razão entre biomassa seca radicular e biomassa seca da parte aérea (R/PA) de 35 clones de *T. cacao* submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (\*P < 0,10; \*\*P < 0,05; \*\*\*P < 0,01).

Houve uma redução significativa no número de folhas (NF) nos clones, em função do alagamento, principalmente para CEPEC-2004, CEPEC-2008, CEPEC-2010, PS-13.19, VB-902 e VB-903, que apresentaram uma diferença de 23, 35, 35, 25, 20 e 31%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 19). Segundo Tang e Kozlowski (1982b) o alagamento do solo inibe a formação de novas folhas e induz a abscisão foliar em mudas de *Betula papyrifera*. Esses autores observaram, após um período de 60 dias, que as plantas alagadas apresentaram um decréscimo de mais de 50% no número de folhas em relação ao controle. Resultados semelhantes também foram observados para *G. americana* (MIELKE et al., 2003) e *Schinus terebinthifolius* (MIELKE et al., 2005).

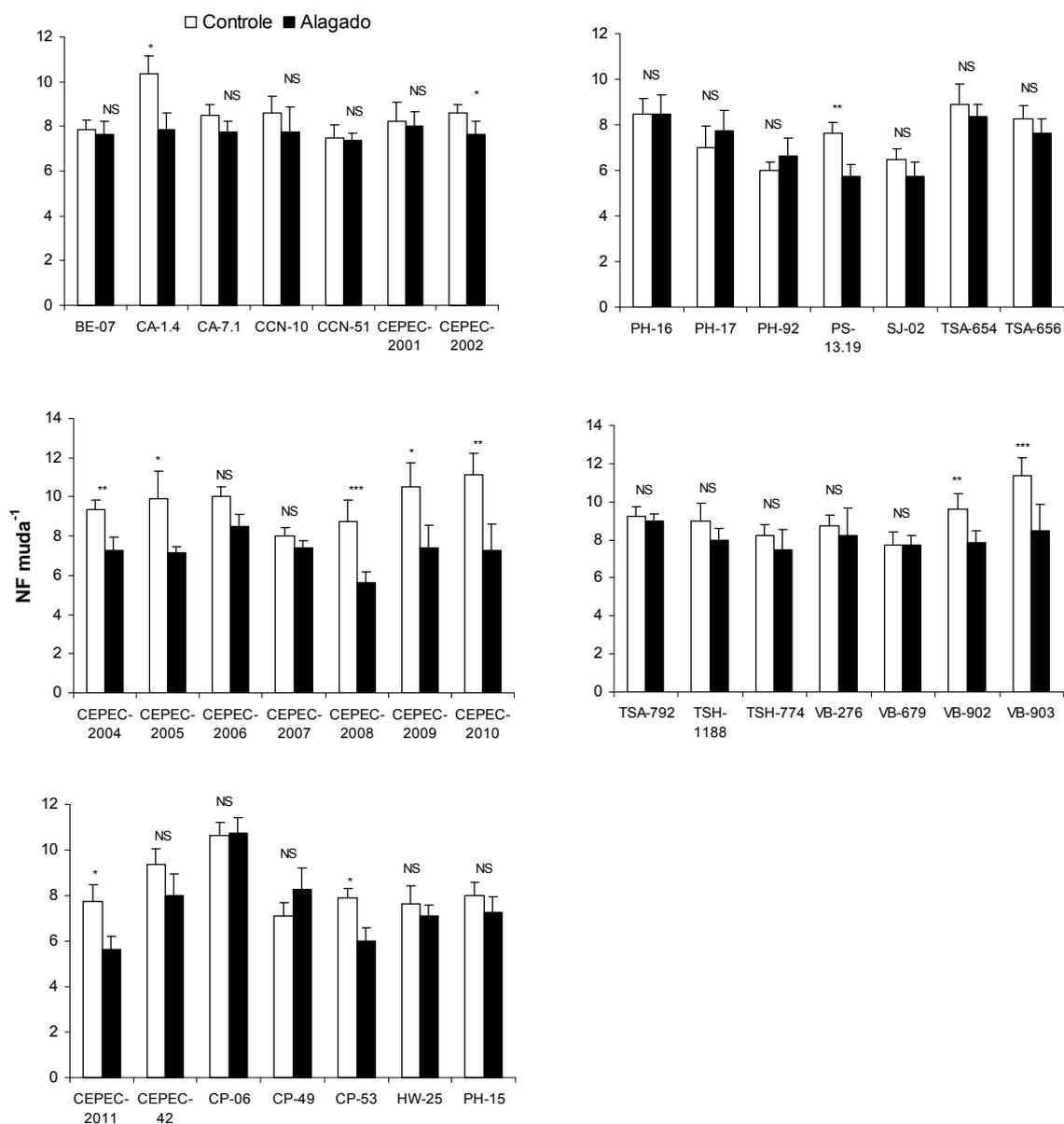


Figura 19. Número médio de folhas (NF) por muda de 35 clones de *T. cacao* submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (\* $P < 0,10$ ; \*\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,01$ ).

Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) foram observadas entre tratamentos para área foliar média por muda (AF) em cerca de 30% dos clones estudados, sendo os maiores decréscimos verificados para CEPEC-2008, CEPEC-2010, CP-53 e PH-16, que corresponderam a 31, 33, 35 e 33% de decréscimo, respectivamente, em relação ao controle (Figura 20). Resultados semelhantes foram observados para espécies arbóreas neotropicais em condições de alagamento do solo (MIELKE et al., 2003; MIELKE et al., 2005). Em *Populus* spp., a expansão foliar de mudas alagadas foi inibida por um decréscimo na extensibilidade da parede celular (SMITH; BOURNE, 1989). Em relação à AFI (Figura 21), ou seja, área foliar individual, apenas os clones CEPEC-2009, PH-16 e PH-17 apresentaram diferenças significativas entre tratamentos ( $P < 0,10$ ).

A massa foliar específica (MFE) representa a massa foliar por unidade de área. No presente trabalho observou-se decréscimos significativos ( $P < 0,10$ ) para MFE nos clones CCN-10, CEPEC-2007, PH-92 e SJ-02, com diferenças correspondentes a 15, 37, 13 e 11%, respectivamente, entre plantas alagadas e controle (Figura 22); ao passo que para os clones CEPEC-2005, CEPEC-2008, CP-53, PH-15, PH-16 e VB-903 foi verificado um incremento significativo ( $P < 0,10$ ) de 25, 39, 18, 28, 17 e 12%, respectivamente, para MFE nas mudas alagadas (Figura 22). Mielke et al. (2003) em seu estudo com *G. americana*, constatou após 21 dias de alagamento do substrato um aumento de 21% em MFE nas mudas alagadas. De acordo com Almeida e Valle (1988) o decréscimo em MFE pode ser um mecanismo adaptativo de clones de *T. cacao*, pois o acréscimo de MFE representa um aumento da resistência difusiva ao  $CO_2$ , devido ao espessamento foliar, que está associado com o grande número e tamanho das células paliádicas e do mesofilo. Assim plantas que apresentam aumento de MFE, em resposta ao estresse por anoxia, conseqüentemente apresentam diminuições em  $g_s$  e  $A$ , ou seja, ocorre um decréscimo na eficiência fotossintética, como foi verificado no presente trabalho para os clones CEPEC-2005, CEPEC-2008, CP-53, PH-15, PH-16 e VB-903.

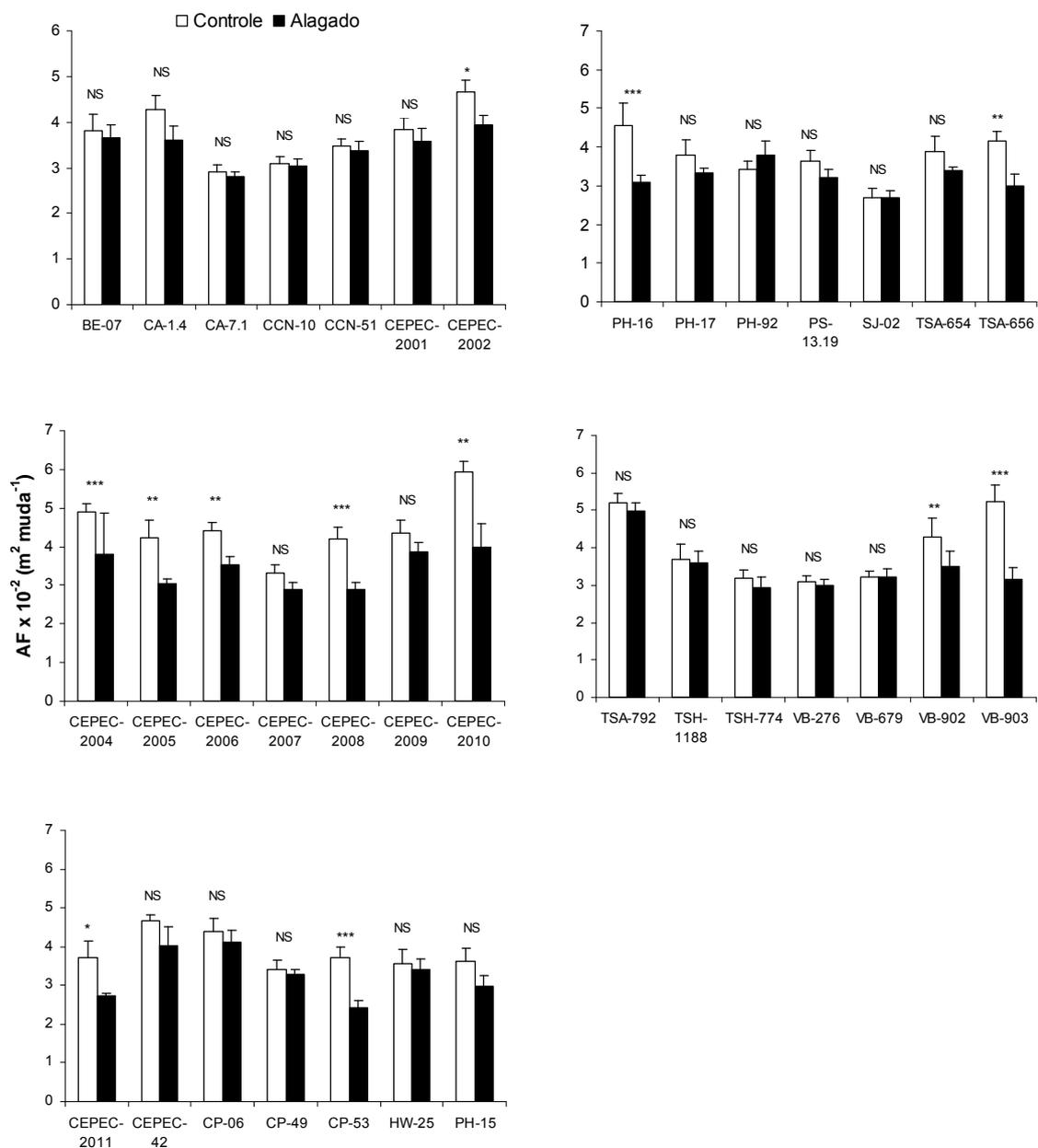


Figura 20. Área foliar média por muda (AF) de 35 clones de *T. cacao* submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (\*P < 0,10; \*\*P < 0,05; \*\*\*P < 0,01).

