

# Agrotropica

Volume 30, número 3, setembro a dezembro de 2018



Centro de Pesquisas do Cacau  
Ilhéus - Bahia



---

© 2018 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

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

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

Ano 2018.

Tiragem: 1.000 exemplares

**Elaboração, distribuição, informações:**

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira

Superintendência Regional no Estado da Bahia

Centro de Pesquisas do Cacau

---

Editor: Ronaldo Costa Argôlo.

Coeditor: Quintino Reis de Araujo.

Normalização de referências bibliográficas: Maria Christina de C. Faria

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

Capa: Ronaldo Costa Argôlo Filho

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

v.

Quadrimestral

Substitui "Revista Theobroma"

1. Agropecuária - Periódico.

CDD 630.5

**INFORMAÇÕES SOBRE A CAPA:** "Chuncho" árvore de 100 anos de idade em Cusco, Peru, preferido pelo produtor por causa do sabor mexerica e pelo aroma de jasmim da sua polpa. Mario Frutuoso Vargas Conde, produtor tradicional do Peru, quem identificou um sabor interessante na fruta fresca.

**INFORMATION ON THE COVER:** Hundred year old "Chuncho" tree in Cuzco, Peru, preferred by the farmer for its mandarin pulp flavor and its jasmine aroma. Mario Frutuoso Vargas Conde, traditional producer from Peru, who identified an interesting flavor in fresh fruit.

**AGROTRÓPICA é indexada em:**

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



**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,  
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**

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

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

**Comitê Editorial:**

Adonias de Castro Virgens Filho; Antônio Cesar Costa Zugaib; Dan Érico Vieira Petit Lobão; Edna Dora Martins Newman Luz; George Andrade Sodré; Givaldo Rocha Niella; Jacques Hubert Charles Delabie; Jadergudson Pereira; José Basílio Vieira Leite; José Inácio Lacerda Moura; José Luís Bezerra; José Luís Pires; José Marques Pereira; José Raimundo Bonadie Marques; Karina Peres Gramacho; Manfred Willy Muller; Paulo César Lima Marrocos; Raúl René Melendez Valle; Uilson Vanderlei Lopes.

**Editor:** Ronaldo Costa Argôlo.

**Coeditor:** Quintino Reis de Araujo.

**Normalização de referências bibliográficas:** Maria Christina de C. Faria

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

**Capa:** Ronaldo Costa Argôlo Filho

**Endereço para correspondência:**

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

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

**E-mail:** agrotrop.agrotrop@gmail.com

**Tiragem:** 1000 exemplares

# AGROTRÓPICA

V. 30

setembro - dezembro

2018

N.3

## CONTEÚDO

### ARTIGOS

- 157 Grande diversidade genética para características de sabor fino revelada no cacau (*Theobroma cacao* L.) com especial atenção para a variedade nativa Chunchu de Cusco, Peru (em inglês). **A. B. Eskes, C. A. C. Rodriguez, D. C. Condori, E. Seguíne, L. F. G. Carrion, P. Lachenaud.**
- 175 Impacto de solos e sistemas de cultivo sobre atributos bioquímicos de amêndoas secas de cacau (em inglês). **Q. R. Araujo, G. A. H. A. Loureiro, C. Rohsius, V. C. Baligar.**
- 195 Efeitos da ventilação na polinização do cacaueiro. **K. Nakayama.**
- 205 Influência do sistema de cultivo na biogeografia das espécies de *Phytophthora* patogênicas ao cacaueiro na Bahia, Brasil. **E. D. M. N. Luz, D. M. A. Magalhães, A. A. Pimenta Neto, L. P. dos Santos Filho, L. A. Magalhães, A. F. Faria Filho.**
- 215 Avaliação do controle biológico por formigas (Hymenoptera: Formicidae) numa cronosequência de cacauais do sudeste da Bahia. **E. S. da Conceição, A. de O. Costa-Neto, J. H. C. Delabie, T. M. C. D. Lucia.**
- 227 Influência de meios de cultura, fotoperíodo e pH no crescimento e esporulação de *Phytophthora nicotianae*. **A. A. Pimenta Neto, E. D. M. N. Luz, G. D. Gonçalves, S. M. A. de Oliveira.**
- 237 Coleópteros associados a dendezeiros e piaçaveiras em municípios da região Sul da Bahia. **G. B. de S. Santos, E. A. S. F. Melo, A. da S. Lima, O. O. dos Santos e M. A. L. Bittencourt.**
- 245 Regeneração de espécies arbóreas em ambiente de mata ciliar do rio Catolé no município de Itapetinga, Bahia, Brasil. **F. G. F. Damasceno, P. S. D. da Silva, L. C. Marinho, A. de Paula, R. J. de Sá Neto, M. M. Corrêa.**

### NOTA CIENTÍFICA

- 253 Método empírico de previsão de safras de cacau. **L. P. dos Santos Filho.**



MINISTRY OF AGRICULTURE  
LIVESTOCK AND FOOD SUPPLY

CEPLAC - Executive Commission of  
the Cacao Agriculture Plan

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

**Editorial Committee:**

Adonias de Castro Virgens Filho; Antônio Cesar Costa Zugaib; Dan Érico Vieira Petit Lobão; Edna Dora Martins Newman Luz; George Andrade Sodré; Givaldo Rocha Niella; Jacques Hubert Charles Delabie; Jadergudson Pereira; José Basílio Vieira Leite; José Inácio Lacerda Moura; José Luís Bezerra; José Luís Pires; José Marques Pereira; José Raimundo Bonadie Marques; Karina Peres Gramacho; Manfred Willy Muller; Paulo César Lima Marrocos; Raúl René Melendez Valle; Uilson Vanderlei Lopes.

**Editor:** Ronaldo Costa Argôlo.

**Coeditor:** Quintino Reis de Araujo.

**Revision of bibliographical references:**  
Maria Christina de C. Faria

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

**Cover:** Ronaldo Costa Argôlo Filho

**Address for correspondence:**

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

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

**E-mail:** agrotrop.agrotrop@gmail.com

**Circulation:** 1000 copies.

# AGROTRÓPICA

V.30

September - December

2018

N.3

## CONTENTS

### ARTICLES

- 157** Large genetic diversity for fine-flavor traits unveiled in cacao (*Theobroma cacao* L.) with special attention to the native chuncho variety in Cusco, Peru. **A. B. Eskes, C. A. C. Rodriguez, D. C. Condori, E. Seguire, L. F. G. Carrion, P. Lachenaud.**
- 175** Impact of soils and cropping systems on biochemical attributes of dry cacao beans. **Q. R. Araujo, G. A. H. A. Loureiro, C. Rohsius, V. C. Baligar.**
- 195** Effects of ventilation in cocoa pollination (in Portuguese). **K. Nakayama.**
- 205** Influence of the cultivation system on the biogeography of *Phytophthora* species pathogenic to cacao in Bahia, Brazil (in Portuguese). **E. D. M. N. Luz, D. M. A. Magalhães, A. A. Pimenta Neto, L. P. dos Santos Filho, L. A. Magalhães, A. F. Faria Filho.**
- 215** Evaluation of biological control by ants (Hymenoptera: Formicidae) according a chronosequency in a cocoa plantation of South East Bahia, Brazil (in Portuguese). **E. S. da Conceição, A. de O. Costa-Neto, J. H. C. Delabie, T. M. C. D. Lucia.**
- 227** Influence of culture media, photoperiod and pH on growth and sporulation of *Phytophthora nicotianae* (in Portuguese). **A. A. Pimenta Neto, E. D. M. N. Luz, G. D. Gonçalves, S. M. A. de Oliveira.**
- 237** Coleoptera associated with oil palm and piaçaveiras in municipalities of the Southern Region of Bahia (in Portuguese). **G. B. de S. Santos, E. A. S. F. Melo, A. da S. Lima, O. O. dos Santos e M. A. L. Bittencourt.**
- 245** Regeneration of tree species in a riparian forest of catolé river, in the municipality of Itapetinga, Bahia State, Brazil (in Portuguese). **F. G. F. Damasceno, P. S. D. da Silva, L. C. Marinho, A. de Paula, R. J. de Sá Neto, M. M. Corrêa.**

### SCIENTIFIC NOTE

- 253** Empirical method for forecasting cocoa safras (in Portuguese). **L. P. dos Santos Filho.**

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A normalização das referências deve seguir os exemplos abaixo:

### PERIÓDICO

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

### LIVRO

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

### PARTE DE LIVRO

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

### DISSERTAÇÃO

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

### TESE

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

### MONOGRAFIA SERIADA

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

### PARTE DE EVENTO

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

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

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

Os autores receberão cópias do seu trabalho publicado.

## GUIDELINES TO AUTHORS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Citation should be given as follows.

### PERIODICALS

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

### BOOKS

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

### BOOK CHAPTERS

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

### DISSERTATION

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

### THESIS

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

### SERIAL MONOGRAPHS

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

### PART OF MEETINGS

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

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

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

Authors will receive the reprints of their published paper.



## LARGE GENETIC DIVERSITY FOR FINE-FLAVOR TRAITS UNVEILED IN CACAO (*Theobroma cacao* L.) WITH SPECIAL ATTENTION TO THE NATIVE CHUNCHO VARIETY IN CUSCO, PERU

Albertus Bernardus Eskes<sup>1\*</sup>, C. A. C. Rodriguez<sup>2</sup>, David Cruz Condori<sup>3</sup>, Ed Seguíne<sup>4</sup>, Luis Fernando García Carrion<sup>5</sup>, Philippe Lachenaud<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Ex-CIRAD/Bioversity International Cocoa Geneticist, Montpellier, France. albertuseskes@gmail.com. <sup>2</sup>Minagri-Senasa, Ministry of Agriculture and Irrigation, Quillabamba, Cusco, Peru. <sup>3</sup>Unidad de Investigación de Productos Naturales, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru. <sup>4</sup>Consultant to Guittard Chocolate / President of Seguíne, Cocoa and Chocolate Advisors, Hanover PA, 17331, USA. <sup>5</sup>Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), Tingo Maria, Peru. <sup>6</sup>Ex-Cocoa Geneticist at CIRAD-BIOS, Montpellier, France.

The fine-flavor cocoa industry explores mainly six chocolate sensory traits from four traditional cocoa (*Theobroma cacao* L.) varieties. The importance of cocoa pulp flavors and aromas has been ignored until we recently showed that they migrate into beans and into chocolates. Pulp sensory traits are strongly genotype dependent and correlated to human preference. Growers of the native Chuncho variety from Cusco, Peru, which is the cocoa that the Incas consumed, make pulp juices from preferred trees (genotypes). Evaluations of 226 preferred trees evidenced presence of 64 unique mostly multi-trait sensory profiles. Twenty nine of the 40 flavors and aromas identified mimic those of known fruit and flower or spice species such as mandarin, soursop, custard apple, cranberry, peach, banana, inga, mango, nut, mint, cinnamon, jasmine, rose and lily. Such large sensory diversity and mimicry is unknown in other commercial fleshy fruit species. So far, 14 Chuncho-like pulp sensory traits have been identified among different cocoa varieties elsewhere suggesting that Chuncho is part of the “centre of origin” for cocoa flavors and aromas. Stable expression of multi-trait Chuncho sensory profiles suggest pleiotropic dominant inheritance, favoring selection for quality traits, which is contrasting with the complex sensory trait determination in other fleshy fruit species. It is inferred that the large sensory diversity of Chuncho cocoa can only be explained by highly specialized sensory trait selection pressure exerted by frugivores, during evolution, and by the indigenous “Matsigenkas”, during domestication. Chuncho beans, still largely employed as a bulk cocoa source, deserve to become fully processed as an extra-fine cocoa variety. The valorization of the numerous *T. cacao* sensory profiles in chocolates, raw beans and juices should substantially diversify and boost the fine-flavor cocoa industry, this time based on the Matsigenka/Inca and not anymore on the Maya cocoa traditions.

**Key words:** cocoa fruit sensory traits, mimicking, pleiotropy, fine-flavor cocoa market, cocoa sensory identity.

## Grande diversidade genética para características de sabor fino revelada no cacau (*Theobroma cacao* L.) com especial atenção para a variedade nativa Chuncho de Cusco, Peru.

A indústria de cacau fino explora principalmente seis características sensoriais de quatro variedades tradicionais de cacau (*Theobroma cacao* L.). A importância dos sabores e aromas da fruta fresca de cacau tem sido ignorada até que mostramos recentemente que eles migram para as amêndoas e para os chocolates. As características sensoriais da polpa variam muito com o genótipo e são relacionadas com a preferência humana. Produtores da variedade nativa Chuncho de Cusco, Peru, que é o cacau que os Incas consumiam, prepararam sucos da polpa de árvores (genótipos) preferidas. Avaliações de 226 árvores preferidas mostraram a presença de 64 perfis sensoriais únicas baseados, na maioria, em mais de uma característica. Vinte e nove dos 40 sabores e aromas identificados imitam daqueles de espécies frutíferas, de flores ou de temperos conhecidos, como *mexerica*, *graviola*, *fruta do conde*, *oxicoco*, *pêssego*, *banana*, *ingá*, *manga*, *noz*, *hortelã*, *canela*, *jasmim*, *rosa* e *lírio*. Esta grande diversidade e imitação sensorial não é conhecida em outras espécies comerciais de frutas frescas. Até agora, 14 características sensoriais do Chuncho foram encontradas em diferentes variedades em outras localidades, o que sugere que Chuncho faz parte do “centro de origem” para sabores e aromas de fruta fresca do cacau. A expressão estável dos perfis multi-sensoriais de Chuncho sugere heritabilidade pleiotrópica dominante, facilitando seleção para características de qualidade, o que contrasta com a determinação geralmente complexa das características sensoriais em outras espécies frutíferas. Inferimos aqui que somente uma pressão de seleção muito especializada dos frugívoros, durante a evolução, e dos indígenas “Matsigengas”, durante a domesticação, poderia explicar a grande diversidade sensorial do cacau Chuncho. As amêndoas de Chuncho, ainda amplamente utilizadas como fonte de cacau “bulk”, merecem pleno aproveitamento para serem industrializadas como uma variedade extra-fino de cacau. A valorização dos numerosos perfis sensoriais do cacau identificados aqui em chocolates, amêndoas e em sucos deverá diversificar e impulsionar substancialmente a indústria de cacau fino, desta vez baseada nas tradições dos Matsigengas e não mais nas tradições das Mayas.

**Palavras-chave:** características sensoriais do cacau, imitação, pleiotropia, mercado de cacau fino, identidade sensorial do cacau.

## Introduction

### Fine and bulk cocoa

The cocoa (*Theobroma cacao* L.) market distinguishes between “bulk” and “fine-flavor” cocoa with bulk cocoa representing 95% of the world cocoa market. The fine-flavor cocoa corresponds currently to ca. 220,000 tons annually. The bonus paid to farmers for fine-flavor cocoa varies from +15% to +300 % (Pipitone, 2016). Fine-flavor chocolates have generally variable fruity flavor and/or flower/spicy aroma expressions, besides the typical “cocoa” flavor. Chocolates from bulk cocoa varieties do generally express just cocoa flavor (Pipitone, 2016). Fine-flavor cocoa has historically been provided by the Criollo, Trinitario and Nacional varieties and, more recently, by hybrids with the SCA6 genotype (TSH clones).

### Pulp vs fine-flavor chocolate sensory trait relationship

Regular tasting of cocoa pulp by the first author in 11 cocoa producing countries led in 2006 to the assessment that “*countries that produce fine chocolates (e.g. Trinidad, Ecuador, Venezuela and Peru) grow varieties that have nice cocoa pulps*”. This reasoning lead to the hypothesis of a fine-flavor pulp vs fine-flavor chocolate relationship. Well-known pulp and chocolate (Presilla, 2009; Sukha and Butler, 2005; Afoakwa, 2008; Clapperton et al., 1994) sensory traits of commercial fine-flavor varieties are presented in Table 1. These are uniformly expressed in trees within uniform varieties (Criollo, Nacional and the Sca6 clone), demonstrating the genetic nature of such

sensory traits. The chocolate sensory profiles “caramel”, “fresh fruit”, “floral” and “brown fruit/raisin/floral” are apparently related to the pulp sensory profiles “very sweet”, “lemon”, “jasmine” and “Muscat grape/lily”, respectively. Ancient Criollo pulps and chocolates both do not express fruity flavors nor aromas. These comparisons suggest the existence of a pulp flavor and aroma vs chocolate fine-flavor relationship, be it with certain modifications such as the grape flavor of SCA6 that is transformed into the related brown fruit/raisin flavor. The nutty flavor is not present in the pulp and is known to be formed only during post-harvest processing.

### Neglect to cocoa pulp sensory trait studies

The mucilaginous cocoa pulp is composed of spongy parenchymatous cells containing cell sap rich in sugars (10 to 13%), pentosans (2 to 3%), citric acid (1 to 2%), and salts (8 to 10%). The main role attributed to cocoa pulp has been to provide the essential substrate for microorganisms to develop, during fermentation, the chocolate flavor precursors that react forming “cocoa” aroma components during the roasting process (Figueira et al., 1993). The effect of cocoa pulp sensory traits on fine-flavor chocolate qualities has only recently received attention. Visitors to cocoa plantations might be familiar with the broad variation in cocoa pulp flavor and aroma. The most conspicuous variation is for acidity and sweetness. While pulp flavor and aroma intensities appear to be low and unspecific for the majority of genotypes, a few clones such as SCA6 (e.g. Presilla 2009) and EET62 have been known since long to have very flavorful and aromatic pulp.

Table 1. Comparison of known chocolate and pulp sensory traits for traditional fine-flavor cocoa varieties and for SCA6

| Variety         | Pulp flavor/aroma                       | Chocolate flavor/aroma        |
|-----------------|---|-------------------------------|
| Ancient Criollo | Very sweet pulp, no flavors or aromas   | Caramel/honey, Nutty          |
| Trinitario      | Citrus flavor, balanced sweet/acid pulp | Fresh fruit                   |
| Nacional        | Jasmine aroma and sweet pulp            | Floral                        |
| SCA6 (clone)    | Muscat grape flavor, lily aroma         | Brown fruit or raisin, Floral |

### Selection of cocoa for fine-flavor traits

Objective breeding towards fine-flavor quality varieties over the last century has probably been restricted to the selection over the last 50 years of the TSH varieties in Trinidad that express high-quality multi-trait pulp and chocolate sensory profiles including that of SCA6. The selection for yield and resistance alone has occasionally resulted in lower than average bulk cocoa quality, as is the case with the CCN51 clone selected in Ecuador in the 1980's. Lockwood and Eskes



(1995) concluded that selection for cocoa quality was hampered by differences in objectives among chocolate manufacturers and by lack of efficient individual tree screening methods. Our Chuncho survey represents the first systematic study in *T. cacao* demonstrating the feasibility of within-variety single-tree diversity evaluations and selection for pulp and raw bean flavors and aromas.

### **Volatile Organic Compounds (VOCs) in cocoa pulp and in beans**

Pino et al. (2010) were the first to identify VOCs in fresh cocoa pulp from a farm in Colombia in 2010. The relevant compounds among 66 VOCs were esters (2-heptyl acetate and 2-pentyl acetate) and linalool that are related to the known fresh fruit flavor (esters) and floral (linalool) aroma from Trinitario and Nacional, respectively. Kadow et al. (2013) reported in 2012 on relative concentrations of VOCs in fresh fruit pulp and beans of three genotypes (EET62, SCA6 and CCN51) that were chosen for their well-known pulp and chocolate sensory qualities (Tables 1 and 2). VOC concentrations were very low in the low-flavor CCN51 clone and high in fine-flavor SCA6 and EET62 clones. The VOCs in SCA6 and EET62 derived from two different metabolic pathways: methylketones, secondary alcohols and esters in EET62 and monoterpenes in SCA6. VOC concentrations were substantially higher in the pulp tissue than in the beans, confirming empirical observations that sensory compounds are primarily metabolized in the pulp. Migration to the cotyledons appeared to start only upon fruit ripening and is likely to be completed during fermentation (Kadow et al., 2013). The authors confirmed that pulp sensory traits are the most important source for fine-flavor cocoa sensory trait variations in beans and in chocolates and that VOC profiles and concentrations are in full agreement with the assessments of contrasting pulp sensorial traits in these genotypes (Tables 1 and 2). Based on the study of Kadow et al. (2013), Hegmann (2015) analyzed the volatile profiles of the fruit pulp of five genotypes selected at CATIE, Costa Rica. Relative quantities of aroma-active substances differed strongly with genotypes, season and fruit ripeness. The VOC profiles were quite different from the SCA6 and EET62

control genotypes suggesting that large diversity exists among cocoa genotypes for pulp flavors and aromas.

### **Genetic determination of fleshy fruit sensory traits**

Barry (2009) considers that aromas imparted by ripening fleshy fruits represent the most complex and species-specific aspect of ripening and one of the key attractants for frugivores. Species and varieties all have unique sensory profiles consisting of up to hundreds of individual compounds classified as alcohols, aldehydes, ketones, esters, terpenes, furans, phenolics and sulphur containing compounds (Barry, 2009). However, apparently only a fraction of the VOCs is most odor-active (e.g. Pino and Bent, 2013). The content and composition of VOCs show both genotypic variation and phenotypic plasticity (El Hadi et al., 2013). The number of flavor and aroma genes in fruits is generally large. Although transgenes altering many volatiles simultaneously are already available, fruits with improved flavor will likely still require coordinated regulation of multiple biosynthetic pathways (Klee, 2010).

### **The native Chuncho cocoa variety**

"Chuncho" ("from the jungle") cocoa is native to the La Convención province (Urubamba valley) in the Cusco region in Peru. Reports exist on the trade of cocoa beans by the native Matsigenkas (=human beings) with the highlanders before and during the Inca Empire (Johnson and Johnson, 1996). Chuncho cocoa was cultivated already in the XVI century, but occurring also spontaneously in association with the Matsigenkas (Aparicio, 1999). This tribe has always had a special interest in consumption of Chuncho fruit pulp (Gade, 1975 ; Missioneros Dominicos, 2009) and also of slightly fermented and roasted raw beans. Rozas (1861) cited by Aparicio (2000) describes native cocoa in the valley of "high quality, noble and healthy" while Paz Soldan (1852), cited by Gade (1975), labels Chuncho cocoa from the Echerate Estate as "the best cocoa in the world". Chuncho cultivation increased between 1850 and 1890 with the arrival of immigrants from Cusco (Encinas, 2009). Chuncho acreage culminated in the 1980s with 14,000 ha and a production of 10.000 tons. The acreage of Chuncho has thereafter declined to ca 11,000 ha with production of 2600 tons currently, which

is due to low productivity (150-250 kg/ha), ageing trees and competition from CCN51 and from other replacement crops. Chuncho is still mainly used as a low-valued bulk cocoa bean source for butter and powder extraction. However, traditional farmers consume pulp juices from selected Chuncho trees which is a practice not known to occur elsewhere in the world. Our pulp and bean survey was therefore focused on Chuncho trees used by farmers for juice production. "Common" Chuncho beans express already interesting unspecific flavors and aromas (Condori Cruz, 2015). Chuncho pulps are generally sweet with low acidity and astringency. Even when unfermented or little fermented, Chuncho beans are neither acid nor bitter nor astringent which is a rather unique feature within Forastero cocoas. However, they may become so with fermentation duration of more than four days (Condori Cruz, 2015). Among the 10 currently recognized major genetic groups of *Theobroma cacao* (Motamayor et al., 2008), the Chuncho variety is part of the "Contamana" group including SCA6. SNP marker studies showed however a closer genetic relationship of Chuncho with native accessions from the Madre de Dios and Beni river basins (Céspedes-Del Pozo et al., 2017) that are geographically related. The within Chuncho molecular diversity can be considered as moderate to high as compared to that of other native cocoa varieties (Zhang, 2014).

### ***T. cacao* frugivores and the Matsigenkas**

Ripe cocoa pods do not drop off the tree and do not open (indehiscent fruit). Consequently, evolutionary dispersal of cocoa seeds must have depended on frugivorous animals. Together with color, specific odor is considered to be a key fruit trait for attracting frugivores (Barry, 2009; Dominy et al., 2001 and 2004; Nevo et al., 2015). Important *T. cacao* frugivory-related traits are (Van Roosmalen, 2008): 1. Ripe fruit adherence to the tree, 2. Thick fruit husks, 3. Strong seed adherence to the pulp, 4. Nutritious and sweet fruit pulp, and 5. Frugivore swallowing of the seeds. Six efficient cocoa frugivores were identified in the Amazon basin: four monkeys (spider, woolly, capuchin and saki), the kinkajou and the coati. These are also associated with eight other fleshy fruit families, including *Annonaceae* (e.g. soursop, custard apple and

annona) and *Mimoseae* (e.g. inga). In La Convención Carlos Rodríguez identified five *T. cacao* frugivores (spider and squirrel monkeys, coatis, nocturnal rodents and squirrels) three of which are different from the Amazon frugivores. Olfactory cues for ripe fruit identification have been demonstrated in several primate species (Nevo et al., 2015). Spider monkeys inspect fruits by sniffing or biting (Van Roosmalen, 2008) and were able to discriminate odors from wild fruits of *Coumama crocarpa* and of *Leonia symosa* which are part of the *T. cacao* frugivory syndrome in the Amazon (Nevo et al., 2015). Laska et al. (2009) demonstrated an unexpectedly high olfactory sensitivity of the squirrel monkey, equaling that of the dog. No information was found on the role of fresh fruit flavors in establishing efficient seed dissemination by frugivores in general.

The Matsigenkas must have disseminated Chuncho seeds since historical times in La Convención which is related to their cocoa pulp and bean consumption traditions (Misioneros Dominicos, 2009). While they don't have names for fellow human beings they have names for cocoa and three cocoa products. They must have selected Chuncho trees for their pulp sensory traits and planted trees in their traditional home gardens.

### **Objectives and rationale of the paper**

Fresh cocoa fruit pulp sensory traits include basic flavor traits (acidity, bitterness, astringency), sweetness, fruity flavors and floral/spicy aromas as well as bean bitterness. Our first objective was to identify variations in intensities for these traits in nine genetically different clones. Such allowed us to show the relationship between cocoa pulp sensory traits and human preference. Our second objective was to identify variations in flavor and aroma identities as found in different cocoa populations with specific emphasis on Chuncho cocoa. It became rapidly clear that pure Chuncho trees have generally sweet pulp and non-bitter beans. When we started to discover the large variations for fruity flavor and aroma identities in this germplasm we decided to carry out a survey involving a 226 Chuncho trees that farmers use for pulp juice production. Therefore, in the second part of our results we only mention variations in Chuncho for identities of flavors and aromas that are compared with what is

known to occur in cocoa growing areas outside the La Convención province.

Results are presented in chronological order:

- Genotype x pulp sensory traits' associations Tingo Maria, Peru, 2007;
- Identifications of 12 hitherto unknown cocoa varietal sensory traits in five different locations outside La Convención, 2007 to 2017;
- A survey on fresh fruit flavor and aroma variations among 226 Chuncho trees in La Convención, 2012 to 2017;
- Relationship between flavor and aroma identities with quantitative sensory traits (acidity, bitterness and astringency) flavor identities in a group of 64 preferred Chuncho bean samples .

In the discussion we provide hypotheses that try to answer the many questions raised by our unusual findings and to present the many opportunities opened by them. We infer the apparent absence of a clear resemblance of the genetic determinations of the Chuncho vs other fleshy fruit species sensory traits. We infer also that most of the Chuncho flavor and aroma traits are in fact mimics of those of other fleshy fruit species.

## Materials and Methods

### Sensory trait vocabulary and perception

By "sensory traits" we mean all expressions of flavors (= taste and odor, El Hadi 2013) such as acidity, bitterness, astringency, cocoa flavor, fruity flavors, nutty/nuts flavor, spicy flavors and aromas (flower, herbal, malt odors). "Flavor" is used in short to indicate flavors from fruits, dry fruits, nuts and malt detected in our sensory surveys. "Aroma" is used to identify smells or odors from "flowers", "herbs" or "spices" but not from fruits, nuts or malt. Pulp aromas have been perceived by the nose when opening cocoa pods. Pulp flavors and aromas were perceived by fresh pulp tasting. Flavors and aromas of dry 2-4 days fermented beans were perceived by tasting the cotyledons. The presence of cocoa or chocolate flavors that are formed during roasting is not considered in our study on pulp and raw bean sensory traits.

### Genotype associations for cocoa pulp sensory traits

Six pulp sensory traits of nine unrelated cocoa genotypes from the cocoa genebank of the Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS) in Tingo Maria, Peru, were assessed in September 2007 including two fine-flavor (EET 64 and ICS1) and one low-flavor (CCN51) genotypes. Five randomly chosen Ucayali (U43, U45 and U53) and Huallaga (H56 and H60) clones from collections held by UNAS, Tingo Maria, Peru were also included. Mixed pulp from two ripe pods of each genotype was placed in closed plastic boxes in the laboratory two hours before sensory evaluation. The use of two pods is justified by the low variation found in the maternal pulp flavor and aroma traits between equally ripe pods from the same tree or even from different trees from the same clone. The panel of six cocoa scientists shared experience on scoring of pulp sensory traits in the field on a mixture of genotypes during a few days before the blind laboratory evaluations. Traits were evaluated in the laboratory on a 0 to 5 point scale using seven descriptors: volatile aroma (odor) perceived by smelling after opening of the boxes followed by traits perceived after pulp tasting: flavor, acidity, sweetness, astringency, bean bitterness/astringency and finally "overall preference". The evaluations resulted in highly significant statistical differences among genotypes despite the relatively low number of panelists. Statistical analyses using linear models (ANOVA, linear correlation) were performed to calculate the treatment effects, and Principal Component Analysis (PCA, using the XLSTAT 2007 program version 8.01) to visualize the associations between traits and genotypes.

### Cocoa pulp and bean sensory trait identifications

The cocoa pulp sensory traits evaluations outside the La Convención province were carried out between 2007 and 2017 by experienced individual cocoa scientists during occasional visits to cocoa fields in four different countries. The scientists identified flavors and aromas of randomly chosen genotypes within different cocoa populations. Because the Chuncho basic flavors are generally uniform and very mild among trees (see Table 6), our sensory trait survey aimed mainly at



identification of the large variation for fine-cocoa flavors and aromas. The Chunchu pulp sensory trait survey, performed by two experienced cocoa scientists, included 100 trees from a 50 km long central stretch of the La Convención valley. The main criteria for tree selection were preference by the farmers for pulp juice consumption, typical Chunchu traits (morphological and sensory) and age of the trees. Confirmation of the Chunchu trees identity was obtained in 2014 with SNP markers (Zhang 2014). The assessment consisted of identification of aromas perceived upon pod opening and of fruity flavors during tasting of pulp of two equally ripe pods per tree.

For the bean survey wet beans were collected in early 2015 and fermented during 2-4 days followed by sun-drying (2-3 hrs per day). The bean survey included 126 Chunchu trees scattered over the 200 km long La Convención valley. The criteria for Chunchu tree selection were the same as for the pulp assessments. Evaluation was done in April 2015 by the first three authors. Two Peruvian fine-chocolate manufacturers Alain Schneider (Chocomuseo) and Pablo Morales (Amaz Food) participated afterwards in 50% of the assessments that confirmed identified traits. Bitterness, acidity, astringency, flavor and aroma intensities and general preference was scored on 0-5 point scales after deliberation and consensus of the panel members. Any observed flavor and aroma identities from known fruit, flower or spice species were recorded also by consensus. The logics behind flavor and aroma identification studies are presented in the Discussion. Associations between flavor and aroma traits with basic flavor traits were analyzed with the Kruskal-Wallis test. Repeatability of trait identifications was assessed by blind re-evaluation of pulp and bean sensory traits from 20 different genotypes during the 2016/17 harvest.

### Chocolate making

Chocolates were made on one occasion to compare cocoa pulp and chocolate flavors and aromas by the fine cocoa quality specialist Ed Seguíne in the USA. Roasting was done at 125°C for 26 min according to the ECA/CAOBISCO/FCC Cocoa Quality Guide Appendix B protocol.

## Results

### Pulp sensory traits are discriminative varietal traits

In 2008, pulp sensory trait intensities in nine cocoa genotypes were evaluated in Tingo Maria, Peru. Discrimination level between varieties was high for all traits ( $P=0.05$ ), with group means varying from a to d (Table 2). Discrimination between varieties was highest for pulp astringency ( $F=13.8$ ) and lowest for pulp sweetness ( $F=3.5$ ). Differences between panelists were not significant for overall preference, pulp acidity and pulp sweetness suggesting that these traits were evaluated in a uniform manner by the panelists. Overall preference scores were positively related to pulp odor, flavor and sweetness intensities and negatively, but not significant, to acidity and astringency (Table 2, Figure 1). Pulp acidity and astringency and bean bitterness/astringency were positively correlated with each other and negatively correlated with pulp sweetness. Highest average pulp preference scores were obtained for EET62 (sweet pulp, strong flavor and odor, high preference).

The second highest preference score was given to the unknown Pandora clone from Colombia that expressed the surprising soursop flavor. The third most preferred clone was the well-known ICS1 (Trinitario) with a strong fresh fruit/lemon flavor. The least preferred clone was CCN51 (acid and astringent pulp, bitter beans, no flavor and aroma). Sensory trait attributes of EET62 and CCN51 represent opposite extremes among the nine clones (Table 2, Figure 1).

Table 2. Sensory preference and associated traits for pulps of nine cocoa genotypes evaluated in 2008 in UNAS, Tingo Maria, Peru by six panelists

| Clone        | Pulp description  | Preference |
|--------------|---|------------|
| EET 62       | Aroma, fruity and sweet                                   | 4,3 a      |
| Pandora 1    | Sweet, soursop flavor                                     | 3,2 b      |
| ICS 1        | Sweet/acid, citric (lemon)                                | 2,7 bcd    |
| U 43, 45, 53 | Sweet and intermediate flavor                             | 2,6 bcd    |
| H 56, 60     | Astringent, acid, low fruity                              | 2,1 bcd/d  |
| CCN 51       | Astringent, acid, low flavor, very bitter/astringent bean | 2,0 cd     |

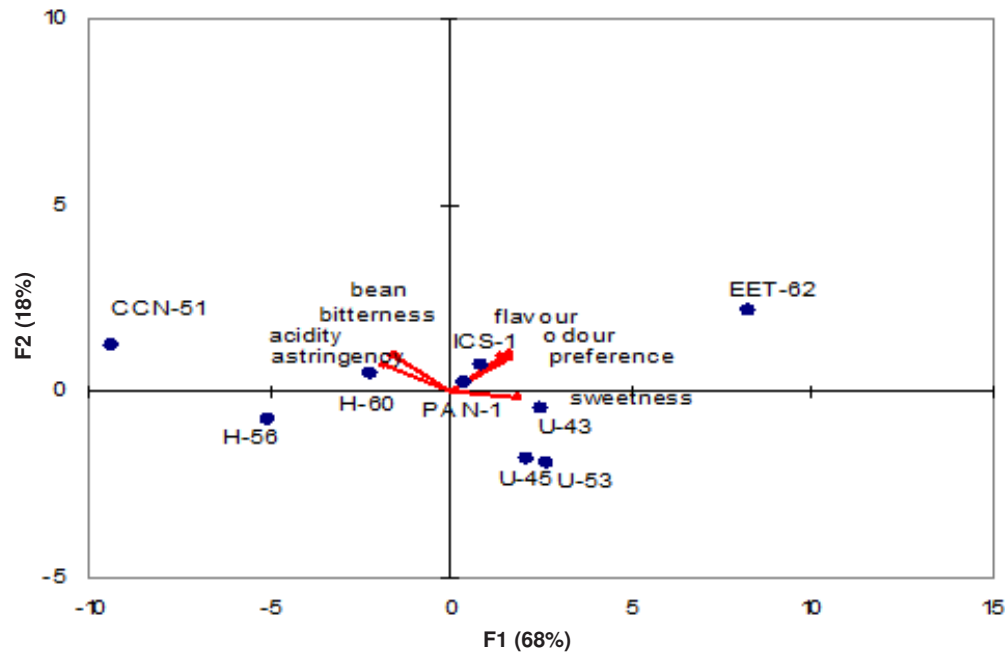


Figure 1. Principal Component Analysis for five sensory traits of the pulp and for fresh bean bitterness of nine cocoa genotypes.

### New pulp sensory traits identified outside La Convencion

Between 2007 and 2017 twelve hitherto unknown cocoa pulp flavor and aroma traits (Table 3) were discovered as a result of limited pulp assessment exercises carried out by three cocoa scientists in seven locations in Trinidad, Peru, Ecuador and Brazil. The most common pulp flavor was soursop identified in all seven locations in widely different cocoa varieties. The mango/rose profile was found in Brazil in a clone that originated from the Ecuador Amazon and was introduced into Brazil for its witches' broom resistance. The banana flavor was discovered in Trinidad in 2008 in an old Trinitario plantation with predominating pulp sensory variation for sweetness and acidity. Five sensory traits (banana, soursop, jasmine, citrus and annona) were identified in Amazon genotypes, as verified with molecular markers (Zhang, 2014) in Satipo, Junin, Peru. Recently it was shown that the formerly widely grown Amelonado variety in Brazil harbors the jasmine aroma which is very surprising. Amelonado has generally been considered as a "bulk" cocoa variety, in contrast with the fine-flavor Ecuadorian Nacional variety that also displays the same jasmine aroma. Other Brazilian clonal varieties also showed

Table 3. Twelve new Chuncho-like sensory traits found in cocoa pulps in seven locations outside La Convencion between 2007 and 2017

| Year | Flavor/aroma trait   | Cocoa population                                  | Country                          |
|------|--|---|----------------------------------|
| 2007 | Soursop*   | Amazon collection INIAP                           | Quevedo, Ecuador                 |
| 2007 | Soursop*   | Pandora clone from Colombia                       | Tingo Maria, Peru                |
| 2008 | Mango/Rose*  | EET397 from Ecuador                               | Bahia, Brazil                    |
| 2008 | Banana*  | Old Trinitario                                    | Trinidad                         |
| 2009 | Soursop*   | French Guiana collection                          | Bahia, Brazil                    |
| 2010 | Soursop**  | Old Trinitario                                    | Trinidad                         |
| 2012 | Mandarin, Soursop and Grape*                                     | Piura "White" or "Criollo" variety                | Piura, Peru                      |
| 2012 | Banana, Soursop, Jasmine, Citrus, Annona***                      | Amazon genotypes verified with genetic markers*** | Satipo, Peru                     |
| 2017 | Soursop, Rose, Lily, Grape, Red Fruit, Citrus, Ingá and Jasmine* | 15 clones plus Amelonado                          | Bahia and Espirito Santo, Brazil |

\*Albertus Eskes; \*\*Maharaj K, 2010; \*\*\*Cruz and Zhang, 2014

fine flavors and aromas, *eg* the CEPEC 2008 clone with soursop flavor and rose aroma (Table 3).

Beans from the Old Trinitario “banana” flavored tree (Table 3) were transformed into chocolates by Ed Seguine. Three cocoa quality specialists described the chocolate flavor as follows: “*The banana flavor was detectable from the mid-session*” (Maharaj, 2010), “*The chocolate comes across with banana skins/strings astringency*” (Ed Seguine) and “*The long lasting aftertaste remembers that of a banana jam*” (Albertus Eskes). This suggests that naturally occurring pulp sensory traits in cocoa may be transformed into very original chocolate flavor traits.

### Chuncho pulp sensory traits survey

Pulp flavors and aromas of 100 Chuncho trees were evaluated in 2012. Ninety seven of the 100 trees showed qualitative expression of pulp flavors and/or aromas (Table 4), representing 30 distinct pulp sensory profiles. These involve 17 fruit flavors and nine aromas or spices. The most frequently encountered sensory profiles are soursop/jasmine, floral and citrus/jasmine found in at least 13 trees each (Table 4).

### Chuncho raw bean sensory traits survey

In April 2015 the sensory panel identified and evaluated intensities of sensory traits and assigned preferences to 126 slightly fermented raw bean samples. Table 5 shows the sensory profiles for 92 bean samples out of the 126 that received overall preference scores of 3 and above. A total of 39 different sensory profiles were identified involving 16 fruity flavors and eight aromas or spices (Table 5). The four most frequently encountered sensory profiles were mandarin/jasmine, soursop/floral, cranberry and malt found each in 6 or more trees.

### Combined pulp and bean surveys

The combined pulp and bean evaluations resulted in a total of 64 unique and highly diverse sensory profiles identified among the 226 evaluated Chuncho genotypes (Tables 4 and 5). Only five identical sensory profiles (8%) and ten (16%) sensory traits were found in the pulp survey as well as in the bean

Table 4. Unique pulp sensory profiles found in 2012 in 100 farmers' preferred Chuncho trees in La Convención province, Cusco, Peru

| No of Profiles | Sensory traits   | No of trees        |
|----------------|--|--------------------|
| 1              | Soursop and Floral   | 16                 |
| 1              | Floral   | 14                 |
| 1              | Citrus and Jasmine   | 13                 |
| 2              | Mandarin and Jasmine / Jasmine   | 6                  |
| 2              | Grape and Jasmine / Tangelo and Jasmine  | 5                  |
| 2              | Fruity / Banana and Floral   | 4                  |
| 3              | Soursop / Lily / Annona  | 2                  |
| 18             | Grape* / Guava and Heavy Floral / Rose Apple and Floral/Banana (var "Cavendish")*/Banana (var. "Manzano") / Green Apple and Floral* / Soursop and Rose* / Rose and Vanilla* / Mint and Rose / Mango* / Custard Apple* / Inga / Inga and Floral / Citrus and Yeast* / Citrus and Banana (var. "Isla") / Citrus, Rose and Jasmine* / Basil / Banana (var. 'Chinito') | 1 *                |
| Total 30       | Fruit flavors: 17<br>Aromas/spices: 9  | Total trees 97/100 |

\* = profile confirmed on occasions outside the survey

Table 5. Sensory profiles of slightly fermented and dried beans collected in La Convención, Cusco, Peru, in 2015 from 126 Chuncho trees

| No of Profiles | Sensory traits   | No of trees        |
|----------------|--|--------------------|
| 1              | Mandarin and Jasmine   | 16                 |
| 1              | Citrus and Jasmine   | 14                 |
| 2              | Cranberry/Malt   | 13                 |
| 2              | Mint and Floral/Malt and Jasmine   | 6                  |
| 2              | Cranberry and Rose   | 5                  |
|                | Mint and Jasmine/Nuts  | 4                  |
| 3              | Mint, Nuts and Lily/Peach and Jackfruit/ Dried Apple/Peach/Ripe Red Fruit / Nuts and Raisin/Nuts and Rose / Peach, Nuts and Rose /Ripe Plum, Raisin and Rose   | 2                  |
| 18             | Peach and Nuts/Peach and Raisin*/ Peach, Raisin and Rose/Peach and Rose /Malt and Lily*/Rose*/Lily*/Lily and Rose*/Fresh Red Fruit*/Ripe Red Fruit and Rose*/Ripe Yellow Fruit and Lily* / Nuts and Lily*/ Nuts, Honey and Cinnamon/Raisin and Jasmine*/ Soursop* /Soursop and Lily/ Jackfruit and Floral/Mint and Nuts/Custard Apple (Cherimoya)* /Mango and Spices / Malt, Nuts and Rose | 1 *                |
| Total 39       | Fruit flavors: 15<br>Aromas/spices: 8  | Total trees 92/123 |

\* = profile confirmed on occasions outside the current survey



survey. Out of the 64 profiles, 25 (39%) are made up by only one flavor or one aroma trait. The remaining 39 profiles (60%) are based on combinations of two or more sensory traits. Thirty-three (52%) contain exclusively fruit flavor and/or flower or spice aroma combinations. Six profiles (9%) are made up of three flavor and/or aroma combinations. Five of the 15 bean flavors are also present among the 17 identified pulp flavors (Table 4) resulting in a total of 28 Chuncho pulp and bean flavors. Five out of the eight bean aromas or spices are also part of the eight identified pulp aromas or spices (Table 4), resulting in a total of 12 identified Chuncho pulp and bean aromas or spices. Therefore, the total number of sensory traits identified so far in Chuncho is  $28+12=40$ . Out of the 40 traits 29 (73%) are mimicking those of known fruit, flower and spice species. Chuncho mimics not only flavors of fruit species but also of varieties within species, such as observed for the four mimicked banana varieties (Tables 4 and 5). It also mimics flavors of related species within the citrus genus (citrus, mandarin and tangelo) all combined with the aroma of the citrus flower aroma (jasmine) (Tables 4 and 5).