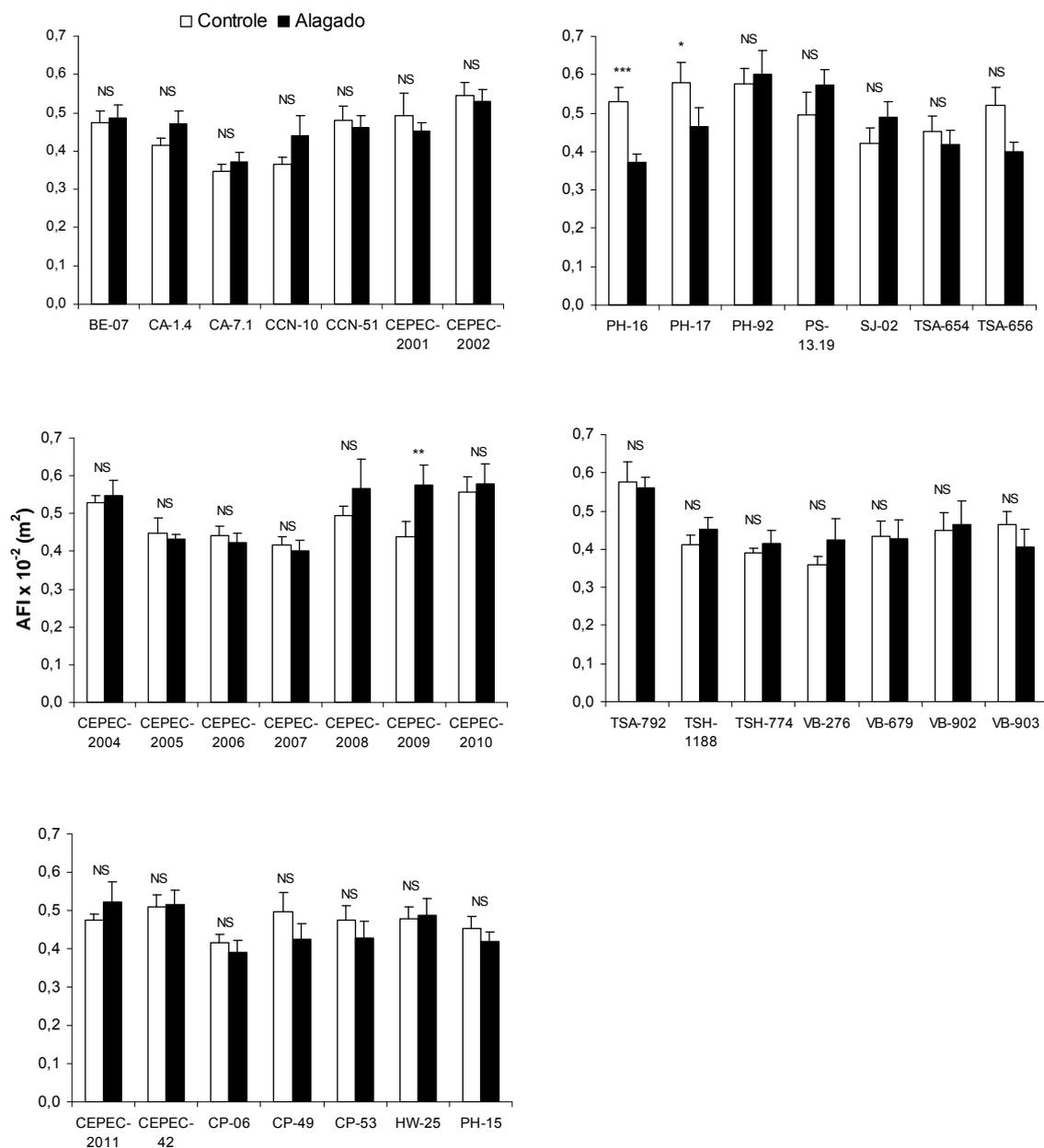


Figura 21. Área foliar média individual (AFI) de 35 clones de *T. cacao* submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (\*P < 0,10; \*\*P < 0,05; \*\*\*P < 0,01).

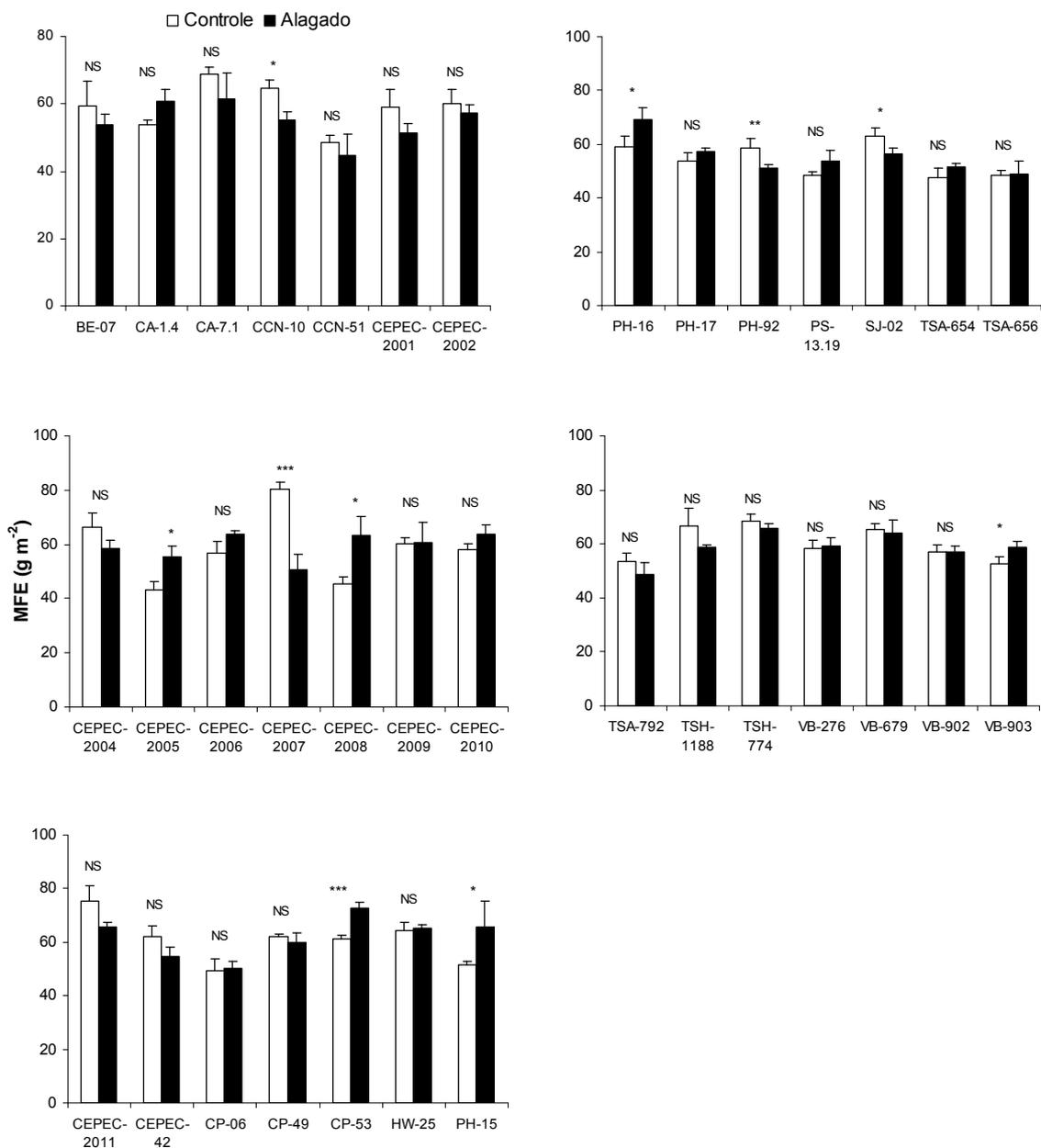


Figura 22. Massa foliar específica (MFE) de 35 clones de *T. cacao* submetidos ao alagamento do substrato por 45 dias. A significância estatística entre os tratamentos alagado e controle foi obtida por meio do test-t (\*P < 0,10; \*\*P < 0,05; \*\*\*P < 0,01).

#### **4.4. Análise de agrupamento por similaridade entre as variáveis fisiológicas**

A análise de agrupamento, baseada na similaridade a partir da razão entre os tratamentos alagado e controle para as variáveis fisiológicas avaliadas após 45 dias de alagamento do substrato, mostrou a existência de variabilidade (Tabelas 2 e 3) entre os 35 clones de *T. cacao* e a formação de seis grupos principais (Figura 23), sendo que dois grupos apresentaram três clones (CEPEC-2002, CEPEC-42, CP-49, e, CEPEC-2010, TSA-656, TSH-774), um grupo apresentou dois clones (CA-1.4 e CEPEC-2006) e dois grupos apenas um clone, BE-07, e, CCN-10, e o sexto grupo 71 % dos clones avaliados. Observou-se, ainda, associação entre a similaridade baseada nas variáveis fisiológicas e a tolerância ou susceptibilidade ao alagamento do solo, com o agrupamento de clones mais tolerantes (CCN-51, TSA-792 e PH-17) e de clones menos tolerantes (CEPEC-2010, TSA-656 e TSH-774) ao alagamento do substrato.

Tabela 2. Valores percentuais médios de fotossíntese líquida por unidade de área foliar ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), condutância estomática ao vapor de água ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), transpiração foliar ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), eficiência intrínseca do uso da água ( $A/g_s$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ ), eficiência instantânea do uso de água ( $WUE$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O}$ ), razão entre as concentrações interna ( $C_i$ ) e atmosférica ( $C_a$ ) de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ), fluorescência inicial ( $F_0$ , unidade relativa), fluorescência máxima ( $F_m$ , unidade relativa) e rendimento quântico potencial máximo ( $F_v/F_m$ ) das mudas alagadas em relação ao controle, de 23 clones de *T. cacao*

Clone	$A$	$G_s$	$E$	$A/g_s$	$WUE$	$C_i/C_a$	$F_0$	$F_m$	$F_v/F_m$
BE-07	75,30 ± 1,82 c	182,65 ± 10,57 <sup>a</sup>	180,72 ± 19,75a	80,11 ± 1,68 c	237,75 ± 16,74ab	73,20 ± 1,77 cde	122,11 ± 3,30 bcd	74,03 ± 5,25 fgh	79,40 ± 2,20cde
CA-1.4	3,67 ± 1,06 j	21,38 ± 3,57 fg	21,37 ± 3,53 de	171,93 ± 14,32a	144,09 ± 15,62 bcd	21,67 ± 9,01 e	103,22 ± 3,41 d	104,01 ± 4,62abc	100,00 ± 0,98a
CA-7.1	36,88 ± 3,53 defghi	32,35 ± 4,30 efg	33,25 ± 2,39 de	91,34 ± 7,95 c	91,76 ± 8,83 cde	118,99 ± 17,24 bcd	105,60 ± 2,06 d	68,02 ± 5,31fgh	81,64 ± 3,53bcd
CCN-10	138,81 ± 22,35 a	68,63 ± 19,82 cde	61,90 ± 16,91cd	63,72 ± 8,08 c	42,26 ± 4,15 e	218,19 ± 25,60a	119,49 ± 4,23 bcd	120,37 ± 7,05a	102,74 ± 3,07a
CEPEC-2001	30,85 ± 2,65 efghij	26,92 ± 2,16 efg	28,85 ± 1,08 de	86,93 ± 13,76 c	94,43 ± 2,13 cde	116,05 ± 11,35 bcd	171,95 ± 23,52a	80,15 ± 11,68efg	69,05 ± 6,00def
CEPEC-2002	65,76 ± 2,53 cd	114,73 ± 21,18 b	106,54 ± 11,28 b	156,85 ± 30,01ab	161,34 ± 13,39 bc	64,65 ± 13,14 cde	121,25 ± 3,04 bcd	85,91 ± 3,99cdef	88,99 ± 3,34abc
CEPEC-2004	26,21 ± 5,05 ghij	24,47 ± 10,82 efg	24,81 ± 7,84 de	84,80 ± 13,57 c	90,63 ± 11,28 cde	138,33 ± 34,25abc	119,98 ± 4,12 bcd	116,04 ± 7,75ab	98,76 ± 1,40a
CEPEC-2007	26,30 ± 6,94 ghij	15,50 ± 4,46 fg	16,47 ± 5,09 e	73,75 ± 11,72 c	61,15 ± 6,02 de	182,60 ± 30,87ab	100,85 ± 3,44 d	70,98 ± 3,79fgh	87,95 ± 2,41abc
CEPEC-2009	40,35 ± 4,82 defgh	35,07 ± 4,46 efg	35,49 ± 6,04 de	88,20 ± 11,51 c	87,24 ± 7,81cde	118,29 ± 16,41 bcd	149,44 ± 4,28ab	83,91 ± 7,11 cdef	71,47 ± 8,22def
CP-06	59,81 ± 7,87 cde	32,79 ± 4,57 efg	34,01 ± 4,07 de	74,21 ± 2,64 c	57,76 ± 5,88 de	184,00 ± 5,18ab	115,66 ± 4,62 bcd	108,76 ± 7,51ab	96,46 ± 4,32ab
CP-49	45,35 ± 3,88 defg	58,83 ± 8,90 cdef	61,80 ± 7,37 cd	109,30 ± 1,03abc	135,12 ± 3,84 cde	78,52 ± 1,28 cde	115,23 ± 3,19 bcd	96,54 ± 1,30 bcde	93,94 ± 1,83abc
CP-53	15,14 ± 5,01 hij	13,33 ± 1,45 g	14,76 ± 2,76 e	98,12 ± 6,92 bc	123,17 ± 28,47 cde	99,43 ± 16,89 bcde	164,44 ± 11,94a	80,59 ± 6,04 defg	70,60 ± 5,48 def
HW-25	29,72 ± 9,95 fghij	27,21 ± 4,65 efg	30,39 ± 6,45 de	85,38 ± 37,56 c	105,90 ± 7,60 cde	112,28 ± 49,14 bcd	147,86 ± 11,31abc	58,17 ± 6,65 gh	61,83 ± 4,57f
PH-16	57,21 ± 2,34 cdef	45,88 ± 1,20 defg	47,11 ± 3,70 cde	95,00 ± 11,20 bc	82,13 ± 6,27cde	127,06 ± 23,18 bcd	104,38 ± 13,11 d	82,07 ± 11,73 cdef	90,12 ± 4,15abc
PH-17	108,58 ± 8,73 b	91,27 ± 5,40 bc	83,01 ± 7,43 bc	88,55 ± 11,47 c	75,81 ± 2,35 cde	124,39 ± 15,10 bcd	109,81 ± 2,76 d	102,93 ± 12,54abcd	98,32 ± 4,59a
PS-13.19	25,85 ± 3,00 ghij	27,88 ± 1,35 efg	29,58 ± 2,41 de	108,25 ± 6,61 bc	168,40 ± 3,19 bc	90,93 ± 17,68 cde	113,74 ± 13,38 cd	102,96 ± 3,99abcd	92,82 ± 4,10abc
TSA-654	35,86 ± 4,38 efghi	35,74 ± 2,39 defg	37,97 ± 2,48 de	100,42 ± 2,77 bc	105,60 ± 8,55 cde	100,50 ± 8,86 bcde	126,07 ± 14,14 bcd	78,34 ± 8,37 efg	80,88 ± 7,01 bcd
TSA-656	7,70 ± 1,18 ij	18,18 ± 0,98 fg	19,73 ± 2,68 de	122,59 ± 10,46abc	266,77 ± 4,89a	43,56 ± 3,75 de	124,28 ± 6,72 bcd	56,15 ± 8,04 h	63,81 ± 2,50ef
TSA-792	78,18 ± 1,19 c	80,78 ± 1,57 bcd	82,19 ± 1,65 bc	103,28 ± 3,03 bc	106,62 ± 31,11 cde	95,56 ± 7,93 bcde	124,76 ± 2,12 bcd	97,15 ± 6,47 bcde	92,89 ± 9,16abc
TSH-1188	32,54 ± 7,83 efghij	24,54 ± 2,97 efg	26,04 ± 7,61 de	82,50 ± 2,05 c	78,08 ± 8,42 cde	150,04 ± 3,47abc	126,63 ± 9,05 bcd	77,16 ± 3,00 efg	81,48 ± 1,79 bcd
TSH-774	10,48 ± 1,82 ij	28,12 ± 2,61 efg	29,50 ± 4,12 de	147,71 ± 15,82ab	285,92 ± 8,50a	37,94 ± 42,61e	145,48 ± 5,39abc	60,05 ± 4,20 gh	58,69 ± 2,40f
VB-276	24,62 ± 2,09 ghij	27,79 ± 5,90 efg	27,35 ± 5,55 de	119,97 ± 7,25abc	110,14 ± 18,75 cde	115,85 ± 3,87 bcd	131,92 ± 2,44 bcd	64,98 ± 10,16fgh	72,51 ± 7,05 bcd
VB-903	25,61 ± 5,23 ghij	24,68 ± 6,75 efg	22,90 ± 4,82 de	91,70 ± 1,02 bc	85,27 ± 2,98 cde	111,11 ± 2,34 bcd	117,16 ± 6,46 bcd	71,57 ± 6,12 fgh	80,95 ± 4,97 bcd

Médias de quatro repetições ± E.P. Comparação de médias pelo Teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Para cada variável letras minúsculas indicam comparação entre clones de *T. cacao*.

Tabela 3. Valores percentuais médios de biomassa seca de folha (BF, g), caule (BC, g), raiz (BR, g) e total (BT, g), razão entre a biomassa seca de raiz e da parte aérea (R/PA), número de folhas (NF), área foliar (AF, m<sup>2</sup> muda<sup>-1</sup>), área foliar individual (AFI, m<sup>2</sup>) e massa foliar específica (MFE, g m<sup>-2</sup>) das mudas alagadas em relação ao controle, de 23 clones de *T. cacao*.

Clone	BF	BC	BR	BT	R/PA	NF	AF	AFI	MFE
BE-07	91,37 ± 1,43abcde	98,74 ± 2,63ab	73,91 ± 1,16 cdefg	78,17 ± 3,61 cde	96,48 ± 4,25abc	91,62 ± 1,38a	98,50 ± 3,41a	102,85 ± 3,75 bcdef	95,23 ± 7,23ab
CA-1.4	85,49 ± 10,67 bcde	96,59 ± 2,50abc	85,83 ± 4,43abc	95,50 ± 3,83ab	91,34 ± 3,80abc	90,62 ± 5,97a	96,77 ± 3,78a	106,61 ± 3,86 bcdef	88,34 ± 10,69abc
CA-7.1	94,48 ± 5,35 def	89,60 ± 4,06ab	61,24 ± 3,24efgh	67,20 ± 3,89efg	75,80 ± 4,30abc	82,57 ± 3,32ab	84,09 ± 2,26abcd	112,63 ± 4,37abcd	112,23 ± 5,22ab
CCN-10	84,63 ± 3,33 bcdef	89,64 ± 4,74abc	72,72 ± 3,85cdefg	84,26 ± 5,49 cde	86,93 ± 5,51abc	84,66 ± 4,71ab	98,75 ± 1,51a	117,36 ± 8,70abc	85,39 ± 1,49 bc
CEPEC-2001	82,83 ± 2,51ab	95,42 ± 3,15abc	82,37 ± 3,75abcde	93,22 ± 3,58a	98,72 ± 3,53abc	87,45 ± 2,02ab	93,19 ± 2,90ab	95,68 ± 5,20 defgh	89,61 ± 4,44abc
CEPEC-2002	88,97 ± 15,07 bcdef	97,86 ± 5,28abc	82,75 ± 2,19abcd	97,19 ± 9,24a	87,62 ± 3,87abc	85,81 ± 1,97ab	84,44 ± 1,23abcd	97,01 ± 1,57 cdefgh	96,47 ± 3,15ab
CEPEC-2004	98,67 ± 7,47 cdef	90,31 ± 2,73 bc	35,32 ± 4,60 ghi	38,79 ± 5,45def	79,21 ± 7,32 bc	72,79 ± 1,33 b	77,23 ± 7,08 bcd	98,88 ± 4,71 bcdef	129,29 ± 3,08abc
CEPEC-2007	95,05 ± 5,57abcde	89,35 ± 3,54 c	98,11 ± 8,11a	103,67 ± 4,13a	66,31 ± 5,84abc	94,43 ± 5,39ab	69,70 ± 2,05abc	111,02 ± 10,23defgh	136,84 ± 8,64 c
CEPEC-2009	70,25 ± 7,06 f	94,95 ± 2,81ab	71,60 ± 7,24 ghi	86,44 ± 9,40fgh	62,63 ± 5,71a	81,28 ± 3,08ab	65,29 ± 7,18abc	102,47 ± 3,82a	108,98 ± 2,69ab
CP-06	93,62 ± 3,17a	101,93 ± 7,69ab	75,85 ± 3,67 bcdef	78,13 ± 2,67 cdef	113,97 ± 4,51abc	93,10 ± 5,80a	97,96 ± 3,18a	86,61 ± 3,42 ghi	96,21 ± 4,29ab
CP-49	78,83 ± 3,61 ef	98,82 ± 4,47abc	101,62 ± 7,77a	111,07 ± 3,37a	75,34 ± 4,15abc	92,63 ± 3,26a	67,13 ± 4,33 d	89,37 ± 3,77 fghi	118,36 ± 1,95a
CP-53	97,53 ± 4,62ab	91,15 ± 7,46ab	66,99 ± 7,09 cdefg	72,70 ± 6,98def	101,25 ± 4,39	85,56 ± 3,89ab	94,45 ± 2,07ab	94,00 ± 2,55defgh	103,28 ± 4,08ab
HW-25	98,59 ± 4,54abcde	75,31 ± 11,84ab	37,21 ± 1,58 i	44,43 ± 2,73 gh	96,92 ± 6,06 c	74,62 ± 5,56ab	95,82 ± 2,03a	100,66 ± 3,45 bcdefg	102,61 ± 3,01ab
PH-16	97,74 ± 2,35ab	99,14 ± 2,53abc	40,76 ± 3,18 fghi	41,07 ± 2,50efg	114,40 ± 5,21abc	82,72 ± 1,32ab	92,54 ± 6,59 cd	80,50 ± 3,01i	107,64 ± 3,37a
PH-17	97,65 ± 6,54 <sup>a</sup>	99,57 ± 2,14ab	56,50 ± 1,60 hi	57,94 ± 3,47 h	108,93 ± 7,80abc	88,71 ± 2,05ab	109,80 ± 4,36ab	102,48 ± 4,15ghi	88,35 ± 2,88ab
PS-13.19	96,62 ± 3,04 ef	108,31 ± 2,14ab	62,97 ± 5,00 defg	61,35 ± 3,71efg	75,46 ± 3,32ab	94,36 ± 2,44a	89,57 ± 3,10abc	121,37 ± 8,88ab	109,32 ± 6,06ab
TSA-654	102,37 ± 9,58abcd	92,51 ± 4,58a	65,21 ± 3,61 cdefg	68,46 ± 3,52 defg	97,35 ± 4,76abc	86,78 ± 2,56ab	91,70 ± 7,32ab	93,72 ± 4,09defgh	112,78 ± 9,20ab
TSA-656	72,78 ± 7,83 bcde	90,35 ± 2,82abc	98,67 ± 1,92a	121,06 ± 5,14a	91,93 ± 2,47abc	86,93 ± 4,42ab	72,15 ± 5,21cd	77,47 ± 1,94hi	100,01 ± 7,17ab
TSA-792	87,80 ± 6,96abc	99,56 ± 1,61abc	84,54 ± 3,92abc	90,59 ± 3,43 bcd	97,61 ± 1,57abc	92,07 ± 3,54a	96,28 ± 1,36a	99,26 ± 4,08 cdefg	89,93 ± 3,93abc
TSH-1188	90,70 ± 3,37 bcde	97,67 ± 3,39ab	95,22 ± 3,87ab	101,65 ± 3,99a	90,77 ± 5,26abc	94,81 ± 4,16a	99,85 ± 4,99a	110,52 ± 2,05abcde	93,90 ± 9,07ab
TSH-774	87,41 ± 3,74 bcdef	80,39 ± 4,79abc	34,48 ± 3,02 i	41,16 ± 2,72 h	88,26 ± 6,86 bc	63,19 ± 1,99 c	90,08 ± 3,42ab	105,14 ± 6,26 bcdef	97,01 ± 1,95ab
VB-276	97,71 ± 2,66 bcde	98,27 ± 2,20ab	98,58 ± 6,67a	100,09 ± 4,61 bcd	90,58 ± 11,22abc	97,98 ± 1,41a	96,54 ± 1,87a	115,47 ± 10,01abc	101,23 ± 2,07ab
VB-903	67,63 ± 3,33 ef	82,31 ± 6,36 bc	76,59 ± 3,67 bcdef	103,65 ± 7,45a	72,51 ± 7,10 bc	76,29 ± 3,76ab	59,75 ± 1,31d	85,88 ± 4,73efghi	112,69 ± 2,66ab

Médias de oito repetições ± E.P. Comparação de médias pelo Teste de Tukey (P < 0,05). Para cada variável letras minúsculas indicam comparação entre clones de *T. cacao*.