The nine and two occurrences of nutty and raisin traits, respectively, were only found in the bean samples (Tables 4 and 5). On the other hand, the soursop flavor trait occurred 19 times (21%) in the assessment of pulp traits (Table 4) but only twice (5%) in the bean assessments. Furthermore, the malt trait was not found in the pulp survey while it was identified 12 times in the bean assessments.

Out of the 64 unique sensory profiles 39 (61 %) were identified in only one tree each. However, 22 of the existing single-tree profiles have been confirmed outside the survey to exist in at least one more tree (Tables 4 and 5). Therefore, only 18 profiles (28%) have so far been identified in only one tree.

### Basic and fruit flavors and aromas in 64 bean samples

Scores on 0-5 point scales for bitterness, acidity, astringency, fruity flavor and aroma traits as well as for overall preference of 20 out of 64 most preferred bean samples, with average scores of 3 and above, are shown in Table 6. These represent 20 of the 39 unique bean sensory profiles identified (Table 5).

Table 6. Examples of 20 unique sensory profiles of 2-4 days fermented Chuncho cocoa beans evaluated on a 0 to 5 point scale in 2015 by a panel of three judges

| Bitterness | Acidity | Astringency | Fruity | Floral | Flavor type                 | Aroma type | Preference |
|------------|---------|-------------|--------|--------|-----------------------------|------------|------------|
| 3          | 0       | 1           | 4      | 5      | Mandarin                    | Jasmine    | 5          |
| 2          | 4       | 1           | 4      | 0      | Cítrus                      | -          | 4          |
| 2          | 3       | 1           | 4      | 4      | Cranberry                   | Rose       | 5          |
| 2          | 1       | 2           | 0      | 4      | -                           | Rose       | 5          |
| 2          | 2       | 1           | 2      | 2      | Peach                       | Rose       | 4          |
| 3          | 2       | 3           | 3      | 2      | Peach/Raisin                | Rose       | 3          |
| 0          | 1       | 1           | 4      | 2      | Mint                        | Jasmine    | 5          |
| 2          | 1       | 0           | 3      | 0      | Mint/Nutty                  | -          | 4          |
| 2          | 2       | 1           | 4      | 0      | Nuts                        | -          | 5          |
| 2          | 1       | 2           | 4      | 0      | Peach                       | -          | 5          |
| 1          | 1       | 1           | 3      | 0      | Peach/Nuts                  | -          | 5          |
| 1          | 1       | 1           | 3      | 0      | Peach, Banana and Jackfruit | -          | 4          |
| 2          | 2       | 3           | 5      | 0      | Cherimoya                   | -          | 5          |
| 2          | 0       | 2           | 0      | 3      | -                           | Lily       | 4          |
| 2          | 2       | 1           | 0      | 5      | -                           | Lily/Rose  | 5          |
| 2          | 1       | 1           | 3      | 2      | Ripe Yellow Fruit           | Lily       | 4          |
| 0          | 0       | 1           | 2      | 2      | Malt                        | Lily       | 3          |
| 3          | 2       | 4           | 4      | 0      | FreshRed Fruit              | -          | 3          |
| 3          | 1       | 3           | 3      | 2      | Raisin                      | Jasmine    | 3          |
| 0          | 2       | 2           | 3      | 4      | Nuts                        | Lily       | 4          |

Despite the low level of fermentation, scores were equal or below 2, on a five point scale, in 80% of the samples for astringency and bitterness (excluding mandarin profiles) and in 89% for acidity, showing the very mild basic flavors in raw Chuncho beans. Overall preference scores of 4 or 5 were given to 60% of the 64 bean samples, showing the appreciation of the panel for the perceived sensory traits.

### **Bean flavor vs basic flavor associations**

Statistical analyses were carried out on average intensities of acidity, bitterness and astringency for sensory profiles that contain specific fruit flavor traits in the 64 most preferred bean samples among the 126 evaluated samples. Three significant associations were identified between flavor and basic flavor scores. Firstly, the 13 bean samples with mandarin/jasmine flavored pulp also produced significantly ( $P=0.003$ ) more bitter beans (score 2.9) than that of the 49 other bean samples (score 2.0). Secondly, the eight bean samples with citrus/jasmine flavor showed significantly higher ( $P=0.01$ ) than average acidity scores (2.3) than that of the control samples (1.3). Thirdly, the average astringency score (3.3) for three red fruit flavored samples was significantly higher ( $P=0.007$ ) than that for the control samples (1.3).

## **Discussion**

### **Progress of cocoa pulp science**

The ignition of pulp sensory trait studies came from the hypothesis launched in 2007 that pulp and chocolate sensory traits are correlated. Further proof came from the finding that during cocoa fermentations with foreign sensory substances transfer of such substances takes place from the fermentation mass into the cocoa beans and into chocolates. Cocoa pulp studies advanced between 2007 and 2012 by the identification in five locations of six hitherto unknown cocoa sensory traits: banana, mango, soursop, mandarin, grape and rose (Table 3). This finding was completely enigmatic until we learned that these traits are part of the genetic sensory trait diversity of Chuncho, hence of *T. cacao*. The first scientific pulp sensory study involved nine cocoa genotypes in Peru in 2008 (Table 2). Another

scientific study concerning cocoa pulp VOCs was published in 2012 (Kadow et al., 2013). Results of both studies were in agreement with the descriptions (Tables 1 and 2) of pulp and chocolate sensory traits in three contrasting clones: EET62, SCA6 and CNN51. Cocoa pulp research is now expanding with the discovery of 64 unique pulp and bean sensory profiles in the Chuncho variety. The most responsible actors for this finding are the traditional Chuncho cocoa producers that use pulp of selected trees to make juices, a habit which is unknown to occur elsewhere. The large genetic sensory diversity found in pulps and beans from these trees suggests that Chuncho farmers select efficiently for diverse and attractive pulp sensory traits. This confirms twice the hypothesis on the existence of a large genetic flavor and aroma diversity in the Chuncho variety.

### **Cocoa pulp vs bean and chocolate sensory trait expression**

Empirical evidence on pulp and chocolate sensory trait correlations for four fine-flavor cocoa varieties is shown in Table 1. However, it also shows modifications for grape and jasmine traits becoming brown fruit and floral traits, respectively, which however are still considered as fine-flavor traits in chocolates (Table 1). We found that 30 (79%) out of the 40 Chuncho sensory traits show high true-to-type expression of pulp flavors and aromas in the raw beans (Tables 4 and 5). However, we also detected modifications of pulp sensory traits in the fermented beans (Tables 5 and 7) of a few genotypes. The soursop flavor becomes a malt flavor in raw Chuncho beans if fermented too long (Table 5) while fresh grape, apple and banana pulp flavors were modified, respectively, into brown fruit/raisin, dry apple and dry banana in the raw beans (Table 7). The grape vs raisin modification resembles that of the SCA6 grape flavor modification (Table 1) in chocolates. Fresh banana flavor was expressed in chocolates as cooked banana/banana jam. These observations suggest that most of the fresh fruit flavors and aromas can be expressed in chocolates be it often with modifications related to processing conditions that will need to be adapted to each genotype in order to obtain a maximum expression of the interesting pulp flavors and aromas in the chocolates.

Table 7. Observed modifications in expression of five Chuncho fresh pulp flavors and two aroma traits in raw beans and in chocolates

| Pulp        | Raw Bean    | Chocolate                          |
|-------------|-------------|------------------------------------|
| Soursop     | Malt*       | ?                                  |
| Grape       | Raisin      | Raisin/Brown Fruit                 |
| Green apple | Dried apple | ?                                  |
| Mandarin    | Mandarin    | Citrus peel                        |
| Jasmine     | Jasmine     | Floral                             |
| Rose        | Rose        | Floral                             |
| Banana      | Dry banana  | Ripe Cooking Banana/<br>Banana Jam |

\*Only if fermented too long.

### Significance of cocoa pulp sensory evaluations

The seven sensory traits evaluated with 9 clones in our 2008 study (Table 2, Figure 1) are considered to provide the basis of what can be evaluated statistically to identify a fine-flavor cocoa genotype. The most important positive traits are considered the preference of the pulp followed by aroma, flavor and sweetness. The most negative traits are acidity, astringency and fresh bean bitterness/astringency. For Chuncho we have however mainly concentrated on the qualitative aroma and flavor identifications because the variation for the quantitative quality traits is rather limited: mild basic flavors, sweet/low acid pulp and non-bitter fresh beans.

The well-known fine-flavor cocoa clones (EET62 and ICS1) had preferred quantitative pulp sensory traits in relation to the least preferred low-flavor CCN51 clone. The pulp sensory traits were correlated with the known chocolate sensory traits of these clones (Tables 1, 2 and 3). Kadow et al. (2013) showed high VOC concentrations in pulp of EET62 and SCA6 (Tables 1 and 2) while the low flavor clone CCN51 did not display any expressive VOCs in the pulp. EET62 and SCA6 displayed two different groups of VOCs in the pulp. This is in agreement with the different fine-flavor sensory profiles in the pulp of EET62 and SCA6. Kadow et al. (2013) concluded that the assessments of pulp sensory traits are in full agreement with the chemical results.

The significance of our qualitative sensory trait survey does mainly depend on the capacity of the panelists to identify flavors and aromas correctly, which would follow the logics of identifying common odors

(e.g. Cain, 1979) that are part of food sensory traits (PubMed, 2012). Cain (1979) and Desor and Beauchamp (1974) found that trained panelists correctly identified 79% and 98%, respectively, of familiar whole odors. Correct recognition of sensory identities is also reflected in the repeatability. So far we obtained 100% repeatability for 20 bean samples in 2015 as compared to the same samples in 2017. The above results suggest that the level of correct identifications obtained by the observations carried out in our surveys is likely to be high.

### Chunchos' vs other cocoa varieties' sensory traits

**Fine-flavor cocoa varieties** Traditional fine-flavor cocoa varieties present six flavor or aroma traits (Table 1) that are very similar to six of the 40 Chuncho pulp and bean sensory traits (Tables 1, 4 and 5). This indicates that 34 of the Chuncho sensory traits are completely new with regard to the traditional fine-flavor varieties. However, two trees identified in old Trinitario plantations in Trinidad expressed banana and soursop pulp flavors (Table 3). This suggests that more Chuncho-like flavors and/or aromas might be found within Trinitario and possibly also within other fine-flavor cocoa varieties.

**Other cocoa varieties** Between 2007 and 2017 twelve different fruit flavors and aromas that are part of the Chuncho trait diversity were detected in pulp of widely different varieties and locations (Table 3). These observations confirm that Chuncho-like flavors and aromas can also be found in different places inside and outside Peru and in different *T. cacao* varieties. It is likely that with systematic single-tree pulp assessments many of the known Chuncho flavors and aromas, and possibly others, will be detected in varieties that are not currently recognized for their fine flavor. An example is the jasmine trait identified in 2017 in the Brazilian Amelonado variety (Table 3) hitherto considered as a typical bulk cocoa variety.

### Chuncho vs *T. cacao* sensory trait specificity

When adding the sensory traits in the traditional fine-flavor cocoa varieties (Table 1) to the traits found in other varieties outside La Convención (Table 3) we arrive at a total of 14 different sensory traits



detected so far outside La Convención that are all included in the 40 Chuncho sensory traits panoply (Tables 2 and 3). This suggests that all sensory traits identified should be considered as *T. cacao* traits rather than as individual cocoa variety traits. It seems likely that many more Chuncho-like sensory traits can be found in other cocoa varieties that might increase the market value of such cocoa varieties. However, Chuncho has the great advantage of presenting very mild basic flavor traits (Table 6). This reduces the need for harsh post-harvest and processing procedures required for most cocoa varieties worldwide to reduce acidity, bitterness and astringency but that at the same time reduce flavor and aroma intensities.

### **Chuncho vs other fleshy fruit genetic sensory trait diversity**

The Chuncho mimicking of 21 flavors and six aromas from known fleshy fruit species seems to be unique when compared to reported variations in sensory trait mimicking in other fleshy fruit species. For example, among 52 descriptors used to analyze diversity of 16 apple varieties (Ulrich et al., 2009), reportedly being the species displaying the “greatest” sensory diversity among commercial fruit species (Baietto and Wilson, 2015), only two refer to other species (pears and almonds). Furthermore, the descriptor lists used for sensory evaluation of nine mango varieties (Vasquez-Cañedo, 2002) only contained non-specific flavors and aromas such as “sweet” or “acid” and “sweet, sour, juiciness and mango impact”, respectively, something that is commonly found also for other fruit species. Presence of great diversity for fruity flavors and flower aromas in “primary wine aromas” is well-documented (e.g. Marais, 1983; Ulrich and Fischer, 2007). However, these are mainly generated by specific combinations of varietal precursors during the fermentation process. Diversity for pre-existing grape varietal aromas, which can be compared to fresh cocoa pulp flavors and aromas, is apparently restricted to a few exceptional grape varieties like Muscat and Shiraz. Grape juices from different grape varieties reportedly show little sensory variation (Ulrich and Fischer, 2007). These comparisons seem to exalt the Chuncho sensory capacity to mimic flavors and aromas from 29 known

fruit and flower or spice species apparently with high precision. Chemical studies will probably be needed to analyze how perfect the mimicked traits of cocoa are.

### **Chuncho trait associations vs evolutionary forces**

Three surprising Chuncho trait associations were identified as follows.

**1. *Citrus x jasmine combinations.*** Out of the 11 Chuncho profiles that present jasmine aromas (Tables 4 and 5), all three of the citrus fruit profiles (citrus, mandarin and tangelo) show the same association with the citrus flower aroma (jasmine). The chance that this is due to pure random events would be 0.001 ( $11/64 \times 11/64 \times 11/64$ ).

**2. *Mandarin flavor vs pulp and bean bitterness.*** The sensory evaluations revealed a significant association between mandarin flavor with increased pulp and bean bitterness. Carlos Rodríguez discovered the location of a bitterness production site in the endocarp tissue of the basal part of pods with mandarin-flavored pulp. This bitterness site does not exist in pods of other Chuncho genotypes. It shows that increased bitterness of the mandarin-flavored beans cannot be an artifact of tasting. Could it be that frugivore animals prefer bittersweet rather than just sweet mandarin pulp?

**3. *Soursop cocoa flavor vs soursop pulp texture.*** Another intriguing Chuncho sensory trait association is that of soursop flavor and soursop pulp appearance observed in all Chuncho trees with soursop flavor. This was also the case with five trees with soursop flavored pulps discovered in Ecuador, in Piura (Peru) and in Brazil (Table 3) showing great stability of this association. It might be inferred that this association has been selected by simultaneous frugivore preferences for flavor and appearance, both part of “taste” (Schwab et al., 2008), of one of their sympatric occurring preferred fruits (soursop).

The above associations exalt the very specific and directive selection pressures that cocoa must have experienced during evolution and domestication.

## Frugivore and human pulp preferences vs Chuncho

### *flavor and aroma diversification*

*T. cacao* depended exclusively on frugivores that effectively disseminated its seeds during evolution. Five legitimate frugivore animal families or genus are associated with *T. cacao* in La Convención as observed by Carlos Rodríguez. The large sensory diversity of Chuncho suggests that evolutionary conditions must have been favorable for intensive and specialized frugivore x *T. cacao* interactions in La Convención.

Besides animal associations, the Matsigenkas have been directly associated with Chuncho cocoa even before the Inca Empire (Johnson and Johnson, 1996) and reportedly always consumed cocoa as fresh fruit pulp (Missioneros Dominicos, 2009) and as slightly roasted beans something that is currently still the case.

Color, smell and texture are reportedly the most important traits of fruit species to attract frugivores (e.g. Dominy et al., 2001; Rodríguez et al., 2013 and Van Roosmalen, 2008). The role of sensory compounds that accumulate inside ripening fleshy fruits in the interactions with legitimate vertebrate dispersers is still badly understood (Rodríguez et al., 2013). It has been suggested that once a frugivore identifies the pulp of a fruit as sweet and nutritious, that would be enough to ensure pulp eating and seed dissemination (e.g. Van Roosmalen, 2008). Chuncho pulp flavor traits are present in 53 (83%) out of the 64 analyzed sensory profiles while 36 pulp aroma traits (56%) were identified in the same 64 profiles. Thirty-three sensory profiles (52%) are made up of specific combinations of one flavor trait (taste) with one aroma or spice trait, which is unlikely to be just a result of chance. It is therefore inferred that ripening *T. cacao* fruits firstly offer an aroma to attract frugivores from a certain distance and then a flavorful pulp to stimulate consumption and effective seed dispersal. However, it is also possible that during domestication the Matsigenkas as well as nowadays the Chuncho growers may have selected trees more for their pulp flavors than for odors.

Chuncho pulps and beans mimic sensory traits associated with four fruit species that are sympatric with *T. cacao* in South American tropical forests: three *Annonaceae* species (soursop, annona and custard

apple) and the inga species (Tables 4 and 5). Frugivores of *T. cacao* are equally associated with the *Annonaceae* and inga species (Van Roosmalen, 2008). It is understandable that these frugivores prefer, and therefore select, *T. cacao* fruit pulp that mimics sensory traits from familiar fruits to which they are also associated as frugivores.

An apparently more difficult question to explain is why *T. cacao* mimics as many as 16 flavors and aromas from allopatric fruit and flower or spice species. The *T. cacao* frugivores might have imposed extremely high evolutionary selection pressures on *T. cacao* for it to be able to metabolize cocktails of compounds that mimic the unique sensory identity of the allopatric fleshy fruit and flower species listed in Tables 4 and 5.

### Genetic determination of Chuncho sensory profiles

The hundred Chuncho trees evaluated in the pulp sensory trait survey showed to belong to the Chuncho molecular genetic diversity cloud (Zhang, 2014) with very little duplication of genotypes. Trees with similar flavor and/or aroma traits were generally different molecular genotypes, suggesting that similar sensory phenotypes can be found in different Chuncho genotypes. However, this aspect deserves to be studied in more detail.

The intensity of the Chuncho lily aroma varied largely in our raw beans' evaluations (scores of 1 to 4) as well as in pulps of different trees in the field. This suggests quantitative expression and polygenic inheritance of this trait.

Several Chuncho hybrid trees, identified as such by molecular markers (Zhang, 2014), have shown high expression of Chuncho pulp sensory traits. The same is known from breeding trials including hybrids of SCA6 and EET62 with unrelated cocoa genotypes. The above is suggestive of dominant gene action of *T. cacao* pulp sensory profiles.

The multi-trait Chuncho sensory profiles represent 60% of the 64 Chuncho sensory profiles. Chuncho multitrait sensory profiles that were found in more than one tree (Tables 4, 5 and 6) are mainly expressed as stable qualitative traits with rather similar intensities among trees and locations. One example is the mandarin/jasmine sensory profile that always displays

strong mandarin fruit flavor and medium to strong jasmine odor combined with higher than average bean bitterness. The soursop flavor occurring alone or with other traits is always associated with a translucent pulp (see also above). Other stable multi-trait sensory profiles are soursop/jasmine, citrus/jasmine, mint/floral, cranberry/rose, mint/jasmine, nuts/rose and peach/nuts/rose. These stable multiple trait associations, including in hybrid genotypes, are suggestive of pleiotropic dominant gene action such as Gregor Mendel identified in pea trait number “three” (Mendel, 1866) responsible for simultaneous expression of “brown seed coat”, “violet flowers” and “axial spots”. The molecular age proved that single genes can produce multiple products with pervasive effects on the phenotype (Stearns, 2010), including for mutants affecting ripening (Kovacs et al., 2009). *T. cacao* may have benefitted from pleiotropy as an evolutionary favorable mechanism associating several attractive traits for frugivores simultaneously. Genetic correlations between flavor and aroma traits may have exemplified *T. cacao* pleiotropy (Stearns, 2010). Such is contrasting with the commonly found quantitative and polygenic expression of sensory traits in other fleshy fruit species (e.g. Klee, 2010).

The possible common dominant pleiotropic inheritance of flavors and aromas in sensory profiles of *T. cacao* would facilitate largely the selection and breeding for specific qualitative sensory traits in cocoa. The above inferences on the genetic determination of flavors and aromas in cocoa would merit confirmation by carrying out more formal genetic studies.

### **Unique Chuncho sensory profiles vs the fine-flavor cocoa market**

The commercial value of a fine-flavor cocoa variety is dependent on the full spectrum of flavor and aroma traits including basic flavor traits. Chuncho has the advantage of combining a multitude of very interesting sensory traits with favorable basic flavor traits (Table 6). While commercial fine cocoas usually have a narrow sensory profile, Chuncho offers a remarkable choice of 64 interesting flavor and/or aroma combinations. Thirty-three (52%) of the 64 unique sensory profiles are made up by fruity flavor x floral or spice aroma combinations. Six profiles (9%) are

made up of a combination of three flavors and/or aromas. The 25 Chuncho profiles with just one sensory trait mimic 16 known flavors and aromas: cranberry, basil, dried apple, peach, rose, jasmine, lily, inga, mango, three banana varieties, soursop, grape, annona and custard apple. Fifteen of these traits are attractive already just because they are completely new to the current fine-flavor cocoa market. Complex Chuncho sensory profiles might be even be more attractive commercially as seems to be the case for the multiple sensory traits found in TSH varieties selected in Trinidad. A few examples of apparently interesting complex Chuncho sensory profiles (Tables 4 and 5) are: mandarin/jasmine, soursop/jasmine, rose/vanilla, mint/jasmine, citrus/jasmine, tangelo/jasmine, cranberry/rose, nuts/raisin, peach/nuts, peach/rose, lily/rose, mint/nuts/lily, ripe plum/raisin/rose and nuts/honey /cinnamon. The expected commercial use of such unique varieties should lead to a significantly refined diversification and enlargement of the fine-flavor cocoa market. We propose here that multiple-trait sensory profiles are baptized as “extra-fine” cocoa sensory profiles.

### **Potential for Chuncho fresh juice and roasted whole bean consumption markets**

Matsigenkas and Chuncho growers consume selected cocoa pulps and juices as well as slightly roasted whole beans. These two ways of consumption may potentially become two new segments in the fine cocoa market. The fresh juices produced from selected Chuncho trees would be as diverse as the 64 unique sensory profiles, eg soursop”, cranberry”, mango/rose”, peach/jasmine and tangelo/jasmine”. Our sensory trait assessments have convinced us that eating the Chuncho dry raw bean from selected genotypes is a superior tasting experience. The flavors and aromas are fully expressed in raw Chuncho beans while several Chuncho sensory traits are modified or become weaker in chocolates (Table 7). Basic flavors of Chuncho beans are very mild (Table 6) favoring direct consumption of slightly roasted de-hulled beans or nibs. Such a new market might favor cocoa producers who would possibly receive a higher percentage of the final selling price of the cocoa beans that do need only minimal processing and no transformation of the Chuncho



cocoa beans. Last but not least, consumption of de-hulled slightly roasted cocoa beans is expected to bring along health benefits through higher polyphenol concentrations than in chocolates combined with high tasting pleasure benefits.

### **Cocoa's sensory identity and evolutionary survival**

Any fruit or flower species has built up its own sensory identity over millions of years during evolution and domestication (Barry, 2009). This sensory identity is very precious to the fruit and flower species as it serves as the main recognition factor for frugivores and human beings to be efficient seed dispersers, thus guaranteeing survival during evolution and domestication. Each of such sensory identities is based on a very delicate quantitative and qualitative balance among large numbers of VOCs (Barry, 2009; El Hadi et al., 2013; Klee, 2010). With Chuncho possibly being the “mother” of all *T. cacao* flavor and aroma traits we might consider the possibility that it is also the “mother” of the cocoa sensory identity. With our findings that Chuncho mimicks sensory traits of 29 fruit, flower and spice species one might wonder if *T. cacao* has at all built up its own specific sensory identity. We hypothesize that in the absence of a specific *T. cacao* pulp sensory identity, Chuncho and possibly other cocoa varieties may have developed a large number of mimicked flavors and aromas to attract specialized frugivores.

### **Identification, selection, breeding and multiplication of fine-flavor genotypes in Chuncho and in other varieties**

As shown by our results, selection for fine-flavor cocoa genotypes can be done rapidly and efficiently by pulp evaluation for fine-flavor sensory traits. We expect that besides Chuncho, pulp flavor and aroma selection can be successful also in other cultivated and native cocoa populations or in landraces in Peru and elsewhere. Populations that are genetically narrowly related to Chuncho *eg* from Madre de Dios and Beni deserve extra attention. Farmer associations and research institutes could promote large scale competitions for farmers to identify trees, within any

diverse cocoa variety, with the most delicious pulp combined with non-bitter beans that should thereafter be characterized for flavor and aroma identity and intensity, following the logics of our approach in Chuncho. Once trees with favorable pulp and bean traits have been identified and which have also interesting yield components then the next step is multiplication and/or breeding. Firstly, individually selected trees need to be multiplied as clones for conservation purposes. Secondly, if the selected tree has also interesting yield components and is self-compatible it could be used directly for commercial mono-clonal multiplication.

Breeding should aim at high yield, resistance and fine-flavor quality. An interesting option is the creation of hybrid varieties by crossing Chuncho selections with parental genotypes (*e.g.* PA121 and PA169, that are available in La Convención and elsewhere) that are known to produce high yielding and resistant hybrids and which neutral pulp does not interfere with the fine-flavor Chuncho quality expected to dominate in the hybrids.

Thirdly, the establishment of small-scale commercial plantations can be achieved by using open-pollinated seed from selected Chuncho trees which, even if self-incompatible, as expected from the pleiotropic dominant gene action should reproduce largely the sensory traits of the parental trees. Such seed progenies could be selected within 3-5 years for flavor/aroma traits and for yield components. The then selected trees should provide enough budwood to ensure establishment of larger commercial polyclonal plantations with uniform sensory traits. Finally, the definite answer to the need of rapid commercial multiplication of Chuncho trees with high quality and average or high yield potential is probably best provided by large-scale somatic embryogenesis.

### **Acknowledgements**

The authors wish to acknowledge the invaluable and continuous collaboration obtained by the numerous Chuncho cocoa farmers in La Convención in sharing indigenous knowledge on trees having interesting pulp traits that served as the basis for our pulp and bean sensory assessment studies. Special thanks go to Carlos Valer and Alipio Caceres whose Chuncho

gardens have served as our sensory trait laboratory. The relevant contributions of the Lima-based fine-flavor chocolate manufacturers Alain Schneider (Chocomuseo) and Pablo Morales (Amaz Food) to 50% of the bean sensory trait assessments is acknowledged. The results presented here would not have been possible without the logistic support from the INIA/Bioversity International Chunchu “Competitiveness” Project (2011-2015), including the INIA project coordinator Dr. Arturo Távora and the Bioversity administrative coordinator Dr. Charles Staver. The support of the CGIAR Research Program on Forests, Trees and Agroforestry is further acknowledged. Relevant field support was provided by the INIA scientists César Odicio and Wilbert Cruz in the Chunchu pulp sensory assessments. We thank SENASA for having permitted Carlos Rodríguez to spend considerable time and dedication to activities that were not directly included in his SENASA assignment. Acknowledgements go further to the cocoa specialists that accepted to revise the manuscript: Dr. Dapeng Zhang, cocoa geneticist and genetic diversity specialist of the USDA/ARS, Beltsville, USA, Dr. Daniel Kadow, a cocoa VOC specialist of the Hamburg University, Germany, and Maricel Presilla, author of “*The New Taste of Chocolate: A Cultural and Natural History of Cacao*” and a knowledgeable cocoa and chocolate sensory evaluation specialist living in the USA.

### Literature Cited

- AFOAKWA, E. O. et al. 2008. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48:839-864.
- APARICIO VEGA, M. J. 1999. De Vilcabamba a Camisa: Histografía de la Provincia de la Convención. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco, Peru.
- APARICIO VEGA, M. J. 2000. Perspectivas y observaciones de los valles de Santa Ana por José Teodosio Rozas, Cusco Noviembre de 1861. Instituto Americano de Arte y Monografías Históricas del Cusco N° 2. Cusco, Peru.
- BAIETTO, M.; WILSON, A. D. 2015. Electronic-Nose Applications for Fruit Identification, Ripeness and Quality Grading. *Sensors* 15:899-931; doi:10.3390/s150100899.
- BARRY, C. S. 2009. The discovery of aroma and flavor genes in fruit. In: Ostergaard L. ed. *Fruit development and seed dispersal. Annual Plant Reviews* 38. Wiley-Blackwell. pp.307-289.
- CAIN, W. S. 1979. To know with the nose: Keys to odor identification. *Science* 203:467-470.
- CÉSPEDES-DEL POZO W. H. et al. 2017. Assessing genetic diversity of the native Chunchu cacao (*Theobroma cacao* L.) in La Convención, Cusco, Perú. International Symposium on Cocoa Research (ISCR), Lima, Peru, 13-17 November 2017. ICCO.
- CLAPPERTON, J. et al. 1994. Contribution of genotype to cocoa (*Theobroma cacao* L.) flavor. *Tropical Agriculture* 71:283-288.
- CONDORI CRUZ, D. 2015. Optimización del manejo pos cosecha del cacao proveniente de La Convención (Cusco) para el mejoramiento de su calidad organoléptica y del contenido de fitoquímicos benéficos para la salud. MSC Dissertación thesis. UPCH, Lima.
- CRUZ, W.; ZHANG, D. 2014. Personal communication. Genetic diversity and sensory trait associations in Satipo, Peru. Cocoa geneticists at INIA, Peru and USDA, USA, respectively.
- DESOR, J. A.; BEAUCHAMP, G. K. 1974. The human capacity to transmit olfactory information. *Perception Psychophysics* 16:551-556.
- DOMINY, N. J. et al. 2001. Role of smell. The sensory ecology of primate food perception. *Evol Anthropol* 10:171-186.
- DOMINY, N. J. 2004. Fruits, fingers and fermentation: the sensory cues available to foraging primates. *Integrative and Comparative Biology* 44(4):295-303.
- EL HADI, M. A. et al. 2013. Advances in Fruit Aroma Volatile Research. *Molecules* 18:8200-8229.
- ENCINAS, M. A. 2009. Historia de la Provincia de la Convención, Tomo I, Siglos XVI al XIX, Centro Cultural José Pío Aza, Lima, Perú. 325p.
- FIGUEIRA, A. et al. 1993. New products from *Theobroma cacao*: Seed pulp and pod gum.

- In: Janick, J.; Simon J. E. editors, New Crops, Wiley, New York. pp 475-478.
- GADE, D. W. 1975. Plants man and the land in the Vilcanota valley. Biogeographica vol 6, Dr. W. Junk B.V. Publishers, The Hague.
- HEGMANN, E. C. 2015. Qualitätsbedingende eigenschaften neuer kakao-genotypen und deren verhalten im nachernteverfahren – eine analyse neuer kakao-selektionen aus Costa Rica, Dissertation, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität von Hamburg. ICCO 2016. Fine or Flavor Cocoa.
- JOHNSON, O.; JOHNSON, A. 1996. Matsigenka. Encyclopedia of World Cultures. Encyclopedia.com.
- KADOW, D. et al. 2013. Identification of main fine or flavor components in two genotypes of the cocoa tree (*Theobroma cacao* L.). Journal Applied Botany Food Quality 86:89-98.
- KLEE, H. J. 2010. Improving the flavor of fresh fruits: genomics, biochemistry and biotechnology. New Phytol 187:44–56.
- KOVACS, K. et al. 2009. Effect of tomato pleiotropic ripening mutations on flavor volatile biosynthesis. Phytochemistry 70:1003-1008.
- LASKA, M. et al. 2006. Olfactory Sensitivity for Aliphatic Alcohols and Aldehydes in Spider Monkeys (*Ateles geoffroyi*). American Journal of Physical Anthropology 129:112-120.
- LOCKWOOD, G.; ESKES, A. B. 1995. Relationship between cocoa variety and quality. Seminar Proceedings, Cocoa Meetings “The Various Aspects of Quality”; 1995 AFCC. CIRAD, June 30, 1995, Montpellier, France. pp.159-167.
- MAHARAJ, K. 2010. Discovery of a Trinitario tree with soursop pulp flavor. Cocoa geneticist, MALMR, Trinidad. (Personnal communication).
- MARAIS, J. 1983. Terpenes in the aroma of grapes and wine: a review. South African Journal of Enology and Viticulture 4(2):49-58.
- MENDEL, J. G. 1866. Experiments in plant hybridization. Verhandlungen des Naturforschenden Vereines in Brunn 4:3-47.
- MISIONEROS DOMINICOS. 2009. La Vida del Pueblo Matsiguenga, Aporte etnográfico de los misioneros dominicos al estudio de la cultura Matsiguenga (1923-1978) Centro Cultural Jose Pio Aza, Lima, Perú.
- MOTAMAYOR, J. C. et al. 2008. Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L). Plos One. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>.
- NEVO, O. et al. 2015. Chemical recognition of fruit ripeness in spider monkeys. Scientific Reports 5:14895.
- PINO, J. A. et al. 2010. Headspace volatiles of *Theobroma cacao* L. pulp from Colombia. Journal of Essential Oil Research 22:113-115.
- PINO, J. A.; BENT, L. 2013. Odour-active compounds in guava (*Psidium guajava* L. cv. Red Suprema), Journal of the Science of Food and Agriculture 3114-3120.
- PIPITONE, L. 2016. Global Situation and Prospects of the Cocoa and Chocolate Markets Current Challenges and Opportunities, 2nd Cocoa Revolution, Ho Chi Minh City, 09-11 March 2016.
- PRESILLA, M. E. 2009. The new taste of chocolate: A cultural and natural history of cacao with recipes, Berkeley, Ten Speed Press.
- PUBMED HEALTH. 2012. How does our sense of taste work? US National Library of Medicine, January 2012.
- RODRÍGUEZ, A. et al. 2013. Fruit aromas in mature fleshy fruits as signals of readiness for predation and seed dispersal. New Phytologist 197:37–48.
- SCHWAB, W. et al. 2008. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. Plant Journal 2008. On-line Wiley Library.
- STEARNS, F. W. 2010. One hundred years of pleiotropy: Retrospective. Genetics 186(3):767-773.
- SUKHA, D. A.; BUTLER, D. R. 2005. The CFC/ ICCO/INIAP Cocoa Flavour Project- Investigating the Spectrum of Fine Flavour within Genotypes and between Origins. INGENIC Newsletter 10:22-25.

- ULRICH, U. et al. 2009. Diversity and dynamic of sensory related traits in different apple cultivars. *Journal Applied Botany Food Quality* 83:70-75.
- ULRICH, U.; FISCHER, C. 2007. Wine aroma. In *Flavors and Fragrances, Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Ed R.G. Berger, Springer, Chapter 11.
- VAN ROOSMALEN, M. G. M. 2008. *Blootvoets door de Amazone: De evolutie op het spoor*. Bert Bakker, Amsterdam.
- VÁSQUEZ-CAICEDO, A. et al. 2002. Physical chemical and sensory properties of nine Thai mango cultivars and evaluation of their technological and nutritional potential. In: *International Symposium on Sustainable Food Security and Managing Natural Resources in Southeast Asia Challenges, 22st Century*, 2002, Chiang Mai, Thailand.
- ZHANG D. 2014. Genetic diversity of Chuncho genotypes evaluated with SNP markers. Cocoa geneticist, USDA/ARS, Beltsville, USA. (Personnal Communication).





## IMPACT OF SOILS AND CROPPING SYSTEMS ON BIOCHEMICAL ATTRIBUTES OF DRY CACAO BEANS

*Quintino R. Araujo<sup>1,2</sup>, Guilherme A. H. A. Loureiro<sup>3</sup>, Christina Rohsius<sup>4</sup>, Virupax C. Baligar<sup>5</sup>*

<sup>1</sup>Cocoa Research Center (CEPEC) at the Executive Commission for the Cacao Farming Plan (CEPLAC), km 22 Ilhéus-Itabuna Highway. 45600-970, Itabuna, Bahia, Brazil. quintinoar@gmail.com, gahal.85@gmail.com; <sup>2</sup>Department of Agricultural and Environmental Sciences at the State University of Santa Cruz (UESC), km 16 Ilhéus-Itabuna Highway. 45662-000, Ilhéus, Bahia, Brazil. <sup>3</sup>Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx), Faculty of Chemistry. Toluca 50100, México. <sup>4</sup>Department of Crop Science and Plant Ecology, Biocentre Klein Flottbek and Botanical Garden, Ohnhorststr 18, D-22609 Hamburg, Germany. crohsius@iangbot.uni-hamburg.de. <sup>5</sup>USDA-ARS Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland, USA. vc.baligar@ars.usda.gov.

In the present technological context, the identification of substances that contribute to the quality of dry cacao (*Theobroma cacao* L.) beans is as important as the agricultural practices and processing of cacao beans for food safety and marketing. The objective of this study was investigating the influence of cropping sites, represented by different soils (Argisols, Cambisols and Latosols) and cropping systems (cacao cabruca agroforestry system, cacao tree shaded with erythrina tree, agroforestry system of cacao tree with rubber tree) on biochemical attributes of dry cacao beans of PH-16 clone, in the humid zone of cacao growing region of Bahia, Brazil. The average contents of dry cacao bean attributes total acidity, simple carbohydrates (sucrose, fructose and glucose), theobromine and epicatechin have varied according to the different cropping sites. For these attributes, the cropping site that correspond to typic Dystrophic Red-Yellow Latosol in the agroforestry system of cacao tree with rubber tree (400 trees ha<sup>-1</sup>) showed the best quality characteristics in dry cacao beans. In contrast, the cropping site that correspond to the abrupt Dystrophic Red-Yellow Argisol in the cacao cabruca agroforestry system (60 shade trees ha<sup>-1</sup>) showed the worst performance relative to these same cacao beans quality indicators.

**Key words:** *Theobroma cacao* L., cacao quality, total acidity, simple carbohydrates, theobromine, epicatechin.

**Impacto de solos e sistemas de cultivo sobre atributos bioquímicos de amêndoas secas de cacau.** No contexto tecnológico atual, a identificação de substâncias que contribuem para a qualidade das amêndoas secas de cacau (*Theobroma cacao* L.) é tão importante quanto as práticas agrícolas e o processamento do cacau para a segurança e comercialização dos alimentos. O objetivo deste estudo foi investigar a influência dos locais de cultivo representados por diferentes solos (Argissolos, Cambissolos e Latossolos) e sistemas de cultivo (sistema agroflorestal cacau cabruca, cacau sombreado com eritrina, sistema agroflorestal cacaueiro com seringueira) sobre os atributos bioquímicos das amêndoas secas do clone PH-16, na zona úmida da região de cultivo de cacau da Bahia, Brasil. Nas amêndoas secas de cacau, os teores médios dos atributos acidez total, carboidratos simples (sacarose, frutose e glicose), teobromina e epicatequina variaram de acordo com os diferentes locais de cultivo. Para estes atributos, o local de cultivo que corresponde ao Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico típico no sistema agroflorestal cacaueiro com seringueira (400 árvores ha<sup>-1</sup>) mostrou as melhores características de qualidade nas amêndoas secas de cacau. Em contraste, o local de cultivo que corresponde ao Argissolo Vermelho-Amarelo Distrófico abrupto no sistema agroflorestal da cabruca (60 árvores de sombra ha<sup>-1</sup>), apresentou o pior desempenho em relação a esses mesmos indicadores de qualidade de amêndoas de cacau.

**Palavras-chave:** *Theobroma cacao* L., qualidade do cacau, acidez total, carboidratos simples, teobromina, epicatequina.

## Introduction

Cacao (*Theobroma cacao* L.) is an important commodity cultivated over 10 million ha of land area in the tropical countries with world production over 4 million tones, of which about 6 million people worldwide depend directly on its cultivation to sustain their livelihood (FAO, 2003, 2017). The current prospects for the supply of chocolate makers industries and other industrial sectors benefited by seeds (beans), coming from various countries in different continents, suggest that the relationship between supply and demand tends to become increasingly fierce (FAO, 2003, 2017; ICCO, 2012; WCF, 2014). Besides increased production by raising productivity and price appreciation, the world's cacao is facing the challenge of quality of primary production and cacao by-products (EFSA, 2012a, 2012b, EU, 2006, 2014; ICCO, 2010; WCF, 2014).

In this context, in addition to all agricultural practices and the processing of cacao beans (ICCO, 2008), the need arises to identify internal substances that contribute to the quality of cacao. Many biochemical attributes are linked to the quality of cacao beans, such as pH and total acidity, acetic and lactic acids, sucrose, fructose, glucose, lipids, proteins, amino acids, theobromine and caffeine, catechin, epicatechin and the total phenols (Loureiro et al., 2016). Because of their importance, these attributes were included in the development methodology of cacao quality index (Araujo et al., 2014; Loureiro, 2014).