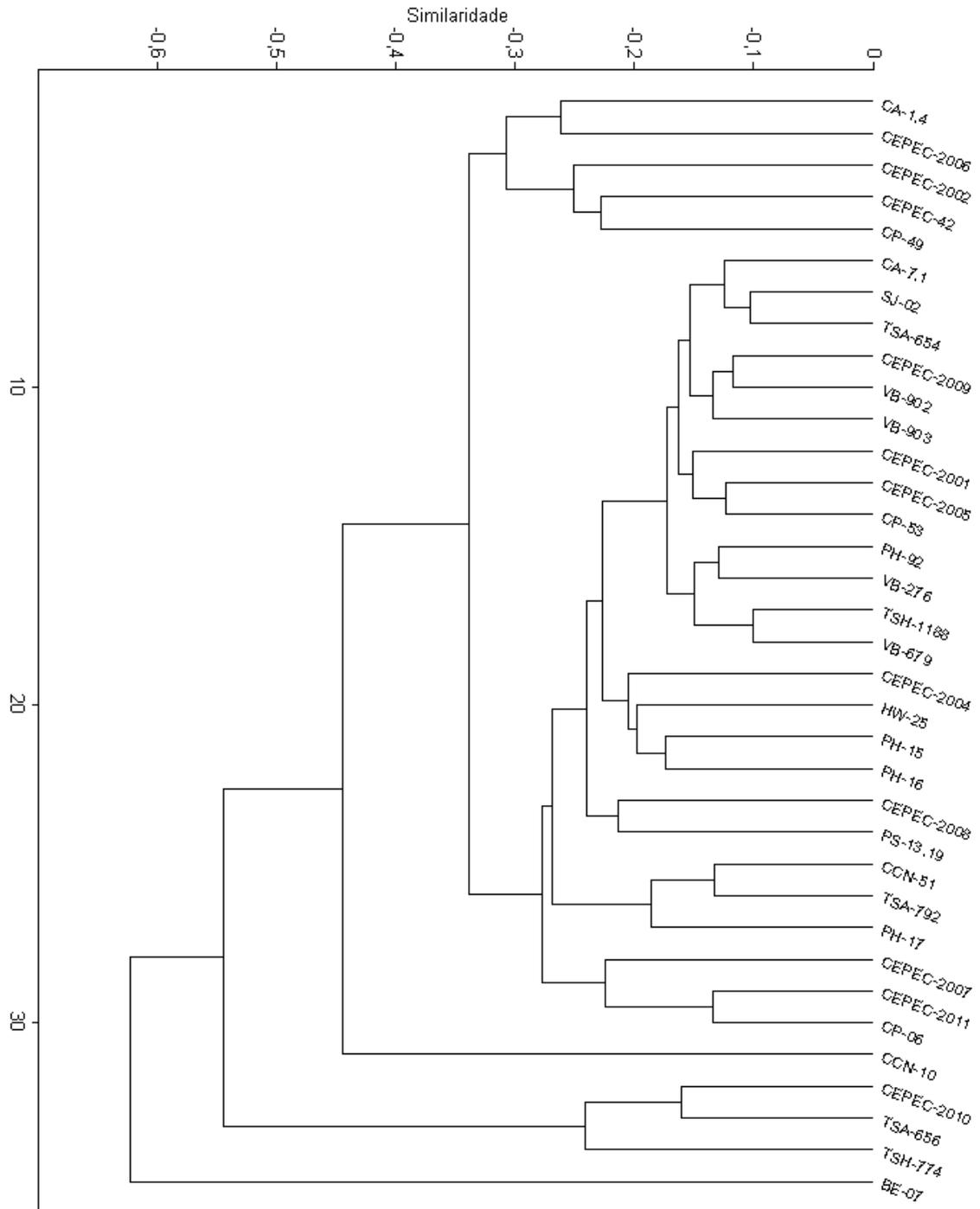


Figura 23. Análise de agrupamento de 35 clones de *T. cacao* submetidos ao alagamento do substrato durante 45 dias, baseada na distância Euclidiana, a partir da razão entre os tratamentos alagado e controle para as variáveis fisiológicas avaliadas ( $A$ ,  $gs$ ,  $E$ ,  $Ci/Ca$ ,  $WUE$ ,  $A/gs$ ,  $F_o$ ,  $F_m$ ,  $F_v/F_m$ ,  $BF$ ,  $BC$ ,  $BR$ ,  $BT$ ,  $R/PA$ ,  $NF$ ,  $AF$ ,  $AFI$ ,  $MFE$ ), utilizando o método UPGMA.

#### 4.5. Análise de diversidade genética

Os 18 pares de *primers* específicos para microssatélites usados neste estudo geraram um total de 291 alelos, com uma média de 16,17 alelos por loco (Tabela 2), superior às observadas em outros trabalhos de estudo de diversidade genética utilizando marcadores microssatélites e eletroforese em gel de agarose a 3% (FALEIRO et al., 2004a; FALEIRO et al., 2004b) e até mesmo em trabalho com microssatélites em que foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (LEAL, 2004). A utilização de géis de alta resolução na eletroforese possibilita a obtenção de uma média maior de alelos por loco, a exemplo do gel de poliacrilamida a 5% empregado neste trabalho, que permite separar fragmentos diferentes em apenas 1 pb, enquanto que o gel de agarose separa apenas alelos com diferenças acima de 5 pb. Segundo Risterucci et al. (2000), o uso de oito locos microssatélites seria suficiente para uma caracterização inicial de acessos de *T. cacao*, contudo o uso de 15 locos seria necessário para uma diferenciação de acessos altamente relacionados. O grande número de alelos encontrados entre os materiais analisados pode ser explicado pelas múltiplas procedências das variedades de *T. cacao*, em geral desenvolvidas a partir de materiais de diferentes procedências.

Tabela 4. Padrão por *primer* microssatélite, número de alelos e classificação do tamanho dos alelos em pares de bases amplificados em amostras de DNA dos 46 clones de *T. cacao*

<b>Loco</b>	<b>Padrão*</b>	<b>Nº</b>	<b>Alelos (pb)</b>
AJ 271827	235	10	222, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 256,
AJ 271942	150	21	165, 169, 173, 177, 179, 187, 201, 203, 205, 209, 211, 213, 215, 217, 221, 223, 225, 229, 231, 233, 239
AJ 271944	232	20	177, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 215, 219, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 249, 253, 255, 287
AJ 271945	206	13	198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 250,
AJ 271946	178	14	151, 159, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 193, 195
AJ 271953	165	15	140, 144, 150, 152, 154, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 180
AJ 271956	253	12	244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 282, 284, 288
Y 16883	143	24	119, 125, 129, 133, 135, 137, 139, 141, 145, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 165, 167, 169, 173, 175, 179, 181, 199, 205
Y 16977	249	20	130, 141, 143, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 245, 251, 271
Y 16978	254	9	233, 239, 241, 243, 247, 249, 253, 255, 257
Y 16980	231	15	215, 225, 227, 229, 231, 233, 237, 239, 241, 243, 249, 251, 255, 259
Y 16981	160	22	128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 174
Y 16982	301	23	256, 262, 270, 278, 282, 284, 288, 290, 292, 294, 296, 298, 300, 304, 306, 308, 310, 314, 316, 348, 356, 366, 372
Y 16983	274	21	228, 242, 244, 250, 254, 256, 262, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290, 292, 294, 296, 298
Y 16984	208	7	200, 202, 204, 206, 208, 210, 212
Y 16985	298	14	267, 273, 289, 291, 299, 301, 303, 305, 309, 313, 315, 317, 319, 329
Y 16986	188	20	153, 155, 187, 189, 193, 195, 199, 201, 203, 205, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227
Y 16987	258	11	169, 221, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267

\*Padrão: tamanho do fragmento clonado que foi utilizado para desenhar o par de *primers*, disponíveis no [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

A análise de agrupamento baseada na similaridade genética mostrou a existência de variabilidade genética entre os 46 clones de *T. cacao* e a formação de três grupos quando se faz um corte a 25 % de similaridade genética (Figura 24), sendo que um dos grupos apresentou apenas dois dos acessos (TSA-654 e TSA-656) e os outros dois grupos 50% e 45% dos acessos em cada. As variedades clonais TSA-654 e TSA-656 apresentaram-se agrupadas entre si e distantes em relação às demais, similar ao encontrado por Faleiro et al. (2001), o que seria esperado considerando-se que são irmãs completas, obtidas do cruzamento entre IMC-67 e SCA-6 (PINTO; PIRES, 1998).

O grupo com 50% dos acessos clonais encontra-se subdividido em quatro subgrupos, sendo que em um deles verifica-se a proximidade entre os acessos PH-16 e TSH-1188, e em outro a proximidade entre TSH-565, TSH-516 e EET-397, semelhante ao observado por Leal (2004). No grupo com 45% dos acessos clonais pôde-se observar a formação de três subgrupos, em um desses subgrupos, por exemplo, os clones SJ-02 e CEPEC-42 encontram-se inter-relacionados, como encontrado por Faleiro et al. (2001).

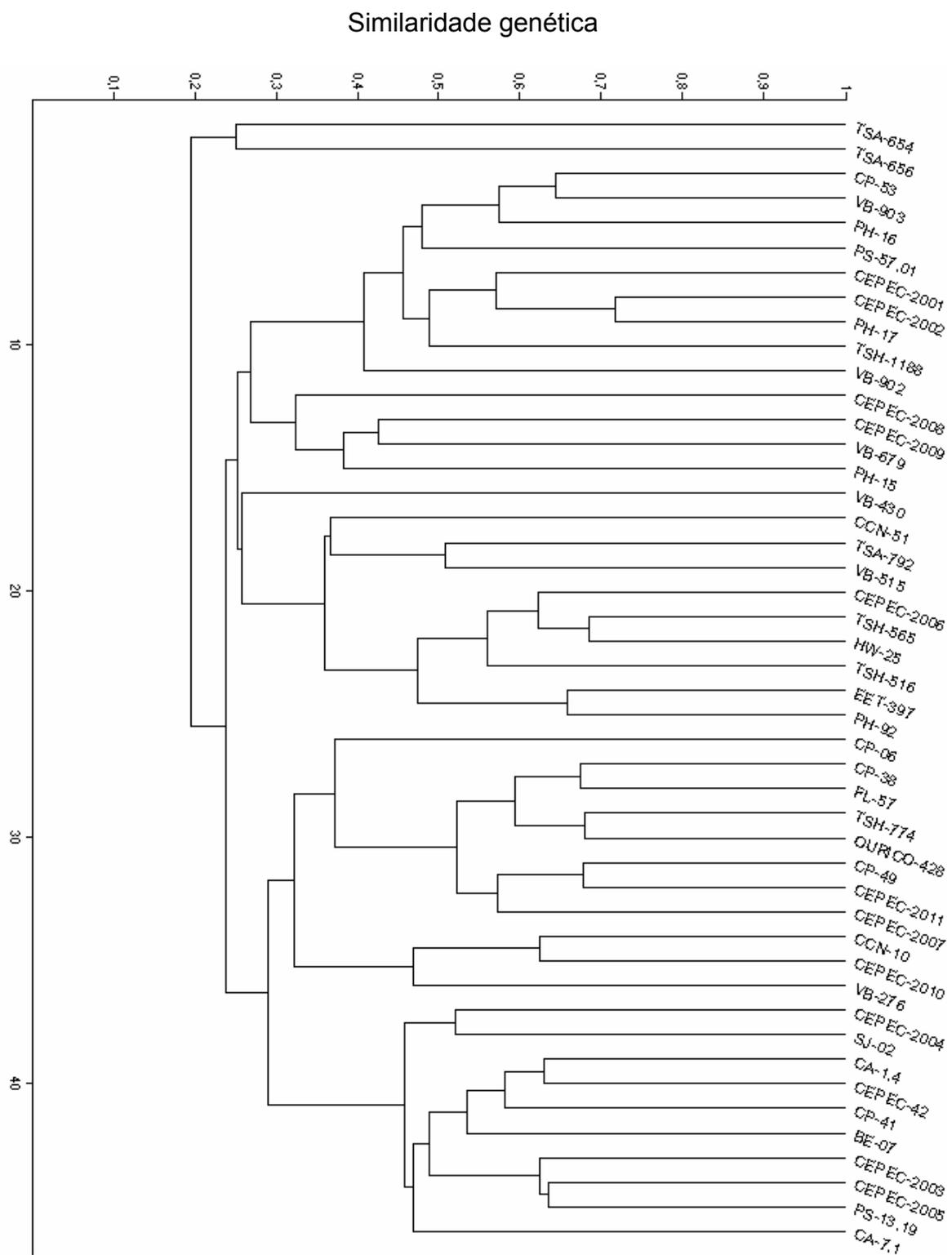


Figura 24. Análise de agrupamento de 46 clones de *T. cacao* baseado no coeficiente de similaridade de Dice (1945), a partir de marcadores microssatélites, utilizando o método UPGMA.

Estudos com diferentes conjuntos de clones de *T. cacao* empregando marcadores microssatélites, apresentaram alguns clones coincidentes com este trabalho (CCN-51, PH-16, PH-92 e TSH-1188), provavelmente por serem materiais de grande valor comercial ou genético. Desta forma, esses clones coincidentes permitiram gerar um padrão comparativo para heterozigose observada (Tabela 5). A heterozigose média entre os valores mínimos e máximos encontrados na literatura considerada foi de 15 % e 72,3 %, respectivamente, enquanto que no presente trabalho, o valor mínimo e máximo foi de 26 % (CA-7.1) e 92 % (TSH-1188), respectivamente. A partir destes dados foi possível classificar, de forma preliminar, o nível de heterozigose em três classes para *T. cacao*: (i) até 40 % - baixa heterozigosidade; (ii) entre 40 % e 67 % - média heterozigosidade; (iii) a partir de 67 % - alta heterozigosidade. Faleiro et al. (2004a) e Faleiro et al. (2004b), analisando diversidade genética em *T. cacao*, com marcadores microssatélites, consideraram 60 % como alta heterozigosidade, já para Kageyama et al. (2003) seria a partir de cerca de 20%; porém, vale lembrar que *T. cacao* é uma espécie cultivada e os valores observados por este último trabalho são referentes a espécies arbóreas tropicais.