The pH during fermentation is crucial as it determines the rate of enzyme activities that are responsible for the production of flavour precursor as well as the development of the characteristic brown color of cacao beans (Afoakwa, 2014). Most of these enzymes are reported to have pH optimum between 4.5 and 5.5 (Biehl et al., 1989). In a study, cacao beans fermented with pH between 5.0 and 5.5 (Biehl et al., 1985) produced higher flavour potentials, whereas cacao beans fermented beans with pH 4.0 to 4.5 produced lower flavour potential (Biehl and Voigt, 1994).

The desired range of total acidity of fermented and dried bean by the chocolate industry is between 12-15 mEq NaOH 100 g<sup>-1</sup> (Lopez and Passos, 1984). However, from the results obtained by Bonvehí and Coll (1997) could infer that optimally fermented cacao

bean samples should have a maximum total fixed acidity of 39 mEq NaOH 100 g<sup>-1</sup>, and a non-volatile fixed acidity of 35 mEq NaOH 100 g<sup>-1</sup>. In different cropping systems, the reported range of average total acidity contents of fermented cacao beans was between 8.3 to 19.8 mEq NaOH 100 g<sup>-1</sup> (Jinap and Dimick, 1990). Holm et al. (1993) also reported that the total acidity average contents ranged from 8 to 29 mEq NaOH 100 g<sup>-1</sup> in cacao beans from different geographic regions.

The contents of most organic acids found in cacao beans are result of fermentation process (Holm et al., 1993; Jinap and Dimick, 1990). Aprotosoie et al. (2016) explained that during fermentation the concentration of organic acids increases as a result of sugar metabolism. According this review, acetic acid with sour and vinegar-like aroma is considered the highest odor-active compound in fermented and unroasted beans. Besides acetic acid, other short-chain carboxylic acids (isobutyric, isovaleric, and propionic) predominate in fermented cacao beans. They produce off-odor notes (rancid, butter, and hammy) and they are eliminated during the roasting and conching stages (Aprotosoie et al., 2016). Rodriguez-Campos et al. (2012) also explained that a prolonged fermentation (over 6 days) increases the level of organic acids and their off-flavour notes. Jinap and Dimick (1990) reported that the average acetic acid contents ranged from 4.19 to 8.09 mg g<sup>-1</sup> in cacao beans from different geographic regions. Another study also reported that the acetic acid average contents ranged from 1.3 to 11.8 mg g<sup>-1</sup> in cacao beans from different cropping regions (Holm et al., 1993). Despite their important role in the enzymatic processes (Schwan and Wheals, 2004), excess of acetic acid may impair important characteristics of chocolate flavour and aroma (Armijos Paredes, 2002; Schwan and Wheals, 2004).

Lactic acid has been claimed to be partly responsible for acidity of the cacao beans (Passos et al., 1984). Jinap and Dimick (1990) reported that the average lactic acid contents ranged from 2.1 to 5.0 mg g<sup>-1</sup> in cacao beans from different geographic regions. Another study also reported that the average lactic acid contents ranged from 0.6 to 11.1 mg g<sup>-1</sup> in cacao beans (Holm et al., 1993). The excess of lactic acid amounts in cacao beans also reduces the quality of products and by-products of cacao beans, being undesirable for the chocolate industry (Armijos

Paredes, 2002; Schwan and Wheals, 2004). Bonvehí and Coll (1997) showed that optimally fermented cacao samples should have a lactic acid content of  $0.5 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  ( $5 \text{ mg g}^{-1}$ ).

The hydrolysis of the sucrose present in the mucilage of beans in the fermentation process, or enzymatic breakdown results in reducing carbohydrates such as fructose and glucose, which are found in the dry beans (Reineccius et al., 1972; Voigt and Biehl, 1995). Due to loss of selective permeability of cell membranes of fermented beans, carbohydrates migrate to the center of the beans (Reineccius et al., 1972; Voigt and Biehl, 1995). The simple carbohydrates sucrose, glucose and fructose are important to detect the quality and purity of the cacao nibs' by-products, such as cacao powder, and the deficiency of reducing carbohydrates (fructose and glucose) is a limiting factor for the development of the ideal flavour for chocolate during roasting (Pisaturo and Bisagno, 1981; Rohan and Stewart, 1966). The post-harvest fermentation process is a major factor affecting the sugars in cacao beans (Reineccius et al., 1972). Recent information on the simple carbohydrate contents in dry cacao beans are scarce. Reineccius et al. (1972) reported that the total free sugars in cacao beans from different cropping regions ranged between  $8.58$  to  $18.56 \text{ mg g}^{-1}$ . However, it was explained that the range of values found in this study was due to the different conditions of data collection, fermentation and drying process (Reineccius et al., 1972). The study by Brito et al. (2000) confirms the hypothesis of changes in the contents of simple carbohydrates from cacao beans during the fermentation, drying and roasting.

Sucrose disappears almost completely during cacao beans fermentation (Knapp, 1937). From the relative percentage of each single carbohydrate in total content of free sugars reported by Reineccius et al. (1972) it was possible to estimate a range of sucrose content in cacao beans from  $0.54 \text{ mg g}^{-1}$  (supposed ideal condition) to  $9.94 \text{ mg g}^{-1}$  (supposed not ideal condition). Brito et al. (2000) reported for Forastero cacao beans from Brazil a sucrose content of  $1.84 \text{ mg g}^{-1}$  in crude beans,  $1.46 \text{ mg g}^{-1}$  in fermented beans (72 hours),  $0.82 \text{ mg g}^{-1}$  in dry beans and  $0.42 \text{ mg g}^{-1}$  in roasted beans. The value of  $1.12 \text{ mg g}^{-1}$  of sucrose average content was reported in Common cacao beans from Bahia, Brazil (Loureiro, 2012).

For fructose contents in dry cacao beans it was possible to estimate a range from  $3.6 \text{ mg g}^{-1}$  (supposed ideal condition) to  $4.9 \text{ mg g}^{-1}$  (supposed not ideal condition) (Reineccius et al., 1972). Brito et al. (2000) reported for Forastero cacao beans from Brazil a fructose average content of  $1.88 \text{ mg g}^{-1}$  in crude beans,  $2.59 \text{ mg g}^{-1}$  in fermented beans (72 hours),  $1.27 \text{ mg g}^{-1}$  in dry beans and  $0.50 \text{ mg g}^{-1}$  in roasted beans. Average fructose content of  $5.94 \text{ mg g}^{-1}$  has been reported for cacao beans of Common cacao from Bahia, Brazil (Loureiro, 2012).

A range of glucose contents it was estimate from  $0.43 \text{ mg g}^{-1}$  (supposed ideal condition) to  $3.4 \text{ mg g}^{-1}$  (supposed not ideal condition) (Reineccius et al., 1972). Brito et al. (2000) reported for Forastero cacao beans from Brazil an average glucose content of  $0.89 \text{ mg g}^{-1}$  in crude beans,  $0.90 \text{ mg g}^{-1}$  in fermented beans (72 hours),  $0.28 \text{ mg g}^{-1}$  in dry beans and  $0.27 \text{ mg g}^{-1}$  in roasted beans. Average glucose content of  $1.93 \text{ mg g}^{-1}$  has been reported for cacao beans of Common cacao from Bahia, Brazil (Loureiro, 2012).

Despite the importance of the lipids content of dry cacao beans, the composition of the different fatty acids has been highlighted due to differences in texture and promotes the melting point of chocolate (Wood, 2001). In addition, it is important to note that different genetic material of cacao trees exhibit different values in the lipids content of their beans (Loureiro et al., 2016). It must be observed the significance of lipids for obtaining cacao butter and also superior quality chocolate (Timms and Stewart, 1999; Wood, 2001).

Proteins and amino acids are important for the quality of chocolate, especially because the proteolysis that occurs in processing steps, among other chemical reactions, are important to the flavour profile and chocolate aroma (Bruto et al., 2000; Jinap et al., 2010; Possignolo, 2010; Rohsius et al., 2006; Yusep et al., 2002).

The total content of proteins in the cacao beans are reported in the range from  $150$  to  $200 \text{ g kg}^{-1}$  (Biehl et al., 1977). Brito et al. (2000) reported for Forastero cacao beans average total proteins content of  $220 \text{ g kg}^{-1}$  in crude beans,  $157 \text{ g kg}^{-1}$  in fermented beans (72 hours),  $118 \text{ g kg}^{-1}$  in dry beans and  $138 \text{ g kg}^{-1}$  in roasted beans.

Rohsius et al. (2006) reported that the total free amino acid contents of 110 cacao beans samples varied between  $5.0$  and  $25.2 \text{ mg g}^{-1}$  fat free dry matter (ffdm), with a mean value of  $13.0 \text{ mg g}^{-1}$  ffm. Further they

also reported the total free amino acid content of 14.5 mg g<sup>-1</sup> in cacao beans from Brazil (Rohsius et al., 2006). Brito et al. (2000) reported by Forastero cacao beans from Brazil of average total free amino acids content of 25.7 mg g<sup>-1</sup> in crude beans, 32.6 mg g<sup>-1</sup> in fermented beans (72 hours), 35.3 mg g<sup>-1</sup> in dry beans and 24.1 mg g<sup>-1</sup> in roasted beans. Jinap et al. (2010) reported that the total free amino acids in samples of under-fermented cacao beans treated with carboxypeptidase B were observed at a range from 46.55 to 61.19 mg g<sup>-1</sup>, whereas those treated with carboxypeptidase Y contained 30.76 to 42.59 mg g<sup>-1</sup>. Yusep et al. (2002) reported that the total free amino acids in samples of under-fermented cacao beans treated with carboxypeptidase B were observed at a range from 52.72 to 76.51 mg g<sup>-1</sup>, whereas those treated with carboxypeptidase Y contained 34.82 to 86.04 mg g<sup>-1</sup>. Without carboxypeptidase, the total free amino acids in cacao beans were ranged at 34.38 to 50.42 mg g<sup>-1</sup> (Yusep et al., 2002). Free amino acids, oligopeptides, and reducing sugars are cacao aroma precursors formed during the fermentation process (Rohsius et al., 2006). Based on reported studies, the amount and composition of free amino acids changes during fermentation process (Jinap et al., 2010; Rohsius et al., 2006; Yusep et al., 2002). Unfermented cacao beans contain low amounts of total free amino acids with high percentages of acidic amino acids (Rohsius et al., 2006).

In the report for Schwan and Fleet (2015), the theobromine content in cacao beans ranged between 8 to 21 mg g<sup>-1</sup>. In another study, the average theobromine contents in cacao beans ranged from 17.72 to 25.28 mg g<sup>-1</sup> in cacao liquor, 16.23 to 26.64 mg g<sup>-1</sup> in dry cacao beans and 16.63 to 29.38 mg g<sup>-1</sup> in cacao powder (Ramli et al., 2001). The average theobromine content found in this study (Table 5) is very similar to the value found in Malaysian cacao beans (Ramli et al., 2001). Theobromine is a typical alkaloid of the cacao beans, and it is also important for the biochemical and sensory profile of chocolate (Araujo et al., 2014; Loureiro et al., 2016). However, because it is a substance stimulating the central nervous system, studies suggest limits for daily consumption (Araujo et al., 2014; Araujo et al., 2013; EFSA, 2008; Pimentel, 2007).

Ramli et al. (2001) reported that the caffeine average contents ranged from 3.13 to 4.12 mg g<sup>-1</sup> in cacao liquor, 2.52 to 4.98 mg g<sup>-1</sup> in dry cacao beans

and 3.27 to 6.58 mg g<sup>-1</sup> in cacao powder. These reported values for cacao beans (Ramli et al., 2001) are also lower than those found in this study (Table 5). Caffeine is also a purine alkaloid widely studied in the context of human health (Araujo et al., 2014; Araujo et al., 2013; Medeiros and Lannes, 2009), so it is an important attribute to the cacao quality (Loureiro et al., 2016).

In the literature, averages catechin content varied between 0.82 and 3.91 mg g<sup>-1</sup> in dry cacao beans (Cruz et al., 2015; Loureiro et al., 2016; Ramli et al., 2001). The (-)-catechin average contents were reported ranged from 2.81 to 4.16 mg g<sup>-1</sup> in cacao liquor, 2.25 to 3.91 mg g<sup>-1</sup> in dry cacao beans and 1.74 to 7.53 mg g<sup>-1</sup> in cacao powder (Ramli et al., 2001). A study related that found (-)-epicatechin and (+)-catechin in unfermented, dried, unroasted cacao beans (Kofink et al., 2007). In contrast, roasted cacao beans and cacao products additionally contained the atypical flavan-3-ol (-)-catechin, another stereoisomer (Kofink et al., 2007). These are generally formed during the manufacturing process by an epimerization which converts (-)-epicatechin to its epimer (-)-catechin (Kofink et al., 2007).

The monomer epicatechin is the main flavanol cacao, representing approximately 35% of the total content of phenolic compounds (Wollgast and Anklam, 2000). This value differs from the results of the current study (Table 5) which was approximately 9% of total phenols. The reports in literature shows that averages of epicatechin content range from 2.15 to 16.52 mg g<sup>-1</sup> in dry cacao beans (Loureiro et al., 2016; Ramli et al., 2001). Ramli et al. (2001) reported that the (-)-epicatechin average contents ranged from 1.41 to 3.65 mg g<sup>-1</sup> in cacao liquor, 3.49 to 5.27 mg g<sup>-1</sup> in dry cacao beans and 0.48 to 7.78 mg g<sup>-1</sup> in cacao powder.

It has been reported earlier that total phenolic content of 52.5 mg g was found in unfermented cacao beans of PH-16 clone (Cruz et al., 2013). According this report (Cruz et al., 2013), the PH-16 cultivar decreased total phenols content during fermentation to about 36.5%. The total phenols content of cacao beans corresponds to approximately 10% (100 mg g<sup>-1</sup>) of dry matter, varying according to the geographical location (Oliveira, 2005). The literature shows that average of total phenols content varying between 30 and 215.5 mg g<sup>-1</sup> in dry cacao beans (Loureiro et al., 2016). The polyphenols have bitter, astringent flavours and their antioxidant properties help protect the seeds



from damage and disease (Kim and Keeney, 1984; Kyi et al., 2005). Ramli et al. (2001) reported that the total polyphenols ranged from 45 to 52 mg g<sup>-1</sup> in cacao liquor, 34.93 to 60.22 mg g<sup>-1</sup> in dry cacao beans, and 20.59 to 61.58 mg g<sup>-1</sup> in cacao powder. Brito et al. (2000) reported that in Forastero cacao beans average total phenols contents was 231 mg g<sup>-1</sup> in crude beans, 213 mg g<sup>-1</sup> in fermented beans (72 hours), 157 mg g<sup>-1</sup> in dry beans and 131 mg g<sup>-1</sup> in roasted beans. After the processing, the contents of total phenols in cacao beans decay to 10-15% - 5%, values equal to or higher than 10% that are considered signs of inadequate fermentation (Wollgast and Anklam, 2000).

Cacao genetic materials tolerant to witch's broom, disease caused by the fungus *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, has been propagated in Bahia, Brazil, as the main strategy to control this disease (Lopes et al., 2011; Monteiro and Ahnert, 2012; Pereira, 2001). Porto Híbrido 16 (PH-16) is a clonal variety selected from a population of crosses between cacao trees of the Forastero (Amazon) and Trinitario groups (whose parents are

unknown), located at Porto Híbrido farm in São José da Vitória, Bahia, Brazil (Cruz et al., 2013). There is shortage of detailed available information on biochemical attributes of these new genetic materials grown in the last 20 years. Studies on the quality of cacao (Araujo et al., 2014; Loureiro, 2012, 2014) and its agri-environment nuances are important tools for the development of public policies aimed at recovery of cacao plantations in Bahia.

The objective of this study was to investigate the influence of cropping sites, represented by different soils and cropping systems on biochemical attributes of dry cacao beans of PH-16 clone.

## Materials and Methods

### Cropping sites and sampling

Twelve cropping sites were located in the humid zone of the cacao growing region of Bahia, Brazil were selected for this study (Table 1). The Thornthwaite climatic classification was B4r A', B3r A', B2r A', B2r B', B1r A', B1r' A', B1w A' (SEI, 1998). These

Table 1. Cropping sites cultivated with PH-16 cacao clone in the cacao growing region of Bahia, Brazil

| Site | Geographic Coordinates          | City           | Acronym of the SiBCS <sup>1</sup> | Soil Classification                           | Soil Taxonomy  | Cropping Systems     | Average density of shade trees/ha |
|------|---------------------------------|----------------|-----------------------------------|---|----------------|----------------------|-----------------------------------|
| 1    | 13° 40' 30" S, 39° 14' 27" W    | Nilo Peçanha   | LAd cam                           | cambisolíc Dystrophic Yellow Latosol          | Hapludox       | CxR <sup>2</sup>     | 150                               |
| 2    | 13° 44' 38" S, 39° 30' 10" W    | Gandú          | PVAd                              | typic Dystrophic Red-Yellow Argisol           | Hapludult      | CxE <sup>3</sup>     | 60                                |
| 3    | 13° 45' 21" S, 39° 20' 25" W    | Pirai do Norte | PVAd                              | abrupt Dystrophic Red-Yellow Argisol          | Hapludult      | Cabruca <sup>4</sup> | 60                                |
| 4    | 13° 46' 07.0"S, 39° 17' 52.0"W  | Ituberá        | LAd                               | typic Dystrophic Yellow Latosol               | Typic Hapludox | CxR <sup>2</sup>     | 350                               |
| 5    | 13° 51' 08" S, 39° 17' 54" W    | Ituberá        | LVAd                              | typic Dystrophic Red-Yellow Latosol           | Typic Hapludox | CxR <sup>2</sup>     | 400                               |
| 6    | 14° 31' 14" S, 39° 15' 45" W    | Uruçuca        | PVAe cam                          | cambisolíc Eutrophic Red-Yellow Argisol       | Hapludalf      | Cabruca <sup>4</sup> | 50                                |
| 7    | 14° 51' 36" S, 39° 14' 42" W    | Itabuna        | CXd                               | typic Dystrophic Haplic Cambisol              | Dystropept     | Cabruca <sup>4</sup> | 35                                |
| 8    | 14° 51' 47" S, 39° 06' 47" W    | Ilhéus         | LVAd arg                          | argisolíc Dystrophic Red-Yellow Latosol       | Hapludox       | Cabruca <sup>4</sup> | 70                                |
| 9    | 15° 17' 04" S, 39° 28' 43" W    | Arataca        | PAd lat                           | latosolíc Dystrophic Yellow Argisol           | Hapludult      | Cabruca <sup>4</sup> | 35                                |
| 10   | 15° 23' 08" S, 39° 26' 04" W    | Camacan        | PVAd                              | typic Dystrophic Red-Yellow Argisol           | Hapludult      | Cabruca <sup>4</sup> | 35                                |
| 11   | 15° 23' 15.1"S, 39° 25' 48.6" W | Camacan        | PVA ali                           | typic Alitic Red-Yellow Argisol               | Hapludult      | Cabruca <sup>4</sup> | 35                                |
| 12   | 16° 29' 02" S, 39° 23' 56" W    | Porto Seguro   | PVAd coe                          | abrupt Cohesive Dystrophic Red-Yellow Argisol | Hapludult      | CxR <sup>2</sup>     | 400                               |

<sup>1</sup>SiBCS - Brazilian System of Soil Classification (Santos et al., 2013). <sup>2</sup>Intercropping with cacao (*Theobroma cacao* L.) and rubber tree (*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr de Juss.) Muell. Arg.). <sup>3</sup>Cacao with shade of erythrina (*Erythrina fusca* Lour). <sup>4</sup>Cabruca is an ecological agroforestry cropping system where cacao trees are grown under native trees of the Atlantic Forest of South of Bahia (Lobão et al., 2012).

cropping sites have been planted with PH-16 cacao clone under different cropping systems, with a range of shade tree densities and across three soil class: Argisols, Cambisols and Latosols. Soils were classified in the Brazilian System of Soil Classification (SiBCS) (Santos et al., 2013), and its corresponding classification in Soil Taxonomy (Soil Survey Staff, 2006).

Cacao pod sampling occurred on November of 2008. This month was chosen because it is representative of the second harvest period (August / 2008 to January / 2009). Each study site with approximately one hectare was divided into three collection areas, characterized by the same soil and same cropping system. Each single composite sample corresponds to 50 mature cacao pods from each of the three sampling areas of a given site for the post-harvest processing of fermentation and drying. The origin of each sample of pods and beans corresponds to a properly identified and classified soil in each study site.

#### **Post-harvest Processing**

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

#### **pH and Total Acidity**

Dried and milled cacao endosperm were used to determine hydrogenic potential (pH) and total acidity by methods 970.21 and 942.15 of the Association of Official Analysts Chemists (AOAC, 2005), respectively.

#### **Organic acids and simple carbohydrates**

Organic acids (acetic acid and lactic acid) and simple carbohydrates (glucose, fructose, and sucrose)

contents of dried and milled cacao endosperm were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) according to the method described by Schwan and Souza (1986) slightly modified by this study.

#### **Lipids**

Lipid content of dry cacao beans was determined according to the method 963.15 of AOAC (2005) slightly modified by this study.

#### **Proteins**

Samples of 0.2 g of dried and milled cacao endosperm was used for determination of total nitrogen and estimation of proteins. Protein content of dry cacao beans was estimated from the total nitrogen, according to the 31.1.08 method of micro-Kjeldahl (AOAC, 2005) slightly modified by Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) (Carmo et al., 2000), based on hydrolysis and subsequent distillation of the sample protein was calculated by factor  $6.25 \times \% \text{ total N}$ .

#### **Amino Acids**

Free amino acid contents of dried and milled cacao endosperm were analyzed according to the method described by Kirchhoff et al. (1989) and Rohsius et al. (2006).

#### **Theobromine and Caffeine**

Dried and milled cacao endosperm were used for quantifying simultaneously theobromine and caffeine by high performance liquid chromatography (HPLC) according to the method described by Brunetto et al. (2007).

#### **Phenolic substances**

The phenolic substances (-)-epicatechin and (+)-catechin contents of dried and milled cacao endosperm were determined with the procedure described by Elwers et al. (2009).

#### **Total phenols**

The total phenols content of dried and milled cacao endosperm was determined with the Folin-Ciocalteu procedure described by Singleton and Rossi (1965) and Elwers et al. (2009).

### Statistical Analysis

A completely randomized experimental design was used, with 12 cropping sites characterized by different soil types and cropping systems, with three replicates at each site. The replicate measurements were taken during identical but different experimental runs, which were randomized. This multiple response measurement was taken at the same combination of factor settings (geographic coordinate, cropping system and shade tree densities), and mainly characterized by soil type. Statistical procedures used in this study were performed in the R Core Team program (2016). Package ‘stats’: Shapiro-Wilks normality test, Bartlett homoscedasticity test (R Development Core Team, 2016). Package ‘nortest’: Kolmogorov-Smirnov normality test (Lilliefors correction) (Gross and Ligges, 2015). Package ‘MASS’: Box-Cox transformation (Venables and Ripley, 2002). Package ‘ExpDes’: Analysis of Variance (ANOVA) and Scott-Knott test (Ferreira et al., 2015). Package ‘Lattice’: Graphics (Sarkar,

2016). Package ‘bpca’: Biplot applied to Principal Component Analysis (Faria et al., 2015).

### Results and Discussion

The variables that correspond to the attributes of acidity and organic in dry cacao beans of PH-16 clone were subjected to verification of the normality assumptions and homoscedasticity of ANOVA. The attributes pH, lactic acid, total amino acids and caffeine did not meet the normal criteria and homoscedasticity of ANOVA, and therefore were transformed by normalization by the average and standard deviation (Jöreskog et al., 2000).

#### Acidity attributes

Statistically significant differences in averages of the total acidity content in dry cacao beans of PH-16 clone are associated with the cropping sites (Table 2). For pH, and lactic acid and acetic acid contents, no differences were observed (Table 2).

Table 2. Analysis of variance, Scott-Knott test and descriptive analysis of the acidity attributes in dry cacao beans of PH-16 clone

| Source                     | DF  | pH                                   | Total Acidity                | Acetic Acid        | Lactic Acid        |
|----------------------------|-----|--------------------------------------|------------------------------|--------------------|--------------------|
|                            |     |                                      | mEq NaOH 100 g <sup>-1</sup> |                    | mg g <sup>-1</sup> |
|                            |     |                                      | Mean Square                  |                    |                    |
| Cropping Site <sup>1</sup> | 11  | 0.04 <sup>ns</sup>                   | 10.27**                      | 0.56 <sup>ns</sup> | 0.12 <sup>ns</sup> |
| Error                      | 24  | 0.02                                 | 2.05                         | 0.27               | 0.06               |
| Total                      | 35  |                                      |                              |                    |                    |
| CV (%)                     | 2.4 | 9.8                                  | 25                           | 23.3               |                    |
| Cropping Site <sup>1</sup> |     | Average ± Standard Deviation (n = 3) |                              |                    |                    |
| 01 LAd cam                 |     | 6.0 ± 0.2                            | 14.3 ± 1.5 b                 | 2.66 ± 0.96        | 1.36 ± 0.18        |
| 02 PVAd                    |     | 5.9 ± < 0.1                          | 13.5 ± 1.8 b                 | 2.29 ± 0.61        | 0.72 ± 0.07        |
| 03 PVAd                    |     | 5.9 ± 0.1                            | 15.4 ± 0.5 a                 | 1.73 ± 0.45        | 0.83 ± 0.31        |
| 04 LAd                     |     | 6.0 ± < 0.1                          | 12.9 ± 0.6 b                 | 2.79 ± 0.22        | 0.63 ± 0.07        |
| 05 LVAd                    |     | 6.2 ± 0.2                            | 12.4 ± 1.8 b                 | 2.58 ± 0.40        | 0.98 ± 0.14        |
| 06 PVAe cam                |     | 6.0 ± 0.1                            | 17.0 ± 0.8 a                 | 2.11 ± 0.26        | 0.97 ± 0.10        |
| 07 CXd                     |     | 6.1 ± < 0.1                          | 17.2 ± 2.4 a                 | 2.14 ± 0.38        | 0.84 ± 0.12        |
| 08 LVAd arg                |     | 5.9 ± 0.1                            | 17.7 ± 1.3 a                 | 2.60 ± 0.41        | 0.81 ± 0.05        |
| 09 PAd lat                 |     | 6.3 ± 0.3                            | 13.3 ± 1.6 b                 | 2.10 ± 0.53        | 0.83 ± 0.23        |
| 10 PVAd                    |     | 5.9 ± 0.1                            | 13.5 ± 0.7 b                 | 1.32 ± 0.39        | 0.72 ± 0.24        |
| 11 PVA ali                 |     | 6.0 ± 0.1                            | 13.0 ± 1.9 b                 | 1.98 ± 0.22        | 0.89 ± 0.19        |
| 12 PVAd coe                |     | 5.9 ± < 0.1                          | 14.2 ± 0.1 b                 | 2.59 ± 0.83        | 1.13 ± 0.62        |
|                            |     | Overall Average (n = 36)             |                              |                    |                    |
| Minimum                    |     | 5.8                                  | 10.5                         | 0.93               | 0.48               |
| Average ± SD               |     | 6.0 ± 0.2                            | 14.5 ± 2.1                   | 2.24± 0.6          | 0.89 ± 0.28        |
| Maximum                    |     | 6.6                                  | 19.2                         | 3.6                | 1.85               |

<sup>1</sup> Cropping site identified by soil type: 01 LAd cam - cambisolic Dystrophic Yellow Latosol; 02 PVAd - typic Dystrophic Red-Yellow Argisol; 03 PVAd - abrupt Dystrophic Red-Yellow Argisol; 04 LAd - typic Dystrophic Yellow Latosol; 05 LVAd - typic Dystrophic Red-Yellow Latosol; 06 PVAe cam - cambisolic Eutrophic Red-Yellow Argisol; 07 CXd - typic Dystrophic Haplic Cambisol; 08 LVAd arg - argisolic Dystrophic Red-Yellow Latosol; 09 PAd lat - latosolic Dystrophic Yellow Argisol; 10 PVAd - typic Dystrophic Red-Yellow Argisol; 11 PVA ali - typic Alitic Red-Yellow Argisol; 12 PVAd coe - abrupt Cohesive Dystrophic Red-Yellow Argisol. DF - Degrees of Freedom. CV - Coefficient of Variation. SD - Standard Deviation. Significance levels by test F: (\*\*) = 1% of error, (ns) = not significant. In bold are highlighted the average clusters positively correlated with cacao quality.

In the current study the observed pH ranged from 5.8 to 6.6 (Table 2) which is higher than the pH range of 5.0 to 5.5 required by the chocolate industry (Biehl et al., 1985; Biehl and Voigt, 1994). These pH values suggested by chocolate industry indicate that when the processing of beans at such pH ranges tend to produce good quality beans that tend to have a lower acidic character, which is an important feature for obtaining good quality chocolate (Amin et al., 2002; Amores and Jiménez, 2007; Voigt and Biehl, 1995).

This study highlights the group of lower total acidity averages generated by the Scott-Knott test (Table 2), because these values are within the total acidity contents standards required by the chocolate industry (Lopez and Passos, 1984). The differences between the total acidity contents demonstrate that this biochemical indicator is also influenced by the environment of the cropping site.

The overall average acetic acid content of cacao beans of PH-16 clone (Table 2) observed in the

current study will not pose any problems in the fermentation process adapted.

The averages lactic acid content found in the current study (Table 2) are lower than this critical recommended value (Bonvehí and Coll, 1997).

### Simple carbohydrates

The Table 3 show statistically significant differences between the averages of simple carbohydrates of dry cacao beans of PH-16 clone.

This current study considers that the groups of highest averages of simple carbohydrate sucrose, fructose and glucose contents of cacao beans (Table 3) are more closely related to the best cacao quality. Sucrose content varied from 0.99 to 2.23 mg g<sup>-1</sup> with an average value of 1.59 mg g<sup>-1</sup>. Average fructose content of 6.11 mg g<sup>-1</sup> in cacao beans of PH-16 (Table 3) was higher than the values reported in the previous literature. Average glucose content of 2.98 mg g<sup>-1</sup> in cacao beans of PH-16 was observed in the current

Table 3. Analysis of Variance, Scott-Knott test and Descriptive Analysis of the simple carbohydrates in dry cacao beans of PH-16 clone

| Source                           | DF | Sucrose                                     | Fructose             | Glucose              |
|----------------------------------|----|---|----------------------|----------------------|
|                                  |    | mg g <sup>-1</sup>                          |                      |                      |
|                                  |    | Mean Square                                 |                      |                      |
| Cropping Site <sup>1</sup>       | 11 | 0.48**                                      | 6.18**               | 1.76**               |
| Error                            | 24 | 0.08  | 0.86                 | 0.51                 |
| Total                            | 35 |   |                      |                      |
| CV (%)                           |    | 17.4  | 15.2                 | 24                   |
| <b>Cropping Site<sup>1</sup></b> |    | <b>Average ± Standard Deviation (n = 3)</b> |                      |                      |
| 01 LAd cam                       |    | <b>1.88 ± 0.40 a</b>                        | <b>5.62 ± 1.27 a</b> | 2.18 ± 0.56 b        |
| 02 PVAd                          |    | 1.54 ± 0.07 b                               | 4.66 ± 0.83 b        | 2.46 ± 0.48 b        |
| 03 PVAd                          |    | 0.99 ± 0.37 c                               | 2.85 ± 0.24 c        | 1.46 ± 1.00 b        |
| 04 LAd                           |    | 1.54 ± 0.19 b                               | <b>6.07 ± 0.47 a</b> | <b>3.31 ± 0.13 a</b> |
| 05 LVAd                          |    | <b>2.23 ± 0.44 a</b>                        | <b>6.42 ± 1.08 a</b> | <b>3.07 ± 0.22 a</b> |
| 06 PVAd cam                      |    | 1.48 ± 0.23 b                               | <b>7.19 ± 1.01 a</b> | <b>2.96 ± 0.17 a</b> |
| 07 CXd                           |    | <b>2.13 ± 0.40 a</b>                        | <b>7.76 ± 1.12 a</b> | <b>3.56 ± 0.72 a</b> |
| 08 LVAd arg                      |    | <b>1.86 ± 0.11 a</b>                        | <b>8.11 ± 1.61 a</b> | <b>3.42 ± 1.58 a</b> |
| 09 PAd lat                       |    | <b>1.73 ± 0.30 a</b>                        | 5.12 ± 0.75 b        | 2.13 ± 0.70 b        |
| 10 PVAd                          |    | 1.03 ± 0.17 c                               | <b>6.37 ± 0.69 a</b> | <b>3.96 ± 0.71 a</b> |
| 11 PVA ali                       |    | 1.55 ± 0.09 b                               | <b>6.91 ± 0.57 a</b> | <b>3.82 ± 0.28 a</b> |
| 12 PVAd coe                      |    | 1.18 ± 0.19 c                               | <b>6.23 ± 0.63 a</b> | <b>3.41 ± 0.62 a</b> |
|                                  |    | <b>Overall Average (n = 36)</b>             |                      |                      |
| Minimum                          |    | 0.76  | 2.59                 | 0.85                 |
| Average ± SD                     |    | 1.59 ± 0.45                                 | 6.11 ± 1.59          | 2.98 ± 0.95          |
| Maximum                          |    | 2.73  | 9.82                 | 5.21                 |

<sup>1</sup> Cropping site identified by soil type: 01 LAd cam - cambisolic Dystrophic Yellow Latosol; 02 PVAd - typic Dystrophic Red-Yellow Argisol; 03 PVAd - abrupt Dystrophic Red-Yellow Argisol; 04 LAd - typic Dystrophic Yellow Latosol; 05 LVAd - typic Dystrophic Red-Yellow Latosol; 06 PVAd cam - cambisolic Eutrophic Red-Yellow Argisol; 07 CXd - typic Dystrophic Haplic Cambisol; 08 LVAd arg - argisolic Dystrophic Red-Yellow Latosol; 09 PAd lat - latosolic Dystrophic Yellow Argisol; 10 PVAd - typic Dystrophic Red-Yellow Argisol; 11 PVA ali - typic Alitic Red-Yellow Argisol; 12 PVAd coe - abrupt Cohesive Dystrophic Red-Yellow Argisol. DF - Degrees of Freedom. CV - Coefficient of Variation. SD - Standard Deviation. Significance levels by test F: (\*\*) = 1% of error. In bold are highlighted the average clusters positively correlated with cacao quality.



study (Table 3). The glucose content was approximately 3 times lower than the sucrose content reported by Brito et al. (2000), and 1.5 times higher than the sucrose content reported by Loureiro (2012).

The ratio of sucrose: fructose: glucose was similar in both genetic materials, corresponding to 1:4:2 in PH-16 clone (Table 3), 1:5:2 in Common cacao (Forastero) from Bahia (Loureiro, 2012), and 3:4.5:1 in Forastero cacao from São Paulo, Brazil (Brito et al., 2000). The sugar content in the cacao hybrid variety PH-16 was higher compared to the common cacao Forastero group (Loureiro, 2012). Lower sucrose values in cacao beans (Table 3) indicate that the hydrolysis process was satisfactorily, contributing to the rise in fructose and glucose levels, which is an important aroma precursors and chocolate flavour (Voigt and Biehl, 1995).

Figure 1 shows a statistically significant positive correlation ( $r = 0.77$ ) between glucose and fructose, which agrees with the information described in the literature on these important attributes associated with chocolate flavour (Pisaturo and Bisagno, 1981; Reineccius et al., 1972; Rohan and Stewart, 1966).

### Structural substances

The attributes lipid, proteins and amino acids of dry cacao beans of PH-16 clone did not showed significant differences by F ANOVA test between averages related to different cropping sites (Table 4).

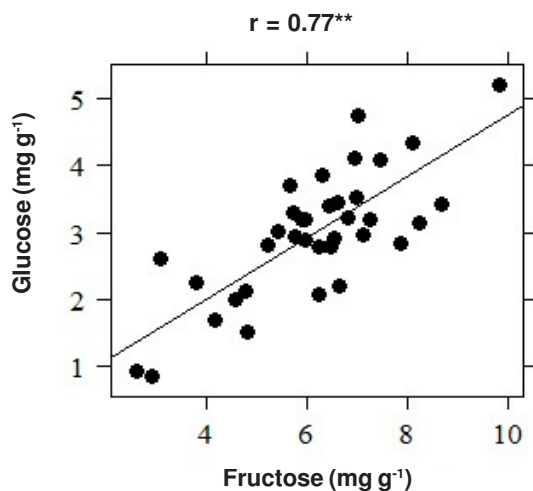


Figure 1. Correlation between glucose and fructose of dry cacao beans of PH-16 clone grown in the cacao region of Bahia ( $r$  = Pearson's linear correlation coefficient; \*\*Significant at 1% level;  $n = 36$ ).

Although a significant difference between the averages of lipids content in dry cacao beans of PH-16 clone for the different cropping sites was not detected, data in Table 4 shows the lipid average content of 366.5 g kg<sup>-1</sup> is depicted, this value is lower than that the content of 500 g kg<sup>-1</sup> related to the cacao quality (Ávila and Dias, 1993; Beckett, 2008, 2009; Biehl et al., 1977; Romanczyk et al., 1997). Another study with dry cacao beans of PH-16 clone showed a lipids content of 457.5 g kg<sup>-1</sup> (Cruz, 2012), this value is higher than that found in the current study (Table 4).

Overall average of proteins content of 164.8 g kg<sup>-1</sup> of dry cacao beans was observed in the current study (Table 4) is about 15% higher than the proteins content of 137.5 g kg<sup>-1</sup> observed in another study with the same cacao clone (Cruz, 2012) and it is also higher than the proteins content reported by Brito et al. (2000).

The overall average content of amino acids contents in cacao beans of PH-16 clone corresponds to value of 14 mg g<sup>-1</sup>, this value represents approximately 85% of proteins content (Table 4). The total amino acids content in Common cacao beans (Forastero) from Bahia, Brazil, corresponds to a value 168.6 mg g<sup>-1</sup> (Lopes et al., 2003), this value is higher than that of the amino acids content of cacao beans samples of the PH-16 clone (Table 4). The overall average of free amino acids content observed in this study (Table 4) was similar to the average reported for cacao beans samples from Brazil (Rohsius et al., 2006), and higher than the overall average of samples from different countries (Rohsius et al., 2006). However, free amino acids content found in the current study was approximately 2 to 4 times lower than the contents found in other studies (Brito et al., 2000; Jinap et al., 2010; Yusep et al., 2002). Figure 2 shows a statistically significant positive correlation ( $r = 0.93$ ) between the attributes proteins and amino acids content in dry cacao beans.

### Purine Alkaloids and Phenolic substances

Statistically significant differences in averages of the theobromine and epicatechin contents in dry cacao beans of PH-16 clone are associated with the cropping sites (Table 5). No significant differences were observed in the caffeine, catechin and total phenols contents (Table 5).

Table 4. Summary of analysis of variance, Scott-Knott test and descriptive analysis of the structural substances in dry cacao beans of PH-16 clone

| Source                     | DF | Lipids                               | Proteins            | Total Free Amino Acids |
|----------------------------|----|--------------------------------------|---------------------|------------------------|
|                            |    | g kg <sup>-1</sup>                   | g kg <sup>-1</sup>  | mg g <sup>-1</sup>     |
|                            |    | Mean Square                          |                     |                        |
| Cropping Site <sup>1</sup> | 11 | 707.01 <sup>ns</sup>                 | 39.54 <sup>ns</sup> | 4.87 <sup>ns</sup>     |
| Error                      | 24 | 878.0                                | 36.71               | 5.57                   |
| Total                      | 35 |                                      |                     |                        |
| CV (%)                     |    | 8.09                                 | 11.6                | 15.5                   |
| Cropping Site <sup>1</sup> |    | Average ± Standard Deviation (n = 3) |                     |                        |
| 01 LAd cam                 |    | 371.6 ± 12.7                         | 169.2 ± 16.5        | 14.65 ± 1.89           |
| 02 PVAd                    |    | 362.5 ± 9.6                          | 157.1 ± 21.6        | 12.87 ± 3.42           |
| 03 PVAd                    |    | 370.2 ± 31.1                         | 165.0 ± 23.3        | 14.48 ± 3.41           |
| 04 LAd                     |    | 359.5 ± 50.4                         | 155.1 ± 15.0        | 13.75 ± 1.35           |
| 05 LVAd                    |    | 354.7 ± 9.7                          | 163.0 ± 5.2         | 12.75 ± 1.0            |
| 06 PVAe cam                |    | 355.1 ± 48.9                         | 180.6 ± 39.0        | 15.79 ± 4.10           |
| 07 CXd                     |    | 411.1 ± 30.4                         | 183.4 ± 12.3        | 16.15 ± 3.2            |
| 08 LVAd arg                |    | 358.6 ± 30.5                         | 182.1 ± 15.0        | 15.44 ± 1.38           |
| 09 PAd lat                 |    | 366.3 ± 9.6                          | 150.9 ± 5.1         | 12.99 ± 0.79           |
| 10 PVAd                    |    | 368.0 ± 18.6                         | 157.2 ± 21.2        | 12.37 ± 3.58           |
| 11 PVA ali                 |    | 366.3 ± 18.2                         | 159.1 ± 19.9        | 13.50 ± 2.02           |
| 12 PVAd coe                |    | 353.7 ± 40.7                         | 155.1 ± 10.4        | 13.28 ± 0.91           |
|                            |    | Overall Average (n = 36)             |                     |                        |
| Minimum                    |    | 307.7                                | 133.3               | 8.5                    |
| Average ± SD               |    | 366.5 ± 28.7                         | 164.8 ± 19.4        | 14.0 ± 2.31            |
| Maximum                    |    | 436.8                                | 206.4               | 18.94                  |

<sup>1</sup> Cropping site identified by soil type: 01 LAd cam - cambisolic Dystrophic Yellow Latosol; 02 PVAd - typic Dystrophic Red-Yellow Argisol; 03 PVAd - abrupt Dystrophic Red-Yellow Argisol; 04 LAd - typic Dystrophic Yellow Latosol; 05 LVAd - typic Dystrophic Red-Yellow Latosol; 06 PVAe cam - cambisolic Eutrophic Red-Yellow Argisol; 07 CXd - typic Dystrophic Haplic Cambisol; 08 LVAd arg - argisolic Dystrophic Red-Yellow Latosol; 09 PAd lat - latosolic Dystrophic Yellow Argisol; 10 PVAd - typic Dystrophic Red-Yellow Argisol; 11 PVA ali - typic Alitic Red-Yellow Argisol; 12 PVAd coe - abrupt Cohesive Dystrophic Red-Yellow Argisol. DF - Degrees of Freedom. CV - Coefficient of Variation. SD - Standard Deviation. Significance levels by test F: (<sup>ns</sup>) = not significant.