Tabela 5. Valores mínimos e máximos de heterozigose observada em *T. cacao*, com base em marcadores microssatélites, por autores que incluíram pelo menos um dos clones analisados neste trabalho

Autor	Nº. Locos	Mínimo (%)	Mínimo coincidente (%)	Máximo(%)	Máximo coincidente (%)
Faleiro et al., 2004a	16	IMC-67 (20)	PH-16 (40)	FSU-117 (75)	PH-92 (60)
Leal, 2004	9	LCT37A (14)	CCN-51 (25)	TSH-1188 (75)	TSH-1188 (75)
Lima et al., 2007	13	FO 21-0 (11)	CCN-51 (32)	TSH-1188 (67)	TSH-1188 (67)
Este trabalho	18	-	CA-7.1 (26)	-	TSH-1188 (92)
Média	14	15	-	72,3	-

Alta diversidade foi encontrada em algumas variedades clonais, com cerca de 60% das variedades analisadas, apresentando a partir de 50% dos locos em heterozigose (Figura 25). Os clones CA-7.1, CCN-51, CEPEC-2002, CEPEC-2004, CEPEC-2008, CEPEC-2009, PH-16, PH-17 e TSA-792 apresentaram baixa heterozigosidade ( $\leq 40\%$ ), e os clones CEPEC-2006, TSA-654, PH-15, SJ-02, OURICO-428 e TSH-1188 apresentaram alta heterozigosidade ( $\geq 67\%$ ), sendo que os demais (67% dos clones) apresentaram média heterozigosidade, de acordo com as classes estabelecidas anteriormente. Esse alto índice de locos em heterozigose pode ser explicado pelo fato de o *T. cacao* ser uma espécie alógama e pela história genealógica desses materiais (clones híbridos, recomendados pelo CEPEC/CEPLAC). No geral, os clones avaliados apresentaram heterozigosidade superior aos clones sabidamente pouco heterozigotos, a exemplo do CCN-51 (LECEREAU et al., 1997; LEAL, 2004; LIMA et al., 2007), porém inferior aos clones altamente heterozigotos, TSH-1188 (LEAL, 2004), podendo-se inferir que a maior parte desses clones apresenta heterozigose intermediária.

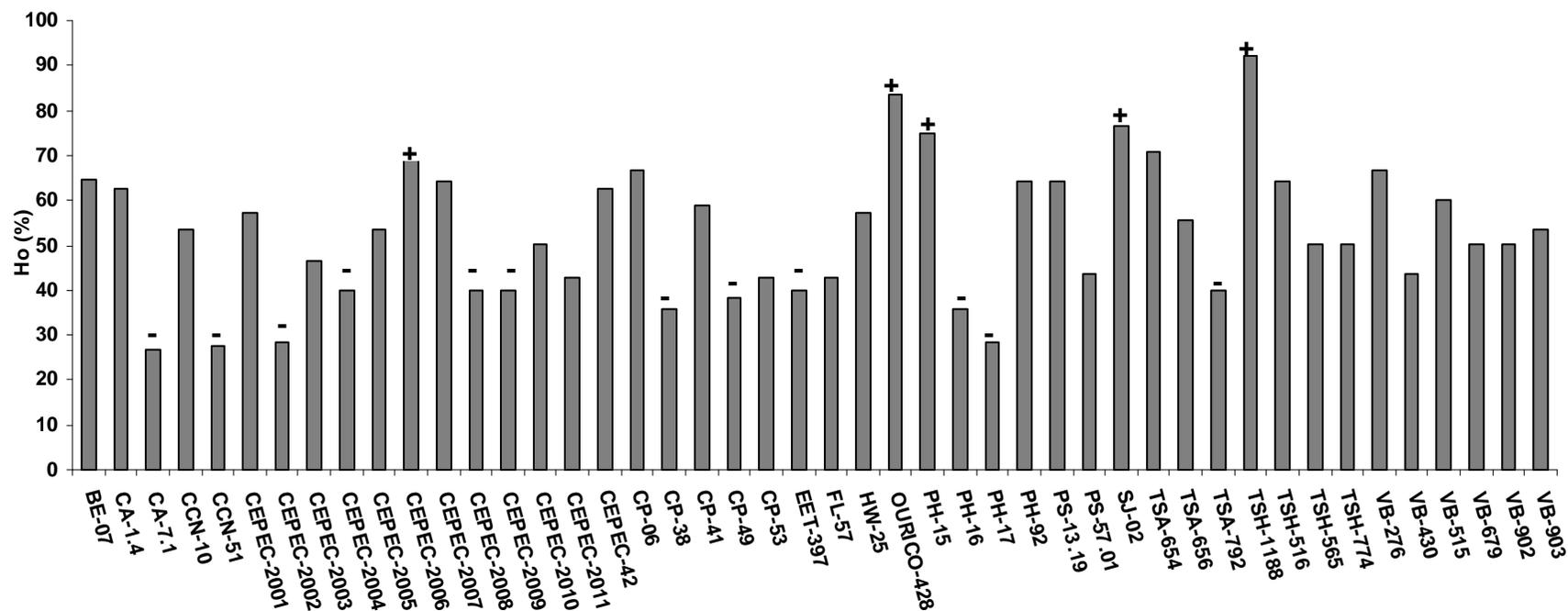


Figura 25. Heterozigose observada para os 46 clones de *T. cacao*, calculada com base em 18 locos microssatélites. (+: alta heterozigose; -: baixa heterozigose; outros: média heterozigose).

Dessa forma, pôde-se deduzir que, de acordo com as análises realizadas nesse trabalho, não há uma relação direta entre as respostas fisiológicas de *T. cacao* ao alagamento do substrato e os dados moleculares avaliados. Alguns trabalhos têm demonstrado que a característica tolerância à deficiência de O<sub>2</sub> no substrato é dominante e com segregação muito simples, indicando que somente poucos genes estejam envolvidos com essa característica (VANTOAI et al., 2001; SUBBAIAH; SACHS, 2003). Entretanto, os marcadores microssatélites, empregados neste trabalho, são marcadores polimórficos e neutros, que permitem a detecção de variações que não estão associadas a nenhuma variação fenotípica mensurável, sendo usados apenas como ponto de referência que podem ser úteis para se achar um vizinho no genoma (HOSBINO et al., 2002). Deve-se destacar ainda que os marcadores moleculares permitem demonstrar que os clones estudados possuem uma ampla diversidade genética. Portanto, trata-se de material útil para programas de melhoramento.

## 5. CONCLUSÕES

- Houve variações interclonais em relação à tolerância ao alagamento do substrato. Os 35 clones de *T. cacao* avaliados apresentaram, de um modo geral, diminuições no crescimento.
- Dentre os clones avaliados, o CCN-10, CCN-51, o PH-17 e o TSA-792 apresentaram maior tolerância ao estresse hídrico por alagamento, justificada pelos maiores valores médios desses clones para a maioria das variáveis fotossintéticas e de crescimento avaliadas, mesmo apresentando alterações em seu comportamento fisiológico. Por outro lado, os clones CEPEC-2010, CEPEC-42, HW-25, PH-15, TSH-774, TSA-656 e VB-903, foram os menos tolerantes, apresentando as maiores diferenças significativas entre os tratamentos alagado e controle, e os outros 29 clones avaliados apresentaram tolerância média ao alagamento do substrato.
- Em geral os 46 clones de *T. cacao* analisados molecularmente apresentaram de média a alta heterozigose quando comparados a materiais sabidamente pouco heterozigotos como o CCN-51.
- Não foram observadas relações significativas entre as variáveis fisiológicas em resposta ao alagamento do substrato e os padrões de heterozigose nos clones de *T. cacao* estudados.

## 6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A-A.F.; VALLE, R.R. Análise de crescimento de dez cacaueiros híbridos. **Theobroma**. v. 18, n. 2, p. 95-113, 1988.
- ANDERSEN, P.C.; LOMBARD, P.B.; WESTWOOD, M.N. Effect of root anaerobiosis on the water relations of several *Pyrus species*. **Physiology Plantarum**. v. 62, p. 245-252, 1984.
- ARMSTRONG, W. Aeration in higher plants. **Advances in Botanical Research**. v. 7, p. 225–232, 1979.
- ASHRAF, M. Relationships between leaf gas exchange characteristics and growth of differently adapted populations of blue panicgrass (*Panicum antidotale* Retz) under salinity or waterlogging. **Plant Science**. v. 165, p. 69-75, 2003.
- BALL, M.C.; BUTTERWORTH, J.A.; RODEN, J.S.; CHRISTIAN, R.; EGERTON, J.G. Applications of chlorophyll fluorescence to forest ecology. **Australian Journal Plant Physiology**. v. 22, p. 311-319, 1994.
- BJÖRKMAN, O.; DEMMIG, B. Photon yield de O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta**. v. 170, p. 489-504, 1987.
- BLOM, C.W.P.M.; VOESENECK, L.A.C.L. Flooding: the survival strategies of plants. **Tree**. v.11, n.7, p. 290-295, 1996.

CAMARGO, F.A.O.; SANTOS, G.A.; ZONTA, E. Alterações eletroquímicas em solos inundados. **Ciência Rural**. v. 29, n. 1, p. 171-180, 1999.

CARMI, A.; HEUER, B. The role of roots in control of bean shoot growth. **Annals Botany**. v. 48, p. 519-527, 1981.

CHEESMAN, E.E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. **Tropical Agriculture**. v.21, p. 144-159, 1944.

CHEN, H.; QUALLS, R.G.; MILLER, G.C. Adaptive responses of *Lepidium latifolium* to soil flooding: biomass allocation, adventitious rooting, aerenchyma formation and ethylene production. **Environmental and Experimental Botany**. v. 48, p. 119–128, 2002.

CORRÊA, R.X.; ABDELNOOR, R.V.; FALEIRO, F.G.; CRUZ, C.D.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Genetic distances in soybean based on RAPD markers. **Bragantia**, Campinas, v.58, n.1, p.15-22, 1999.

DAT, J.F.; CAPELLI, N.; FOLZER, H.; BOURGEADE, P.; BADOT, P.M. Sensing and signalling during plant flooding. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 42, p. 273–282, 2004.

DAVIES, F.S.; FLORE, J.A. Short-term flooding effects on gas exchange and quantum yield of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). **Plant Physiology**. v. 81, p. 289-292, 1986.

DENNIS, E.S.; DOLFERUS, R.; ELLIS, M.; RAHMAN, M.; WU, Y.; HOEREN, F.U.; GROOVER, A.; ISMOND, K.P.; GOOD, A.G.; PEACOCK, W.J. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. **Journal of Experimental Botany**. v. 51, p. 89-97, 2000.

DICE, L.R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**. v. 26, p. 297-302, 1945.

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

DREW, M.C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 48, p. 223–250, 1997.

ELSE, M.A.; TIEKSTRA, A.E.; CROKER, S.J.; DAVIES, W.J.; JACKSON, M.B. Stomatal closure in flooded tomato plants involves abscisic acid and a chemically unidentified anti-transpirant in xylem sap. **Plant Physiology**. v. 112, p. 239-247, 1996.

FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; PIRES, J.L.; BAHIA, R.C.S.; SANTOS, R.C.; GOMES, L.M.C.; ARAÚJO, I.S.; FALEIRO, A.S.G.; GRAMACHO, K.P.; MELO, G.R.P.; MONTEIRO, W.R.; VALLE, R.R. Caracterização de variedades clonais de *Theobroma cacao* L. com base em marcadores RAPD, AFLP e microssatélites. **Agrotrópica**. v.13, n.2, p.79–86, 2001.

FALEIRO, F.G.; YAMADA, M.M. ; LOPES, U.V.; FALEIRO, A.S.G.; BAHIA, R.C.S; GOMES, L.M.C.; SANTOS, R.C.; SANTOS, R.F. Genetic similarity of *Theobroma cacao* L. acessions maintained in duplicate at the cacao research center germplasm collection base on RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v.2, n.3, p.439-444, 2002.