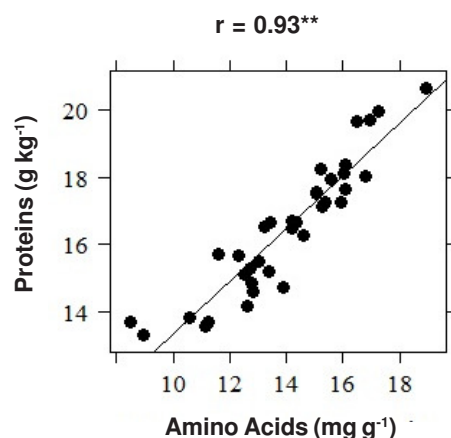


Figure 2. Correlation between proteins and amino acids of dry cacao beans of PH-16 clone grown in the cacao region of Bahia ( $r$  = Pearson's linear correlation coefficient; \*\*Significant at 1% level;  $n$  = 36).

From previous reports theobromine content in cacao beans ranged between 8 to 21 mg g<sup>-1</sup> (Schwan and Fleet, 2015), these values were lower than the value

found in the current study (Table 5). Average theobromine content of 29.6 mg g<sup>-1</sup> in dry cacao beans of PH-16 clone was recorded (Table 5) which is approximately 5 times lower than the content of 5.53 mg g<sup>-1</sup> previously reported for the same cacao genotype (Cruz et al., 2015). This cacao quality study highlights the group of lower average contents of theobromine (Table 5).

Average caffeine content of 5.93 mg g<sup>-1</sup> of dry cacao beans of PH-16 (Table 5) was approximately two times higher than the content of 3.02 mg g<sup>-1</sup> reported in another study for the cacao beans of the same cacao genotype (Cruz et al., 2015). The content found in the current study (Table 5) is also higher than the caffeine content ranges from 0.8 to 2.3 mg g<sup>-1</sup> reported in other studies (Schwan and Fleet, 2015).

Average catechin content of 1.94 mg g<sup>-1</sup> of dry cacao beans in this study (Table 5) was approximately two times higher than 0.82 mg g<sup>-1</sup> reported in another study with the same cacao clone (Cruz et al., 2015).

Table 5. Summary of analysis of variance, Scott-Knott test and descriptive analysis of the purine alkaloids and phenolic substances in dry cacao beans of PH-16 clone

| Source                     | DF | Theobromine                          | Caffeine           | Catechin           | Epicatechin           | Total Phenols       |
|----------------------------|----|--------------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|
| mg g <sup>-1</sup>         |    |                                      |                    |                    |                       |                     |
| Mean Square                |    |                                      |                    |                    |                       |                     |
| CS <sup>1</sup>            | 11 | 10.71*                               | 1.38 <sup>ns</sup> | 1.58 <sup>ns</sup> | 14.08*                | 159.6 <sup>ns</sup> |
| Error                      | 24 | 3.63                                 | 0.84               | 0.78               | 5.98                  | 95.1                |
| Total                      | 35 |                                      |                    |                    |                       |                     |
| CV (%)                     |    | 6.44                                 | 15.5               | 45.82              | 39.63                 | 14.4                |
| Cropping Site <sup>1</sup> |    | Average ± Standard Deviation (n = 3) |                    |                    |                       |                     |
| 01 LAd cam                 |    | <b>28.35 ± 1.00 b</b>                | 5.95 ± 0.43        | 1.58 ± 0.74        | 5.12 ± 2.22 c         | 62.20 ± 10.08       |
| 02 PVAd                    |    | 31.43 ± 3.28 a                       | 5.17 ± 0.30        | 2.12 ± 0.21        | 6.48 ± 2.00 c         | 70.94 ± 9.48        |
| 03 PVAd                    |    | 29.57 ± 1.25 a                       | 5.13 ± 0.31        | 2.16 ± 1.10        | 5.74 ± 1.20 c         | 67.29 ± 1.32        |
| 04 LAd                     |    | 29.98 ± 1.96 a                       | 5.97 ± 0.47        | 0.86 ± 0.21        | 4.30 ± 0.81 c         | 62.45 ± 1.89        |
| 05 LVAd                    |    | <b>27.84 ± 2.79 b</b>                | 6.87 ± 0.21        | 1.46 ± 0.76        | 5.11 ± 2.41 c         | 65.43 ± 10.37       |
| 06 PVAd cam                |    | 29.73 ± 1.20 a                       | 7.05 ± 2.32        | 3.69 ± 1.87        | <b>11.58 ± 4.92 a</b> | 78.06 ± 14.19       |
| 07 CXd                     |    | 30.96 ± 1.59 a                       | 5.90 ± 0.56        | 2.31 ± 1.13        | 7.71 ± 3.48 b         | 73.09 ± 11.84       |
| 08 LVAd arg                |    | <b>26.45 ± 1.72 b</b>                | 6.20 ± 1.27        | 2.39 ± 1.22        | 7.41 ± 3.33 b         | 71.44 ± 12.20       |
| 09 PAd lat                 |    | <b>27.35 ± 1.63 b</b>                | 6.59 ± 1.16        | 1.85 ± 0.67        | 4.78 ± 1.86 c         | 66.71 ± 10.19       |
| 10 PVAd                    |    | 29.38 ± 1.41 a                       | 5.31 ± 0.75        | 1.73 ± 0.23        | 4.24 ± 0.56 c         | 52.04 ± 9.09        |
| 11 PVA ali                 |    | 31.01 ± 2.05 a                       | 6.01 ± 0.22        | 1.08 ± 0.23        | 3.98 ± 1.68 c         | 64.73 ± 10.76       |
| 12 PVAd coe                |    | 33.10 ± 1.68 a                       | 5.02 ± 0.48        | 2.04 ± 0.50        | 7.59 ± 0.95 b         | 77.99 ± 6.39        |
| Overall Average (n = 36)   |    |                                      |                    |                    |                       |                     |
| Minimum                    |    | 24.68                                | 4.55               | 0.65               | 2.22                  | 45.99               |
| Average ± SD               |    | 29.60 ± 2.42                         | 5.93 ± 1.01        | 1.94 ± 1.02        | 6.17 ± 2.92           | 67.70 ± 10.74       |
| Maximum                    |    | 35.21                                | 9.61               | 5.72               | 16.58                 | 92.37               |

<sup>1</sup>Cropping site identified by soil type: 01 LAd cam - cambisolic Dystrophic Yellow Latosol; 02 PVAd - typic Dystrophic Red-Yellow Argisol; 03 PVAd - abrupt Dystrophic Red-Yellow Argisol; 04 LAd - typic Dystrophic Yellow Latosol; 05 LVAd - typic Dystrophic Red-Yellow Latosol; 06 PVAd cam - cambisolic Eutrophic Red-Yellow Argisol; 07 CXd - typic Dystrophic Haplic Cambisol; 08 LVAd arg - argisolic Dystrophic Red-Yellow Latosol; 09 PAd lat - latosolic Dystrophic Yellow Argisol; 10 PVAd - typic Dystrophic Red-Yellow Argisol; 11 PVA ali - typic Alitic Red-Yellow Argisol; 12 PVAd coe - abrupt Cohesive Dystrophic Red-Yellow Argisol. DF - Degrees of Freedom. CV - Coefficient of Variation. SD - Standard Deviation. Significance levels by test F: (\*) = 5% of error, (<sup>ns</sup>) = not significant. In bold are highlighted the average clusters positively correlated with cacao quality.

The cropping site 6 (cambisolic Eutrophic Red-Yellow Argisol) (Table 5) stands out for its high content epicatechin. The eutrophic character of the soil of this cropping site may have been an important factor for the increment of this phenolic substance. Average epicatechin content of 6.17 mg g<sup>-1</sup> was observed in cacao beans in the current study (Table 5) which was approximately two times higher than the value of 2.98 mg g<sup>-1</sup> observed in the same genotype (Cruz et al., 2015). Current cacao quality study highlights the group of higher average content of epicatechin (Table 5).

The overall average of total phenols content in dry cacao beans of the PH-16 clone was 67.70 mg g<sup>-1</sup> (Table 5). The total phenols contents observed in the current study with dry cacao beans of the PH-16 clone was less than 100 mg g<sup>-1</sup>; that is, good indication that the adapted fermentation process was adequate.

Statistically significant positive correlations were observed between catechin and epicatechin ( $r = 0.91$ ) (Figure 3a), between catechin and total phenols ( $r = 0.68$ ) (Figure 3b), and between epicatechin and total phenol ( $r = 0.78$ ) (Figure 3c).

Is worth emphasizing that the different genetic cacao materials can have higher variations in the contents of phenolic substances, therefore it is important to determine the existence of differences due to beans processing of different genotypes and regions from where they are grown (Cedeño, 2008; Cruz, 2012; Efraim et al., 2010; Kwik-Urbe, 2005; Loureiro, 2012).

Figures 4 and 5 shows the Biplot graphics of secondary metabolites of dry cacao beans. Table 6 list the summary of PCA secondary metabolites of cacao beans of PH-16 clone exploited by Biplot graphs (Figures 4 and 5).

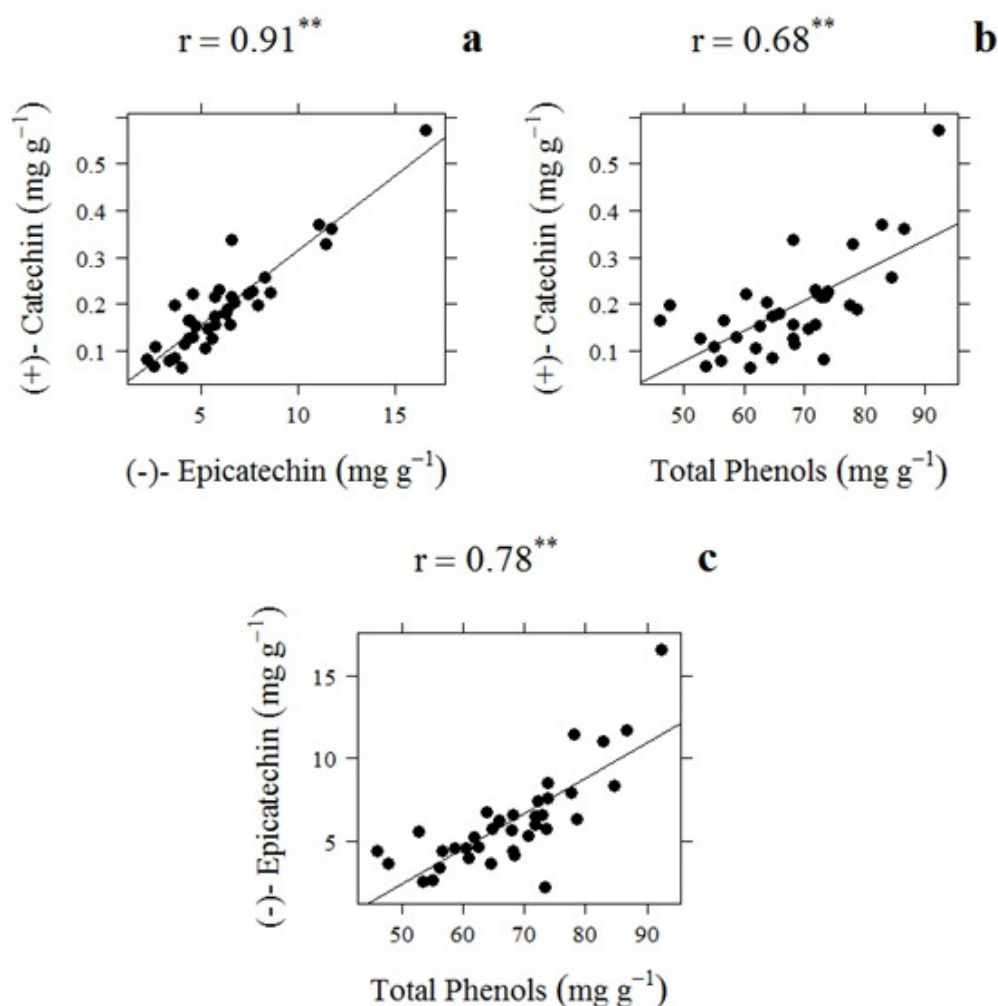


Figure 3. Correlation between phenolic substances of dry beans of PH-16 clone grown in 12 cropping sites in the cacao growing region of Bahia ( $r$  = Pearson's linear correlation coefficient. Catechin correlated with epicatechin (a). Catechin correlated with total phenols (b). Epicatechin correlated with phenols (c). \*\*Significant at 1% level;  $n = 36$ ).

Biplot graphs represent the secondary metabolites of dry cacao beans of PH-16 clone, which vary according to the cropping sites identified by soils (Figure 4a) and their classes (Figure 5a), the different cropping systems (Figures 4b and 5b), the average density of shade trees per hectare (Figure 4b) and different geographic coordinates (Figure 4a and b).

Graphs a and b of Figure 4 have the same structure between variables and objects because they are the same Principal Component Analysis (PCA). The objects were renamed for interpretation purposes (Figure 4a and b). In this same way the objects of graphs a and b of Figure 5 were also renamed.

The PCA represented in Biplot graphs a and b of Figure 4 have eigenvalue higher than 1, and retains

86% of the total variance of the data for interpretation based on the average cropping sites (Table 6). The PCA represented by the graphs a and b of Figure 5 also have eigenvalue higher than 1, and retains about 81% of the total variance of the data for interpretation based on the sample observations of the cropping sites (Table 6).

The variables catechin (CAT), epicatechin (EPI) and total phenols (PHE) were positively correlated (Figures 4 and 5). Graphically, the site 6 (cambisolic Eutrophic Red-Yellow Argisol) (Figure 4a) in cacao cabruca system (Cab) with an average density of 50 shade trees (Figure 4b) is positively correlated with these variables (CAT, EPI, PHE). According to Table 5, the higher epicatechin content also



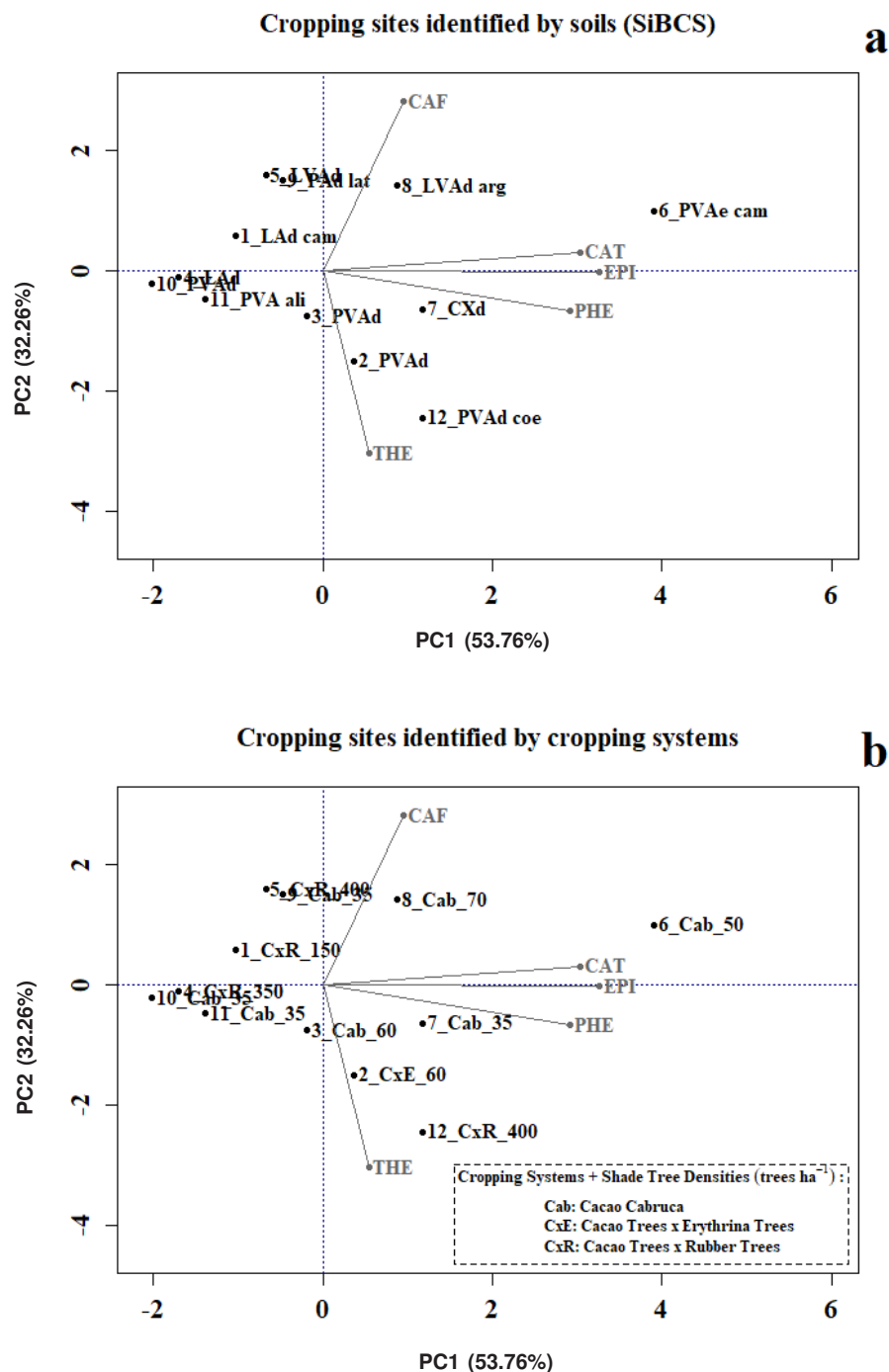


Figure 4. Biplots the Principal Component Analysis. Factors indicate the relative weight of the variables on the axes. Secondary metabolites of dry cacao beans of PH-16 clone: theobromine (THE), caffeine (CAF), catechin (CAT), epicatechin (EPI), total phenols (PHE). Cropping sites identified by soils (Brazilian System of Soil Classification - SiBCS) (a): cambisolic Dystrophic Yellow Latosol (1\_LAd cam), typical Dystrophic Red-Yellow Argisol (2\_PVAd), abrupt Dystrophic Red-Yellow Argisol (3\_PVAd), typical Dystrophic Yellow Latosol (4\_LAd), typical Dystrophic Red-Yellow Latosol (5\_LVAd), cambisolic Eutrophic Red-Yellow Argisol (6\_PVAe cam), typical Dystrophic Haplic Cambisol (7\_CXd), argisolic Dystrophic Red-Yellow Latosol (8\_LVAd arg), latosolic Dystrophic Yellow Argisol (9\_PAd lat), typical Dystrophic Red-Yellow Argisol (10\_PVAd), typical Alitic Red-Yellow Argisol (11\_PVA ali), abrupt Cohesive Dystrophic Red-Yellow Argisol (12\_PVAd coe). Sites identified by cropping systems (b). Numbered soils according to the longitudinal direction North-South.

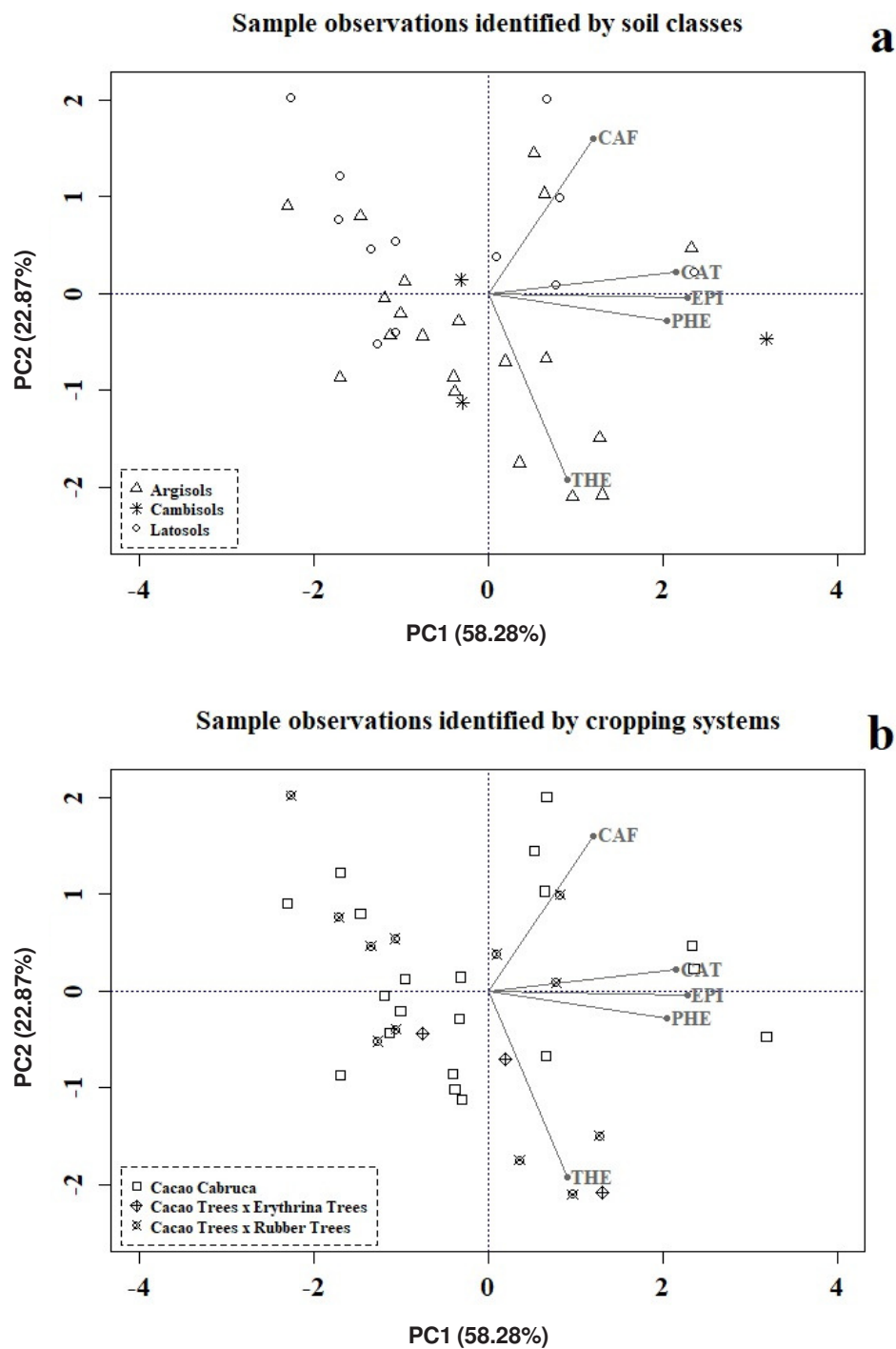


Figure 5. Biplots the Principal Component Analysis. Factors indicate the relative weight of the variables on the axes. Secondary metabolites of dry cacao beans of PH-16 clone: theobromine (THE), caffeine (CAF), catechin (CAT), epicatechin (EPI), total phenols (PHE). Sample observations identified by soil classes (Brazilian System of Soil Classification) (a). Sample observations identified by cropping systems (b).

Table 6. Summary of principal component analysis of secondary metabolites of dry cacao beans of PH-16 clone grown in 12 cropping sites in the cacao growing region of Bahia, Brazil

| Summary              | Averages of cropping sites<br>(12 soils and cropping<br>systems with average<br>density of shade trees) |       | All sample<br>observations<br>(soil types and<br>cropping systems) |       |
|----------------------|---|-------|--|-------|
|                      | PC1   | PC2   | PC1  | PC2   |
| THE - Theobromine    | 0.10  | -0.72 | 0.22   | -0.76 |
| CAF - Caffeine       | 0.17  | 0.67  | 0.30   | 0.63  |
| CAT - Catechin       | 0.56  | 0.07  | 0.53   | 0.09  |
| EPI - Epicatechin    | 0.60  | 0.00  | 0.56   | -0.02 |
| PHE -Total Phenols   | 0.54  | -0.16 | 0.51   | -0.11 |
| Eigenvalue           | 5.44  | 4.21  | 10.10  | 6.33  |
| Retained Variance    | 0.54  | 0.32  | 0.58   | 0.23  |
| Accumulated Variance | 0.54  | 0.86  | 0.58   | 0.81  |

PC - Principal Component.

corresponded to site 6. The sites 4 (typic Dystrophic Yellow Latosol), 10 (typic Dystrophic Red-Yellow Argisol) and 11 (typic Alitic Red-Yellow Argisol) showed negative correlations with these same variables (CAT, EPI, PHE) (Figure 4a). The eutrophic character observed in the site 6 corresponding to the availability of nutrients for plants, both in the natural condition or the management of fertilization (Meurer, 2007; Oliveira, 2008). Good soil fertility conditions can increase plant production, provided that all other environmental and climatic factors are according to the ecophysiological requirements of plants (Meurer, 2007; Taiz and Zeiger, 2013). The production of secondary metabolites in plants are controlled by genetic and environmental factors (Taiz and Zeiger, 2013), and thus physiologically healthy plants have higher chances of survive if they produce substances that could act as defense against predators (Heitefuss and Williams, 1976). Phenolic substances are natural compounds that act on the protection of plants against diseases and pests (Strack, 1997; Taiz and Zeiger, 2013), so in seeds such as cacao beans, are found high levels of these substances (Calderón, 2002; Efraim et al., 2006; Kim and Keeney, 1984; Pereira-Caro et al., 2013). The correlation between phenolic substances with a eutrophic soil could be evidence of the influence of soil mineral nutrients in the production of these substances in cacao beans. However, the majority of the observations of these polyphenols contents proved uncorrelated or weak correlations, as well as with negative correlations with

the observations corresponding to almost all samples of the cultivation sites represented by soil classes (Figure 5a) and cropping systems (Figure 5b).

Theobromine (THE) and caffeine (CAF) showed an inverse correlation (Figures 4 and 5). Graphically, no correlation was observed between phenolic compounds and purine alkaloids in cacao beans (Figures 4 and 5), and too weak correlations (not-significant) with the phenolic substances (CAT, EPI, PHE) (Figures 4 and 5). Site 12 (abrupt Cohesive Dystrophic Red-Yellow Argisol) showed positive correlation with theobromine (THE) (Figure 4a). The chemical and

physical conditions that affect soil fertility influence on the different biochemical attributes in cacao beans (Loureiro, 2012, 2014), and another study indicate the differences between dry and rainy seasons influence the levels of purine alkaloids in cacao beans (Cedeño, 2008). From such information, it is possible that the different soil water levels (capacity of available water) and other soil characteristics (soil bulk density, clay content) of different cropping sites influence the contents of purine alkaloids in cacao beans. This same site was negatively correlated with the caffeine variable indicating the possibility of influence exerted by soil water conditions probably less favorable to the plants.

The different geographical locations (Table 1), implicit to the condition of identification of the cacao samples and the cropping sites, influenced on the content of purine alkaloids in cacao beans, as was observed in the group of sites of 1 (cambisolic Dystrophic Yellow Latosol), 5 (typic Dystrophic Red-Yellow Latosol), 8 (argisolic Dystrophic Red-Yellow Latosol) and 9 (latosolic Dystrophic Yellow Argisol) from THE and CAF (Table 1 and 5; Figure 4a). The sites 10 and 11 (Table 1 and 5; Figure 4a) are close to each other and showed the influence of geographical locations on the phenolic substances CAT, EPI, PHE (Table 1 and 5; Figure 4a). The same influence of the cropping site was observed in the distancing of sites 6, 7 (typic Dystrophic Haplic Cambisol) and 12 from CAT, EPI, PHE (Table 1 and 5; Figure 4a) in relation to the other dry cacao beans samples.

Despite the low number of observations, a trend of positive correlation of theobromine with the samples corresponding to the class of argisols was observed, and inversely correlated with latosols (Figure 5a). This information needs to be confirmed in the future studies. However, differences in soil clay content, used for soil classification (Oliveira, 2008), directly affects the edaphic water conditions (Ferreira, 2010), and it seems to influence the theobromine content in the cacao beans (Table 5, Figures 4a and 5a).

Not observed clusters that enable associate these attributes with the cacao cropping systems (Figure 4b and 5b). However, although the level of detail of this study was not sufficient to explain these differences directly, or indirectly they indicate that the secondary metabolites of dry cacao beans could be also influenced by genotype x environment (Figures 4 and 5) interaction as evidenced by the univariate analysis (Table 5).

### Conclusions

The average contents of total acidity, simple carbohydrates (sucrose, fructose and glucose), theobromine and epicatechin have varied according to the different cropping sites, indicating that due to discriminating power of these attributes they could be used for determination of the cacao beans quality.

With the exception of epicatechin, all the other attributes highlighted in the current study (total acidity, sucrose, fructose, glucose and theobromine) showed satisfactory contents for the cacao bean quality in the cropping site corresponding to typic Dystrophic Red-Yellow Latosol in the agroforestry system of cacao tree with rubber tree (400 trees ha<sup>-1</sup>). In turn, the cropping site characterized by abrupt Dystrophic Red-Yellow Argisol in the cacao cabruca agroforestry system (60 trees ha<sup>-1</sup>) did not showed any satisfactory content of these same cocoa beans quality indicators.

### Acknowledgments

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

### Literature Cited

- AFOAKWA, E. O. 2014. Cocoa production and processing technology. Boca Raton, FLorida, CRC Press, Taylor & Francis Group. 374p.
- AMIN, I. et al. 2002. Analysis of vicilin (7S)-class globulin in cocoa cotyledons from various genetic origins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82(7):728-732. <http://doi.org/10.1002/jsfa.1104>.
- AMORES, F.; JIMÉNEZ, J. 2007. Aspectos de la calidad de cacao. In: Taller Internacional "Técnicas de fermentación, catación y evaluación sensorial para el mejoramiento de la calidad organoléptica de cacao". Quevedo, Ecuador, INIAP. Estación Experimental Tropical Pichilingue. pp.1-3.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. 2005. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. W. Horwitz, L. Jr., & George W. eds. 18th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC.
- APROTOSOAIE, A. C.; LUCA, S. V.; MIRON, A. 2016. Flavor chemistry of cocoa and cocoa products-an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15(1):73-91. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12180>
- ARAUJO, Q. R. et al. 2014. Cocoa quality index - a proposal. *Food Control* 46:49-54. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.003>
- ARAUJO, Q. R. et al. 2013. Cacao and human health: from head to foot - A Review. *critical reviews . Food Science and Nutrition*. <http://doi.org/10.1080/10408398.2012.657921>
- ARMIJOS PAREDES, A. I. 2002. Características de la acidez como parámetro químico de calidad en muestras de cacao (*Theobroma cacao* L.) fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación. Thesis of Degree. Quito, Ecuador, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 103p.
- ÁVILA, M. G.; DIAS, J. C. 1993. Características de qualidade do cacau comercial da Amazônia brasileira. Belém, PA, CEPLAC/SUPOR. Boletim Técnico n. 10. 26p.
- BECKETT, S. T. 2008. The science of chocolate. London, Royal Society of Chemistry. 240p.
- BECKETT, S. T. 2009. Industrial chocolate manufacture and use. London, Chapman and Hall. 720p.



- BIEHL, B. et al. 1985. Acidification, proteolysis and flavour in fermenting cocoa beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36:583–598.
- BIEHL, B. et al. 1989. Chemical and physical changes in the pulp during ripening and post-harvest storage of cocoa pods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 48:189–208.
- BIEHL, B.; PASSERN, U.; PASSERN, D. 1977. Subcellular structures in fermenting cocoa beans. Effect of aeration and temperature during seed and fragment incubation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28:41–52.
- BIEHL, B.; VOIGT, J. 1994. Biochemical approach to raw cocoa quality improvement: Comparison of seed proteins and proteases in their ability to produce cocoa aroma precursors. In: *International Cocoa Conference, Kuala Lumpur, Malaysia. Proceedings. Lagos, Nigeria, Cocoa Producer's Alliance.*
- BONVEHÍ, J. S.; COLL, F. V. 1997. Parameters affecting the quality of processed cocoa powder: acidity fraction. *Z Lebensm Unters Forsch A* 204:287–292.
- BRITO, E. S. et al. 2000. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation, drying and roasting. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81:281–288.
- BRUNETTO, M. del R. et al. 2007. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry* 100:459–467.
- CALDERÓN, L. 2002. Evaluación de los compuestos fenólicos del cacao (*Theobroma cacao* L.) de tipo fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación en relación a la calidad. Thesis of Degree. Ecuador, Quito, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 114p.
- CARMO, C. A. F. de S. do et al. 2000. Método de análise de tecidos vegetais. Rio de Janeiro, RJ: EMBRAPA SOLOS. Circular Técnica n. 6. 41p.
- CEDEÑO, Á. L. P. 2008. Establecimientos de parámetros (físicos, químicos y organolépticos) para diferenciar y valorizar el cacao (*Theobroma cacao* L.) producido en dos zonas identificadas al norte y sul del litoral ecuatoriano. Thesis of Degree. Manabi, Ecuador, Universidad Técnica de Manabi, Facultad de Ingeniería Agronomica. 219p.
- CRUZ, J. F. M. 2012. Caracterização das sementes de variedade de cacau *Theobroma cacao* L. resistentes à vassoura de bruxa durante a fermentação e após a secagem. Dissertação Mestrado. Campinas, SP. Universidade Estadual, Faculdade de Engenharia de Alimentos. 101p.
- CRUZ, J. F. M. et al. 2013. Assessment of the fermentative process from different cocoa cultivars produced in Southern Bahia, Brazil. *African Journal of Biotechnology* 12(33):5218–5225. <http://doi.org/10.5897/AJB2013.12122>
- CRUZ, J. F. M. et al. 2015. Bioactive compounds in different cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivars during fermentation. *Food Science and Technology (Brasil)* 35(2): 279–284. <http://doi.org/10.1590/1678-457X.6541>
- EFRAIM, P. et al. 2010. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos (Brasil)* 30 (Supl.1):142–150.
- EFRAIM, P. et al. 2006. Teores de compostos fenólicos de sementes de cacaueiro de diferentes genótipos. *Brazilian Journal of Food Technology (Brasil)* 9(4): 229–236.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY-EFSA. 2008. Theobromine as undesirable substances in animal feed. *EFSA Journal* 725:1–66.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY-EFSA. 2012a. Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA Journal* 10(1):2551. <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2551>
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY-EFSA.. 2012b. Lead dietary exposure in the European population. *EFSA Journal* 10(7): 2831(1–21). <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2831>
- ELWERS, S. et al. 2009. Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *European Food Research and Technology* 229:937–948.
- EUROPEAN UNION-EU. 2006. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for

- the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Official Journal of the European Union 70: 10–34.
- EUROPEAN UNION-EU. 2014. Commission Regulation (EU) No 488/2014 of 12 May 2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs. Official Journal of the European Union 138:75-79.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS-FAO. 2003. Agricultural Commodities: profiles and relevant WTO negotiating issues. Rome, Italy, FAO Economic and Social Development Department. 89p.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS-FAO. 2017. FAOSTAT. Food and agriculture data. Production quantities of cocoa, beans by country. Average 1994-2014. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.
- FARIA, J. C.; DEMÉTRIO, C. G. B.; ALLAMAN, I. B. 2015. Package 'bpca'. Biplot of multivariate data based on principal components analysis. R package version 1.2-2. R: The R Project for Statistical Computing. 45p.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. 2015. Package 'ExpDes'. Experimental Designs package. R package version 1.1.2. R: The R Project for Statistical Computing. 42p.
- FERREIRA, M. M. 2010. Caracterização física do solo. In: Ferreira, M. M. ed. Física do solo. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. pp.1–27.
- GROSS, J.; LIGGES, U. 2015. Package 'nortest'. Tests for normality. R package version 1.0-4. R: The R Project for Statistical Computing. 10p.
- HEITEFUSS, R.; WILLIAMS, P. H. 1976. Physiological plant pathology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-66279-9>
- HOLM, C. S.; ASTON, J. W.; DOUGLAS, K. 1993. The Effects of the organic acids in cocoa on the flavour of chocolate. Journal of the Science of Food and Agriculture 61:65-71.
- INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION-ICCO. 2008. Manual of best known practices in cocoa production. Berlin, Germany, Consultative Board on the World Cocoa Economy. CB/16/2Rev.1. 9p.
- INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION-ICCO. 2010. Inventory of diversification practices on cocoa farms. Consultative board on the world cocoa economy (CB/22/04). London, ICCO. 9p.
- INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION-ICCO. 2012. The world cocoa economy. London, ICCO. 43p.
- JINAP, S.; DIMICK, P. S. 1990. Acidic characteristics of fermented and dried cocoa beans from different countries of origin. Journal of the Science of Food and Agriculture 55(2):547–550.
- JINAP, S. et al. 2010. Role of carboxypeptidases to the free amino acid composition, methylpyrazine formation and sensory characteristic of under-fermented cocoa beans. International Food Research Journal 17:763-774.
- JÖRESKOG, K. et al. 2000. LISREL 8: New statistical features. Chicago, USA: Scientific Software International. 248p.
- KIM, H.; KEENEY, P. G. 1984. Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. Journal of Food Science 49(4):1090-1092. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb10400.x>
- KIRCHHOFF, P. M. et al. 1989. Kinetics of the formation of free amino acids in cocoa seeds during fermentation. Food Chemistry 34(3):161-179. [http://doi.org/10.1016/0308-8146\(89\)90137-4](http://doi.org/10.1016/0308-8146(89)90137-4)
- KNAPP, A. W. 1937. Cacao fermentation - a critical survey of its scientific aspects. London, United Kingdom, John Bale, Sons & Curnow. 171p.
- KOFINK, M.; PAPAGIANNPOULOS, M.; GALENSA, R. 2007. Catechin in cocoa and chocolate: occurrence and analysis of an atypical flavan-3-ol enantiomer. Molecules 12(7):1274-1288.
- KWIK-URIBE, C. 2005. Potential health benefits of cocoa flavanols. The Manufacturing Confectioner 85(10):43-49.
- KYI, T. M. et al. 2005. The kinetics of polyphenol degradation during the drying of Malaysian cocoa beans. International Journal of Food Science and Technology 40(3):323–331. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00959.x>
- LOBÃO, D. É. et al. 2012. Cacau Cabruca - Sistema agrossilvicultural Tropical. In: Valle, R.R. ed. Ciência, tecnologia e manejo do cacau. Brasília, DF, MAPA. pp.467-506.

- LOPES, A. S. et al. 2003. Avaliação das condições de torração após a fermentação de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) e cacau (*Theobroma cacao* L.). Brazilian Journal of Food Technology 62(2):309-316.
- LOPES, U. V. et al. 2011. Cacao breeding in Bahia, Brazil - strategies and results. Crop Breeding and Applied Biotechnology (S1):73-81.
- LOPEZ, S. A. F.; PASSOS, F. M. L. 1984. Factors influencing cacao bean acidity-fermentation, drying and the microflora. In: Internacional Cocoa Research Conference, 9º, Lagos, Nigéria, Cocoa Producer's Alliance. pp.701-704.
- LOUREIRO, G. A. H. A. et al. 2016. Cacao quality: Highlighting selected attributes. Food Reviews International 1-24. <http://doi.org/10.1080/87559129.2016.1175011>
- LOUREIRO, G. A. H. A. 2012. Atributos qualitativos de solo e amêndoas de cacau comum: revisão, análises e interpretação de relações. Thesis of Degree. Ilhéus, BA, Universidade Estadual de Santa Cruz. 87p.
- LOUREIRO, G. A. H. A. 2014. Qualidade de solo e qualidade de cacau. Dissertação Mestrado. Ilhéus, BA, Universidade Estadual de Santa Cruz. 202p.
- MEDEIROS, M. L.; LANNES, S. C. da S. 2009. Avaliação química de substitutos de cacau e estudo sensorial de achocolatados formulados. Ciência e Tecnologia de Alimentos (Brasil) 29(2):247-253. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/cta/v29n2/02.pdf>.
- MEURER, E. J. 2007. Fatores que influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. In: Novais, R. F. et al. eds. Fertilidade do solo. Viçosa, MG, SBCS. pp.65-90.
- MONTEIRO, W. R.; AHNERT, D. 2012. Melhoramento genético do cacaueiro. In: Valle, R. R. ed. Ciência, tecnologia e manejo do cacaueiro. Brasília, DF, MAPA. pp.1-29.
- OLIVEIRA, J. B. 2008. Pedologia aplicada. Piracicaba, SP, FEALQ. 592p.
- OLIVEIRA, M. A. 2005. Extração de polifenóis da semente de cacau (*Theobroma cacao*). Dissertação Mestrado, Florianópolis, SC, Universidade Federal de Santa Catarina. 65p.
- PASSOS, F. M. L. et al. 1984. Characterization and distribution of lactic acid bacteria from traditional cocoa bean fermentations in Bahia. Journal of Food Science 49(1):205-208.
- PEREIRA-CARO, G. et al. 2013. Profiles of phenolic compounds and purine alkaloids during the development of seeds of *Theobroma cacao* cv. Trinitario. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61(2): 427-434. <http://doi.org/10.1021/jf304397m>
- PEREIRA, A. B. 2001. Melhoramento clonal. In: Dias, L. A. S. ed. Melhoramento genético do cacaueiro. Viçosa, MG, FUNAPE, UFG. pp.361-384.
- PIMENTEL, F. A. 2007. Avaliação do poder antioxidante do chocolate amargo - um comparativo com o vinho tinto. Dissertação Mestrado. Porto Alegre, RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 81p.
- PISATURO, G.; BISAGNO, T. 1981. The significance of the absence (or minimum presence) of fructose in powdered cocoa. Pharmaceutica Acta Helveticae 56(4-5):142-144.
- POSSIGNOLO, A. A. 2010. Perfil proteico de sementes de acessos de cacaueiros no desenvolvimento do sabor do chocolate. Dissertação Mestrado. Piracicaba, SP, Universidade de São Paulo, CENA. 116p.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2016. R: A language and environment for statistical computing. Viena, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.r-project.org/>
- RAMLI, N. et al. 2001. HPLC Determination of methylxanthines and polyphenols levels In Cocoa and Chocolate Products. Malaysian Journal of Analytical Sciences 7(2):377-386.
- REINECCIUS, G. A. et al. 1972. Identification and quantification of the free sugars in cocoa beans. Journal of Agricultural and Food Chemistry 20(2): 199-202.
- RODRIGUEZ-CAMPOS, J. et al. 2012. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. Food Chemistry 132(1):277-288. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.078>.
- ROHAN, T. A.; STEWART, T. 1966. The Precursors of chocolate aroma: changes in the sugars during the roasting of cocoa beans. Journal of Food Science 31(2): 206-209. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1966.tb00480.x>

- ROHSIUS, C.; MATISSEK, R.; LIEBEREI, R. 2006. Free amino acid amounts in raw cocoas from different origins. *European Food Research and Technology* 222(3-4):432-438. <http://doi.org/10.1007/s00217-005-0130-y>.
- ROMANCZYK, L. et al. 1997. The similarity of cocoa flavour of fermented seeds from fingerprinted genotypes of *Theobroma cacao* L. from Brazil and Malaysia. *Tropical Agriculture* 74(2):132-139.
- SANTOS, H. G. dos et al. 2013. Sistema brasileiro de classificação de solos. 3 ed. Brasília, DF, EMBRAPA. 353p.
- SARKAR, D. 2016. Package 'Lattice'. Multivariate data visualization with R. R package version 0.20-34. R: The R Project for statistical computing. 157p.
- SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. 2015. Cocoa and coffee fermentations. Boca Raton, FL, CRC Press, Taylor & Francis Group. 633p.
- SCHWAN, R. F.; SOUZA, S. M. M. 1986. Quantificação por HPLC de álcool etílico, ácido láctico e ácido acético, produzidos na fermentação tradicional de cacau. Ilhéus, BA, CEPLAC /CEPEC.
- SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. 2004. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. critical reviews. *Food Science and Nutrition* 44(4):205-221. <http://doi.org/10.1080/10408690490464104>.
- SUPERINTENDENCIA ECONOMICA E SOCIAL ESTADO DA BAHIA-SEI. 1998. Tipologia climática - segundo Thornthwaite - Pluviometria 1943-1983 / temperatura 1961 - 1990 - Estado da Bahia. [http://www.sei.ba.gov.br/site/geoambientais/cartogramas/pdf/carto\\_tip\\_clim.pdf](http://www.sei.ba.gov.br/site/geoambientais/cartogramas/pdf/carto_tip_clim.pdf).
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16:144-158.
- SOIL SURVEY STAFF. 2006. Keys to Soil Taxonomy. Washington, DC, USA, US Department of Agriculture-Natural Resources Conservation Service.
- STRACK, D. 1997. Phenolic metabolism. In: Dey, P. M.; Harbone, J. B. eds. *Plant biochemistry*. London, United Kingdom, Academic Press. pp.387-416.
- SUPERINTENDENCIA ECONOMICA E SOCIAL ESTADO DA BAHIA-SEI. 1998. Tipologia climática - segundo Thornthwaite - Pluviometria 1943-1983 / temperatura 1961 - 1990 - Estado da Bahia. [http://www.sei.ba.gov.br/site/geoambientais/cartogramas/pdf/carto\\_tip\\_clim.pdf](http://www.sei.ba.gov.br/site/geoambientais/cartogramas/pdf/carto_tip_clim.pdf).
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2013. *Plant physiology*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates Inc. 954p.
- TIMMS, R. E.; STEWART, I. M. 1999. Cocoa butter, a unique vegetable fat. *Lipid Technology Newsletter* 5(5):101-107.
- VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. 2002. *Modern applied statistics with S*. 4th ed. New York, Springer. 495p.
- VOIGT, J.; BIEHL, B. 1995. Precursors of the cocoa-specific aroma components are derived from the vicilin-class (7s) globulin of the cocoa seeds by proteolytic processing. *Botanica Acta* 108: 283-289. <http://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1995.tb00496.x>
- WORLD COCOA FOUNDATION-WCF. 2014. Cocoa Market Update. <http://worldcocoafoundation.org/wp-content/uploads/Cocoa-Market-Update-as-of-4-1-pdf>
- WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. 2000. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and. *Food Research International* 33:423-447.
- WOOD, G. A. R. 2001. Quality and inspection. In: Wood, G. A. R.; Lass, R. A. eds. *Cocoa*. 4th ed. Oxford, Blackwell Science. pp.119-126.
- YUSEP, I. et al. 2002. Influence of carboxypeptidases on free amino acid, peptide and methylpyrazine contents of under-fermented cocoa beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82(13): 1584-1592. <http://doi.org/10.1002/jsfa.1232>



## EFEITOS DA VENTILAÇÃO NA POLINIZAÇÃO DO CACAUEIRO

*Kazuiyuki Nakayama*

CEPLAC/CEPEC - km 22, Rod. Ilhéus/Itabuna, 45600-970, Ilhéus, Bahia Brasil. Kazuiyuki.nakayama@agricultura.gov.br

Considerando a necessidade de elevar as produções de cacaueiros em áreas de plantios tecnificados e a efetividade da polinização ventilada no incremento da frutificação o trabalho avaliou os efeitos da intensidade de frutificação do cacaueiro quando submetido à ventilação forçada. O experimento foi instalado no mês de maio de 2013, na Fazenda Álamo, município de Eunápolis, BA, num cacauzal de seis anos de idade, espaçamento de 4,3 x 2,3 m, densidade de 930 plantas por ha, plantado em fila dupla com a variedade CCN -51. A ventilação foi propulsionada usando pulverizador Jacto PJ 2000 tracionado por um trator Valmet. As variáveis independentes foram: horário da ventilação, distância entre a flor e o bocal de saída do ventilador, número de ramos por face da copa do cacaueiro e a planta. Os tratamentos foram os respectivos horários de ventilação classificados em: 1 - ventilação pela manhã, entre 7:00 às 9:00 horas; 2 - ventilação pela tarde, entre as 14 às 18 horas; 3 - ventilação pela manhã e tarde; e 4 - testemunha - Plantas sem ventilação submetidas à polinização natural. Observou-se que a intensidade de frutificação das plantas ventiladas foi maior do que a frutificação gerada naturalmente pela mosca polinizadora *Forcipomyia* spp. Os resultados mostraram que a polinização ventilada incrementou a polinização fértil e a frutificação do cacaueiro; que a ventilação vespertina incrementa a polinização fértil e a frutificação de forma significativamente superior à ventilação matutina; que a dupla ventilação aplicada nos períodos matutino e vespertino do mesmo dia, produz menos polinizações férteis; que a ventilação, com velocidade superior a 80 km/hora, produz lesões nos frutos de cacau em desenvolvimento e que frutos lesionados por ventilação de alta velocidade desenvolvem cicatrizes na casca, mas não são abortados nem atacados por enfermidades.

**Palavras-chave:** anemofilia, *Theobroma cacao* L., polinização, *Forcipomyia*.

**Effects of ventilation in cocoa pollination.** Considering the need to increase cacao yields in technically planted areas and the effectiveness of ventilated pollination in the increase of fruiting, the work evaluated the effects of the fruiting intensity of the cacao tree when subjected to forced ventilation. The experiment was carried out in May 2013 at the Álamo farm in Eunápolis, Bahia, Brazil, in a six-year-old plot with a spacing of 4.3 x 2.3 m, a density of 930 plants per ha planted in double rows with the CCN -51 variety. Ventilation was propelled using a PJ 2000 spray jet powered by a Valmet tractor. The independent variables were: ventilation time, distance between the flower and the ventilator exit nozzle, number of branches per face of the cacao tree and the plant. The treatments were the respective ventilation schedules classified as: 1 - morning ventilation, between 7:00 and 9:00, 2 - ventilation in the afternoon, between 14:00 and 16:00, 3 - ventilation in the morning and afternoon, and 4 - control - non - ventilation plants subjected to natural pollination. It was observed that the fruiting intensity of the ventilated plants was higher than the fruiting generated naturally, by the pollinating fly *Forcipomyia* spp. The results showed that the ventilated pollination increased the fruitful pollination and the fruiting of the cacao tree; that evening ventilation increases fertile pollination and fruiting significantly better than morning ventilation; that the double ventilation applied in the morning and evening periods of the same day produces less fertile pollination; that ventilation with velocity greater than 80 km/h produces lesions in developing cocoa fruits and that lesions damaged by high velocity ventilation develop scars on the bark but are not aborted nor attacked by diseases.

**Key words:** anemophily, *Theobroma cacao* L., pollination, *Forcipomyia*.

## Introdução

A formação do fruto do cacaueteiro é iniciada, após a polinização da flor, se houver um número mínimo de óvulos fertilizados. No cacaueteiro, a intensidade de frutificação ou carga de frutos adicionada à planta, num período de tempo determinado, depende das variáveis, frequência de óvulos fertilizados após a polinização, quantidade de pólen depositada no estigma da flor (Pound, 1932a e b), tipo de polinização quanto à origem do pólen (cruzada ou auto) e grau de incompatibilidade gamética, auto ou inter, das variedades que compõe o cacaueteiro (Pound, 1935a e b; Cope 1958, 1962; Seavey & Bawa, 1986), quantidade de almofadas florais e flores na planta, frequência de flor polinizada, densidade populacional do polinizador, eficiência polinizadora do agente polinizador (Hernandez, 1965; Soria, 1970).

A fertilização, no cacaueteiro é, geneticamente, determinada por um conjunto de cinco alelos, os quais definem o grau de incompatibilidade gamética do genótipo e entre os genótipos envolvidos no cruzamento (Lundqvist, 1975; Seavey & Bawa, 1986). A incompatibilidade gamética dos genótipos cacaueteiros tem várias categorias, a seguir. Autoincompatibilidade, quando o pólen da planta de um genótipo, mediante autopolinização, não fertiliza sua própria flor ou flores das outras plantas do mesmo genótipo. Autocompatibilidade, quando o pólen de uma planta, mediante a autopolinização fertiliza suas próprias flores ou as flores de outras plantas do mesmo genótipo. Inter compatibilidade, quando os pólenes dos genótipos distintos se fertilizam mutuamente. Inter incompatibilidade, quando o pólen de diferentes genótipos, através de polinização cruzada, não fertiliza as flores, reciprocamente (Cope, 1958; Cope, 1962; Lundqvist, 1975; Nettancourt, 1997; Seavey & Bawa, 1986).

A frequência de polinização, também, depende da morfologia floral do cacaueteiro. Durante a abertura do botão floral, a flor forma uma estrutura anatomo-morfológica hercogâmica (Ferri, 1983). A hercogamia deprime a frequência de polinização, quer seja pela presença da concha da pétala, quer seja pela heterostilia. A concha da pétala é uma expansão membranosa globosa, originária da pétala. Ela envolve a antera e limita que agentes polinizadores como, insetos, vento e água atinjam a antera e, naturalmente,

dispersem o pólen (Knoke et al., 1980), enquanto que a heterostilia, diferença de comprimento entre o estigma e filamento do androceu, dispõe a antera e o estigma em planos distintos e, cria um afastamento, entre antera e estigma, que também, diminui a probabilidade da transferência da massa polínica pelos agentes polinizadores naturais (Ferri, 1983; Sampayan, 1963).

Há alta diversidade de insetos, potencialmente, polinizadores, de tamanhos variados, que visitam as flores do cacaueteiro, em busca de pólen, néctar e seiva, e que, ativamente, acessam o interior da flor ou da concha da pétala e, até, coletam o pólen, mas, são incapazes de transferir o pólen das anteras para o estigma floral (Hernandez, 1965; Soria, 1970; Soria e Wirth, 1974). A hercogamia e a heterostilia floral, portanto, impedem a efetividade polinizadora dos insetos visitantes da flor do cacaueteiro e, limitam a riqueza de espécies de artrópodes polinizadores a um pequeníssimo número de espécies (Hernandez, 1965; Knoke et al., 1980; Soria, 1970; Soria e Wirth, 1974).

Considerando-se a identidade gênica dos genótipos envolvidos, há dois tipos de polinização: (i) cruzada, caracterizada como transferência de pólen entre flores de plantas de genótipos diferentes e (ii) autopolinização, caracterizada como a transferência de pólen, da antera para o estigma da mesma flor, entre flores da mesma planta ou planta diferente do mesmo genótipo. Na América do Sul, os insetos que, comprovadamente, realizam as polinizações auto e cruzada, no cacaueteiro, são as moscas aladas das espécies, *Forcipomyia blantonii*, na América do sul (Soria, 1970; Soria e Wirth, 1974) e *Forcipomyia spatullifera*, na América Central e México (Hernandez, 1965). Baixas densidades populacionais dessas mosquinhas limitam, intensivamente, a polinização e frutificação no cacaueteiro (Hernandez, 1965; Soria, 1970; Soria e Wirth, 1974).

A efetividade polinizadora, de vários agentes físicos em cacaueteiro, tem sido estudada, desde a década de cinquenta. Alguns agentes se mostraram promissores, outros não. É o caso da água. Foi comprovado que a água pulverizada sobre a flor de cacaueteiro autocompatível não gerou polinização fértil. Ao contrário, foi constatado que as gotículas de água aplicadas, com pulverizador motorizado, sobre flores da variedade autocompatível UF 667, reduziu a eficácia polinizadora do vento seco (Knoke et al., 1980). Em relação à água, foi constatado que, a quantidade de pólen contida nas gotículas da

água, menos de 10 grãos, naturalmente encontradas na flor, não foi suficiente para gerar polinização fértil (Smith, 1950).

O vento é o principal agente físico de polinização natural, em várias espécies vegetais e a polinização realizada pelo vento é denominada de anemófila (Bawa, 1990). Demonstrou-se que o vento artificial aplicado com pulverizador costal motorizado sobre flores de cacauero autocompatível, incrementou a polinização fértil. No cacau comum foi observado incremento de até 200% em relação à polinização entomófila (Soria, 1974). Na variedade UF 667, autocompatível, foi registrado aumento de 475% na frutificação, em relação à polinização entomófila (Knoke et al., 1980).

Nos dias de hoje, em função do aumento dos custos de produção, para garantir a viabilidade econômica da cacaucultura brasileira, é, absolutamente, necessário, buscar o aumento da produtividade e a diminuição dos custos de produção. Neste contexto, a polinização artificial apresenta-se como fitotecnica promissora, porque ela potencializa incrementar a frutificação num pequeno espaço de tempo, concentrando a frutificação e a maturação. A concentração de frutos maduros, permite reduzir o número de colheitas, o qual representa 27% do custo de produção. Deste modo, esta pesquisa visou aferir o impacto da ação de agentes físicos e biológicos sobre a autopolinização e frutificação de cacauero e inferir sobre o impacto da velocidade do vento e da densidade floral na eficácia polinizadora da ventilação artificial em cacauero autocompatível.

## Material e Métodos

Instalou-se o experimento, entre o mês de março e outono de 2013, na Fazenda Álamo, no município de Eunápolis, BA. O cacau tinha seis anos de idade e fora plantado em fila dupla. Os espaçamentos eram de 4,3 m entre filas duplas, de 2,3 m entre filas simples e de 2,5 m entre plantas na fila. A densidade, por ha, era de 930 cacaueiros CCN51 consorciados com 194 coqueiros anão verde (*Cocos nucifera* L.). O cacau estava fertirrigado por sistema de micro aspersão, com lâmina de irrigação de sete mm/m<sup>2</sup>/dia. O solo continha 65% de saturação de bases e 80 mg dm<sup>-3</sup> de fósforo disponível pelo extrator Mellich 1.

A variável agente de polinização foi dividida em (i) físico e (ii) biológico. O agente físico de polinização foi categorizado em três níveis:

1 - ventilação pela manhã, entre nove e dez horas, com duas passagens de ventilações, no mesmo horário, por dia.

2 - ventilação pela tarde, entre as 13 e 15 horas, com duas passagens de ventilações, no mesmo horário, por dia.

3 - ventilação pela manhã e tarde, com quatro passagens de ventilações por dia, sendo duas ventilações pela manhã e duas pela tarde.

O agente de polinização entomófila e natural foi categorizado num nível único: mosca polinizadora *Forcipomyia* spp. O período de ventilação foi de vinte dias ininterruptos.

A ventilação foi gerada pelo conjunto pulverizador Jacto PJ 2000 tracionado por trator Valmet (Figura 1). A rotação da tomada de força do trator foi de 2200 rpm e a velocidade do trator foi de 2,7 km/h. O pulverizador possuía um sistema gerador-propulsor de ventilação, composto por um ventilador, condutos centrífugos, aletas direcionais e bocal de saída da ventilação. A velocidade da ventilação foi estimada com anemômetro digital.

O pulverizador gerava e propulsionava o fluxo de ventilação, nas direções equivalentes a de um ângulo de 180°, formando um fluxo de ventilação, em forma de leque aberto (Figura 1). Ao trafegar entre duas linhas de cacaueiros, o pulverizador propulsionava a ventilação, desde as bases dos troncos até as partes mais distantes e altas das copas dos cacaueiros, das duas linhas de plantas posicionadas uma de cada lado do pulverizador. Assim, as flores presentes, nas partes



Figura 1 – Trator e pulverizador.

mais altas da copa e nos ramos mais finos, também eram ventiladas.

O experimento foi delineado aplicando a ventilação sobre duas filas adjuntas de cacaueiros. As filas ventiladas também foram polinizadas pela mosca *Forcipomyia* spp. Cada fila media 400 metros e continha, aproximadamente, 160 cacaueiros. As filas ventiladas foram separadas por duas filas duplas e as filas com polinização da mosca *Forcipomyia* spp. foi locada isolada, das filas ventiladas, por uma distância, aproximada, de trinta metros.

O modelo matemático submetido à análise de covariância, idealizado, aferiu a efetividade dos agentes de polinização, ventilação artificial e *Forcipomyia* spp. Sobre a polinização e frutificação, foi: quantidade de bilro ( $y$ ) = data da contagem (covariável) x agentes de polinização (ventilação com três categóricas + *Forcipomyia* spp.) x planta.

Com o pulverizador em operação, a ventilação, no interior dos condutos do pulverizador, deslocava-se comprimida, mas, fora dos condutos, após ultrapassar o bocal de saída, livre, ela sofria uma descompressão. Sob a ação da resistência do ar, na proporção que se distanciava do pulverizador, a ventilação diminuía de velocidade e perdia energia. Assim, uma flor, próxima ao bocal de saída da ventilação, era impactada com força maior do que uma flor situada mais longe do pulverizador. Por essa razão, foi hipotecado que, quanto maior a distância entre o ventilador do pulverizador e a flor, então menor seria a velocidade do vento e, em consequência, menor seria a eficiência polinizadora da ventilação.

Para testar esta hipótese, a variável velocidade da ventilação foi substituída pela variável explicativa “distância entre bocal de saída da ventilação e copa do cacaueiro”. Fez-se a substituição porque, a partir do bocal de saída, a velocidade da ventilação correlaciona-se, inversamente, com a distância. Isto é, fora do conduto do pulverizador, quanto maior a distância percorrida pelo vento, menor a velocidade da massa de ar.

Foram estimadas duas distâncias médias, entre o bocal de saída do vento do pulverizador e as flores nos ramos, das várias regiões da copa do cacaueiro. As duas distâncias médias foram estimadas, tomando como referências, o espaçamento da entrelinhas onde trafegava o pulverizador-trator e um plano vertical

imaginário passando pela linha de plantio ou troncos dos cacaueiros. Considerando-se o plano vertical imaginário, a copa do cacaueiro ficava dividida em duas faces ou regiões. Uma face da copa, em frente e perto do pulverizador e, outra face da copa situada, mais longe, a partir do tronco da planta ou depois do plano vertical imaginário, orientado na mesma direção da linha de plantio.

O espaçamento entre as filas duplas era de 4,3 m e diâmetro do bocal circular de saída da ventilação era de 1,3 m. Assim, para a face da copa situada em frente e perto do pulverizador, a distância entre o bocal de saída da ventilação até o plano vertical imaginário, passando pelo centro da planta, foi estimado variar entre 0,0 a 1,5 m. Para a face da copa situada após o plano vertical e mais longe do pulverizador, a partir do centro da planta, a distância, entre o bocal de saída da ventilação até o extremo oposto da copa, foi estimada variar entre 1,5 até 3,0 m.

A distância entre o bocal de saída do vento e as flores na copa era variável porque, a partir do tronco ou centro da planta, os ramos se projetavam, radialmente, ou se afastando ou se aproximando do bocal de saída da ventilação. Assim, para avaliar distância como variável explicativa categórica, nas avaliações, as polinizações e frutificações, observadas nas duas regiões ou faces da copa, foram contabilizadas em separado. Na análise de covariância, a variável distância foi categorizada em perto e longe.

Os caracteres relacionados à florescência, quantidade de almofada floral por ramo, dimensão da almofada floral e quantidade de flor por almofada floral são de natureza genética e específicas de cada variedade. Elas definem a densidade floral potencial da planta (Machado, 1979; Vogel et al., 1981; Enriquez, 1985; Zuniga, 1985).

A densidade de almofada floral do cacaueiro, submetida às forças sazonais dos fatores do ambiente, em presença de recursos agroecológicos adequados para a planta e sob a ação das principais interações fisiológicas e fenológicas, tais como, intensidade fotossintética, frutificação e lançamento foliar, faz a florescência variar ao longo das estações do ano e do tempo ecológico (Alvim et al., 1972; Alvim et al., 1974; Alvim, 1993; Machado, 1979; Alvim, 1984; Vogel et al., 1981).

De fato, a flor é formada, principalmente, na almofada floral presente no ramo plagiotrópico do



cacaueteiro adulto, mas o ramo ortotrópico de idade, também, forma almofada floral e flor. A almofada floral emerge e desenvolve-se no ramo onde, originalmente, havia um pecíolo foliar. Ao longo do ano, há sucessivos lançamentos foliares anuais (Machado, 1979; Enriquez, 1985; Zuniga, 1985). Assim, os ramos finos e jovens, com diâmetros menores que 1,5 centímetros e com menos de 18 meses de idade, carregam pequenas e jovens almofadas florais, em desenvolvimento e, por isso, produzem menos flores, mas estas flores são viáveis e, se polinizadas, produzem frutos.

Num cacaueteiro, com o envelhecimento das plantas, o incremento do diâmetro do ramo aumenta a dimensão da almofada floral e seu potencial floral. Na maioria das variedades de cacaueteiro, as almofadas florais, maiores e com alto potencial produtor de botões florais e flores, concentram-se no tronco e ramos mais velhos e mais grossos (Machado, 1979; Zuniga, 1985). Portanto, a quantidade de almofada floral está relacionada, proporcionalmente, a quantidade de ramos presente na copa da árvore. Por esta razão, neste experimento a variável densidade de flores, metodologicamente, de maior dificuldade de mensuração, foi substituída pela variável quantidade de ramos/face de copa. Tomando como referência, o plano imaginário vertical no centro da planta, na mesma direção da linha de cacaueteiro, os ramos foram contados considerando-se as faces, perto e longe, da copa dos cacaueteiros.

Num cacaueteiro monovarietal, mesmo quando em pleno florescimento, as plantas apresentam intensidade de florescimento muito variável. Visando selecionar e

reduzir a diferença de florescência entre as plantas experimentais, empregou-se uma escala de florescência de zero a dez, onde zero equivaleu à ausência de almofada ativa (sem flor) e dez equivaleu 100% das almofadas em florescência (com flor). No experimento, foram selecionadas e marcadas 25 plantas por nível categórico dos agentes de polinização, com notas de florescências variando entre cinco até oito, em média, equivalendo a 200 flores abertas por dia.

Um dia antes do início da ventilação, todas as flores abertas e bilros de vários estágios das plantas foram removidas, mantendo-se somente os botões florais. Para quantificar a intensidade de polinização fértil, nas avaliações foram contabilizadas as frutificações tipos bilro-pétala (Figura 2), bilro-sépala (Figura 3) e bilro liso (Figura 4) por face da copa.

Na fase bilro-pétala, o fruto exibiu a região do ovário arredondada, estigma enegrecido, presença de pétala praticamente seca e, a fase durava até sete dias. Na fase bilro-sépala, o fruto apresentava-se alongado, com menos de um e meio centímetros de comprimento, estigma seco e enegrecido, sépala floral entre viva até, quase totalmente, seca e a fase durava até 11 dias. Na fase bilro-liso, o fruto apresentava-se com formato alongado, sépala vestigial ou ausente, comprimento variando de um até 12 cm. Foi considerado bilro-liso o fruto em desenvolvimento até a idade de 60 dias. Todas as frutificações emergidas foram marcadas com alfinete, para acompanhar o crescimento e avaliar o abortamento. Os bilros abortados foram desconsiderados.

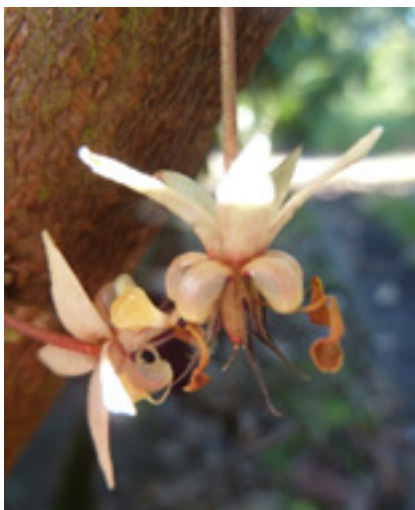


Figura 2 - bilro-pétala.



Figura 3 - bilro-sépala.



Figura 4 - bilros-lisos.

O modelo matemático submetido à análise de variância, idealizado para inferir sobre o impacto da velocidade do vento e da densidade de flor sobre a eficácia polinizadora da ventilação artificial sobre a flor de cacaueteiro autocompatível, foi: quantidade de fruto (y) = data (dias após início da ventilação) x planta x distancia do pulverizador à copa (categórica com dois níveis: perto (zero a 1,5) m e longe (1,5 até 3,0) m) x quantidade de ramo/face da copa.

A análise estatística foi processada no programa R (Venables et al., 2000). A crítica das distribuições dos erros dos dados foi desenvolvida conforme os procedimentos preconizados para os Modelos Lineares Generalizados (GLM) (Crawley, 2002).

A análise dos dados foi composta de análises de covariância, ANCOVA (Crawley, 2002), e análises de variâncias (Anovas). Nas Ancovas, a co-variável foi o número de dias após o início da ventilação. As aditividades dos termos das variáveis explicativas, objetivando a simplificação do modelo e a detecção das variáveis não significativas e significativas foram criticadas aplicando o teste F, a 1% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

Verificou-se que o desenvolvimento do fruto ocorreu nos primeiros dias, imediatamente, após a ventilação, polinização e fertilização. Após a polinização, os frutos passaram pelos estádios de bilro-pétala (Figura 2), bilro-sépala (Figura 3) e bilro-liso (Figura 4).

Nas avaliações, a visualização dos bilros pequenos foi dificultada, principalmente, dos bilros formados nos ramos, no alto da copa, em meio à folhagem. Esses bilros tornaram-se visualizáveis só após atingirem comprimento acima de 1,5 cm. Assim, a fração de bilros gerados pelas ventilações realizadas no final do período de ventilação (20 dias), foi detectada depois de decorridos 15 a 20 dias após a suspensão da ventilação.

A partir do 14º dia, foi constatado bilros-lisos, de comprimento entre 1,0 até 1,3 cm, com pequenas lesões na casca. Estas lesões em bilros foram observadas nas avaliações do 26º e 40º dias. Nas avaliações do 55º e 60º dias, confirmou-se que os

frutos lesionados desenvolveram-se com cicatrizes na casca, mas não abortaram e nem houve enfermidades sobre os mesmos.

A análise estatística dos impactos dos agentes de polinização sobre a frutificação, confirmou que os agentes de polinização, ventilação e a mosca *Forcipomyia* spp., impactaram e, significativamente, modificaram a intensidade de polinização e frutificação (Tabela 1). A análise estatística, também, demonstrou que a variável "planta" impactou, significativamente, a intensidade de polinização e frutificação (Tabela 1), conquanto, antes da aplicação da ventilação, tenham sido selecionadas plantas com florescências próximas.

O impacto dos agentes de polinização, ventilação e *Forcipomyia* spp., pode ser constatado através da frutificação gerada, ao longo dos 69 dias de avaliação (Tabela 2). A ventilação matutina aumentou a frutificação até o 26º dia de avaliação (seis dias após a suspensão da ventilação). A ventilação vespertina incrementou a frutificação até o 14º dia da avaliação e decresceu a partir do 26º dia (Tabela 2).

A polinização entomófila natural, realizada pela mosca *Forcipomyia* spp. foi a que menos incrementou a polinização e frutificação (Tabela 2). No período até 40 dias, os cacaueteiros polinizados, naturalmente, pela mosca *Forcipomyia* spp. geraram e acumularam a média de 2,4 frutos/planta, e, aos 69 dias, só haviam permitido vingar 0,6 frutos/planta (Tabela 2).

Esta baixa frequência de polinização entomófila natural deve ser, preferencialmente, atribuída a uma baixa densidade populacional de mosca polinizadora. As condições de temperatura alta, frequentes no verão, desfavorecem a multiplicação das larvas da *Forcipomyia*, as quais se criam, somente, quando consegue sobreviver sobre úmida matéria orgânica vegetal, em decomposição primária (Soria e Wirth, 1974; Besemer & Soria, 1978).

Tabela 1 - Anova da frutificação do cacaueteiro em resposta ao horário de ventilação, polinização da *Forcipomyia* spp. e planta

| Causa de variação   | g.l. | Variância Residual | F      | Pr (> F)     |
|---|------|--------------------|--------|--------------|
| Ventilação (manhã, tarde, manhã e tarde) <i>Forcipomyia</i> spp | 3    | 16757              | 42,499 | < 2,2e-16*** |
| Planta  | 1    | 5973               | 45,446 | 8,38E-08***  |
| Ventilação x planta   | 3    | 4628               | 11,736 | 0,0002784*** |
| Resíduo   | 292  | 38379              |        |              |
| Total   | 299  | 65737              |        |              |

Tabela 2 - Frutificação (bilro/planta) do cacauero em resposta ao horário de aplicação da ventilação e polinização da *Forcipomyia* spp.

| Agente de polinização   | Dias após início da ventilação |      |      |      |      |      | Incremento % |
|-------------------------|--------------------------------|------|------|------|------|------|--------------|
|                         | 10                             | 14   | 26   | 40   | 55   | 69   |              |
|                         | Numero de bilros por planta    |      |      |      |      |      |              |
| Vento Tarde             | 8,12                           | 17,8 | 26,2 | 23,4 | 25,6 | 27,8 | 4527         |
| Vento Manhã             | 5,64                           | 18,3 | 11,0 | 15,4 | 13,0 | 8,08 | 1347         |
| Vento Manhã-Tarde       | 4,56                           | 8,80 | 8,24 | 7,76 | 7,36 | 5,00 | 833          |
| <i>Forcipomyia</i> spp. | 1,84                           | 2,60 | 2,28 | 2,40 | 2,28 | 0,60 | -            |

Em relação à polinização natural, os turnos de ventilação que mais incrementaram a polinização e frutificação, em ordem decrescente, foram: ventilação vespertina (4527%), ventilação matutina (1347%) e a dupla ventilação matutina e vespertina (833%) (Tabela 2). Isto é, a polinização da ventilação vespertina foi 3,4 vezes maior que a polinização gerada pela ventilação matutina e 5,4 vezes maior que a polinização gerada pela dupla ventilação diária, matutina e vespertina.

A maior eficácia polinizadora da ventilação vespertina admite duas explicações, a seguir: estado de maturação da antera e turgidez hídrica da flor no momento da ventilação. Em geral, a abertura das flores (antese) do cacauero é iniciada ao final da madrugada, entre 04:00 e 05:00h, mas a maioria da florescência ocorre entre 06:00 e 09:00h (Soria, 1974). Em condições de campo, na variedade CCN51, verifica-se que, antes da deiscência, a coloração da antera é branco-leitosa, e, depois da deiscência, a antera adquire a coloração pérola-amarelado.

Nas avaliações, foi observado, na variedade CCN51, que a maioria das anteras, entre 06:00 e 09:00h apresentava aspecto esbranquiçado, ainda, indeiscente e, depois das 11:00h, uma coloração, francamente pérola-amarelada. No período vespertino, é possível que a maioria das flores já tenha realizada a deiscência das anteras, liberando a massa polínica. Desse modo, a probabilidade de um choque mecânico, entre antera e estigma, transferir a massa de pólen da antera para o estigma é maior no período vespertino e menor no matutino.

O estado de turgescência hídrica da flor e de seus componentes anato-morfológicos, tais como pedúnculo, pétala, concha petaloide, antera e estigma pode ter incrementado a polinização nas plantas ventiladas de tarde. É possível que pela manhã, o estado de turgidez hídrica da flor seja maior do que o estado hídrico da

tarde, pois de tarde, a umidade relativa do ar é frequentemente mais baixa do que pela manhã, podendo a flor ser mais desidratada. A menor turgidez hídrica do pedúnculo floral e demais tecidos florais à tarde, pode permitir maior vibração da flor e incrementar o deslocamento da concha da pétala. O deslocamento

da concha pode aumentar a frequência de anteras expostas, incrementar a probabilidade da colisão entre antera e estigma e, finalmente, aumentar a frequência de autopolinização.

A intensidade de autopolinização e frutificação da dupla ventilação diária, matutina e vespertina, foi menor do que as polinizações e frutificações geradas pelas ventilações diárias únicas, matutina ou vespertina (Tabela 2). Este resultado inesperado pode ser atribuído a uma provável remoção, pela ação da ventilação vespertina, da massa polínica adicionada ao estigma, e pela ação da ventilação matutina. Esta remoção pode ter ocorrido porque, a fertilização, dos gametas femininos pelos grãos de pólen (oósporos), predominantemente, ocorre entre quatro a seis horas, após a deposição do pólen no estigma. Este hiato de tempo é necessário, para que os tubos polínicos germinem, se desenvolvam e alcancem os óvulos no ovário (Cheesman, 1927).

As ventilações matutinas foram realizadas entre 9 e 10 horas e as ventilações vespertinas entre 13 e 15 horas. Isto é, os intervalos diários entre as ventilações matutina e vespertina foram iguais ou menores que 5 horas. Este tempo pode ter sido insuficiente para permitir que, a maioria dos pólenes transferidos pelas ventilações matinais, já tivesse germinado no momento da realização das ventilações vespertinas. A despeito das hipóteses explicativas, conclui-se que a dupla ventilação diária deve ser rejeitada.

A análise de variância da variável quantidade de ramo por face da copa do cacauero confirmou, de modo significativo, que a quantidade de ramo presente em cada face da planta foi determinante na quantidade de flores polinizadas e da frutificação (Tabela 3). De modo, também significativo, a análise de variância confirmou que a variável planta impactou a intensidade de polinização e frutificação promovida pela ventilação

(Tabela 3). Por último, a análise de variância confirmou que, a interação das variáveis planta e quantidades de ramo/face da copa é significativa e que modifica a intensidade de polinização e frutificação (Tabela 3). Estes resultados garantem que, quanto maior o número de ramos na copa ou quanto mais ramos uma planta possuir na sua estrutura, então maior será a frequência de flores polinizadas em resposta a uma dada intensidade de ventilação artificial.

A quantidade de ramo por face da copa ou planta foi adotada como variável explicativa, por questões de facilidade metodológica, em substituição às variáveis quantidades de flor e almofada floral ativa, conquanto, estas variáveis, sabidamente, fossem as mais adequadas e precisas para aferir a resposta da polinização ao impacto da ventilação artificial. Este procedimento metodológico foi válido porque a densidade de flor e a quantidade de almofada floral relacionam-se, diretamente, com quantidade de ramo, uma vez que são os ramos dos cacaueiros que carregam as almofadas florais e flores. Isto é, para um dado genótipo, em florescência, quanto maior as quantidades de ramo na planta, também, maiores serão as quantidades de almofadas florais e flores. Do mesmo modo, a face da copa com maior número de ramos também terá mais almofada floral e mais flor.

Visto que a quantidade de ramos da copa incrementou a polinização e frutificação então podemos inferir que, para uma mesma intensidade de ventilação artificial, o aumento na densidade de flor incrementa a frequência de flores polinizadas. Ou seja, quanto maior a densidade de almofada floral por ramo e por planta, maior será a densidade de flor exposta à ventilação, elevando a efetividade polinizadora da ventilação em cacau auto compatível.

A análise estatística da variável "distância entre o bocal do ventilador e a copa do cacaueiro", categorizada em dois níveis, face perto (0,0 a 1,5) m e face longe (1,5 até 3,0) m, confirma que a

maior distância, entre o bocal da saída da ventilação e a copa do cacaueiro, reduziu de modo significativo, a polinização e a frutificação (Tabela 3).

O impacto do aumento da distância, entre copa e bocal de saída da ventilação do pulverizador, sobre a polinização e frutificação, pode ser visualizado na Tabela 4. Constata-se que a frutificação da face da copa mais perto, em frente ao pulverizador foi, ao longo do período avaliado, sempre maior do que a frutificação na face da copa mais longe do pulverizador. As diferenças, entre as frutificações das duas faces da copa, foram mais acentuadas nas ventilações vespertina e matutina. Portanto, quanto menor a distância entre o pulverizador e a copa da planta, maior a eficácia polinizadora da ventilação artificial.

A velocidade do vento foi estimada variar entre 80 a 110 km/hora, aproximadamente, a uma distância de 0,3 m do bocal de saída da ventilação. Na ventilação artificial, a velocidade do vento decresce com o aumento da distância entre copa e pulverizador, então pode assumir-se que a velocidade do vento, na face da copa em frente ao ventilador, era maior que a velocidade do vento na face mais longe e oposta da copa. Como a frutificação da face da copa mais perto

Tabela 3. Anova da frutificação em resposta à distância de aplicação da ventilação, quantidade de ramos por face da copa e planta

| Causa de variação  | g.l. | Variância Residual | F      | Pr (> F)     |
|--|------|--------------------|--------|--------------|
| Distância do pulverizador à copa (perto (0 a 1,5) m e longe (1,5 até 3,0) m) | 1    | 1121               | 17,625 | 0,02994***   |
| Número de ramos/face da copa   | 1    | 1065               | 16,738 | 0,0473***    |
| Planta   | 1    | 3704               | 58,236 | 6,66 e-11*** |
| Número de ramo x planta  | 1    | 2728               | 42,898 | 1,04 e-07*** |
| Resíduo  | 795  | 50564              |        |              |
| Total  | 799  | 59181              |        |              |

Tabela 4 - Frutificação (bilro/planta) em função do horário e distância entre pulverizador e copa da planta durante a ventilação

| Agente de polinização   | Dias após o início da ventilação motomecanizada         |           |         |           |         |           |         |           |
|-------------------------|---|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|
|                         | 26  | 26        | 40      | 40        | 55      | 55        | 69      | 69        |
|                         | Distância (m) entre pulverizador e copa (perto e longe) |           |         |           |         |           |         |           |
|                         | Perto   | Longe     | Perto   | Longe     | Perto   | Longe     | Perto   | Longe     |
|                         | 0 a 1,5   | 1,5 a 3,0 | 0 a 1,5 | 1,5 a 3,0 | 0 a 1,5 | 1,5 a 3,0 | 0 a 1,5 | 1,5 a 3,0 |
| Vento-Tarde             | 16,44   | 9,76      | 14,68   | 8,68      | 15      | 10,56     | 15,92   | 11,84     |
| Vento Manhã e Tarde     | 4,32  | 3,92      | 4,36    | 3,4       | 4,12    | 3,24      | 3,64    | 1,36      |
| Vento-Manhã             | 7,36  | 3,6       | 9,76    | 5,64      | 7,48    | 5,56      | 4,24    | 3,84      |
| <i>Forcipomyia</i> spp. | 1,32  | 0,96      | 1,72    | 0,68      | 1,4     | 0,88      | 0,32    | 0,28      |



do ventilador foi maior do que a frutificação da face da copa mais longe, então, infere-se que a polinização e a frutificação respondem ao aumento da velocidade do vento gerado pela ventilação.

Pesquisas com pulverizador costal motorizado demonstraram que a eficácia polinizadora da ventilação artificial depende da velocidade do vento. Foi comprovado que ventos, de alta velocidade, gerados por pulverizador costal motorizado, aplicados sobre a flor de cacauero, incrementaram a polinização fértil em cacauero autocompatível. Os incrementos variaram entre 200% a 500% (Soria, 1974; Knoke et al., 1980). Por outro lado, estudos envolvendo a anemofilia artificial e dispersão do pólen, em laboratório, confirmaram que a consistência viscosa da massa polínica impedia que o vento, de baixa velocidade, artificialmente produzido, removesse a massa polínica da antera (Smith, 1950).

Um próximo desafio tecnológico, para viabilizar a tecnologia polinização ventilada em cacau, é desenvolver uma tecnologia que permita incrementar, uniformizar e concentrar a florescência em todos os cacaueros de um cacau.

### Conclusões

Os resultados da pesquisa mostram que a intensidade de florescimento da planta é condição fundamental para obter a máxima frequência de polinização para uma mesma intensidade e frequência de ventilação artificial.

A eficácia polinizadora da ventilação artificial é elevada quando a flor é atingida por ventos com velocidade entre 80 a 110 km/hora.

A ventilação (80 a 110 km/hora) causou lesões em frutos e cicatrizes na casca, mas sem refletir negativamente no aborto, nem em enfermidades dos frutos.

### Agradecimentos

Ao Sr. Fernando D'Martins, proprietário da Fazenda Álamo, por ter disponibilizado os equipamentos e o cacau para execução da pesquisa.

À valorosa e aguerrida equipe composta pelos companheiros de trabalho: José Raimundo Maia dos Santos; Gilmar Batista Costa; Jose Eduardo Silveira; Jose Crispim Soares do Carmo e Valmir Paulino dos Santos, pela dedicação ao trabalho.