FALEIRO, A.S.G.; FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; MELO, G.R.P.; MONTEIRO, W.R.; YAMADA, M.M.; BAHIA, R.C.S.; CORRÊA, R.X. Variability in cacao selected by producers for resistance to witches' broom base don microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v. 4, p.290-297, 2004a.

FALEIRO, F.G.; PIRES, J.L.; MONTEIRO, W.R.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; PIEDRA, A.G.; MOURA, A.D.; ARÉVALO-GARDINI, E.; MARQUES, J.R.B.; GRAMACHO, K.P.; FALEIRO, A.S.G.; SANTOS, M.C.M. Variability in cacao accessions from the Brazilian, Ecuadorian, and Peruvian Amazons based on molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v. 4, p.227-233, 2004b.

FARQUHAR, G.D.; SHARKEY, T.D. Stomatal conductance and photosynthesis. **Annual Review Plant Physiology**. v. 33, p. 317-345, 1982.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; LEVY, M.; GOLDSBROUGH, P. Reexamining the classification of *Theobroma cacao* L. using molecular markers. **Journal American from Society Horticultural Science**. v. 119, p. 1073-1082, 1994.

FIGUEIRA, A.V.O.; CASCARDO, J.C.M. Marcadores moleculares no melhoramento. DIAS, L.A.S. (Editor). **Melhoramento Genético do Cacaueiro**. Viçosa, MG: FUNAPE, UFG, 2001. 578p.

FOLZER, H.; CAPELLI, N.; DAT, J.; BADOT, P.-M. Molecular cloning and characterization of calmodulin genes in young oak seedlings (*Quercus petraea* L.) during early flooding stress. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1727, p. 213– 219, 2005.

GRICHKO, V.P. and GLICK, B.R. Ethylene and flooding stress in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 1–9, 2001.

HE, C.J.; DREW, M.C.; MORGAN, P.W. Induction of enzyme associated with lysigenous aerenchyma formation in roots of *Zea mays* during hypoxia or nitrogen-starvation. **Plant Physiology**. v. 105, p. 861-865, 1994.

HE, C.J.; FINLAYSON, S.A.; DREW, M.C.; JORDAN, W.R.; MORGAN, P.W. Ethylene biosynthesis during aerenchyma formation in roots of *Zea mays* subjected

to mechanical impedance and hypoxia. **Plant Physiology**. v. 112, p. 1679-1685, 1996.

HOLMBERG, N.; BÜLLOW, L. Improving stress tolerance in plants by gene transfer. **Trends in plant science** (reviews). v.3, n. 2, p. 61-66, 1998.

HOOKE, D.D.; BROWN, C.L.; KORMANIK, P.P. Inductive flood tolerance in swamp tupelo (*Nyssa sylvatica* var. *biflora* (Walt.) Sarg.). **Journal of Experimental Botany**. v. 22, p. 78-89, 1971.

HOSBINO, A.A.; PALMIERI, D.A.; BRAVO, J.P.; PEREIRA, T.E.B.; LOPES, C.R.; GIMENES, M.A. Marcador microssatélite na conservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. n. 29, p.146-150, 2002.

JACKSON, M.B. The impact of flooding stress on plants and crops. [http://www.plantstress.com/Articles/waterlogging\\_i/waterlog\\_i.htm](http://www.plantstress.com/Articles/waterlogging_i/waterlog_i.htm), 2004.

JOLY, C.A. Flooding tolerance: a reinterpretation of Crawford's metabolic theory. **Proceedings Research Society Edinburgh**. v. 102, p. 343-354, 1994.

KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M.; RIBAS, R.A.; GANDARA, F.B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M.B.; VENCOSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, n. 64, p. 93-107, 2003.

KENNEDY, R.A.; RUMPHO, M.E.; FOX, T.C. Anaerobic metabolism in plants. **Plant Physiology**. v. 100, p. 1-6, 1992.

KLOK, J.E.; WILSON, I.W.; CHAPMAN, C.S.; EWING, M.R.; SOMERVILLE, C.S.; PEACOCK, W.J.; DOLFERUS, R.; DENNIS, E.S. Expression profile analysis of low-oxygen response in *Arabidopsis* root cultures. **Plant Cell**. v. 14, p. 2481-2494, 2002.

KOZLOWSKI, T.T.; KRAMER, P.L.; PALLARDY, S.G. **The physiological ecology of wood plants**. San Diego: Academic Press, 1991. 656p.

KOZLOWSKI, T.T. Responses of woody plants to flooding and salinity. **Tree Physiology Monograph**. v. 1, p. 1-29, 1997.

KOZLOWSKI, T.T.; PALLARDY, S.G. **Growth control in woody plants**. San Diego: Academic Press, 1997.

KOZLOWSKI, T.T. Acclimation and Adaptive Responses of Woody Plants to Environmental Stresses. **The Botanical Review**. v. 68, n. 2, p. 270-334, 2002.

LANAUD, C. **Nouvelles donnés sur la biologie du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.): diversité des populations, système d'incompatibilité, haploïdes spontanés, leurs conséquences pour l'amélioration de cette espèce**. 1987. Tese (Doutorado) - Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, Paris, 1987.

LAURENT, V.; RISTERUCCI, A.M.; LANAUD, C. Variability for nuclear ribosomal genes within *Theobroma cacao*. **Heredity**. v. 71, p. 96-103, 1993.

LAURENT, V.; RISTERUCCI, A.M.; LANAUD, C. Genetic diversity in cocoa revealed by cDNA probes. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 88, p.193-198, 1994.

LEAL, J.B. **Diversidade genética de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) resistentes à vassoura-de-bruxa com base em marcadores RAPD e microssatélites**. 61f. 2004. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, 2004.

LERCETEAU, E.; ROBERT, T.; PETIARD, V.; CROUZILLAT, D. Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 95, p. 10-19, 1997.

LICHTENTHALER, H.K. Vegetation stress: an introduction to stress concepts in plants. **Journal Plant Physiology**. v.148, p. 4-14, 1996.

LICHTENTHALER, H.K.; BURKART, S.; SCHLINDER, C.; STOBER, F. Changes in photosynthetic pigments and in vivo chlorophyll fluorescence parameters under photoinhibitory growth conditions. **Photosynthetica**. v. 27, p. 343- 353, 1992.

LIMA, E.M. **Caracterização da produção, resistência a vassoura-de-bruxa e diversidade genética molecular de cacao em Itagibá, BA**. 70f. 2007. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, 2007.

LOPEZ, O.R.; KURSAR, T.A. Flood tolerance o four tropical tree species. **Tree Physiology**. v. 19, p. 925-932, 1999.

MARITA, J.M. **Characterization of *Theobroma cacao* using RAPD marker based estimates of genetic distance and development of a core collection to maximize genetic diversity**. 1988. Dissertação (Mestrado) - University of Wisconsin, Madison, 1998.

MARITA, J.M.; NIENHUIS, J.; PIRES, J.L.; AITKEN, W.M. Analysis of genetic diversity in *Theobroma cacao* with emphasis on Witches' Broom disease resistance. **Crop Science**. v.41, p.1305-1316, 2001.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**. v. 51, p. 659- 668, 2000.

MEDRI, M.E. Aspectos morfo-anatômicos e fisiológicos de *Peltophorum dubium* (Spr.) Taub. submetida ao alagamento e à aplicação de etrel. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 21, p. 261-267, 1998.

MIELKE, M.S.; ALMEIDA, A-A.F.; GOMES, F.P.; AGUILAR, M.A.G.; MANGABEIRA, P.A.O. Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and growth

responses of *Genipa americana* seedlings to soil flooding. **Environmental and Experimental Botany**. v. 50, p. 221-231, 2003.

MIELKE, M.S.; ALMEIDA, A-A.F.; GOMES, F.P.; MANGABEIRA, P.A.O.; SILVA, D.C. Effects of soil flooding on leaf gas exchange and growth of two neotropical pioneer tree species. **New Forest**. v. 29, p. 161-168, 2005.

NEI, M.; LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variations in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 76, p. 5269-5273, 1979.

N'GORAN, J.A.K.; LAURENT, V.; RISTERUCCI, A.M.; LANAUD, C. Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers. **Heredity**. v.73, p. 589-597, 1994.

PENG, H.; LIN, T.; WANG, N.; SHIH, M. Differential expression of genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis* during hypoxia. **Plant Molecular Biology**, v. 58, p. 15-25, 2005.

PEREIRA, S.L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, I.M.; ALMEIDA, L.C.C. Primeira ocorrência da Vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotrópica**, v. 1, p.79-81, 1989.

PESCHKE, V.M.; SACHS, M.M. Characterization and expression of anaerobically induced maize transcripts. **Plant Physiology**. v. 104, p. 387-394, 1994.

PEZESHKI, S.R. Differences in patterns of photosynthetic responses to hypoxia in flood-tolerant and flood-sensitive tree species. **Photosynthetica**. v. 28, p. 423-430, 1993.

PEZESHKI, S.R. Responses of baldcypress (*Taxodium distichum*) seedlings to hypoxia: leaf protein content, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity and photosynthesis. **Photosynthetica**. v. 30, p. 59-68, 1994.

PEZESHKI, S. R.; PARDUE, J. H.; DELAUNE, R. D. Leaf gas exchange and growth of flood-tolerant and flood-sensitive tree species under low soil redox conditions. **Tree Physiology**, v. 16, p. 453-458, 1996.

PEZESHKI, S. R.; SANTOS, M.I. Relationships among rhizosphere oxygen deficiency, root restriction, photosynthesis and growth in baldcypress (*Taxodium distichum* L.) seedlings. **Photosynthetica**. v. 35, p. 381-390, 1998.

PEZESHKI, S.R. Wetland plant responses to soil flooding. **Environmental and Experimental Botany**. v. 46, p. 299–312, 2001.

PINTO, L. R. M.; PIRES, J. L. Seleção de Plantas de cacau resistentes a vassoura-de-bruxa. **Boletim Técnico**, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, **CEPEC/CEPLAC**, Ilhéus, BA, n. 181, 1998, 34 p.

PIRES, J.L.; MARITA, J.M.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; AITKEN, W.M.; MELO, G.P.; MONTEIRO, W.R.; AHNERT, D. Diversity for phenotypic traits and molecular markers in CEPEC's germplasm collection in Bahia, Brazil. In: **Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding**, Ingenic, Malaysia, p.72-88, 2000.

PROBERT, M.E.; KEATING, B.A. What soil constraints should be included in crop and forest models? **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v. 82, p. 273–281, 2000.

RADFORD, R.J. Growth analysis formula their use and abuse. **Crop Science**. v. 7, p. 171-175, 1967.

RICHARDS, F.J. **The quantitative analysis of growth**. In: STEWARD, F.C. (Ed) *Plant Physiology: a treatise*. New York: Academic Press. P. 3-76, 1969.

RISTERUCCI, A.M.; ESKES, B.; FARGEAS, D.; MOTAMAYOR, J.C.; LANAUD, C. Use of microsatellite markers for germplasm identity analysis in cocoa. In:

**Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding, Ingenic, Malaysia. p.25-33, 2000.**

RUBIO, G.; CASASOLA, G.; LAVADO, R.S. Adaptation and biomass production of two grasses in response to waterlogging and soil nutrient enrichment. **Oecologia**. v. 102, p. 102–105, 1995.

SACHS, M.M.; FREELING, M.; OKIMOTO, R. The anaerobic proteins of maize. **Cell**. v. 20, p. 761-767, 1980.

SAAB, I.N.; SACHS, M.M. Complete cDNA and genomic sequence encoding a flooding-responsive gene from maize (*Zea mays* L.) homologous to xyloglucan endotransglycosylase. **Plant Physiology**. v. 108, p. 439-440, 1995.

SAAB, I.N.; SACHS, M.M. A flooding-induced xyloglucan endotransglycosylase homolog in maize is responsive to ethylene and associated with aerenchyma. **Plant Physiology**. v. 112, p. 385–391, 1996.

SANTOS, C.S.; PIRES, J.L.; LOPES, U.V.; GRAMACHO, K.P.G.; FLORES, A.B.; BAHIA, R.C.S.; RAMOS, H.C.C.; CORRÊA, R.X.; AHNERT, D. Assessment of genetic diversity on a sample of cocoa accessions resistant to witches' broom disease based on RAPD and pedigree data. **Bragantia**. v.64, n.3, p.361-368, 2005.

SCHAFFER, B.; ANDERSEN, P.C.; PLOETZ, R.C. Responses of fruit trees to flooding. **Horticultural Review**. v. 13, p. 257-313, 1992.