### Literatura Citada

- ALVIM, P. de T. 1993. Hydroperiodicity of flowering and flushing of cacao. In: International Cocoa Research. Conference, 11º, Yamoussoukro, Côte D'Ivoire. Proceedings. Lagos, Nigeria, Cocoa Producer's Alliance. pp. 625.
- ALVIM, P. de T.; MACHADO, A. D.; VELLO, F. 1972. Physiological responses of cacao to environmental factors. In: International. Cocoa Research. Conference, 5º, Trinidad y Tobago. Proceedings. Lagos, Nigeria, Cocoa Producer's Alliance. pp. 17.
- ALVIM, P. de T. 1984. Flowering of cocoa. Cocoa Growers Bulletin 35:23-29.
- ALVIM, P. de T.; MACHADO, A. D.; VELLO, F. 1974. Physiological responses of cacao to environmental factors. Revista Theobroma (Brasil) 4:3-25.
- BAWA, K. S. 1990. Plant-pollinator interactions in tropical rain forest. Annual Review of Ecology and Systematics 21:399-422.
- BESEMER, H; SORIA, S. J. 1978. Laboratory rearing of *Forcipomyia* spp. Midges (Díptera, Ceratopogonidae). 1-Adult feeding, larval feeding and copulation trials. A revision of saunders method of rearing. Revista Theobroma (Brasil) 8:43-59.
- CHEESMAN, E. E. 1927. Fertilization and embryogenic in *Theobroma cacao* L. Annual of Botany 41:107-126
- COPE, F. W. 1962. The mechanism of pollen incompatibility in *Theobroma cacao* L. Heredity 17:157-182.
- COPE, F.W. 1958. Incompatibility in *Theobroma cacao*. Nature 181:279-279.
- CRAWLEY, M. J. 2002. Statistical computing: an introduction to data analysis using S-Plus. England, John Wiley & Sons, Ltd. England. 761p.
- ENRIQUEZ, G. 1985. Curso sobre el cultivo del cacao. Turrialba.(Costa Rica). CATIE. 239p.
- FERRI, M. G. 1983. Botânica - Morfologia externa das plantas. Editora Nobel. 152p.
- HERNANDEZ, J. 1965. Insect pollination of cacao-*Theobroma cacao* L, in Costa Rica. Ph. D. Thesis. Madison, Wisconsin, University of Wisconsin. 167p.

- KNOKE, J. K.; SORIA, S. J.; CHAPMAN, R. K. 1980. Cacao pollination with spray equipment, in Costa Rica. *Revista Theobroma (Brasil)* 10(4): 213-224.
- LUNDQVIST, A. 1975. Complex self-incompatibility systems in angiosperms. *Proceedings Royal Society London, B* 188:235-245.
- MACHADO, R. C. R. 1979. Fisiologia do crescimento, floração e frutificação do cacaueiro. Ilhéus, BA. 10p.
- NETTANCOURT, D. 1997. Incompatibility in angiosperms. *Sexual Plant Reproduction* 10(4): 185-199.
- POUND, F. J. 1932a. The genetic constitution of cacao crop. ICTA. First Annual Report on Cacao Research, St. Augustine, Trinidad. pp.10-24
- POUND, F. J. 1932b. Studies of fruit fullness in cacao. II. Evidence for partial sterility. In: ICTA. First Annual Report on Cacao Research St. Augustine, Trinidad. pp.26-28
- POUND, F. J. 1935a. A note on a method of controlled pollination of cacao. In: ICTA. Annual Report 4th. 1934. St. Augustine, Trinidad. pp.15-16.
- POUND, F. J. 1935b. Studies of fruitfulness in cacao. V. Conditional Self-compatibility and its implications. ICTA. Annual Report 4th. 1934. St. Augustine, Trinidad. pp.26-32.
- SAMPAYAN, T. S. 1963. Flower structure and Biology in cacao. *Coffee and Cacao Journal* 6(131):144-145.
- SEAVEY, S.; BAWA, K. 1986. Late-acting self-incompatibility in angiosperm. *Botanical Review* 52:119-219.
- SMITH, A. G. 1950. Pollination of cocoa in Costa Rica. M.A. Thesis. Inter-Ámerican Institute of Agricultural Science. Turrialba, Costa Rica. 43p.
- SORIA, S. J. 1970. Studies on *Forcipomyia* spp. midges (Diptera, Ceratopogonidae) related to the pollination of *Theobroma cacao* L. Dissertation Abstracts International 31(5):2744-B.
- SORIA, S. J. 1974. Indução da produção em cacaueiro com uso de atomizador motorizado portátil na Bahia, Brasil. *Revista Theobroma (Brasil)* 4(2):3-13.
- SORIA, S. J.; WIRTH, W. W. 1974. Identidade e caracterização taxonômica preliminar das mosquinhas *Forcipomyia* spp. (Díptera, Ceratopogonidae) associadas à polinização do cacaueiro na Bahia. *Revista Theobroma (Brasil)* 4(1):3-22.
- VENABLES, W, et al. 2000. Introduction to R. R Development Core Team. <http://www.r-project.org/>
- VOGEL, M.; MACHADO, R. C. R.; ALVIM, P de T. 1981. Remoção de órgãos jovens como método de avaliação das interações fisiológicas no crescimento, floração e frutificação do cacaueiro. In: International Cocoa Research Conference, 8°. Cartagena, Colômbia. Proceedings. Lagos, Nigeria, Cocoa Producer's. pp.215.
- ZUNIGA, A. M. M. 1985. Estudio fenológico y patológico del cacao en la zona de San Carlos. Tesis BsC. Santa Clara, San Carlos (Costa Rica). ITCR. 60p.



## INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE CULTIVO NA BIOGEOGRAFIA DAS ESPÉCIES DE PHYTOPHTHORA PATOGÊNICAS AO CACAUEIRO NA BAHIA, BRASIL

*Edna Dora Martins Newman Luz, Dilze Maria Argôlo Magalhães, Antônio Alves Pimenta Neto, Lindolfo Pereira dos Santos Filho, Larissa Argôlo Magalhães, Antônio Fontes Faria Filho*

Centro de Pesquisas do Cacau, Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Rodovia Ilhéus-Itabuna km 22, 45600-970, Ilhéus - BA, Brasil. dilze.magalhaes@agricultura.gov.br

Quatro espécies de *Phytophthora* agentes da doença podridão parda do cacaueiro ocorrem na Bahia, onde clones resistentes à vassoura de bruxa estão sendo plantados tanto em plantios tecnicamente formados (TF) quanto em Sistema Agroflorestal (SAF) e em cabruca (CA), enxertados em plantas adultas. Sendo assim, tornou-se necessário, conhecer a influência dos sistemas de cultivo na ocorrência da podridão parda e na biogeografia regional das espécies que a causam. Para atingir este objetivo foram coletados durante três anos frutos infectados e amostras de solo em 100 plantas aleatoriamente escolhidas e georeferenciadas em cada uma de cinco propriedades por município, sendo nove dos quais compõem a mesoregião cacaueira e Santo Amaro, no recôncavo baiano. As propriedades agrícolas, sempre que possível, foram escolhidas por possuírem áreas dentro dos sistemas de cultivo TF, SAF e CA. Os isolamentos em frutos e solo resultaram na obtenção de 1916 isolados de diferentes espécies, tendo *P. palmivora* predominado em todos os municípios (77,8%) à exceção de Camacan, onde a prevalência foi de *P. citrophthora*, a segunda espécie mais encontrada (21,6%). *Phytophthora capsici* (0,52%) e *P. heveae* (0,05%) também foram pontualmente isoladas. Santo Amaro seguido de Uruçuca e Belmonte foram os municípios onde o maior número de isolados de *Phytophthora* spp. foram obtidos. Houve efeito ambiental na biogeografia das espécies e o cultivo em SAF, de modo geral, à exceção do município de Gandú, tendeu a diminuir a incidência da podridão parda.

**Palavras-chave:** *Theobroma cacao*, podridão parda, etiologia, distribuição geográfica, *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora citrophthora*.

**Influence of the cultivation system on the biogeography of *Phytophthora* species pathogenic to cacao in Bahia, Brazil.** Four species of *Phytophthora*, agents of the brown rot disease of cacao, occur in Bahia, where clones resistant to witch broom are being planted in both technically formed (TF) and agroforestry systems (SAF) and cabruca (CA) plantations grafted on adult plants. Thus, it became necessary to know the influence of the cropping systems on the occurrence of brown rot and the regional biogeography of the species that cause it. To achieve this objective, infected fruits and soil samples were collected over 3 years in 100 randomly selected plants and georeferenced in each of five properties per city, nine of which make up the cacao and Santo Amaro mesoregion in the Recôncavo Baiano. Agricultural properties, where possible, were chosen because they have areas within the TF, SAF and CA cropping systems. Isolates in fruits and soil resulted in 1916 isolates of different species, with *P. palmivora* predominating in all cities (77.8%), except for Camacan, where the prevalence was *P. citrophthora*, the second most found species (21.6%). *Phytophthora capsici* (0.52%) and *P. heveae* (0.05%) were also isolated in time. Santo Amaro followed by Uruçuca and Belmonte were the cities where the highest number of isolated of *Phytophthora* spp. they were obtained. There was an environmental effect in the biogeography of the species and the cultivation in SAF, in general, with the exception of the city of Gandú, tended to decrease the incidence of brown rot.

**Key words:** *Theobroma cacao*, brown rot, etiology, geographical distribution, *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora citrophthora*.

## Introdução

O gênero *Phytophthora* destaca-se como destruidor de plantas responsável por severos impactos econômicos e ecológicos, marcando a história da fitopatologia como causador da devastação de cultivos de batata (*Solanum tuberosum* L.) na Europa e consequente morte e imigração de pessoas daquela região. (Erwin & Ribeiro, 1996; Luz e Matsuoka, 1996; Luz e Silva, 2001).

Em termos mundiais a podridão parda (PP) é a principal doença do cacau. Na África, principalmente em Ghana, Nigéria e Camarões, 50 a 80% das áreas são afetadas e no México as perdas podem variar de 30 a 80% (Nyassé, 1997). No Brasil durante muitos anos a PP foi responsável por perdas estimadas entre 20 a 30% da produção anual de cacau (Medeiros et al., 1977; Oliveira e Luz, 2005).

Atualmente, na mesorregião cacaueira da Bahia, quatro espécies de *Phytophthora* formam o complexo podridão parda: *Phytophthora palmivora*, *P. capsici*, *P. citrophthora* e *P. heveae* (Luz et al., 1989) afetando as plantações e ainda apresentando potencialidades de assumir os mesmos níveis de importância econômica registrados no passado (Oliveira e Luz, 2012), o que de certo modo, já vem ocorrendo nos últimos anos, demonstrando o que já se esperava, por tratar-se de um gênero de patógenos fortemente associado ao solo e que em cacau, comprovadamente, usa as raízes da planta como reservatório de inóculo (Luz & Mitchell, 1994 a e b).

A importância da PP na região cacaueira baiana decresceu em decorrência da doença vassoura de bruxa (VB), que em 1989 desencadeou forte crise econômica no Sudeste da Bahia (Luz et al., 1997). Porém, também proporcionou fortes mudanças no cultivo do cacau, com a introdução de novos genótipos selecionados como resistentes a VB e outras culturas foram incentivadas, intensificando na região os plantios em sistemas agroflorestais (SAFs) (Marques et al., 2012), bem como o replantio em áreas tecnicamente formadas (TF) com genótipos resistentes, assim como enxertia nas tradicionais plantações em cabruca (CA), o sistema mais ecológico de cultivo de cacau (Araújo et al., 1998; Luz et al., 2013a).

As novas formas de cultivo presentes na região, bem como o impacto da presença de novos genótipos

de cacau, podem repercutir na estabilidade dos patógenos endêmicos bem como na epidemiologia das doenças por eles causadas (Luz et al., 2006). Como no caso da podridão parda do cacau são quatro espécies envolvidas, essas mudanças podem ter repercussões no equilíbrio populacional dessas espécies, com sérias implicações para a própria cultura. Sendo assim, este trabalho objetivou estudar a biogeografia de *Phytophthora* spp., agentes causais da podridão parda do cacau, em plantios tradicionais (cabruca), tecnicamente formados e SAF's em 10 municípios produtores de cacau do estado da Bahia.

## Material e Métodos

### Coletas em propriedades rurais

Foram realizadas coletas durante três anos (2010 a 2012), no período de maior ocorrência da doença (maio-setembro), em 10 municípios (Camacan, Uruçuca, Itabuna, Santo Amaro, Gandú, Mutuípe, Belmonte, Ituberá, Ipiáú, Una), avaliando-se em cada município cinco propriedades agrícolas representativas do perfil da cacauicultura naquele agrossistema e com sistemas de cultivo tradicional, cabruca (CA), tecnicamente formado (TF) e sistemas agroflorestais (SAF). Em cada propriedade foram realizadas coletas de solo e de frutos infectado em 100 plantas distribuídas aleatoriamente nas plantações, mas georeferenciadas.

A coleta do solo foi feita a 20 cm de profundidade, utilizando um trado e retirando amostras em quatro pontos ao redor da planta (Norte, Sul, Leste e Oeste) aproximadamente a 1m de distância do caule. Foram coletadas quatro amostras simples e misturadas em um saco de polietileno formando uma amostra composta com 500 g aproximadamente. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e transportadas para o laboratório de *Phytophthora* do Centro de Pesquisas do Cacau (Cepec) da Ceplac, em Ilhéus, para isolamento em meio de cultura e posterior classificação.

### Isolamento de *Phytophthora* do solo e material vegetal do cacau

No laboratório de *Phytophthora* do Cepec as amostras de tecidos vegetais foram lavadas em água corrente, secadas em papel toalha esterilizado, retirados



fragmentos entre a área sadia e lesionada, que foram desinfestados em uma solução de hipoclorito de sódio a 3%, transferidos a seguir para álcool 70% e água estéril e então colocados em placas de Petri contendo meio seletivo PARPH (Kamwischer & Mitchell, 1978), preparado 24 horas antes, e as placas incubadas a temperatura ambiente, na ausência de luz por 72 horas.

As amostras de solo foram avaliadas quanto à presença de propágulos de *Phytophthora* spp. usando o método de diluição do solo em placas de meio seletivo PARPH, o que proporcionou a oportunidade de quantificar o número de propágulos do patógeno por grama de solo. Foram utilizadas alíquotas das diluições de  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  da mistura de 10 g de solo em 90 mL de ágar-água a 0,2%.

### **Caracterização e identificação dos isolados de *Phytophthora* spp.**

Após o crescimento em meio seletivo, os isolados foram transferidos para placas contendo meio de cultura cenoura-ágar (CA), para caldo de cenoura previamente esterilizado e para placas contendo água esterilizada. A forma das colônias em meio sólido, assim como a formação de esporângios, clamidósporos e oósporos foram avaliados nos diferentes substratos. Os isolados foram identificados por critérios morfofisiológico através da mensuração destas estruturas em culturas axênicas dos isolados obtidos e prospecção de peculiaridades miceliais ou em propágulos infectivos, características marcantes para identificação através das chaves morfológicas existentes (Waterhouse, 1963; Stamps et al., 1990; Gallegly & Hong, 2008). Após identificação, os isolados foram incorporados à coleção de *Phytophthora* Arnaldo Gomes Medeiros do CEPEC.

### **Construção de mapa de distribuição espacial**

Foram utilizados os arquivos digitais dos municípios baianos produzido pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), projetado de décimo de grau para UTM, datum Sirgas 2000, trabalhadas na escala 1:2.500.000 e apresentadas por meio magnético, adequadamente estruturados para utilização em ambiente SIG, no programa ARCGIS 10.5. As informações sobre a localização dos isolados foram coletadas no campo, catalogadas por pontos oriundos de marcações por receptor GPS e após análise de prevalência, projetados no mapa a partir de gráficos em cada município.

## **Resultados**

As quatro espécies de *Phytophthora* anteriormente assinaladas na Bahia (Luz et al., 1989) *P. palmivora*, *P. citrophthora*, *P. capsici* e *P. heveae* (Figura 1A-D) foram encontradas na presente pesquisa. Foram obtidos 1916 isolados de *Phytophthora* spp. nos três anos de coleta, com prevalência de *P. palmivora* (77,8% dos isolados), tendo *P. citrophthora* com 21,6% dos isolados obtidos, sendo a segunda, seguida de *P. capsici* (0,52%) e *P. heveae* (0,05%) que não diferiram estatisticamente em número de isolados. *Phytophthora heveae* foi encontrada em solo de uma fazenda no município de Ipiaú obtendo-se somente um isolado. *Phytophthora capsici* foi encontrada apenas esporadicamente em seis municípios: Belmonte, Camacan, Ituberá, Gandú, Itabuna e Una. *Phytophthora palmivora* foi encontrada em todos os municípios onde foram realizadas coletas (Figura 2) correspondendo a 74,5% no 1º ano de coleta, 81,6% no 2º ano e 78,1% no 3º ano do total de isolados obtidos, tendo prevalecido como o principal agente de podridão parda em todos eles, à exceção de Camacan, onde predominou *P. citrophthora* com 98% dos isolados no 1º ano de coleta, 87,7% no 2º ano e 80,3% no 3º ano. Desta espécie também obteve-se isolados nos 10 municípios amostrados.

Com base nos dados obtidos foi construído um mapa de distribuição das espécies de *Phytophthora* de acordo com a ocorrência e predominância nos municípios coletados (Figura 3).

Nos municípios avaliados na mesorregião cacaueira, somente em Ituberá, Camacan e Gandú foi possível coletar amostras representativas para os três tipos de sistema de cultivo. Em Una foram analisados apenas TF e SAF, enquanto que em Urucuá e Belmonte apenas os sistemas SAF e CA. Em Mutuípe e Ipiaú, somente TF e CA, e as cinco fazendas localizadas em Santo Amaro só tinham plantios tecnicamente formados.

Considerando como variável o número de isolados, a ANOVA permitiu inferir que não houve diferença significativa entre os anos de coleta, sendo estes então usados como repetições para análise subsequente usando como fatores sistema de cultivo e município. Embora não tenha havido significância para sistema de cultivo pelo teste f, pelo teste de médias Tukey ( $P > 0,05$ ), os sistemas CA (13,3%) e TF (13,2%) diferiram significativamente de SAF (8,75%)

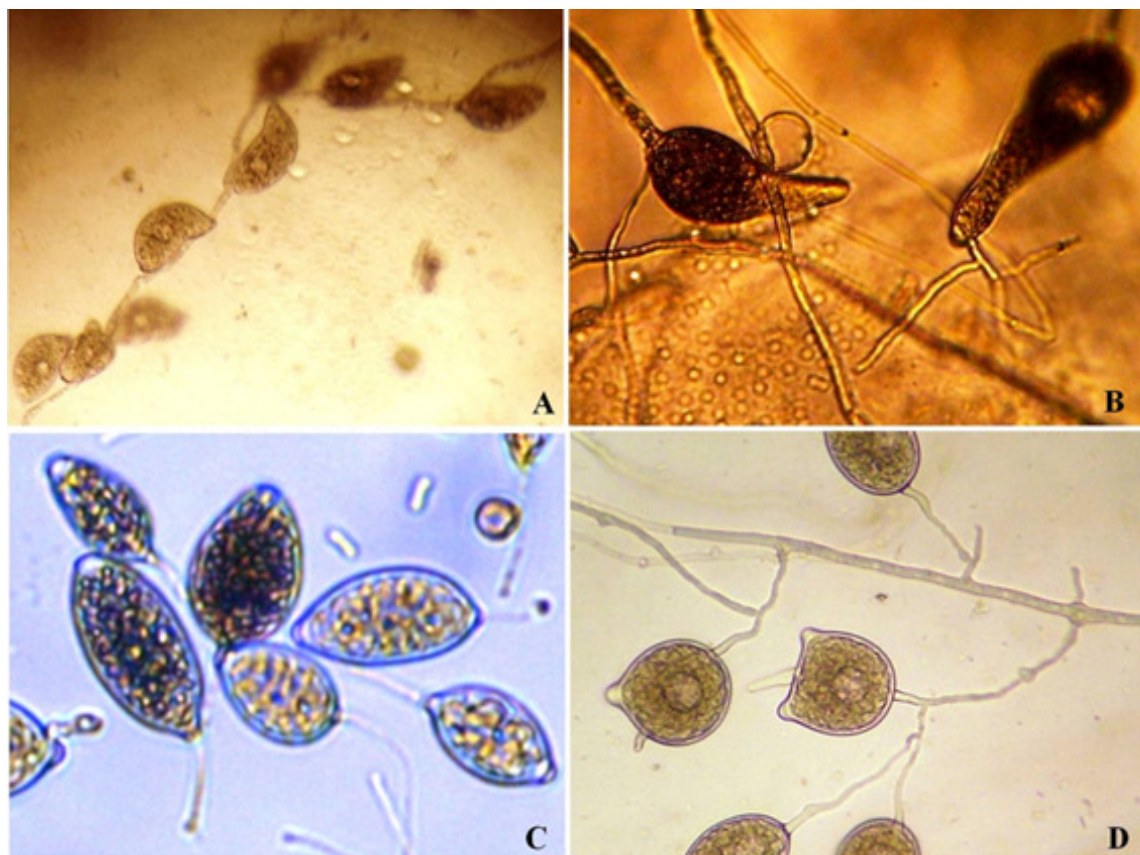


Figura 1- *Phytophthora* spp. do cacaueiro: (A) *P. palmivora*; (B) *P. citrophthora*; (C) *P. capsici*; (D) *P. heveae*.

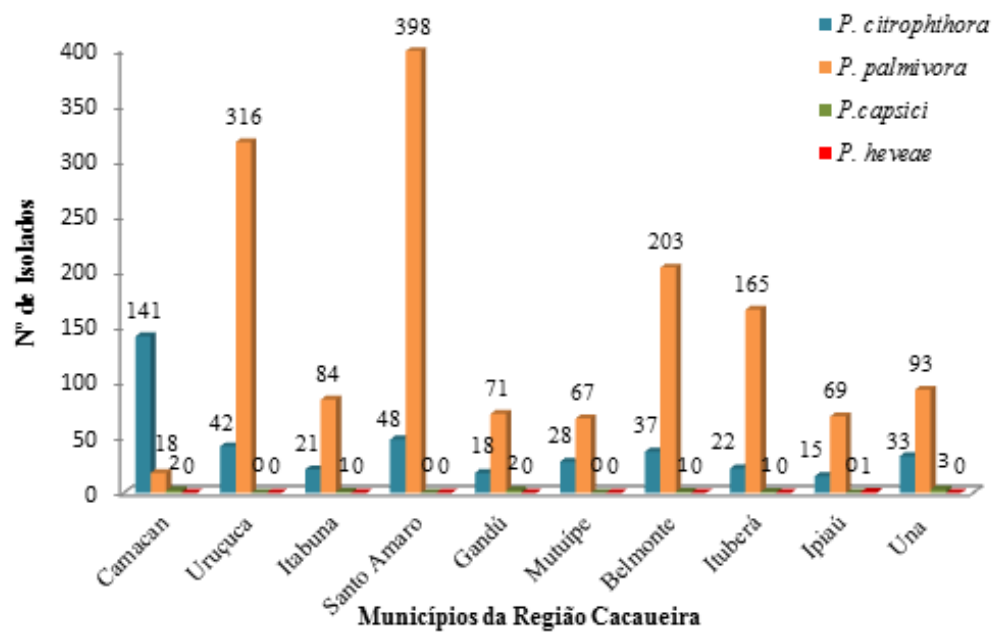


Figura 2 - Número de isolados de *Phytophthora* spp. obtidos em 10 municípios da região cacaueira durante três anos consecutivos (2010 a 2012).

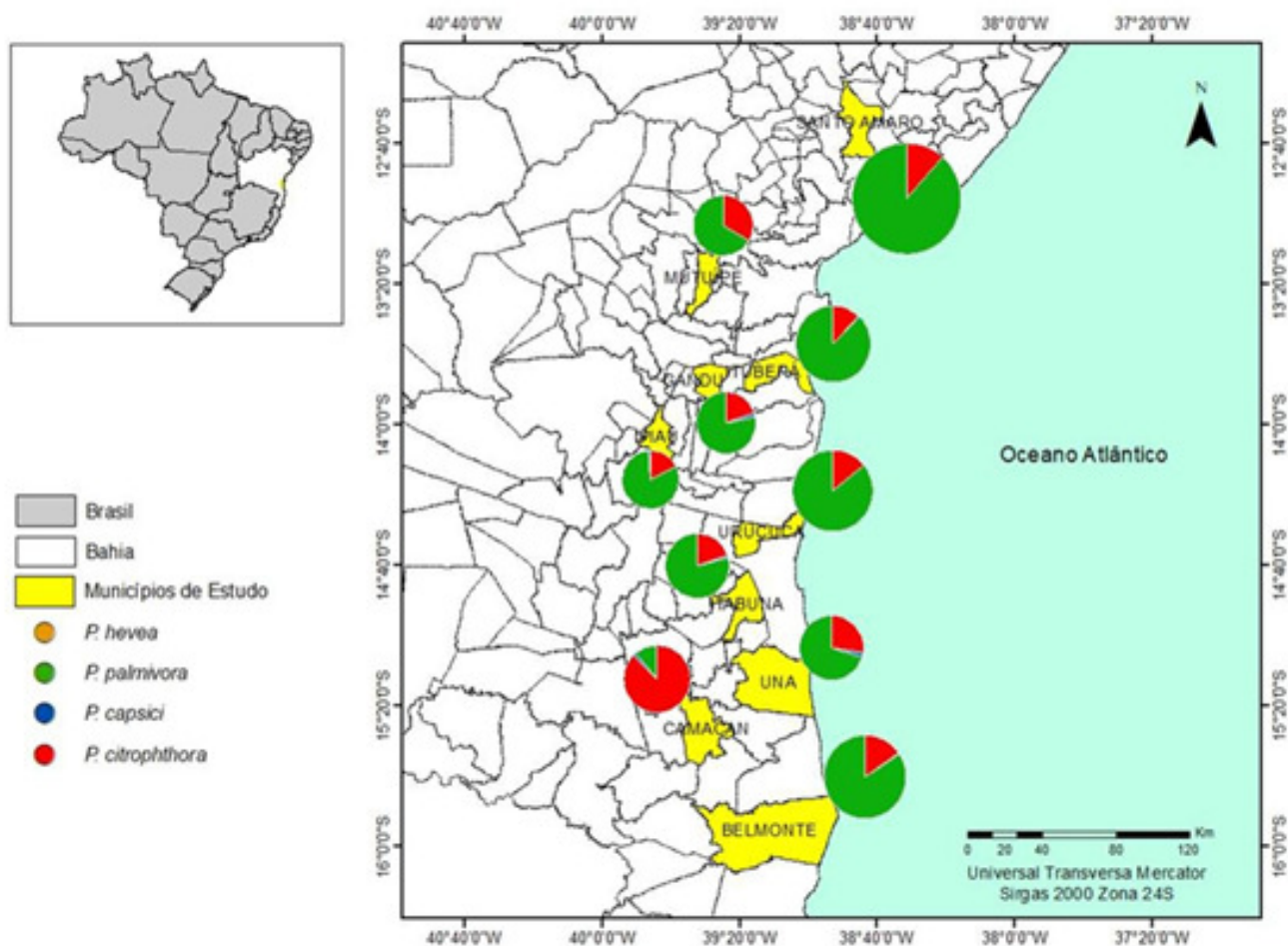


Figura 3 - Municípios da Mesorregião Cacaueira e do Recôncavo na Bahia, Brasil, onde foram coletados isolados de *Phytophthora* spp.

demonstrando que o menor número de isolados de *Phytophthora* spp. foi encontrado neste último sistema de cultivo. Já para município, a variação foi altamente significativa, tendo sido encontrado o maior número de isolados de *Phytophthora* no município de Santo Amaro, seguido de Uruçuca e de Belmonte sendo que a média de isolado neste último não diferiu significativamente (Tukey  $p < 0,001$ ) daquelas dos demais municípios (Tabela 1).

Quando se levou em consideração também o fator espécie e as interações sistema de cultivo x espécie e município x espécie, foram altamente significativos os efeitos de município, espécie e a interação município x espécie, enquanto a interação sistema de cultivo x espécie foi significativa a 5% de probabilidade. Só houve diferenças entre os sistemas de cultivo nos municípios de Gandú, onde em SAF houve maior

número de isolados de *Phytophthora* do que em CA e TF, e em Mutuípe onde o número de isolados em plantas cultivadas no sistema TF foi maior do que o daquelas em SAF (Tabela 2). Desdobrando a interação

Tabela 1- Média do número de isolados de *Phytophthora* spp. obtidos em cultivos de cacauero por município/fazenda

| Município   | Média nº de Isolados |
|-------------|----------------------|
| Santo Amaro | 31,2 A               |
| Uruçuca     | 23,9 AB              |
| Belmonte    | 16,1 BC              |
| Camacan     | 10,7 C               |
| Ituberá     | 7,8 C                |
| Una         | 7,1 C                |
| Itabuna     | 7,1 C                |
| Gandú       | 6,1 C                |
| Mutuípe     | 6,0 C                |
| Ipiáú       | 5,7 C                |



Tabela 2- Média do número de isolados de *Phytophthora* spp. por município e sistema de plantio

| Município   | Sistemas de cultivo |      |      |
|-------------|---------------------|------|------|
|             | SAF                 | CA   | TF   |
| Santo Amaro | -                   | -    | 44,8 |
| Uruçuca     | 10,8                | 18,1 | -    |
| Belmonte    | 12,3                | 16,6 | -    |
| Camacan     | 7,0                 | 9,7  | 15,7 |
| Ituberá     | 7,2                 | 8,8  | 3,3  |
| Una         | 5,4                 | -    | 13,7 |
| Itabuna     | 3,7                 | 7,2  | -    |
| Gandú       | 12,3                | 7,7  | 0,8  |
| Mutuípe     | -                   | 0,3  | 4,8  |
| Ipiaú       | -                   | 2,7  | 5,3  |

SAF = Sistema Agroflorestal, CA= cabruca, TF= Tecnicamente formado.

espécie x município foi confirmada a predominância de *P. palmivora* nos municípios de Gandú, Ipiaú, Itabuna, Ituberá, Santo Amaro, Una e Uruçuca e a predominância de *P. citrophthora* em Camacan. Em Mutuípe não houve diferença significativa entre a média de isolados obtidos para as espécies *P. palmivora* e *P. citrophthora* (Figura 2).

Constatou-se a presença de *Phytophthora* spp. no solo em todos os municípios amostrados a exceção de Santo Amaro. O solo das plantações só foi coletado nos dois primeiros anos de coleta. Dos 154 isolados obtidos de solo 118 foram coletados no primeiro ano e 36 no segundo, sendo 82,5% de *P. palmivora* e 14,3% *P. citrophthora*. Obteve-se apenas um isolado de *P. heveae* e três de *P. capsici*. Este foi o 1º registro de isolamento de *P. capsici* de solo proveniente do município de Itabuna e Una.

## Discussão

O conhecimento da diversidade, da biologia e do impacto das espécies de *Phytophthora* associadas a qualquer ambiente ou patossistema é de fundamental importância para ampliar os conhecimentos sobre o gênero, uma vez que, tem havido muita variação nas populações de *Phytophthora* em função das possibilidades de hibridação entre as espécies e de variações intraespecíficas (Jung et al., 2017; Oh et al., 2013; Zeng et al., 2009).

Para estudos visando conhecer a predominância das espécies que causam o complexo de doenças denominado podridão parda do cacau na Bahia

foram realizadas coletas de frutos em diversos municípios que compõem a região cacauzeira do estado desde 1978-1980 (Campelo e Luz, 1981). Variações na predominância das espécies desde então foram observadas dentro do complexo podridão parda na Bahia, em função das condições climáticas e de outros fatores, que podem favorecer a uma ou mais espécies em determinada região ou época do ano Luz et al. (2007). Entre 1978-1980 *P. capsici* foi constatada como a espécie predominante, sendo isolada de 95% das 2420 amostras de frutos examinadas, seguida de *P. palmivora* (3%) e *P. citrophthora* (2%) (Campelo e Luz, 1981). No entanto, no final da década de 1980, embora *P. capsici* ainda fosse a espécie predominante, ocorrendo em 45% das 650 amostras examinadas, foi observado um aumento das populações de *P. palmivora* (30%) e *P. citrophthora* (25%), por esta ocasião, constatou-se a presença de *P. heveae*, em raízes de cacauzeiro (Luz et al., 1989). A época foi atribuída a mudança no equilíbrio das populações, principalmente, às mudanças climáticas ocorridas em decorrência de eventos do fenômeno El Niño que haviam afetado especialmente *P. capsici*, que em cacauzeiro não produz clamidósporos, esporos de resistência, o que dificultava a sua sobrevivência em períodos com menor intensidade de chuvas (Luz et al., 2007). A formação de microclima proporcionado pelo alto índice de pluviosidade, umidade relativa do ar acima de 85% proporcionam condições adequadas à disseminação do patógeno, registrando as maiores perdas na produção de cacau nos meses mais frios do ano (junho a agosto) (Luz e Silva, 2001). Entre 1999-2002, dentre 243 amostras de frutos avaliadas, 65% foram identificadas como *P. citrophthora*, 33% como *P. palmivora* e 2% como *P. capsici*. Observações realizadas entre 2004-2005 ratificaram a espécie *P. citrophthora*, a mais virulenta, como a de maior prevalência, com 51% de frutos infectados, contra 37% de *P. palmivora* e 12% de *P. citrophthora* (Luz et al., 2007). Àquele momento, um fato novo havia surgido, o melhoramento para resistência à vassoura de bruxa, considerado pelos autores, como primordial, junto aos eventos do El Niño, para que o aumento da população de *P. citrophthora* tenha ocorrido devido ao cultivo em maior escala de genótipos descendentes de Scavina 6, utilizados no programa de melhoramento genético em substituição aos genótipos suscetíveis a



VB. É que os descendentes do clone SCA-6 são menos resistentes a esta espécie quando comparado com *P. capsici* e *P. palmivora* (Luz et al., 2010).

Observou-se nos dados do presente trabalho a predominância de *P. palmivora* (Figura 2) sobre as demais espécies e o declínio acentuado de isolamentos de *P. capsici*, confirmando o que já vinha sendo observado pelos dados das coletas anteriores (Luz et al., 2007), apesar de realizadas em número de frutos inferior ao atual e em menor número de municípios. Como os eventos de El Niño foram bastante evidentes nas últimas décadas, esta pode realmente ser a causa do declínio na população desse patógeno, desde os anos de 1980 pois, é comprovado serem os isolados de *P. capsici* do cacauero, altamente influenciados pela temperatura nos eventos de produção e liberação dos zoósporos (Luz et al., 1985). Houve um fato novo com a presente pesquisa, *P. capsici* foi pela primeira vez isolada do solo de cacauero. Isto pode ser um indício de adaptação dessa espécie ao novo ambiente dos cacaueiros da região. Fato similar já ocorreu com outras espécies de *Phytophthora* (Jung & Blaschke, 2004; Jung & Burgess, 2009; Jung et al., 2016). A baixa ocorrência de *P. hevea* é justificada por apenas causar danos às raízes, enquanto *P. capsici* apenas a frutos e *P. citrophthora* e *P. palmivora* a frutos, ramos, sementes, chupões, troncos e raízes (Luz e Silva, 2001).

Os resultados obtidos (Tabela 2) demonstram que o cultivo em SAF beneficia o controle da podridão-parda do cacauero, tendo em vista a menor incidência da doença em comparação com os demais sistemas de cultivo. Observou-se que nos consórcios com seringueira a desfolha da cultura ocorria no período das coletas (julho a setembro) nos três anos de realização do experimento, que corresponde ao período de maior incidência de podridão parda em frutos de cacaueiros. A desfolha contribui para que as condições de umidade relativa do ar dentro da plantação sejam desfavoráveis à disseminação de *Phytophthora* spp. do cacauero, que necessitam de água livre na superfície dos frutos para esporulação, disseminação dos propágulos e penetração (Luz et al., 2013b). Apenas no município de Gandú um maior número de isolados foi obtido em plantio em SAF (Tabela 2). Ressalta-se que neste município o sistema TF foi o que apresentou o menor número de isolados nos três anos consecutivos.

Constatou-se a presença de *Phytophthora* spp. no solo em todos os municípios amostrados a exceção de Santo Amaro. Acredita-se que o solo do tipo mais argiloso impediu o isolamento por não ter sido possível realizar a mistura com Agar-água, como requerido pela técnica de diluição em solo, para desaglutinar, completamente, as partículas do solo. Assim como em frutos, a predominância nas amostras de solo foi também de *P. palmivora*. A maior ocorrência desta espécie, atualmente, pode ser justificada pela produção de esporângios em abundância nos tecidos infectados e na presença de água livre, o que facilita a liberação dos zoósporos. Seus esporângios se destacam facilmente do micélio formado na superfície dos frutos infectados podendo ser disseminados pelo vento, chuva e outros agentes. *Phytophthora palmivora* possui uma ampla gama de hospedeiros o que facilita a permanência dos seus propágulos por mais tempo no ambiente e a produção abundante de clamidósporos nesta espécie também concorre para a sua permanência em solo (Luz e Silva, 2001; Luz et al., 2013b). Fatores como densidade, eficiência e potencial do inóculo, bem como forma, sobrevivência e fungistase no solo são condições preponderantes para permanência do patógeno no solo em condições viáveis (Bettiol e Ghini, 2005; Tooley et al., 2013).

Existem diferenças evidentes em *Phytophthora* quanto ao potencial de causar infecção, por exemplo, em solo cultivado com mamão (*Carica papaya* L.) foi determinado por Vawdrey (2001) infecção ao potencial de 262 UFC/g de solo de *P. palmivora*, e em solo cultivado com tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Neher et al. (1993) quantificaram 48 UFC/g de solo. A eficiência do inóculo também apresenta variações em nível de espécie, tipo de propágulo e patossistema. Na relação *P. capsici*-pimentão, foram necessários 91 oósporos/g de solo para causar infecções (Bowers & Mitchell, 1991), enquanto que para o patossistema *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*, English & Mitchell (1988) a eficiência do inóculo variou de 200 a 333 clamidósporos/g de solo/ infecção. Em cacauero, Luz & Mitchell (1994 a e b) demonstraram também diferenças nos níveis de infecção causados em plântulas inoculadas com diferentes concentrações e diferentes tipos de inóculo de *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. heveae* e *P. palmivora*.

Os dados desse trabalho tem importância significativa para o entendimento da dinâmica do comportamento de uma doença causada por múltiplos patógenos, do mesmo gênero, ressaltando a importância das condições de clima e dos diferentes sistemas de cultivo encontrados hoje na cacauicultura baiana. Isto tem reflexos no controle da doença, nas pesquisas para o melhoramento genético visando resistência às doenças, bem como na rentabilidade econômica da cultura. Demonstrem ainda a necessidade de monitoramento constante da população desses patógenos.

### Agradecimentos

Os autores agradecem as Técnicas de laboratório da Ceplac Ana Rosa Rocha Niella e Denise Maria Argôlo Ferreira e a Técnica agrícola Virginia Oliveira Damaceno (Ceplac) pela dedicação na condução dos ensaios em laboratório e em campo.

### Literatura Citada

- ARAÚJO, M. et al. 1998. Mata Atlântica do Sul da Bahia: situação atual, ações e perspectivas. Série Cadernos da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. nº 8. São Paulo, SP, CNRBMA/Unesco. 35p.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. 2005. Solos Supressivos. In: Michereff, S.J.; Andrade, D.E.G.T.; Menezes, M. Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais. Recife: UFRPE. pp.125-152.
- BOWERS, J. H.; MITCHELL, D. J. 1991. Relationship between inoculum level of *Phytophthora capsici* and mortality of pepper. *Phytopathology* 81:178-184.
- CAMPÊLO, A. M. F. L.; LUZ, E. D. M. N. 1981. Etiologia da podridão-parda do cacauero nos Estados da Bahia e Espírito Santo, Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 6(3):313-321.
- ENGLISH, J. T.; MITCHELL, D. J. 1988. Influence of an introduced composite of microorganisms on infection of tobacco by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology* 78:1484-1490.
- ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. [S.1]: APS. 562p.
- GALLEGLY, M. E.; HONG, C. 2008. *Phytophthora*: identifying species by morphology and DNA fingerprints. The American Phytophthora Society. Press. Minnesota. 158p.
- JUNG, T.; JUNG, M. H. et al. 2017. Six new *Phytophthora* species from ITS Clade 7a including two sexually functional heterothallic hybrid species detected in natural ecosystems in Taiwan. *Persoonia*, Jun; 38: 100-135. doi:10.3767/003158517X693615.
- JUNG, T.; BLASCHKE, M. 2004. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathology* 53:197-208.
- JUNG, T.; BURGESS, T. I. 2009. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. *Persoonia* 22:95-110.
- JUNG, T.; ORLIKOWSKI, L.; HENRICOT, B. 2016. Widespread *Phytophthora* infestations in European nurseries put forest, semi-natural and horticultural ecosystems at high risk of *Phytophthora* diseases. *Forest Pathology* 46: 134-163.
- KANMWISCHER, M. E.; MITCHELL, D. J. 1978. The influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. *Phytopathology* 68: 1760-1765.
- LUZ, E. D. M. N.; CAMPELO, A. M. F. L.; MIRANDA, R. A. C. 1985. A água da chuva como agente de disseminação do mal rosado do cacauero. *Revista Theobroma (Brasil)* 15:159-166.
- LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S. D. V. M.; MITCHELL, D. J. 1989. *Phytophthora heveae*: outra espécie causando podridão-parda do cacauero na Bahia. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 22º, Recife. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, DF, Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 14. pp.160-160.
- LUZ, E. D. M. N.; MITCHELL, D. J. 1994a. Effects of inoculum forms and densities on cacao root infection by *Phytophthora* spp. *Agrotrópica (Brasil)* 6 (2):41-51.
- LUZ, E. D. M. N.; MITCHELL, D. J. 1994b. Influence of soil flooding on cacao root infection

- by *Phytophthora* spp. Agrotópica (Brasil) 6 (2): 53-60.
- LUZ, E. D. M. N.; MATSUOKA, K. 1996. Taxonomia e sistemática do gênero *Phytophthora*. Revisão Anual de Patologia de Plantas 4:297-328.
- LUZ, E. D. M. N. et al. 1997. Cacau (*Theobroma cacao* L.) Controle de doenças. In: Valle, F.X.R. do; Zambolim, L. Controle de doenças de plantas - grandes culturas. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2:617-622.
- LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S. D. V. M. 2001. Podridão-parda dos frutos, cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacauero. In: Luz, E. D. M. N., Santos, A. F., Matsuoka, K. E., Bezerra, J. L. eds. Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas, SP, Livraria Rural. pp.175-265.
- LUZ, E. D. M. N. et al. 2006. History of the *Phytophthora* species associated with cacao black pod disease in Bahia, Brazil. In: International Cocoa Research Conference, 15°, San Jose, Costa Rica. pp.1238-1241. Vol.2
- LUZ, E. D. M. N. et al. 2007. History of the *Phytophthora* species associated with cacao black pod disease in Bahia, Brazil. In: International Cocoa Research Conference, 15°, San Jose - Costa Rica. Proceedings. Lagos, Nigéria, COPAL/CATIE. pp.1237-1247. Vol.2
- LUZ, E. D. M. N. et al. 2010. Genetic diversity, distribution and pathogenicity of *Phytophthora* species on cacao in Brazil. In: Pereira, J. L., Lopes, U. V. org. The use of molecular biology techniques in search for varieties resistant to witches' broom disease of cacao. Amsterdam, The Netherlands: Common Fund for Commodities, pp.99-110.
- LUZ, E. D. M. N. et al. 2013a. Atualidades no manejo de doenças do cacauero no Brasil. In: Núcleo de estudos em fitopatologia, org. Patologia florestal: desafios e perspectivas. Lavras, MG, NEFIT - Núcleo de Estudos em Fitopatologia. pp. 313-334.
- LUZ, E. D. M. N. et al. 2013b. *Phytophthora* spp. do cacauero na Bahia - um estudo de prevalência. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 46°, Ouro Preto, MG. Tropical Plant Pathology. Lavras, MG, Sociedade Brasileira de Fitopatologia.
- MARQUES, J. R. B. et al. 2012. Sistema agroflorestal (SAF) com seringueira, cacauero e cultivos alimentares. Ilhéus, BA, Ceplac/ Cenex. 40p.
- MEDEIROS, A. G.; BEZERRA, C. S.; MANDARINO, E. P. 1977. Considerações práticas sobre o controle químico da podridão-parda. Ilhéus, BA, CEPLAC/CEPEC, Extensão Rural. Série Cacau nº 1.
- NEHER, D. A.; MCKEEN, C. D.; DUNIWAY, J. N. 1993. Relationships among *Phytophthora* root rot, *Phytophthora parasitica* populations, and yield of tomatoes under commercial field conditions. Plant disease 77:1106-1111.
- NYASSÉ, S. 1997. Etude de la diversité de *Phytophthora megakarya* et caractérisation de la résistance du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) a cet agent pathogène. (These). Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse.
- OH, E. et al. 2013. Surveys of soil and water reveal a goldmine of *Phytophthora* diversity in South African natural ecosystems. Fungus 4(1):123-131.
- OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. 2005. Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil. Ilhéus, BA, CEPLAC. 132p.
- OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. 2012. Principais doenças do cacauero e seu manejo. In: Valle, R. R. Ciência, tecnologia e manejo do cacauero. 2ed. Brasília, DF. pp.187-275.
- STAMPS, D. J. et al. 1990. Revised tabular key to the genus *Phytophthora*. Wallingford, CAB International. Mycological Papers. 162p
- TOOLEY, P. W.; BROWNING, M.; LEIGHTY, R. M. 2013. Inoculum Density Relationships for Infection of Some Eastern US Forest Species by *Phytophthora ramorum*. Journal of Phytopathology 161:595-603.
- VAWDREY, L. L. 2001. Quantification of inoculum density of *Phytophthora palmivora* in soil and its relation to disease incidence in papaw in far northern Queensland. Australasian Plant Pathology 30:199-204.

- WATERHOUSE, G. M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Kew, Commonwealth Mycological Institute. Mycological Papers 92:80.
- ZENG, H. C.; HO, H. H.; ZHENG, F. C. 2009. A survey of *Phytophthora* species on Hainan Island of South China. Journal of Phytopathology 157:33-39.





## AVALIAÇÃO DO CONTROLE BIOLÓGICO POR FORMIGAS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) NUMA CRONOSSEQUÊNCIA DE CACAUAIS DO SUDESTE DA BAHIA

*Eltamara Souza da Conceição<sup>1</sup>, Antonio de Oliveira Costa-Neto<sup>2</sup>, Jacques Hubert Charles Delabie<sup>3,4\*</sup>, Terezinha Maria Castro Della Lucia<sup>5</sup>*

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade do Estado da Bahia, C.P. 59, 48.040-210 Alagoinhas, Bahia, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44036-900 Feira de Santana, Bahia, Brasil. <sup>3</sup>Laboratório de Mirmecologia, CEPEC/CEPLAC/SEFIT, 45650-970 Itabuna, Bahia, Brasil. <sup>4</sup>Departamento de Ciência Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, 45662-900 Ilhéus, Bahia, Brasil. <sup>5</sup>Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

\*Autor para correspondência: jacques.delabie@gmail.com

O controle biológico com formigas em cultivos perenes tem chamado atenção dos pesquisadores em função da disponibilidade permanente desses predadores nas plantações. Formigas têm a vantagem de poder ser eventualmente manejadas para aumentar sua abundância, distribuição e eficácia. Um bom exemplo são cacauais da Região Sudeste da Bahia, cultivo que abriga rica mirmecofauna, onde espécies arbóricolas exercem um importante papel no controle natural de pragas. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial do controle biológico por formigas durante as diferentes fases do desenvolvimento do cacaueteiro em cacauais de um, três, quatro, oito, 15 e 33 anos de idade situados nas áreas experimentais do Centro de Pesquisa do Cacau, Ilhéus, Bahia, Brasil. Fez-se avaliação dos padrões de danos das principais pragas e avaliou-se a aptidão das formigas para sua predação. Na maioria das idades avaliadas, as formigas contribuíram para reduzir a ação das pragas a nenhum dano ou a níveis baixos de danos. A dolichoderine *Linepithema neotropicum* foi a que apresentou maior índice de predação. A eficácia da predação parece melhor nas plantações mais novas, enquanto em cacauais mais velhos, a proteção das formigas não é tão eficiente.

**Palavras-chave:** controle biológico, Formicidae, predação, *Theobroma cacao* L.

**Evaluation of biological control by ants (Hymenoptera: Formicidae) according a chronosequency in a cocoa plantation of South East Bahia, Brazil.** Biological control with ants in perennial crops has called attention of researchers due to the permanent availability of these predators in the plantations. Ants have the capability to be eventually managed to increase their abundance, distribution and effectiveness. A good example is the cocoa plantations in southeastern Bahia, Brazil, where this crop houses a rich ant fauna, with arboreal species which play an important role in natural pest control. The aim of this study was to evaluate the potential of biological control by ants during the different phases of cocoa tree development in cocoa tree plantations of one, three, four, eight, 15 and 33 year old situated in experimental areas of Cocoa Research Center, at Ilhéus. The damage patterns of the main pests were evaluated and the ants' ability to predation was evaluated. In most of the evaluated ages of the trees, the ants contributed to reduce the pest action from none to low damages. The dolichoderine *Linepithema neotropicum* showed the highest rate of predation. The efficacy of predation appears to be better in newer plantations, while in older plantations ant protection is not so efficacious.

**Key words:** biological control, Formicidae, predation, *Theobroma cacao* L.

## Introdução

O controle biológico natural de pragas utilizando formigas em sistemas agroflorestais (SAFs), tais como em cacauais ou cafezais, tem chamado a atenção no último meio século em função da ubiquidade e abundância desses predadores nas plantações (Majer, 1972; Leston, 1973; Majer, 1976a; Kenne et al., 1999; Perfecto, 1991; Way & Khoo, 1992). O mais antigo caso de controle biológico reportado na literatura mundial foi de formigas predadoras quando, no século III de nossa era, os chineses recomendavam seu uso contra pragas de citrus (Pavan & Ceballos, 1979; Perfecto & Castiñeiras, 1998; Gallo et al., 2002). Desde o último século, diversos experimentos foram realizados a fim de utilizar as formigas como agentes de controle biológico (Pavan & Ceballos, 1979; Jolivet, 1996; Parys & Johnson, 2012; Kergunteuil et al., 2013; Navarrete et al., 2013, por exemplo) e alguns autores sugerem até como as manipularem para este fim (Bruneau de Miré, 1969; Majer 1976a, 1976b; Khoo & Chung, 1989; Kenne et al., 1999; Armbrrecht et al., 2001; Mele, 2008). Em agroecossistema cafeeiro, por exemplo, *Azteca sericeasur* Longino, 2007 é considerada espécie-chave para o controle biológico de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae), a broca-do-café (Morris et al., 2015). Em cacauais da Indonésia e da Malásia, *Dolichoderus thoracicus* (F. Smith, 1860) é utilizada no controle biológico dos Miridae do cacau (Khoo & Chung, 1989; Way & Khoo, 1992). Por sua vez, *Wasmannia auropunctata* (Roger, 1863), conhecida como “pixixica” no Brasil (Delabie, 1988), é utilizada no controle biológico dos Miridae do cacau na República de Camarões, apesar dessa formiga ser invasora (Bruneau de Miré, 1969).

Características como: manutenção das populações de insetos abaixo do nível de danos econômicos; abundância, mesmo quando as presas estão escassas; colônias perenes devido à sua estrutura social; disponibilidade de espécies que formam grandes colônias e que necessitam de alimento em abundância; construção de ninhos polidômicos; habilidade para ocupar áreas amplas mantendo uma alta densidade de população, fazem das formigas agentes efetivos no controle biológico (Finnegan, 1971; Risch & Carrol, 1982; Majer, 1986; Medeiros et al., 1995). Além disso,

ainda são susceptíveis de serem manejadas nas plantações para aumentar sua abundância, distribuição e eficácia (Majer, 1986).

A recente queda nos preços mundiais de cacau e o aumento permanente dos custos de inseticidas e outros insumos agrícolas têm ampliado o interesse pelas formigas como agentes de controle biológico natural, uma vez que isso pode auxiliar, a baixo custo, os produtores a conquistar o mercado de produtos orgânicos (Mele, 2008). Os cacauais do Sudeste da Bahia são colonizados por uma rica fauna de formigas e algumas espécies têm excelente potencial para controlar pragas, sendo uma característica importante dessas, a dominância hierárquica, onde diversas espécies dominantes competem com outras (Majer, 1986; Majer & Delabie, 1993; Majer et al., 1994; Delabie et al., 2007).

A região cacauzeira da Bahia tem sofrido forte impacto negativo em decorrência da ação de diversas pragas e doenças do cacauzeiro, tendo o abandono localizado desse cultivo gerado grandes prejuízos para a economia (Alger e Caldas, 1996). A ação de diversos insetos praga reduz a produtividade das plantas, provocando impactos negativos na geração de recursos para os produtores.

Portanto avaliar a organização temporal das espécies com potencial predador, ou que tenham pelo menos insetos na sua dieta, é relevante. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia das formigas como agentes de controle biológico natural numa lógica de sucessão da assembleia desses insetos, em função do desenvolvimento e do envelhecimento dos cacauais. Com esse fim, testou-se se existiam associações entre formigas e danos (ocorrência ou ausência de danos) e se as formigas tiveram sucesso como agentes de controle biológico.

## Material e Métodos

O estudo foi realizado em cacauais situados nas Quadras E, F, G e H' (nomenclatura CEPEC) das áreas experimentais do Centro de Pesquisas do Cacau (14°47'55"S 39°02'01"W), Ilhéus, Bahia, Brasil. Localizada na microrregião sudeste da Bahia, esta área é caracterizada por um clima quente e úmido do tipo AF (Köppen, 1936), com temperatura anual variando entre 20 e 25°C (Santana et al., 2003); A floresta tropical

é o principal ecossistema regional, incluído na Mata Atlântica, com uma pluviosidade regional anual de 2.000 a 2.400 mm, em média, e a uma altitude de cerca de 60 m acima do nível do mar (Santana et al., 2003).

Cacauais com uma área de pelo menos quatro hectares foram escolhidos por se apresentarem em diferentes estágios de desenvolvimento, com 1, 3, 4, 8, 15 e 33 anos de idade, plantados sob o sistema “derruba total”, tendo *Erythrina* sp. como sombreamento. Todas as áreas foram submetidas a condições culturais e tratamentos edafoclimáticos semelhantes. Trezentos cacauzeiros foram selecionados aleatoriamente dentro das áreas plantadas. Com pelo menos 25m de intervalo entre as árvores, 50 árvores foram selecionadas por faixa etária de plantio, mantendo um mínimo de 25m de distância da borda. As amostras foram coletadas entre setembro de 2008 e março de 2009.

As avaliações das injúrias causadas pelas principais pragas, definidas a partir de Abreu et al. (1989) e Gallo et al. (2002), foram realizadas em galhos de tamanhos iguais, tanto no fruto quanto na planta como um todo nos cacauais das diferentes idades, a saber: 1) Tripes (*Selenothrips rubrocinctus* (Giard, 1901), Thysanoptera, Thripidae): queima das folhas, emponteiramento e ferrugem dos frutos; 2) Formiga cortadeira ou saúva (*Atta cephalotes* (Linnaeus, 1758), Hymenoptera, Formicidae): corte das folhas; 3) Chupança (*Monalonion bondari* (Costa Lima, 1938), Hemiptera, Miridae): morte dos ponteiros, frutos com bexiga e queda, e frutos com manchas pretas e/ou esbranquiçadas; 4) Vaquinha (*Percolapsis ornata* (Germar, 1824), Coleoptera, Chrysomelidae): pequenos furos em folhas novas e ataque dos ponteiros dos lançamentos foliares.

As injúrias foram quantificadas, gerando as informações sobre danos, de acordo com Mody & Linsenmair (2004), tomando-se como referência a relação entre as partes sadias e danificadas, categorizados seguindo Fournier (1974). As categorias corresponderam aos níveis de danos e foram assim indicadas: 0 = 0% de dano (sem dano algum); 1 = 1 a 25% (1 a 25% da parte da planta avaliada apresentava algum dano); sucessivamente 2 = 26 a 50%; 3 = 51 a 75% e; 4 = 76 a 100%.

Além disso, avaliou-se a aptidão das formigas para a predação, metodologia adaptada de Medeiros (1992)

e Conceição et al. (2009), usando larvas de *Nasutitermes* sp. (Blattoidea, Isoptera, Termitidae). Esse experimento foi realizado em março de 2009. Uma larva, de cada vez, foi colocada numa folha da parte central da copa do cacauzeiro escolhido aleatoriamente e onde as espécies de formigas mais frequentes que se pretendia testar ocorrem. Foram realizadas dez observações de até 5 minutos para cada espécie (Figuras 1 e 2), anotando o número de vezes em que cada espécie de formiga capturou a isca e o tempo que levou até a captura.

A escolha das espécies de formigas para as avaliações foi baseada no Percentil 95%; os testes relativos à predação somente foram realizados com as espécies: *Ectatomma tuberculatum* (Olivier, 1792), *Linepithema neotropicum* Wild, 2007 e *W. auropunctata*. Com relação à associação com os danos, houve casos em que grupos de cacauzeiros de determinadas idades não apresentaram ocorrências de formigas com frequência suficiente para as análises. Para verificar a associação entre formigas e danos para plantação de cada idade, foi feita uma Análise Multivariada de Sérição Restrita, utilizando matrizes de presença/ausência (Brower & Kile, 1988).

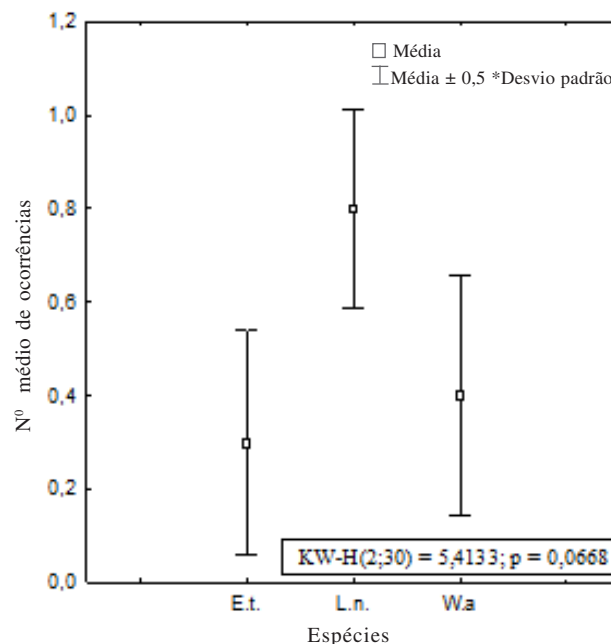


Figura 1. Ocorrência de ataques das formigas às iscas (larvas de *Nasutitermes* sp.) em cacauais do sudeste da Bahia. Março de 2009. E.t.= *Ectatomma tuberculatum*; L.n.= *Linepithema neotropicum*; W.a.= *Wasmannia auropunctata*.

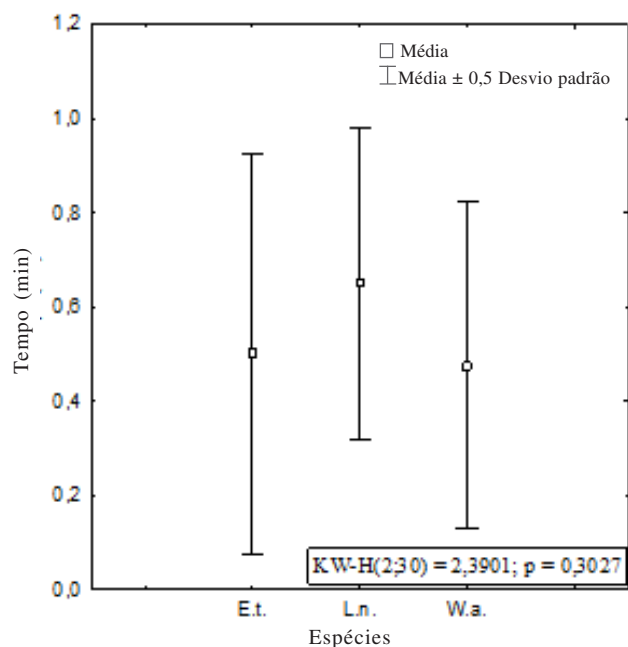


Figura 2. Tempo médio para o ataque das formigas às iscas (larvas de *Nasutitermes* sp.) em cacauais do sudeste da Bahia, Março de 2009. E.t.= *Ectatomma tuberculatum*; L.n.= *Linepithema neotropicum*; W.a.= *Wasmannia auropunctata*.

Posteriormente, com auxílio do programa Past (Hammer et al., 2001), as matrizes foram comparadas a partir do teste de “Monte Carlo”, testando a existência ou não de associação a 95% de confiança ( $p < 0,05$ ). Foram calculados os índices, bem como, as médias do tempo de predação. Os índices foram obtidos através de:  $IP = Npe/Nte \cdot 100$  onde: IP = índice de predação para a espécie estudada; Npe = número total de observações de predação pela espécie estudada; Nte = número total de ensaios. Foi realizado um teste não paramétrico de comparação de médias (Prova de Kruskal-Wallis) (Arango, 2012), com relação ao número de ocorrências e ao tempo médio de ataque.

## Resultados

Para os tipos de injúria “corte de folhas por *Atta cephalotes*” (Tabela 1) e “queima de folhas por *Selenothrips rubrocinctus*” (Tabela 2), o nível de dano 1 foi o que apresentou maior número de associações com formigas. As espécies associadas a essas injúrias e nesse nível de dano nas idades de 3, 4, 8 e 15 anos, foram *Crematogaster erecta* Mayr, 1866 e *Monomorium floricola* (Jerdon, 1851), assim como,

de forma um pouco mais discreta, *E. tuberculatum* e *W. auropunctata*. *Crematogaster erecta* e *M. floricola* também estiveram mais associadas ao nível 2 de dano para “furos nas folhas por *Percolapsis ornata*” (Tabela 3) ocorrendo em um maior número de cacauais de diferentes idades (4, 8 e 15 anos). A espécie *C. erecta* se destacou ainda por estar associada em maior número de cacauais de idades diferentes no nível de dano 3 para a ocorrência de “furos nas folhas por *P. ornata*” (Tabela 3), nas idades de 3, 4, 8 e 15 anos.

Para o tipo de injúria “manchas do fruto por *Monalonion bondari*” (Tabela 4), bem como “morte dos ponteiros por *M. bondari*” e “emponteiramento por *S. rubrocinctus*” (Tabela 5), as espécies de formigas estiveram associadas principalmente ao nível 1 de dano no cacauai de 15 anos. Já para “ferrugem dos frutos por *S. rubrocinctus*” (Tabela 6), as associações ocorreram somente no nível de dano 4 em cacauais de 33 anos. Com exceção para o tipo de injúria “ferrugem dos frutos provocada por *S. rubrocinctus*”, *C. erecta*, portanto, teve destaque em todas as associações com os diferentes tipos de injúrias, em níveis diversos de danos, e em alguns casos, pelo menos em uma idade de cacauais.

Ao comparar as formigas em relação ao potencial como predadoras nos cacauais, *L. neotropicum* apresentou maior número de ataques às iscas oferecidas; no entanto, essa espécie também foi a que demorou em média o maior tempo para atacar as iscas (Figuras 1 e 2). *Ectatomma tuberculatum* e *W. auropunctata* apresentaram um número inferior de ataques às iscas, mas em compensação, o tempo de ataque foi mais curto. Não houve diferença significativa entre ambas as espécies para o período de reconhecimento às iscas e ataque (Figuras 1 e 2). Por sua vez, *M. floricola* não apresentou qualquer atitude de ataque às iscas oferecidas.

## Discussão

Cacauais que sofreram danos relevantes não estavam relacionados com espécies de formigas consideradas dominantes nessas plantações (Majer et al., 1994), com exceção de *C. erecta*, *W. auropunctata* e *E. tuberculatum*. A ocorrência da associação dos danos com essas espécies foi observada



Tabela 1. Associação\* entre espécies de formigas e o nível de dano de “corte das folhas provocado por *A. cephalotes*” em cacauais de idades distintas. Ilhéus-BA. Setembro de 2008 a março de 2009

| Espécies                               | Nível de dano nas plantas (Categoria) |                   |                  |               |            |
|--|---------------------------------------|-------------------|------------------|---------------|------------|
|  | 0                                     | 1                 | 2                | 3             | 4          |
| <i>Azteca paraensis bondari</i>        | -                                     | (3,33,4)          | (33)             | -             | -          |
| <i>Brachymyrmex admotus</i>            | (1)                                   | (3)               | -                | -             | -          |
| <i>Brachymyrmex heeri</i>              | -                                     | (1)               | (8)              | -             | -          |
| <i>Camponotus (Myrmobrachys) sp.1</i>  | -                                     | -                 | (33)             | -             | -          |
| <i>Camponotus crassus</i>              | -                                     | (3,4,15)          | (4)              | -             | -          |
| <i>Camponotus fastigatus</i>           | -                                     | 4)                | (4,15)           | -             | -          |
| <i>Cardiocondyla minutior</i>          | -                                     | (3)               | -                | -             | -          |
| <i>Cephalotes atratus</i>              | -                                     | (3,4)             | (4,15)           | -             | -          |
| <i>Crematogaster carinata</i>          | -                                     | (33)              | (33)             | -             | -          |
| <i>Crematogaster curvispinosa</i>      | -                                     | (8)               | (8,33)           | (8)           | (8)        |
| <b><i>Crematogaster erecta</i></b>     | -                                     | <b>(3,4,8,15)</b> | <b>(4,15)</b>    | <b>(8)</b>    | -          |
| <i>Crematogaster longispina</i>        | -                                     | (3,4)             | (4)              | -             | -          |
| <i>Crematogaster moelleri</i>          | -                                     | -                 | (33)             | -             | -          |
| <i>Crematogaster victima</i>           | -                                     | (3)               | -                | -             | -          |
| <i>Dolichoderus attelaboides</i>       | -                                     | (33)              | (33)             | -             | -          |
| <i>Dolichoderus bispinosus</i>         | -                                     | (3)               | -                | -             | -          |
| <b><i>Ectatomma tuberculatum</i></b>   | -                                     | <b>(8,15,33)</b>  | <b>(8,33,15)</b> | <b>(8)</b>    | <b>(8)</b> |
| <i>Linepithema neotropicum</i>         | (1)                                   | (1,3,4)           | (8)              | -             | -          |
| <b><i>Monomorium floricola</i></b>     | -                                     | <b>(3,4,8,15)</b> | <b>(4,8)</b>     | <b>(8,15)</b> | -          |
| <i>Nylanderia fulva</i>                | -                                     | (15)              | (33)             | -             | -          |
| <i>Neoponera inversa</i>               | -                                     | (33)              | (33)             | -             | -          |
| <i>Pheidole</i> gp. <i>Fallax</i> sp.9 | -                                     | (3)               | -                | -             | -          |
| <i>Solenopsis</i> sp.3                 | -                                     | (33)              | -                | -             | -          |
| <b><i>Wasmannia auropunctata</i></b>   | -                                     | <b>(3,8)</b>      | <b>(4,33,8)</b>  | <b>(8)</b>    | -          |

\*Existe associação significativa pelo método de Monte Carlo ( $p < 0,05$ ).

\*\* Entre parêntesis as idades das plantas em que se observaram os valores de ocorrência indicados.

\*\*\* Em negrito, as espécies consideradas dominantes segundo Majer et al. (1994).

geralmente em cacauais de idades mais avançadas (>8 anos de plantio), embora tenha havido maior número de associações dessas espécies com a injúria “furos nas folhas provocados por *P. ornata*” e em níveis variados de danos. A associação de qualquer formiga com níveis baixos de danos é algo que pode ser considerado positivo para o controle biológico natural, uma vez que se presuponhe que a atividade da formiga tem contribuído para evitar a ação da praga.

As injúrias da formiga cortadeira *At. cephalotes* estão entre as mais temidas pelos cacauicultores, porque podem ocasionar a morte das plantas novas (Abreu & Delabie, 1986; Delabie et al., 1993). Em cacauais de um ano, a ocorrência de *Brachymyrmex admotus* Mayr, 1887 e *L. neotropicum* sempre estava associada à ausência de injúrias nas plantas, no entanto, parece pouco provável que essas duas pequenas

espécies de formigas sejam capazes de inibir o corte de folhas pela saúva.

As espécies de formigas que estiveram associadas a um número maior de tipos de injúrias, tais como *M. floricola* (13 tipos) e *C. erecta* (12 tipos), são consideradas competitivas (Andersen, 1997) e poderiam assumir um papel controlador das populações de insetos praga. Isso seria esperado principalmente para *M. floricola*, que se apresenta como dominante na assembleia de formigas estudadas (Conceição et al., 2015), mas que não possui comportamento agressivo e não atacou nenhuma isca durante os testes comportamentais. Em geral, espécies dominantes apresentam notável impacto na composição de outros invertebrados arborícolas por possuir associações mutualísticas com hemípteros (Delabie, 2001), agressividade, preferência de cada

Tabela 2. Associação\* entre espécies de formigas e o nível de dano de "queima das folhas provocada por *S. rubrocinctus*" em cacauais de idades distintas. Ilhéus-BA. Setembro de 2008 a março de 2009

| Espécies                              | Nível de dano nas plantas (Categoria) |                   |                  |               |            |
|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------|------------------|---------------|------------|
|                                       | 0                                     | 1                 | 2                | 3             | 4          |
| <i>Azteca paraensis bondari</i>       | -                                     | (3,33,4)          | (33)             | -             | -          |
| <i>Brachymyrmex admotus</i>           | (1)                                   | (3)               | -                | -             | -          |
| <i>Brachymyrmex heeri</i>             | -                                     | (1)               | (8)              | -             | -          |
| <i>Camponotus (Myrmobrachys) sp.1</i> | -                                     | -                 | (33)             | -             | -          |
| <i>Camponotus crassus</i>             | -                                     | (3,4,15)          | (4)              | -             | -          |
| <i>Camponotus fastigatus</i>          | -                                     | (4)               | (4,15)           | -             | -          |
| <i>Cardiocondyla minutior</i>         | -                                     | (3)               | -                | -             | -          |
| <i>Cephalotes atratus</i>             | -                                     | (3,4)             | (4, 15)          | -             | -          |
| <i>Crematogaster carinata</i>         | -                                     | (33)              | (33)             | -             | -          |
| <i>Crematogaster curvispinosa</i>     | -                                     | (8)               | (8,33)           | (8)           | (8)        |
| <b><i>Crematogaster erecta</i></b>    | -                                     | <b>(3,4,8,15)</b> | <b>(4,15)</b>    | <b>(8)</b>    | -          |
| <i>Crematogaster longispina</i>       | -                                     | (3,4)             | (4)              | -             | -          |
| <i>Crematogaster moelleri</i>         | -                                     | -                 | (33)             | -             | -          |
| <i>Crematogaster victima</i>          | -                                     | (3)               | -                | -             | -          |
| <i>Dolichoderus attelaboides</i>      | -                                     | (33)              | (33)             | -             | -          |
| <i>Dolichoderus bispinosus</i>        | -                                     | (3)               | -                | -             | -          |
| <b><i>Ectatomma tuberculatum</i></b>  | -                                     | <b>(8,15,33)</b>  | <b>(8,33,15)</b> | <b>(8)</b>    | <b>(8)</b> |
| <i>Linepithema neotropicum</i>        | (1)                                   | (1,3,4)           | (8)              | -             | -          |
| <b><i>Monomorium floricola</i></b>    | -                                     | <b>(3,4,8,15)</b> | <b>(4,8)</b>     | <b>(8,15)</b> | -          |
| <i>Nylanderia fulva</i>               | -                                     | (15)              | (33)             | -             | -          |
| <i>Neoponera inversa</i>              | -                                     | (33)              | (33)             | -             | -          |
| <i>Pheidole gp. Fallax sp.9</i>       | -                                     | (3)               | -                | -             | -          |
| <i>Solenopsis sp3</i>                 | -                                     | (33)              | -                | -             | -          |
| <b><i>Wasmannia auropunctata</i></b>  | -                                     | <b>(3,8)</b>      | <b>(4,33,8)</b>  | <b>(8)</b>    | -          |

\*Existe associação significativa pelo método de Monte Carlo ( $p < 0,05$ ).

\*\* Entre parêntesis as idades das plantas em que se observaram os valores de ocorrência indicados.

\*\*\* Em negrito, as espécies consideradas dominantes segundo Majer et al. (1994).

espécie por tipos e tamanhos específicos de presas, dietas particulares e associação com espécies subdominantes (Majer et al., 1994).

Os danos causados pelo "corte de folhas" só não foram significativos em cacauais de 33 anos e, nas idades onde ocorreu, o impacto foi mais evidente em plantas mais novas. Portanto, a influência das outras formigas (as espécies predadoras) sobre as cortadeiras, é provavelmente mínima. Apesar disso, estudos relatam o uso, pelos índios Kayapós, de espécies de *Azteca*, comuns na lavoura cacauaieira, para controlar *At. cephalotes* e *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) no Pará (Overall e Posey, 1988). Além disso, *E. tuberculatum*, comum nos cacauais do CEPEC, é conhecida por caçar as operárias de *At. cephalotes* e outras formigas (Delabie, 1999; Delabie e Mariano, 2000).

Os danos causados pela "queima das folhas por *S. rubrocinctus*" e "furos nas folhas por *P. ornata*" ocorreram em todas as idades com alguma variação. As pragas que ocasionam esses tipos de danos têm atividade sazonal e a ação controladora das formigas pode ocorrer de forma bastante irregular em função disso. Essa flutuação pode ter ocorrido também em função dos recursos disponíveis na planta, tais como lançamentos foliares e produção de bilros (Abreu et al., 1989; Ferronato, 1999). Esta sazonalidade é hipoteticamente responsável pela ocorrência dos herbívoros na planta e a resposta destes às condições do cultivo e, isso inclui o tipo de tecido vegetal escolhido pela praga para o ataque, comportamento alimentar ou reprodutivo, entre outros (Marquis, 1992).

*Wasmannia auropunctata* esteve presente em cacauais onde ocorreram os danos causados pela

Tabela 3. Associação\* entre espécies de formigas e o nível de dano de "furos nas folhas provocados por *P. ornata*" em cacauais de idades distintas. Ilhéus-BA. Setembro de 2008 a março de 2009

| Espécies                             | Nível de dano nas plantas (Categoria) |                |                 |                   |               |
|--------------------------------------|---------------------------------------|----------------|-----------------|-------------------|---------------|
|                                      | 0                                     | 1              | 2               | 3                 | 4             |
| <i>Azteca paraensis bondari</i>      | -                                     | (4)            | (4)             | (33)              | -             |
| <i>Brachymyrmex admotus</i>          | (1)                                   | (1)            | (1)             | -                 | -             |
| <i>Camponotus crassus</i>            | -                                     | (4,15)         | (4,15)          | (3,4)             | (4)           |
| <i>Camponotus fastigatus</i>         | -                                     | -              | 5(4)            | -                 | -             |
| <i>Cephalotes atratus</i>            | -                                     | (4,15)         | (8,15)          | (3,15)            | -             |
| <i>Crematogaster acuta</i>           | -                                     | -              | -               | (33)              | (33)          |
| <i>Crematogaster carinata</i>        | -                                     | (33)           | (4)             | -                 | -             |
| <i>Crematogaster curvispinosa</i>    | -                                     | -              | (8)             | (8,33)            | (8,33)        |
| <b><i>Crematogaster erecta</i></b>   | -                                     | <b>(4,15)</b>  | <b>(4,8,15)</b> | <b>(3,8,4,15)</b> | <b>(4)</b>    |
| <i>Crematogaster longispina</i>      | -                                     | -              | (33)            | -                 | -             |
| <b><i>Ectatomma tuberculatum</i></b> | -                                     | <b>(15,33)</b> | <b>(8,15)</b>   | <b>(8,15,33)</b>  | <b>(8,33)</b> |
| <i>Linepithema neotropicum</i>       | (1)                                   | (1,4)          | (4,8)           | (3)               | -             |
| <i>Monomorium floricola</i>          | -                                     | -              | (4,8,15)        | (3,8,15)          | (8,15)        |
| <i>Nylanderia</i> sp.2               | -                                     | -              | -               | (15)              | -             |
| <i>Neoponera inversa</i>             | -                                     | -              | -               | (33)              | -             |
| <i>Neoponera baccronica</i>          | -                                     | -              | (15)            | -                 | -             |
| <i>Pseudomyrmex termitarius</i>      | -                                     | -              | (15)            | -                 | -             |
| <i>Solenopsis</i> sp.3               | -                                     | -              | -               | (8)               | -             |
| <b><i>Wasmannia auropunctata</i></b> | -                                     | <b>(33)</b>    | <b>(8)</b>      | <b>(8,33)</b>     | <b>(8)</b>    |

\*Existe associação significativa pelo método de Monte Carlo ( $p < 0,05$ ).

\*\* Entre parêntesis as idades das plantas em que se observaram os valores de ocorrência indicados.

\*\*\* Em negrito, as espécies consideradas dominantes segundo Majer et al. (1994).

“queima das folhas por *S. rubrocinctus*” e “furos nas folhas por *P. ornata*”, em todas as idades. Suspeita-se que a “pixixica” não exerça controle biológico sobre nenhuma delas, uma vez que a maior parte da atividade dessa formiga parece ligada à serapilheira, ao tronco e aos frutos do cacaueteiro (Delabie, 1988) e não à folhagem. Além do mais, é notável a maioria das associações de *W. auropunctata* com número elevado de danos. Majer & Delabie (1993) observaram a ocorrência das mesmas espécies estudadas aqui (*W. auropunctata* e *E. tuberculatum*) associadas a níveis intermediários de abundância de outros invertebrados em cacaueteiros, constatando que o número de indivíduos de invertebrados de cada táxon foi bastante variável entre as árvores dominadas por determinadas formigas (Majer & Delabie, 1993). Comunidades de artrópodes com características diferentes podem estar associadas a cada espécie de formiga dominante (ou codominante), com uma composição dependente da ação predatória, do manejo da plantação e da especialização alimentar das formigas (Majer, 1976a). Estas espécies podem ter algum valor no controle

biológico (Bruneau de Miré, 1969; Majer & Delabie, 1993; Medeiros et al., 1995), mas os indivíduos de *W. auropunctata* são pequenos e somente parecem reduzir as taxas de invertebrados nas plantas onde ocorrem com um grau moderado. Por sua vez, *E. tuberculatum*, apesar de formar pequenas populações (~200-500 indivíduos por formigueiro, sendo um por árvore), consegue dominar áreas grandes e contínuas das copas através da justaposição de suas populações; além disso, essa espécie é de grande tamanho e é particularmente agressiva (Majer et al., 1994; Hora et al., 2005).

As plantas começam a apresentar danos mais evidentes a partir de três anos, sendo mais severos aos 33. Isso talvez ocorra porque as formigas têm ação mais efetiva no controle das pragas no estágio inicial de desenvolvimento ou senão porque as plantas ainda não são atrativas o suficiente às pragas a ponto de ocasionarem tais danos. Além disso, uma planta jovem ocupa um espaço (volume, altura) reduzido, o que faz com o que, hipoteticamente, qualquer herbívoro possa naturalmente ser facilmente descoberto por algum

Tabela 4. Associação\* entre espécies de formigas e o nível de dano de "manchas dos frutos provocadas por *Monalonion bondari*" em cacauais de idades distintas. Ilhéus-BA. Setembro de 2008 a março de 2009

| Espécies                             | Nível de dano nas plantas (Categoria) |             |   |   |   |
|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------|---|---|---|
|                                      | 0                                     | 1           | 2 | 3 | 4 |
| <i>Camponotus atriceps</i>           | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <i>Cephalotes atratus</i>            | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <b><i>Crematogaster erecta</i></b>   | -                                     | <b>(15)</b> | - | - | - |
| <b><i>Ectatomma tuberculatum</i></b> | -                                     | <b>(15)</b> | - | - | - |
| <i>Linepithema neotropicum</i>       | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <i>Monomorium floricola</i>          | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <b><i>Wasmannia auropunctata</i></b> | -                                     | <b>(15)</b> | - | - | - |

\*Existe associação significativa pelo método de Monte Carlo ( $p < 0,05$ ). \*\* Entre parêntesis as idades das plantas em que se observaram os valores de ocorrência indicados. \*\*\* Em negrito, as espécies consideradas dominantes segundo Majer et al. (1994).

Tabela 5. Associação\* entre espécies de formigas e cacauzeiros com o nível de dano de "morte dos ponteiros provocada por *Monalonion bondari*", "emponteiramento provocado por *S. rubrocinctus*" e "ataque dos ponteiros provocado por *P. ornata*" em cacauais de idades distintas. Ilhéus-BA. Setembro de 2008 a março de 2009

| Espécies                           | Nível de dano nas plantas (Categoria) |             |   |   |   |
|------------------------------------|---------------------------------------|-------------|---|---|---|
|                                    | 0                                     | 1           | 2 | 3 | 4 |
| <i>Azteca paraensis bondari</i>    | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <i>Camponotus atriceps</i>         | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <i>Camponotus fastigatus</i>       | (15)                                  | (15)        | - | - | - |
| <i>Camponotus trapezoides</i>      | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <i>Camponotus crassus</i>          | (15)                                  | (15)        | - | - | - |
| <i>Cephalotes atratus</i>          | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <i>Cephalotes pavonii</i>          | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <b><i>Crematogaster erecta</i></b> | <b>(15)</b>                           | <b>(15)</b> | - | - | - |
| <i>Dorymyrmex thoracicus</i>       | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <i>Ectatomma tuberculatum</i>      | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <i>Linepithema humile</i>          | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <i>Monomorium floricola</i>        | (15)                                  | (15)        | - | - | - |
| <i>Nylanderia fulva</i>            | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <i>Nylanderia</i> sp.2             | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <i>Odontomachus haematodus</i>     | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <i>Neoponera inversa</i>           | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <i>Paratrechina longicornis</i>    | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <i>Pseudomyrmex gracilis</i>       | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <i>Pseudomyrmex oculatus</i>       | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <i>Pseudomyrmex termitarius</i>    | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <i>Solenopsis geminata</i>         | -                                     | (15)        | - | - | - |
| <i>Solenopsis</i> sp.2             | -                                     | (15)        | - | - | - |

\*Existe associação significativa pelo método de Monte Carlo ( $p < 0,05$ ). \*\* Entre parêntesis as idades das plantas em que se observaram os valores de ocorrência indicados. \*\*\* Em negrito, as espécies consideradas dominantes segundo Majer et al. (1994).

Tabela 6. Associação\* entre espécies de formigas e cacauzeiros com o nível de dano de "ferrugem dos frutos provocada por *S. rubrocinctus*" em cacauais de diferentes idades. Ilhéus-BA. Setembro de 2008 a março de 2009

| Espécies                                       | Nível de dano nas plantas (Categoria) |   |   |   |             |
|--|---------------------------------------|---|---|---|-------------|
|  | 0                                     | 1 | 2 | 3 | 4           |
| <i>Azteca paraensis bondari</i>                | -                                     | - | - | - | (33)        |
| <i>Brachymyrmex heeri</i>                      | -                                     | - | - | - | (33)        |
| <i>Camponotus</i> ( <i>Myrmobrachys</i> ) sp.1 | -                                     | - | - | - | (33)        |
| <i>Crematogaster acuta</i>                     | -                                     | - | - | - | (33)        |
| <i>Crematogaster carinata</i>                  | -                                     | - | - | - | (33)        |
| <i>Nylanderia fulva</i>                        | -                                     | - | - | - | (33)        |
| <i>Neoponera inversa</i>                       | -                                     | - | - | - | (33)        |
| <i>Solenopsis</i> sp.2                         | -                                     | - | - | - | (33)        |
| <i>Solenopsis</i> sp.3                         | -                                     | - | - | - | (33)        |
| <b><i>Wasmannia auropunctata</i></b>           | -                                     | - | - | - | <b>(33)</b> |

\*Existe associação significativa pelo método de Monte Carlo ( $p < 0,05$ ). \*\* Entre parêntesis as idades das plantas em que se observaram os valores de ocorrência indicados. \*\*\* Em negrito, as espécies consideradas dominantes segundo Majer et al. (1994).

predador e tem maior probabilidade de ser atacado. Por sua vez, a planta mais velha ocupa um espaço bem mais complexo, oferecendo certa conectividade com as plantas adjacentes, onde pragas encontram muitas oportunidades de se alimentar e se esconder, havendo maior competição entre predadores e, consequentemente, menor probabilidade de as mesmas serem atacadas.

Determinadas pragas só são capazes de usar recursos em plantas a partir de certa idade. Esse é o caso de *P. ornata* e *M. bondari* que têm uma probabilidade baixa de ocorrer em plantas jovens ou baixas, onde esses insetos não têm como cumprir a totalidade de seu ciclo biológico, a menos que, por algum motivo, a árvore apresente uma excepcional quantidade de lançamentos foliares, de tecidos vegetais novos, ou ainda um sistema radicular similar a uma planta adulta (inferências baseadas em Abreu et al., 1989; Ferronato, 1999). Já as formigas cortadeiras desfolham as plantas por vezes sucessivas, atacando uma a uma todas as plantas com os requisitos de sua escolha ao alcance de sua área de forrageamento (Delabie et al., 1993), e o ataque a um pé de cacauzeiro novo pode ser letal, se a desfolha for integral. Embora a organização das formigas em mosaico pareça ter uma grande influência na distribuição das pragas de cacauzeiro (Leston, 1978; Majer & Delabie, 1993;



Majer et al., 1994; Jolivet, 1996) e o conhecimento das associações entre as espécies dominantes e subordinadas possa ser útil para o controle de pragas, não foi possível concluir neste estudo que a redução do ataque das pragas do cacauete deve-se à sucessão das espécies de formigas no plantio, em função do desenvolvimento e envelhecimento da árvore.