SMITH, M.W.; BOURNE, R.D. Seasonal effects of flooding on greenhouse-grown seedling pecan trees. **Hortscience**. v. 24, p. 81-83, 1989.

SOUSA, C.A.F.; SODEK, L. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. **Brazilian Journal Plant Physiology**. v.14, n. 2, p. 83-94, 2002.

SOUZA, C. A. S. e DIAS, L. A. S. Melhoria ambiental e sócio-economia. In: DIAS, L.A.S. (Ed.) **Melhoramento genético do cacauzeiro**. Editora Folha de Viçosa Ltda, Viçosa, 2001.

SUBBAIAH, C.C.; BUSH, D.S.; SACHS, M.M. Mitochondrial contribution to the anoxic  $\text{Ca}^{2+}$  signal in maize suspension-cultured cells. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.118, p. 759–771, 1998.

SUBBAIAH, C.C.; KOLLIPARA, K.P.; SACHS, M.M. A  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent cysteine protease is associated with anoxia-induced root tip death in maize, **Journal of Experimental Botany**. v. 51, p. 721– 730, 2000.

SUBBAIAH, C.C.; SACHS, M.M. Molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress. **Annals of Botany**, v. 90, p. 119-127, 2003.

SNEDDEN, W.A.; FROMM, H. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. **New Phytologist**. v.151, p. 35–66, 2001.

TANG, Z.C.; KOZLOWSKI, T.T. Some physiological and morphological responses of *Quercus macrocarpa* seedlings to flooding. **Canadian Journal Research**. v. 12, p. 196–202, 1982a.

TANG, Z.C.; KOZLOWSKI, T.T. Some physiological and growth responses of *Betula papyrifera* seedlings to flooding. **Physiology Plantarum**. v. 55, p. 415-420, 1982b.

TOPA, M.A.; MCLEOD, K.W. Aerenchyma and lenticel formation in pine seedlings: a possible avoidance mechanism to anaerobic growth conditions. **Physiology Plantarum**. v. 68, p. 540- 550, 1986.

von CAEMMERER, S.; FARQUHAR, G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. **Planta**. v. 153, p. 376-387, 1981.

VANTOAI, T.T.; BEUERLEIN, J.E.; SCHMITHENNER, A.F.; MARTIN, S.K.St. Genetic variability for flooding tolerance in soybeans. **Crop Science**. v. 34, p. 1112-1115, 1994.

VANTOAI, T.T.; MARTIN, S.K. St.; CHASE, K.; BORU, G.; SCHNIPKE, V.; SCHMITHENNER, A.F.; LARK, K.G. Identification of a QTL associated with tolerance of soybean to soil waterlogging. **Crop Science**. v. 41, p. 1247-1252, 2001.

VARTAPETIAN, B.B.; JACKSON, M.B. Plant adaptations to anaerobic stress. **Annals of Botany**. v. 79 (Supplement A), p. 3–20, 1997.

WHITKUS, R.; DE LA CRUZ, M.; MOTA-BRAVO, L.; GOMEZ-POMPA, A. Genetic diversity and relationships of cacao (*Theobroma cacao* L.) in southern México. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 96, p. 621-627, 1998.

YAMADA, M.M.; FALEIRO, F.G.; LOPES, U. V.; BAHIA, R.C.; PIRES, J.L.; GOMES, L.M.C.; MELO, G.R.P. Genetic variability in cultivated cacao populations in Bahia, Brazil, detected by isozymes and RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v. 1, n. 4, p. 377-383, 2001.

ZIELINSKI, R.E. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants, **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 49, p. 697–725. 1998.

## **APÊNDICES**

Apêndice A – Matriz das distâncias Euclidiana entre 35 clones de *T. cacao*, a partir da razão entre os tratamentos alagado e controle para as variáveis fisiológicas avaliadas (*A*, *gs*, *E*, *Ci/Ca*, *WUE*, *A/gs*, *F<sub>o</sub>*, *F<sub>m</sub>*, *F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>*, *BF*, *BC*, *BR*, *BT*, *R/PA*, *NF*, *AF*, *AFI*, *MFE*).

Clones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25		
<b>BE-07</b>	<b>1</b>																										
<b>CA-1.4</b>	<b>2</b>	1,66																									
<b>CA-7.1</b>	<b>3</b>	1,63	1,37																								
<b>CCN-10</b>	<b>4</b>	1,72	1,68	1,41																							
<b>CCN-51</b>	<b>5</b>	1,57	1,37	1,16	1,35																						
<b>CEPEC-2001</b>	<b>6</b>	1,65	1,38	1,21	1,44	1,19																					
<b>CEPEC-2002</b>	<b>7</b>	1,36	1,36	1,39	1,57	1,33	1,41																				
<b>CEPEC-2004</b>	<b>8</b>	1,69	1,43	1,18	1,42	1,25	1,27	1,47																			
<b>CEPEC-2005</b>	<b>9</b>	1,67	1,32	1,14	1,52	1,23	1,17	1,42	1,24																		
<b>CEPEC-2006</b>	<b>10</b>	1,62	1,26	1,32	1,59	1,30	1,24	1,36	1,42	1,25																	
<b>CEPEC-2007</b>	<b>11</b>	1,77	1,52	1,23	1,39	1,29	1,31	1,55	1,29	1,28	1,44																
<b>CEPEC-2008</b>	<b>12</b>	1,65	1,36	1,14	1,52	1,26	1,27	1,43	1,26	1,16	1,33	1,32															
<b>CEPEC-2009</b>	<b>13</b>	1,64	1,39	1,15	1,41	1,19	1,14	1,40	1,22	1,17	1,28	1,25	1,23														
<b>CEPEC-2010</b>	<b>14</b>	1,64	1,44	1,57	1,87	1,61	1,57	1,52	1,63	1,51	1,44	1,71	1,51	1,58													
<b>CEPEC-2011</b>	<b>15</b>	1,74	1,53	1,22	1,29	1,24	1,26	1,54	1,23	1,30	1,43	1,21	1,32	1,23	1,72												
<b>CEPEC-42</b>	<b>16</b>	1,48	1,31	1,24	1,55	1,27	1,32	1,26	1,35	1,26	1,28	1,45	1,24	1,28	1,44	1,42											
<b>CP-06</b>	<b>17</b>	1,71	1,52	1,25	1,26	1,21	1,26	1,51	1,25	1,32	1,44	1,24	1,36	1,27	1,73	1,13	1,44										
<b>CP-49</b>	<b>18</b>	1,51	1,29	1,25	1,50	1,22	1,27	1,24	1,34	1,25	1,24	1,37	1,31	1,23	1,49	1,39	1,23	1,37									
<b>CP-53</b>	<b>19</b>	1,65	1,32	1,21	1,52	1,24	1,13	1,42	1,25	1,12	1,25	1,34	1,23	1,20	1,49	1,32	1,30	1,33	1,28								
<b>HW-25</b>	<b>20</b>	1,64	1,42	1,16	1,48	1,24	1,19	1,43	1,21	1,18	1,34	1,34	1,21	1,22	1,55	1,28	1,27	1,31	1,33	1,16							
<b>PH-15</b>	<b>21</b>	1,69	1,45	1,15	1,43	1,22	1,24	1,47	1,22	1,19	1,37	1,23	1,23	1,21	1,62	1,22	1,32	1,24	1,33	1,25	1,20						
<b>PH-16</b>	<b>22</b>	1,62	1,42	1,17	1,38	1,17	1,26	1,41	1,19	1,25	1,40	1,33	1,26	1,24	1,64	1,23	1,30	1,22	1,31	1,26	1,20	1,17					
<b>PH-17</b>	<b>23</b>	1,53	1,50	1,29	1,29	1,20	1,34	1,35	1,34	1,40	1,46	1,42	1,38	1,33	1,72	1,32	1,35	1,28	1,34	1,39	1,34	1,35	1,22				
<b>PH-92</b>	<b>24</b>	1,67	1,36	1,22	1,47	1,21	1,15	1,42	1,29	1,16	1,27	1,24	1,27	1,18	1,57	1,30	1,35	1,28	1,23	1,18	1,27	1,24	1,29	1,38			
<b>PS-13.19</b>	<b>25</b>	1,57	1,27	1,22	1,54	1,27	1,28	1,35	1,26	1,21	1,31	1,39	1,21	1,27	1,41	1,38	1,24	1,38	1,23	1,21	1,26	1,32	1,29	1,38	1,28		

Continua...

Apêndice A – Continuação....

Clones		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
<b>SJ-02</b>	<b>26</b>	1,59	1,32	1,14	1,43	1,14	1,12	1,34	1,24	1,16	1,24	1,32	1,20	1,14	1,53	1,27	1,24	1,28	1,22	1,14	1,16	1,24	1,21	1,28	1,19	1,22
<b>TSA-654</b>	<b>27</b>	1,59	1,32	1,12	1,45	1,14	1,16	1,35	1,19	1,13	1,28	1,30	1,19	1,16	1,53	1,27	1,23	1,27	1,21	1,14	1,14	1,18	1,16	1,28	1,18	1,19
<b>TSA-656</b>	<b>28</b>	1,62	1,37	1,52	1,81	1,52	1,48	1,45	1,58	1,42	1,34	1,62	1,47	1,51	1,16	1,66	1,38	1,65	1,39	1,42	1,51	1,54	1,57	1,65	1,47	1,37
<b>TSA-792</b>	<b>29</b>	1,47	1,37	1,25	1,38	1,13	1,26	1,23	1,33	1,32	1,31	1,39	1,33	1,25	1,59	1,35	1,25	1,32	1,19	1,31	1,32	1,33	1,24	1,18	1,28	1,29
<b>TSH-1188</b>	<b>30</b>	1,68	1,42	1,17	1,37	1,17	1,16	1,45	1,26	1,21	1,32	1,18	1,25	1,18	1,62	1,18	1,36	1,18	1,29	1,23	1,25	1,22	1,25	1,33	1,15	1,32
<b>TSH-774</b>	<b>31</b>	1,61	1,43	1,54	1,85	1,58	1,55	1,48	1,57	1,49	1,47	1,72	1,49	1,56	1,21	1,71	1,41	1,71	1,51	1,46	1,49	1,59	1,58	1,66	1,58	1,38
<b>VB-276</b>	<b>32</b>	1,63	1,32	1,17	1,47	1,19	1,16	1,37	1,29	1,14	1,23	1,27	1,21	1,19	1,52	1,31	1,28	1,30	1,22	1,17	1,24	1,25	1,27	1,36	1,13	1,23
<b>VB-679</b>	<b>33</b>	1,67	1,37	1,20	1,39	1,15	1,17	1,43	1,26	1,21	1,29	1,23	1,28	1,21	1,61	1,23	1,36	1,19	1,25	1,22	1,28	1,24	1,25	1,33	1,14	1,28
<b>VB-902</b>	<b>34</b>	1,62	1,33	1,15	1,42	1,13	1,13	1,36	1,23	1,16	1,24	1,25	1,23	1,12	1,56	1,24	1,28	1,24	1,19	1,18	1,23	1,23	1,23	1,31	1,13	1,22
<b>VB-903</b>	<b>35</b>	1,67	1,36	1,15	1,46	1,21	1,19	1,42	1,25	1,15	1,26	1,23	1,24	1,12	1,57	1,25	1,28	1,29	1,22	1,22	1,24	1,18	1,26	1,37	1,17	1,29

Continua...

Apêndice A – Continuação....

Clones		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
<b>TSA-654</b>	<b>27</b>	1,11									
<b>TSA-656</b>	<b>28</b>	1,47	1,46								
<b>TSA-792</b>	<b>29</b>	1,20	1,21	1,52							
<b>TSH-1188</b>	<b>30</b>	1,18	1,19	1,54	1,27						
<b>TSH-774</b>	<b>31</b>	1,51	1,49	1,28	1,56	1,63					
<b>VB-276</b>	<b>32</b>	1,14	1,15	1,43	1,25	1,15	1,52				
<b>VB-679</b>	<b>33</b>	1,18	1,18	1,52	1,25	1,11	1,61	1,17			
<b>VB-902</b>	<b>34</b>	1,11	1,13	1,47	1,21	1,13	1,55	1,13	1,11		
<b>VB-903</b>	<b>35</b>	1,20	1,18	1,48	1,29	1,19	1,57	1,19	1,19	1,15	

Apêndice B – Matriz de coeficientes de similaridade genética entre 46 clones de cacau, obtidos pelo Método de Dice (1945) com base em marcadores SSR

Clones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
<b>BE-07</b>	1																							
<b>CA-7.1</b>	2	0,46																						
<b>CA-4.1</b>	3	0,54	0,49																					
<b>CCN-51</b>	4	0,18	0,16	0,30																				
<b>CCN-10</b>	5	0,21	0,22	0,20	0,25																			
<b>CP-06</b>	6	0,16	0,18	0,37	0,47	0,20																		
<b>CP-38</b>	7	0,43	0,39	0,52	0,45	0,16	0,50																	
<b>CP-41</b>	8	0,56	0,50	0,56	0,21	0,16	0,18	0,41																
<b>CP-49</b>	9	0,20	0,16	0,16	0,56	0,19	0,40	0,46	0,16															
<b>CP-53</b>	10	0,19	0,37	0,17	0,14	0,17	0,27	0,14	0,17	0,23														
<b>CEPEC-42</b>	11	0,50	0,42	0,63	0,35	0,18	0,35	0,56	0,60	0,14	0,17													
<b>CEPEC-2001</b>	12	0,26	0,18	0,17	0,21	0,36	0,24	0,15	0,20	0,18	0,44	0,20												
<b>CEPEC-2002</b>	13	0,23	0,18	0,18	0,16	0,17	0,19	0,14	0,20	0,15	0,36	0,18	0,61											
<b>CEPEC-2003</b>	14	0,50	0,44	0,43	0,32	0,13	0,34	0,52	0,55	0,29	0,14	0,48	0,21	0,19										
<b>CEPEC-2004</b>	15	0,50	0,42	0,43	0,15	0,17	0,27	0,37	0,48	0,23	0,42	0,42	0,43	0,44	0,40									
<b>CEPEC-2005</b>	16	0,49	0,41	0,44	0,12	0,13	0,20	0,40	0,53	0,27	0,18	0,42	0,21	0,16	0,62	0,41								
<b>CEPEC-2006</b>	17	0,23	0,29	0,34	0,58	0,42	0,30	0,28	0,24	0,39	0,18	0,37	0,31	0,17	0,32	0,15	0,35							
<b>CEPEC-2007</b>	18	0,19	0,17	0,16	0,31	0,19	0,40	0,52	0,22	0,63	0,19	0,21	0,20	0,17	0,35	0,21	0,28	0,18						
<b>CEPEC-2008</b>	19	0,20	0,43	0,15	0,16	0,14	0,19	0,16	0,24	0,26	0,41	0,21	0,32	0,28	0,25	0,19	0,29	0,17	0,30					
<b>CEPEC-2009</b>	20	0,26	0,37	0,19	0,11	0,18	0,19	0,17	0,18	0,28	0,21	0,12	0,24	0,19	0,20	0,21	0,33	0,30	0,39	0,37				
<b>CEPEC-2010</b>	21	0,14	0,24	0,37	0,62	0,16	0,37	0,32	0,15	0,41	0,13	0,37	0,15	0,18	0,16	0,13	0,17	0,58	0,13	0,18	0,19			
<b>CEPEC-2011</b>	22	0,44	0,38	0,40	0,52	0,16	0,33	0,67	0,41	0,68	0,11	0,35	0,19	0,18	0,54	0,37	0,38	0,38	0,51	0,17	0,21	0,43		
<b>TSH-516</b>	23	0,24	0,30	0,18	0,21	0,37	0,26	0,21	0,17	0,19	0,17	0,21	0,34	0,42	0,39	0,18	0,33	0,54	0,19	0,22	0,37	0,17	0,21	
<b>TSH-565</b>	24	0,17	0,16	0,33	0,39	0,35	0,38	0,32	0,21	0,15	0,15	0,34	0,48	0,32	0,33	0,19	0,32	0,58	0,17	0,19	0,19	0,39	0,18	0,53
<b>TSH-774</b>	25	0,43	0,38	0,36	0,16	0,13	0,17	0,57	0,43	0,35	0,19	0,41	0,34	0,34	0,43	0,42	0,40	0,17	0,46	0,22	0,25	0,16	0,56	0,26
<b>TSH-1188</b>	26	0,21	0,18	0,33	0,44	0,19	0,49	0,43	0,22	0,29	0,39	0,33	0,39	0,53	0,46	0,34	0,36	0,44	0,31	0,17	0,22	0,29	0,28	0,53
<b>EET-397</b>	27	0,20	0,28	0,18	0,14	0,36	0,20	0,41	0,15	0,39	0,14	0,17	0,34	0,16	0,20	0,14	0,16	0,38	0,41	0,15	0,37	0,17	0,42	0,47
<b>FL-57</b>	28	0,16	0,14	0,28	0,47	0,16	0,50	0,67	0,16	0,46	0,13	0,32	0,34	0,26	0,33	0,16	0,19	0,31	0,54	0,12	0,18	0,30	0,51	0,22
<b>HW-25</b>	29	0,19	0,34	0,35	0,33	0,35	0,36	0,36	0,18	0,15	0,17	0,37	0,33	0,19	0,35	0,16	0,35	0,66	0,17	0,19	0,36	0,42	0,15	0,60
<b>OURICO-428</b>	30	0,41	0,44	0,36	0,32	0,14	0,30	0,67	0,41	0,54	0,17	0,39	0,31	0,28	0,52	0,36	0,46	0,28	0,58	0,29	0,42	0,18	0,62	0,36

Continua...

Apêndice B – Continuação

<b>Clones</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	
<b>PH-15</b>	31	0,19	0,12	0,13	0,18	0,15	0,25	0,16	0,17	0,32	0,47	0,13	0,22	0,17	0,17	0,20	0,31	0,16	0,32	0,33	0,38	0,10	0,16	0,23
<b>PH-16</b>	32	0,17	0,12	0,12	0,41	0,15	0,15	0,13	0,17	0,36	0,57	0,17	0,45	0,46	0,17	0,36	0,15	0,38	0,14	0,24	0,12	0,41	0,37	0,15
<b>PH-17</b>	33	0,21	0,18	0,13	0,14	0,14	0,14	0,12	0,15	0,14	0,42	0,20	0,53	0,72	0,19	0,43	0,18	0,17	0,21	0,29	0,25	0,16	0,17	0,42
<b>PH-92</b>	34	0,18	0,25	0,18	0,19	0,34	0,23	0,38	0,16	0,38	0,17	0,20	0,31	0,18	0,33	0,15	0,31	0,51	0,44	0,16	0,31	0,18	0,36	0,57
<b>PS-13.19</b>	35	0,52	0,56	0,44	0,14	0,19	0,18	0,36	0,56	0,17	0,20	0,50	0,24	0,16	0,63	0,40	0,64	0,47	0,24	0,23	0,48	0,19	0,37	0,48
<b>PS-57.01</b>	36	0,18	0,18	0,14	0,17	0,11	0,18	0,18	0,18	0,13	0,48	0,18	0,47	0,43	0,18	0,42	0,17	0,17	0,22	0,19	0,29	0,14	0,14	0,24
<b>SJ-02</b>	37	0,52	0,50	0,46	0,13	0,23	0,18	0,42	0,51	0,15	0,17	0,50	0,21	0,18	0,46	0,52	0,46	0,21	0,19	0,19	0,18	0,23	0,41	0,18
<b>TSA-654</b>	38	0,14	0,19	0,16	0,21	0,16	0,20	0,17	0,24	0,15	0,21	0,22	0,22	0,22	0,19	0,13	0,15	0,23	0,25	0,24	0,32	0,16	0,13	0,25
<b>TSA-656</b>	39	0,16	0,18	0,16	0,17	0,15	0,15	0,18	0,32	0,13	0,19	0,24	0,17	0,22	0,22	0,14	0,14	0,19	0,15	0,18	0,13	0,13	0,14	0,20
<b>TSA-792</b>	40	0,19	0,16	0,13	0,11	0,34	0,19	0,12	0,20	0,13	0,38	0,17	0,47	0,31	0,19	0,19	0,18	0,30	0,17	0,33	0,24	0,14	0,20	0,41
<b>VB-276</b>	41	0,15	0,31	0,17	0,44	0,17	0,20	0,13	0,17	0,47	0,16	0,17	0,23	0,21	0,19	0,20	0,17	0,53	0,25	0,18	0,45	0,49	0,44	0,33
<b>VB-430</b>	42	0,17	0,33	0,17	0,10	0,17	0,34	0,13	0,17	0,29	0,24	0,13	0,23	0,19	0,16	0,26	0,16	0,28	0,20	0,21	0,36	0,17	0,16	0,31
<b>VB-515</b>	43	0,23	0,16	0,19	0,15	0,40	0,17	0,14	0,18	0,20	0,19	0,24	0,48	0,32	0,22	0,22	0,19	0,32	0,29	0,34	0,30	0,17	0,19	0,38
<b>VB-679</b>	44	0,16	0,14	0,19	0,29	0,13	0,37	0,30	0,19	0,39	0,20	0,16	0,34	0,31	0,36	0,17	0,32	0,18	0,51	0,26	0,42	0,12	0,30	0,21
<b>VB-902</b>	45	0,21	0,27	0,16	0,17	0,15	0,19	0,15	0,13	0,16	0,39	0,18	0,35	0,52	0,18	0,16	0,13	0,28	0,15	0,16	0,35	0,19	0,13	0,54
<b>VB-903</b>	46	0,20	0,20	0,17	0,18	0,16	0,20	0,18	0,22	0,14	0,64	0,19	0,61	0,56	0,23	0,41	0,19	0,20	0,19	0,23	0,23	0,16	0,19	0,26

Continua....

Apêndice B – Continuação

Clones	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	
<b>TSH-774</b>	25	0,35																						
<b>TSH-1188</b>	26	0,46	0,18																					
<b>EET-397</b>	27	0,35	0,45	0,18																				
<b>FL-57</b>	28	0,50	0,52	0,42	0,45																			
<b>HW-25</b>	29	0,68	0,22	0,45	0,47	0,38																		
<b>OURICO-428</b>	30	0,31	0,68	0,33	0,48	0,61	0,30																	
<b>PH-15</b>	31	0,22	0,18	0,21	0,19	0,17	0,18	0,25																
<b>PH-16</b>	32	0,16	0,18	0,36	0,12	0,14	0,18	0,16	0,39															
<b>PH-17</b>	33	0,22	0,25	0,55	0,19	0,15	0,21	0,16	0,22	0,52														
<b>PH-92</b>	34	0,48	0,42	0,34	0,66	0,42	0,56	0,48	0,15	0,16	0,17													
<b>PS-13.19</b>	35	0,37	0,46	0,36	0,33	0,21	0,49	0,49	0,19	0,16	0,25	0,45												
<b>PS-57.01</b>	36	0,22	0,29	0,42	0,18	0,16	0,19	0,21	0,20	0,41	0,52	0,18	0,29											
<b>SJ-02</b>	37	0,19	0,44	0,19	0,17	0,18	0,20	0,37	0,16	0,19	0,20	0,16	0,45	0,16										
<b>TSA-654</b>	38	0,25	0,28	0,29	0,17	0,16	0,21	0,20	0,19	0,20	0,23	0,20	0,30	0,32	0,23									
<b>TSA-656</b>	39	0,23	0,16	0,20	0,10	0,14	0,19	0,21	0,14	0,18	0,15	0,14	0,25	0,18	0,15	0,25								
<b>TSA-792</b>	40	0,37	0,23	0,20	0,33	0,15	0,35	0,19	0,47	0,47	0,34	0,32	0,23	0,23	0,23	0,18	0,20							
<b>VB-276</b>	41	0,23	0,23	0,21	0,34	0,16	0,30	0,28	0,17	0,40	0,28	0,30	0,37	0,22	0,17	0,29	0,15	0,26						
<b>VB-430</b>	42	0,16	0,17	0,14	0,34	0,14	0,35	0,29	0,16	0,16	0,17	0,34	0,31	0,13	0,17	0,18	0,14	0,20	0,36					
<b>VB-515</b>	43	0,39	0,27	0,23	0,36	0,19	0,35	0,20	0,25	0,27	0,42	0,37	0,29	0,25	0,25	0,29	0,15	0,51	0,34	0,16				
<b>VB-679</b>	44	0,34	0,37	0,33	0,21	0,47	0,19	0,52	0,38	0,16	0,22	0,20	0,29	0,27	0,15	0,23	0,13	0,18	0,25	0,18	0,28			
<b>VB-902</b>	45	0,33	0,31	0,38	0,30	0,29	0,32	0,40	0,40	0,39	0,43	0,24	0,30	0,22	0,16	0,23	0,19	0,41	0,31	0,31	0,23	0,34		
<b>VB-903</b>	46	0,36	0,38	0,43	0,20	0,29	0,23	0,33	0,42	0,58	0,44	0,20	0,24	0,54	0,19	0,30	0,21	0,49	0,25	0,16	0,29	0,34	0,57	