Nenhum dano foi observado em cacauais de qualquer idade quando a formiga dominante associada à árvore foi *Azteca chartifex* Forel, 1896. Esse fato reforça sua reputação como agente de controle biológico tradicional em cacauais da região, o que corroboram diversas publicações (Delabie, 1990; Majer et al., 1994; Delabie et al., 2007). A espécie *Az. sericeasur* também é considerada importante agente de controle biológico da broca-do-café, no México, independente da densidade da praga (Morris et al., 2015). No presente estudo, a baixa frequência de *Az. chartifex* impossibilitou que qualquer tipo de associação com danos fosse detectável. Segundo Majer & Delabie (1993), seu valor como agente de controle biológico tem sido ponto de discussão desde a época de Bondar (1939), mas que, apesar de protegerem hemípteros, que potencialmente podem ocasionar danos às plantas, quando em alta densidade, essas formigas certamente reduzem substancialmente populações de muitos invertebrados em seu território. Prova disso é que as árvores que apresentam essa espécie têm sua produção aumentada enquanto suas operárias excluem numerosos insetos (Delabie, 1990). Assim *A. chartifex* é uma opção interessante para programas de controle biológico, pois é um predador eficiente de *S. rubrocinctus* e *Monalonion* spp. (Majer & Delabie, 1993; Medeiros et al., 1999) e apresenta relações negativas com a ocorrência de danos aos cacauais causados por insetos fitófagos, bem como possui um comportamento ativo de predação (Medeiros et al., 1995). Numa perspectiva de manejo, foi a única espécie que conseguiu ampliar mais de 10% da sua área territorial em cacauais, ao longo de um ano (Medeiros et al., 1995).

É conhecido que as formigas mais frequentes nos cacauais são, em geral, predadoras oportunistas e generalistas (Delabie et al., 2007). Algumas dessas espécies, normalmente vistas como boas candidatas a agentes de controle biológico, tais como *M. floricola* (Moura et al., 1994; Conceição et al., 2009), se

mostraram de fato predadoras ineficientes. Formigas do gênero *Ectatomma* são comumente conhecidas como predadoras de amplo espectro (Delabie et al., 2007; Conceição et al., 2009), o que se confirmou com *E. tuberculatum*. Também considerada como inimigo natural potencial, a “pixixica” *W. auropunctata* (Majer et al., 1994; Way & Bolton, 1997) só teve desempenho regular como predadora. Sob esse aspecto, pode até ser sugerida como agente de controle biológico (vide Bruneau de Miré, 1969), mas com restrições drásticas em função dos numerosos problemas que ocasiona em cacauais (Delabie, 1988, 1990; Medeiros et al., 1995; Delabie et al., 2007).

Observações sobre a comunidade de formigas sugerem que as estratégias a serem sugeridas numa perspectiva de manejo devem ter em vista as particularidades das espécies, que, apesar de apresentarem, às vezes, atributos adequados como agentes de controle de pragas, possuem numerosas limitações. Qualquer manipulação com esse intuito deveria oferecer um controle biológico eficaz durante todo o desenvolvimento do cacauete. O manejo dos formigueiros de determinadas espécies, por exemplo, pode ser usado para favorecer uma espécie em detrimento de outras (Majer, 1976b; Djieto-Lordon & Dejean, 1999). A substituição de espécies menos eficientes por mais benéficas poderia promover a proteção do cacauete contra muitas pragas potenciais (Majer, 1976b), pois há muitos insetos susceptíveis ao ataque de uma grande variedade de formigas predadoras (Leston, 1970; Way & Khoo, 1992). A ocorrência de espécies predadoras pode ser um importante trunfo na proteção da planta, manipulando-se as populações a fim que elas possam manter ou aumentar seus territórios.

Observamos que, em geral, cacauais novos apresentam níveis mais baixos de danos do que plantações mais antigas. Nossa interpretação é que as plantas mais jovens ainda não oferecem recursos suficientes para a maioria das pragas ali se desenvolver (caso das vaquinhas, por exemplo, cujas larvas certamente não encontram recursos suficientes no subsolo). Isso não vale para o forrageamento das formigas cortadeiras que possuem grande capacidade de se deslocar através da plantação. Portanto, num ponto de vista de Manejo Integrado de Pragas (MIP), o uso de pesticidas pode ser recomendado, se

necessário, principalmente em cacauais mais velhos, na ocasião do surto inesperado e abrupto de determinadas pragas. De qualquer forma, mesmo que mudanças sucessivas na organização das comunidades de formigas não influenciem o controle das principais pragas do cacauero, a ocorrência e a atividade de determinadas espécies de formigas contribui para manter as populações dessas pragas em níveis economicamente aceitáveis.

### Agradecimentos

À UNEB, CEPLAC e UFV pelas condições de execução do projeto. Ao José Raimundo Maia dos Santos, José Crispim Soares do Carmo e estagiários do laboratório pelo apoio em campo. Ao Ivan Cardoso do Nascimento e Alexandre Arnhold pela revisão de uma versão anterior do manuscrito. A UNEB pela bolsa de doutorado PAC/UNEB a ESC. Ao CNPq pela bolsa de produtividade a JHCD.

### Literatura Citada

- ABREU, J. M. et al. 1989. Manejo de pragas do cacauero. Ilhéus, BA, CEPLAC/CEPEC. 32p.
- ABREU, J. M.; DELABIE, J. H. C. 1986. Controle das formigas cortadeiras em plantio de cacau. *Revista Theobroma (Brasil)* 16(4):199-211.
- ALGER, K.; CALDAS, M. 1996. Cacau na Bahia. *Ciência Hoje (Brasil)* 117(20):28-35.
- ANDERSEN, A. N. 1997. Functional groups and patterns of organization in North American ant communities: a comparison with Australia. *Journal of Biogeography* 24(4):433-460.
- ARANGO, H.G. 2012. Bioestatística teórica e computacional. Rio de Janeiro, RJ, Guanabara Koogan. 438p.
- ARMBRECHT, I. et al. 2001. An ant mosaic in the Colombian rain forest of Chocó (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 37(38):491-509.
- BROWER, J. C.; KILE, K. M. 1988. Sedation of an original data matrix as applied to paleoecology. *Lethaia* 21:79-93.
- BRUNEAU DE MIRÉ, P. 1969. Une fourmi utilisée au Cameroun dans la lutte contre les mirides du cacaoyer: *Wasmannia auropunctata* Roger. *Café Cacao Thé* 13(3):209-212.
- CONCEIÇÃO, E. S. et al. 2015. Structural changes in arboreal ant assemblages (Hymenoptera: Formicidae) in an age sequence of cocoa plantations in the south-east of Bahia, Brazil. *Austral Entomology* 54:315-324.
- CONCEIÇÃO, E. S. et al. 2009. Atividade de formigas nas inflorescências do coqueiro no sudeste baiano, com enfoque sobre o período entre a antese e a formação de fruto. *Agrotropica (Brasil)* 21(2):113-122.
- DELABIE, J. H. C. 1988. Ocorrência de *Wasmannia auropunctata* (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae) em cacauais na Bahia. *Revista Theobroma (Brasil)* 18(1):29-37.
- DELABIE, J. H. C. 1990. The ant problems of cocoa farms in Brazil. In: Vander Meer, R. K.; Jaffe, K.; Cedeño A. *Applied Myrmecology: A World Perspective*. Colorado, Westview Press. pp.555-569.
- DELABIE, J. H. C. 1999. Aspectos da mirmecofagia na Região Neotropical. *Naturalia* 24 (n.esp.): 225-231.
- DELABIE, J. H. C. 2001. Trophobiosis between Formicidae and Hemiptera (Stenorrhyncha and Auchenorrhyncha): an overview. *Neotropical Entomology* 30 (4):501-516.
- DELABIE, J. H. C.; ENCARNÇÃO, A. M. V.; CAZORLA, I. M. 1993. Impact d'une fourmilière d'*Atta cephalotes* (L.) (Formicidae; Myrmicinae; Attini) sur une cacaoyère en formation. *Actes des Colloques Insectes Sociaux* 8:63-70.
- DELABIE, J. H. C. et al. 2007. Contribution of cocoa plantations to the conservation of native ants (Insecta: Hymenoptera: Formicidae) with a special emphasis on the Atlantic Forest fauna of southern Bahia, Brazil. *Biodiversity and Conservation* 16:2359-2384.
- DELABIE, J. H. C.; MARIANO, C. S. F. 2000. Papel das formigas (Insecta: Hymenoptera: Formicidae) no controle biológico natural das pragas do cacauero na Bahia: síntese e limitações. In: *International Cocoa Research Conference*, 13. Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. *Proceedings*.

- Lagos Nigéria, Cocoa Producer's Alliance. pp.2359-2384.
- DJIETO-LORDON, C.; DEJEAN, A. 1999. Tropical arboreal ant mosaics: innate attraction and imprinting determine nest site selection in dominant ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 45(3):219-225.
- FERRONATTO, E. M. O. 1999. Fluctuation in the abundance of immature forms and imagoes of Eumolpinae (Coleoptera: Chrysomelidae) in *Theobroma cacao* (Sterculiaceae) in the south of Bahia, Brazil. In: Cox, M. L. *Advances in Chrysomelidae Biology*, 1 ed. Leiden: Backhuys Publishers. pp.271-297.
- FINNEGAN, R. J. 1971. An appraisal of indigenous ants as limiting agents of forest pests in Quebec. *Canadian Entomologist* 103:1489-1493.
- FOURNIER, L. A. 1974. Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. *Turrialba (Costa Rica)* 24:422-423.
- GALLO, D. et al. 2002. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba, SP, FEALQ. 920p.
- HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P. D. 2001. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4(1):1-9.
- HORA, R. R. et al. 2005. Facultative polygyny in *Ectatomma tuberculatum* (Formicidae, Ectatomminae). *Insectes Sociaux* 52:194-200.
- JOLIVET, P. 1996. *Ants and Plants: an Example of Coevolution*. Paris, Société nouvelle des éditions Boubée. 254p.
- KENNE, M.; CORBARA, B.; DEJEAN, A. 1999. Impact des fourmis sur les plantes cultivées en milieu tropical. *Année Biologique* 38(3-4):195-212.
- KERGUNTEUIL, A.; BASSO, C.; PINTUREAU, B. 2013. Impact of two ant species on egg parasitoids released as part of a biological control program. *Journal of Insect Science* 13(106):1-8.
- KHOO, K. C.; CHUNG, G. F. 1989. Use of the black cocoa ant to control mirid damage in cocoa. *The Planter* 65:370-383.
- KÖPPEN, W. 1936. Das Geographisches System der Klimate. In: W. Köppen, W. Geiger (eds.), *Handbuch der Klimatologie (Kapitel 3 V.1)*. Berlin: Teil. C. Ebr. Bornträger.
- LESTON, D. 1970. Entomology of the cocoa farm. *Annual Review Entomology* 15:273-294.
- LESTON, D. 1978. A Neotropical ant mosaic. *Annals of Entomological Society of America* 71(4):649-653.
- LESTON, D. 1973. The ant mosaic-tropical tree crops and the limiting of pests and diseases. *Pest Articles and News Summaries* 19:311-341.
- MAJER, J. D. 1972. The ant mosaic in Ghana cocoa farms. *Bulletin of Entomological Research* 62: 151-60.
- MAJER, J. D. 1976a. The influence of ants and ant manipulation on the cocoa farm fauna. *Journal Applied Ecology* 13:157-175.
- MAJER, J. D. 1976b. The ant mosaic in Ghana cocoa farms: further structural considerations. *Journal Applied Ecology* 13:145-155.
- MAJER, J. D. 1986. Utilizing economically beneficial ants. In: Vinson. *Economic Impact and Control of Social Insects*. New York, Praeger Press. pp.314-331.
- MAJER, J. D.; DELABIE, J. H. C. 1993. An evaluation of Brazilian cocoa farm ants as potential biological control agents. *Journal of Plant Protection in the Tropics* 10(1):43-49.
- MAJER, J. D.; DELABIE, J. H. C.; SMITH M. R. B. 1994. Arboreal ant community patterns in Brazilian cocoa farms. *Biotropica* 26(1):73-83.
- MARQUIS, R. J. 1992. Selective impact of herbivores. In: Fritz, R.S.; Simms, E. L. *Plant Resistance to Herbivores and Pathogens: Ecology, Evolution, and Genetics*. Chicago, University of Chicago Press. pp.301-325.
- MEDEIROS, M. A. 1992. *Ecologia e comportamento de Azteca chartifex spiriti* Forel (Formicidae: Dolichoderinae) e sua perspectiva como agente de controle biológico natural de pragas de cacauzeiros em Ilhéus - Bahia. *Dissertação de Mestrado*. Rio Claro, São Paulo, UNESP. 97p.

- MEDEIROS, M. A.; FOWLER, H. G.; DELABIE, J. H. C. 1995. O mosaico de formigas (Hymenoptera: Formicidae) em cacauais do sul da Bahia. *Científica (Brasil)* 23(2):291-300.
- MEDEIROS, M. A.; FOWLER, H. G.; DELABIE, J.H.C. 1999. Formiga ataca pragas de cacau. *Ciência Hoje* 26(152):59-61.
- MELE, P. V. 2008. A historical review of research on the weaver ant *Oecophylla* in biological control. *Agricultural and Forest Entomology* 10:13-22.
- MODY, K.; LINSSENMAIR, K. E. 2004. Plant-attracted ants affect arthropod community structure but not necessary herbivory. *Ecological Entomology* 29:217-225.
- MORRIS, J. R.; VANDERMEER, J.; PERFECTO, I. 2015. A keystone ant species provides robust biological control of the coffee berry borer under varying pest densities. *PLoS ONE* 10(11):1-15.
- MOURA, J. I. L.; MARIAU, D.; DELABIE, J. H. C. 1994. Stratégie de lutte contre *Amerrihinus ynca* Sahlb, 1823 (Coleoptera, Curculionidae) foreur du rachis foliaire du cocotier (*Cocos nucifera* L.) au Brésil. *Oléagineux Corps Gras Lipides* 49:221-226.
- NAVARRETE, B.; MCAUSLANE, H.; DEYRUP, M.; PEÑA, J. E. 2013. Ants Hymenoptera: Formicidae) associated with *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and their role in its biological control. *Florida Entomologist* 96(2):590-597.
- OVERALL, W. L.; POSEY, D. A. 1988. Uso de formigas *Azteca* spp. para controle biológico de pragas agrícolas entre os índios Kayapós do Brasil. In: *International Congress of Ethnobiology. Proceedings*. Belém, UFPA. pp.218-225.
- PARYS, K. A.; JOHNSON, S. J. 2012. Impact of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae), on biological control of *Salvinia minima* (Hydropteridales: Salviniaceae) by *Cyrtobagous salviniae* (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomologist* 95(1):136-142.
- PAVAN, M.; CEBALLOS, P. 1979. Comptes rendus de la réunion des groupes de travail *Formica rufa* et "Vertébrés Prédateurs des Insectes" de l'OILB (Varenna, Italie, 1978). *Bulletin Srop* II-3. 514p.
- PERFECTO, I.; CASTIÑEIRAS, A. 1998. Deployment of the predaceous ants and their conservation in agroecosystems. In: Barbosa, P. *Perspectives on the Conservation of Natural Enemies of Pest Species*. San Diego, Academic Press. pp.269-289.
- PERFECTO, I. 1991. Ants (Hymenoptera: Formicidae) as natural control agents of pests in irrigated maize in Nicaragua. *Journal of Economic Entomology* 84(1):65-70.
- RISCH, S. J.; CARROL, C. R. 1982. The ecological role of ants in two Mexican agroecosystems. *Oecologia* 55(1):114-119.
- SANTANA, S. O. et al. 2003. Zoneamento Agroecológico do Município de Ilhéus, Bahia, Brasil, Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. Ilhéus: Boletim Técnico n.186. 144p.
- WAY, M. J.; BOLTON, B. 1997. Competition between ants for coconut palm nesting sites. *Journal of Natural History* 31:439-455.
- WAY, M. J.; KHOO, K. C. 1992. Role of ants in pest management. *Annual Review of Entomology* 37(1):479-503.





## INFLUÊNCIA DE MEIOS DE CULTURA, FOTOPERÍODO E pH NO CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE *Phytophthora nicotianae*

**Antônio Alves Pimenta Neto<sup>1,2</sup>, Edna Dora Martins Newman Luz<sup>2</sup>, Gláucio Dias Gonçalves<sup>3</sup>,  
Sônia Maria Alves de Oliveira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia (PPGF)/ Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil, pimenta\_dm@yahoo.com.br, s.oliveira@depa.ufrpe.br; <sup>2</sup>Centro de Pesquisas do Cacau (Cepec)/Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (Ceplac), Rod. Ilhéus-Itabuna, km 22, 45662-000, Ilhéus, BA, Brasil, ednadora@yahoo.com.br; <sup>3</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rod. Ilhéus/Itabuna, km 16, 45662-900, Ilhéus, BA, Brasil, glauciogdg@yahoo.com.br.

O comportamento de dois isolados *Phytophthora nicotianae* foi avaliado em meios de cultura agarizados e líquidos de cenoura (c), tomate (t), berinjela (b), feijão (f), soja (s), mandioca (m) e suco de vegetais (V8), submetidos à luz (L), escuro (E) e fotoperíodo de 12h (LE), à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . O pH inicial dos meios e após ajuste para 4,8 foi correlacionado com o crescimento e esporulação nos meios líquidos. Foi avaliada a evolução radial diária do micélio e a biomassa produzida após 10 e 15 dias de incubação. A esporulação foi ponderada no 10º e 15º dia em câmara de Neubauer. Nos meios agarizados, (E) proporcionou os maiores crescimentos, entretanto em todos os regimes de luz os meios se diferenciaram, destacando-se dos demais os de (m), (b), (t), e (V8) os dois primeiros com os maiores crescimentos e os dois últimos com os menores. Os regimes de luz não influenciaram o crescimento nos meios líquidos com 10 dias de incubação. Já com 15 dias, o crescimento nos meios (b) (c) (t) e (V8) foi inversamente proporcional à presença de luz, que é um fator essencial para a esporulação. Verificou-se que meios mais ácidos proporcionam um menor crescimento, mas uma maior esporulação para *P. nicotianae*.

**Palavras-chave:** oomicetos, zoosporogênese, comportamento fisiológico.

**Influence of culture media, photoperiod and pH on growth and sporulation of *Phytophthora nicotianae*.** The behavior of two *Phytophthora nicotianae* isolates was evaluated in agar and liquid culture media of carrot (c), tomato (t), eggplant (b), soybean (s), cassava (m) and vegetable juice (V8), submitted to light (L), dark (E) and photoperiod of 12h (LE) at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . The initial pH of the media and after adjustment to 4.8 was correlated with growth and sporulation in the liquid media. The daily radial evolution of mycelium and biomass produced after 10 and 15 days of incubation were evaluated. Sporulation was weighted on the 10th and 15th day in Neubauer chamber. In the agar media, (E) provided the highest growth, however in all light regimes the media differed, standing out from the others were the ones of (m), (b), (t), and (V8). The first two with the highest growths and the last two with the lowest. Light regimes did not influence growth in liquid media with 10 days of incubation. At 15 days, growth in media (b) (c) (t) and (V8) was inversely proportional to the presence of light, but light is an essential factor for sporulation. It has been found that more acidic media provide lower growth, but greater sporulation for *P. nicotianae*.

**Key words:** oomycetes, zoosporogenesis, physiological behavior.

## Introdução

Dentre os fitopatógenos habitantes do solo, um grupo em especial possui merecido destaque em razão do seu efeito destrutivo em plantas hospedeiras, caráter polífago e cosmopolita. Espécies de *Phytophthora* podem estar associadas a diversos órgãos vegetais como folhas, troncos, hastes, almofadas florais, frutos em qualquer estágio de amadurecimento, e principalmente a raízes, ocasionando sintomas típicos de podridões radiculares e tombamento (Luz et al., 2001).

No Brasil, *Phytophthora nicotianae* Breda de Hann é relatada como a espécie do gênero que possui a maior gama de hospedeiros, sendo patogênica a mais de 31 espécies vegetais (Luz, 2006), incluindo plantas aromáticas, ornamentais, medicinais, espécies florestais, e cultivos agrícolas perenes e anuais de grande importância econômica. Apesar desta espécie estar associada a inúmeras plantas incitando doenças, a dificuldade em conseguir isolados esporulantes, ou mesmo padronizar condições ideais para a esporulação, é um dos principais problemas para o estudo da patogênese a estes hospedeiros.

A esporulação é um processo de diferenciação mais específico, no qual, estão envolvidas as células reprodutivas afetadas por modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (Griffin, 1993). A luminosidade exerce efeito direto sobre a célula fúngica, induzindo ou inibindo a formação de estruturas de reprodução, embora haja algumas espécies que são indiferentes à quantidade e/ou qualidade da luz (Hawker, 1957). A maioria dos fungos sensíveis à luz esporula quando expostos à luz contínua, mas alguns, chamados de esporuladores diurnos, requerem a alternância de luminosidade (Dhingra; Sinclair, 1995). A necessidade de luz para o crescimento e esporulação de fungos é tão variável, que pode ocorrer até mesmo entre isolados da mesma espécie (Masangkay et al., 2000). Alguns esporulam melhor na presença de luz contínua ou em escuro contínuo (Cooperman; Jenkins, 1986).

Assim como a qualidade e intensidade luminosa (Pulz; Massola Jr., 2009), a composição do meio de cultura e a temperatura determinam a quantidade e qualidade do crescimento micelial e esporulação dos fitopatógenos (Dhingra; Sinclair, 1995).

Esporângios e zoósporos são as principais estruturas responsáveis pela disseminação, infecção e desenvolvimento das doenças causadas por *Phytophthora* (Luz; Matsuoka, 2001), entretanto a obtenção dessas estruturas nem sempre é alcançada nos meios de cultura convencionais (Abdanur et al., 2003).

Os fungos e os oomicotas requerem uma variedade de elementos químicos para se desenvolverem, portanto para o cultivo em laboratório, é necessário que os meios de cultura simulem ou até mesmo melhorem as condições naturais (Pelczar et al., 1996). Vários meios de cultura foram desenvolvidos para atender as exigências nutricionais das diferentes espécies de fungos encontrados na natureza, podendo ser sintéticos, semissintéticos ou naturais (Menezes; Assis, 2004).

Estudos visando testar meios e métodos de produção de esporângios e liberação dos zoósporos “*in vitro*”, incluindo a ação de outros fatores fisiológicos, contribuirão para facilitar os testes de patogenicidade com *P. nicotianae*, tornando-os mais apropriados à realidade do campo, bem como aqueles que visam o controle da doença. Com estas perspectivas, o objetivo do presente estudo foi fornecer informações sobre os efeitos de diferentes meios de cultura, luminosidade, e pH no crescimento micelial, e padrões de esporulação de isolados de *P. nicotianae*.

## Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de *Phytophthora* do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), da Comissão Executiva da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), Ilhéus, Bahia, Brasil.

### Obtenção dos isolados

Foram utilizados dois isolados de *P. nicotianae* (1365 e 1405) obtidos de tecido vegetal infectado e solos cultivados com hospedeiros, pertencentes a Coleção Brasileira de *Phytophthora* “Arnaldo Gomes Medeiros” (CEPEC-CEPLAC). Para a obtenção de culturas novas e patogenicamente viáveis, os isolados foram inoculados em frutos de berinjela (*Solanum melongena* L.) e reisolados segundo metodologia de Luz et al. (2008).

### Influência de diferentes meios de cultura

Sete diferentes substratos foram escolhidos para a composição dos meios de cultura com base na literatura existente e/ou suscetibilidade da espécie vegetal a *P. nicotianae*: sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (f), sementes de soja (*Glycine max* L.) (s), frutos de berinjela (b) e de tomate (t), raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (m) além de suco de vegetais - V8 (Campbell Soup Company) (V8), e raízes de cenoura (*Daucus carota* L.) (c). A exceção do V8, os substratos foram submetidos à fervura por 15min em microondas com água destilada, triturados em liquidificador e filtrados em quatro camadas de gase, de modo a obter meios líquidos (200 g do substrato; 800 mL de água destilada) e meios agarizados (200 g do substrato; 800 mL de água destilada; 14 g de ágar). Após o preparo, os meios foram autoclavados a 121°C por 20 minutos e vertidos assepticamente em placas de Petri. Discos de 0,9 mm de diâmetro foram retirados dos bordos das colônias dos isolados, cultivados por sete dias em cenoura-ágar (CA), e transferidos para o centro de placas de Petri com os meios supracitados.

### Influência do fotoperíodo

Os isolados cresceram sob três condições de luminosidade: luz constante (L), fotoperíodo de 12h (LE), e ausência de luz (E). Na iluminação contínua, três lâmpadas fluorescentes (General Electric, 40 Watts, luz do dia), foram posicionadas a cerca de 50 cm acima das placas (2000 lux), expondo-as aos raios luminosos. No regime de alternância luminosa, as placas foram incubadas em BOD com temperaturas ajustadas para 25°C e 12h de fotoperíodo. A ausência de iluminação foi obtida pelo acondicionamento das placas em caixas plásticas foscas. O ensaio foi conduzido em ambiente do laboratório, com temperatura mantida em 25±2°C e monitorada com aparelhos data logger HOBO®.

### Avaliação do crescimento e esporulação

O crescimento radial das colônias formadas em meios agarizados foi avaliado diariamente com paquímetro, em dois sentidos diametralmente opostos das colônias para a obtenção da média, e cálculo da

taxa de crescimento ao longo de seis dias. Em meios líquidos, avaliou-se o peso seco da biomassa produzida após 10 e 15 dias de incubação, com cinco repetições/tratamento. A esporulação nos diferentes meios, líquidos e agarizados, foi avaliada aos 10 e 15 dias de incubação, quantificando os zoósporos em câmara de Neubauer em cinco repetições por tratamento. Nos meios líquidos, após o 9º e o 14º dia de incubação, foi escorrido o excesso dos meios de cultura, o micélio lavado com água destilada esterilizada (ADE) e incubado novamente sob as mesmas condições que se encontrava por 24h. A obtenção da suspensão de zoósporos, seja nos meios líquidos ou sólidos seguiu metodologia proposta por Luz et al. (2008).

### Influência do pH

Após a confecção dos meios de cultura foi aferido o pH inicial, e os valores correlacionados com o crescimento e esporulação. A influência do pH na esporulação também foi avaliada através do número de zoósporos produzidos após submissão da massa micelial formada nos diferentes meios líquidos ao 14º dia, em soluções salinas (NaCl e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) com pH ajustado para 4,8, por 48h. Os valores de pH foram aferidos a partir de amostras de 15 mL de cada meio de cultura, com potenciômetro previamente calibrado por soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

### Análises dos dados

O comportamento dos dois isolados de *P. nicotianae* foi avaliado após 10 e 15 dias de incubação através de esquema fatorial 7x3 (meios de cultura x luminosidade), totalizando 21 tratamentos com 5 repetições cada. O crescimento micelial nos meios sólidos foi mensurado até a maioria das colônias atingirem os bordos das placas (seis dias de cultivo). Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. O crescimento micelial, taxas de crescimento em meios agarizados, e biomassa e esporulação após transformação ( $\sqrt{x+1}$ ) foram submetidas à análise de variância pelo teste F ( $p = 0,01$ ), e comparadas pelo teste de Tukey ( $p = 0,05$ ). A biomassa e a esporulação produzida pelos isolados ao 15º dia de incubação foram correlacionadas, através do coeficiente de Pearson. As análises foram

realizadas utilizando a versão 9 do software SAS® - Statistical Analysis System (SAS, 2004).

## Resultados e Discussão

Os isolados 1365 e 1405 se comportaram de forma análoga, não diferindo significativamente ao apresentar crescimento vegetativo semelhante nos diferentes meios agarizados ou líquidos, permitindo que fosse usada a média de crescimento dos dois isolados para avaliação do efeito dos meios e regimes de luminosidade.

Houve efeito do regime de luminosidade no crescimento dos isolados em diferentes meios de cultura. No geral, a exceção dos meios de cenoura e mandioca, a ausência da luz (E) durante todo o tempo de cultivo e alternância luminosa de 12h (L/E) proporcionou uma rápida evolução do diâmetro médio das colônias comparado aos tratamentos com luz constante (E) (Tabela 1). Destacaram-se os grupos formados pelos meios a base de mandioca (m) e berinjela (b), e tomate (t) e suco de vegetais (V8), evidenciando sempre os maiores crescimentos nos dois primeiros e, nos dois últimos, os menores. Apesar da menor taxa de crescimento micelial entre o terceiro e o sexto dia de incubação, ter sido evidenciada em (m), este meio induziu a formação das maiores colônias em todas as condições. Os regimes de luz pouco influenciaram o crescimento dos isolados no meio (s), não havendo diferenças significativas em relação às

variáveis analisadas. O efeito dos regimes de luz foi mais acentuado quando os isolados foram cultivados em (V8), manifestando-se desde os primeiros dias de avaliação do crescimento. A taxa de crescimento e o tamanho da colônia ao sexto dia de incubação demonstram a diferença na evolução das colônias nos regimes (LE), (E), (L), que proporcionaram, nestes meios, em ordem decrescente, os maiores crescimentos.

Comparando-se a biomassa seca produzida pelos isolados com 10 e 15 dias de cultivo, na maioria dos meios líquidos avaliados observa-se que não houve um aumento significativo da biomassa no intervalo de cinco dias de cultivo, sendo, portanto, apresentados somente os dados referentes à 15 dias de cultivo. Assim como nos meios agarizados, os meios e regimes de luz influenciaram significativamente o comportamento dos isolados. A presença de luz retardou o desenvolvimento das colônias na maioria dos meios, tendo como exceções o meio (m) por não haver diferença da biomassa produzida nos três regimes de luz, e (s) por proporcionar o maior desenvolvimento da colônia em alternância luminosa de 12h. A maior produção de biomassa ocorreu quando os isolados foram cultivados em (m), e as menores em (t) e (V8).

O meio de (m) influenciou positivamente o crescimento dos isolados testados, ao proporcionar os maiores crescimentos em todos os tratamentos, nos meios líquidos ou agarizados. Dentre os meios testados, (m) é o mais rico em carbono por ser composto

Tabela 1. Crescimento micelial de isolados (1365 e 1405) de *Phytophthora nicotianae* em diferentes meios de cultura, agarizados e líquidos, sob diferentes regimes de luz, à 25±2°C

| Meios <sup>1</sup> | Diâmetro médio da colônia                |                 |                |                       |         |         | Biomassa <sup>4</sup> (g) |            |           |
|--------------------|--|-----------------|----------------|-----------------------|---------|---------|---------------------------|------------|-----------|
|                    | TCM <sup>2</sup> (cm.dia <sup>-1</sup> ) |                 |                | CM6 <sup>3</sup> (cm) |         |         |                           |            |           |
|                    | E <sup>5</sup>                           | LE <sup>6</sup> | L <sup>7</sup> | E                     | LE      | L       | E                         | LE         | L         |
| B                  | 1,42 aA                                  | 1,32 aA         | 1,14 bB        | 9,49 aA               | 9,50 aA | 9,07 aB | 0,076 cdA                 | 0,041 dB   | 0,022 eC  |
| C                  | 1,15 cB                                  | 1,31 aA         | 1,34 aA        | 9,39 aA               | 9,47 aA | 8,87 aB | 0,134 cA                  | 0,100 cdB  | 0,104 cB  |
| F                  | 1,26 bA                                  | 1,24 aA         | 1,15 bB        | 9,00 bA               | 8,41 bB | 8,52 bB | 0,161 bA                  | 0,155 cbAB | 0,096 cdB |
| M                  | 0,87 dC                                  | 1,29 aA         | 1,16 bB        | 9,50 aA               | 9,48 aA | 9,18 aA | 0,397 aA                  | 0,386 aA   | 0,362 aA  |
| S                  | 1,09 cA                                  | 1,13 bA         | 1,03 bcA       | 7,95 cA               | 8,00 cA | 8,15 cA | 0,173 bB                  | 0,210 bA   | 0,165 bB  |
| T                  | 1,27 bA                                  | 1,30 aA         | 1,14 bB        | 7,84 cA               | 7,58 dA | 6,71 dB | 0,090 dA                  | 0,074 daB  | 0,042 deB |
| V8                 | 1,11 cB                                  | 1,29 aA         | 0,96 cC        | 7,20 dB               | 8,05 cA | 6,00 eC | 0,091 cA                  | 0,055 dB   | 0,047 deB |
| CV (%)             | 7,44                                     |                 |                | 6,02                  |         |         | 7,16                      |            |           |

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si de acordo com o teste Tukey (p = 0,05)<sup>1</sup>Meios - B = berinjela; C = cenoura; F = feijão caupi; M = mandioca; S = soja; T = tomate; V8 = suco de vegetais;

<sup>2</sup>TCM = taxa de crescimento micelial entre o terceiro e sexto dia de incubação; <sup>3</sup>CM6 = crescimento micelial ao sexto dia de cultivo;

<sup>4</sup>Biomassa = Biomassa seca com 15 dias de cultivo; <sup>5</sup>E = ausência de luz; <sup>6</sup>LE = fotoperíodo de 12h; <sup>7</sup>L = luz constante.



majoritariamente de amido. Várias fontes de carbono são utilizadas na suplementação de meios de cultivo para fungos, como frutose, maltose, sacarose, além da glucose ou dextrose, presente na composição do meio BDA (batata-dextrose-ágar), considerado um meio de rotina na maioria dos laboratórios de micologia.

A composição dos meios, bem como os regimes de luz, induz variações no micélio aéreo e nas colônias (Luz, 2006). Neste estudo, os meios mais ricos em carbono, em ausência de luz induziram a formação de um micélio aéreo denso e cotonoso.

Segundo Hohl (1983), as fontes de alimento têm uma profunda influência no crescimento, tanto na extensão linear ou no aumento da massa celular. Elas também determinam as chances de sobrevivência nas várias condições ambientais e formam a base para a reprodução e germinação dos esporos.

Quanto à esporulação, houve diferença significativa entre o comportamento dos dois isolados de *P. nicotianae* testados (ANOVA, Teste F  $p \geq 0,05$ ), sendo, portanto, apresentados separadamente os dados obtidos para cada um deles. A avaliação foi realizada aos 10 e 15 dias de crescimento nos diferentes meios levando em consideração apenas concentrações acima de  $10^4$  zoósporos/mL, sendo a concentração mínima de zoósporos utilizada nas metodologias de inoculação de *Phytophthora* spp. (Luz et al., 2008).

Aos 10 dias, os dois isolados apresentaram esporulação abaixo de  $10^4$  zoósporos/mL, na maioria dos meios líquidos avaliados, à exceção dos meios (V8)

e (t), que proporcionaram a esporulação máxima para o isolado 1365 de  $1,4 \times 10^4$  zoósporos/mL, e para o isolado 1405 de  $5,5$  (V8) e  $15,8 \times 10^4$  zoósporos/mL (t). Os regimes de luz influenciaram a esporulação apenas do isolado 1365, no meio (V8). Nos meios agarizados, também foram identificadas esporulações significativas somente nos meios (V8) e (t), havendo em (t), um decréscimo no número de zoósporos observados em relação à ausência de luz.

As maiores concentrações de zoósporos dos dois isolados foram observadas em culturas com 15 dias de incubação, sendo, portanto, apresentados somente os dados referentes a 15 dias de cultivo (Tabela 2). Os meios (b), (c), (t), e (V8) foram os únicos meios que proporcionaram esporulação nos três regimes de luminosidade para o isolado 1405. O meio (m), que proporcionou o maior crescimento, induziu esporulação do isolado 1365 apenas em (L/E) e do isolado 1405 em (L/E) e (L). Nos meios (f) e (s) não houve esporulação em nenhum regime de luz. As maiores concentrações de zoósporos foram proporcionadas pelo meio V8 em (E),  $1,7 \times 10^6$  (isolado 1365) e  $1,1 \times 10^6$  (isolado 1405).

Como a maioria dos meios apresentou baixa liberação de zoósporos em 10 dias de incubação, não foi possível correlacioná-la com a biomassa. As exceções foram os meios (V8) e (t), que proporcionaram a esporulação dos dois isolados em todas as condições avaliadas (Tabela 2). O isolado 1365 apresentou uma correlação negativa alta, quando

Tabela 2. Produção média de zoósporos ( $\times 10^4$ ) dos isolados 1365 e 1405 de *Phytophthora nicotianae* cultivados por 15 dias em diferentes meios de cultura líquidos e em três regimes de luz, à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$

| Meios <sup>1</sup> | Isolado/Fotoperíodo |                 |                |        |          |         |         |        |
|--------------------|---------------------|-----------------|----------------|--------|----------|---------|---------|--------|
|                    | 1365                |                 |                |        | 1405     |         |         |        |
|                    | E <sup>2</sup>      | LE <sup>3</sup> | L <sup>4</sup> | CV (%) | E        | LE      | L       | CV (%) |
| B                  | 0,4 bA              | 2,0 bcA         | 3,0 bA         | 17,36  | 20,8 bA  | 22,6 aA | 10,6 bA | 32,23  |
| C                  | - bC                | 2,4 bB          | 4,4 abA        | 9,59   | 1,0 cB   | 2,0 bAB | 3,6 bcA | 25,11  |
| F                  | - bA                | - cA            | - cA           | -      | - cA     | - bA    | - cA    | -      |
| M                  | - bB                | 1,6 bcA         | - cA           | 17,05  | - cB     | 4,2 bA  | 3,8 bcA | 24,31  |
| S                  | - bA                | - cA            | - cA           | -      | - cA     | - bA    | - cA    | -      |
| T                  | 5,2 bA              | 2,3 bA          | 4,0 abA        | 34,32  | 18,2 bA  | 12,4 bA | 24,6 aA | 33,30  |
| V8                 | 172,6 aA            | 10,6 aB         | 5,8 aB         | 18,78  | 114,2 aA | 19,2 aB | 7,6 bB  | 14,40  |
| CV (%)             | 28,87               | 21,17           | 11,41          |        | 32,62    | 26,08   | 25,62   |        |

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si de acordo com o teste Tukey ( $p = 0,05$ ). <sup>1</sup>Meios - B= berinjela; C= cenoura; F= feijão; M= mandioca; S= soja; T= tomate; V8= suco de vegetais; <sup>2</sup>E= ausência de luz; <sup>3</sup>LE= fotoperíodo de 12h; <sup>4</sup>L= luz constante.

cultivado no meio (V8), e incubado na ausência de luz por 10 dias, indicando que quanto menor a biomassa, maior a esporulação, no entanto, como houve um maior desenvolvimento da colônia do isolado 1405 nestas condições, a correlação foi positiva e fraca. No regime de luz (LE), a correlação existente entre o crescimento e a esporulação produzida pelo isolado 1365 foi ainda mais alta e significativa, mas esse resultado foi proporcionado pelo efeito inverso ao da situação anterior, devido a maior produção de biomassa e menor concentração de zoósporos. A correlação do isolado 1405 nestas condições também foi fraca. A presença de luz durante todo o tempo de cultivo proporcionou ao isolado 1365 uma baixa esporulação e crescimento, havendo assim correlação nula. O isolado 1405 esporulou mais nessas condições, mas teve um crescimento equivalente ao isolado 1365, gerando uma correlação negativa alta e significativa. No meio (t), mesmo sendo observada a presença de quantidades significativas de zoósporos, não houve alta correlação entre as variáveis biomassa e esporulação (Tabela 3).

Poucas correlações altas foram identificadas aos 15 dias de incubação. Na ausência de luz, a biomassa e o número de zoósporos produzidos pelo isolado 1405 evoluíram de forma inversamente proporcional nos meios (b) e (t), apresentando coeficientes de correlação de -0,845 e -0,936, respectivamente. A relação entre carbono e nitrogênio é muito importante para o crescimento e esporulação dos fungos; alta concentração de nitrogênio reprime a esporulação e está diretamente ligada a concentração de carbono (Elliot, 1949; Griffin, 1993). Desse modo, a adequação de composições de meios de cultivo é fundamental para que se obtenham quantidades satisfatórias de inóculo. A glicose geralmente é estimuladora da esporângiogenese nas concentrações até 0,5g/L. Acima desta concentração, a formação de esporângios é normalmente inibida (Tariq, 1990).

A concentração mínima de nutrientes que permite o crescimento micelial é, muitas vezes, insuficiente para induzir a produção de esporos, ou seja, geralmente

Tabela 3. Coeficientes de correlação linear de Pearson ( $r_{xy}$ ) e  $p$ -valor entre as variáveis esporulação e biomassa produzida por dois isolados de *Phytophthora nicotianae* (1365 e 1405) em diferentes meios de cultura e fotoperíodos e avaliados aos 10 e 15 dias, à 25±2°C

| Meios <sup>1</sup> | Fotoperíodo/dias de incubação <sup>2</sup> |       |                  |        |                 |        |                 |        |                  |        |                 |        |
|--------------------|--|-------|------------------|--------|-----------------|--------|-----------------|--------|------------------|--------|-----------------|--------|
|                    | E <sub>10</sub>                            |       | LE <sub>10</sub> |        | L <sub>10</sub> |        | E <sub>15</sub> |        | LE <sub>15</sub> |        | L <sub>15</sub> |        |
|                    | 1365                                       | 1405  | 1365             | 1405   | 1365            | 1405   | 1365            | 1405   | 1365             | 1405   | 1365            | 1405   |
| <b>B</b> $r_{xy}$  | -  | -     | -                | -      | 0,250           | -0,08  | -0,408          | -0,655 | 0,953            | -0,757 | 0,745           | 0,463  |
|                    | $p$ -valor                                 | -     | -                | -      | 0,685           | 0,898  | 0,495           | 0,229  | 0,012            | 0,138  | 0,148           | 0,431  |
| <b>C</b> $r_{xy}$  | -  | -     | -                | -      | 0,562           | 0,377  | -               | -0,845 | 0,612            | -0,102 | 0,230           | -0,007 |
|                    | $p$ -valor                                 | -     | -                | -      | 0,323           | 0,530  | -               | 0,071  | 0,272            | 0,869  | 0,708           | 0,906  |
| <b>F</b> $r_{xy}$  | -  | -     | -                | -      | -               | -      | -               | -      | -                | -      | -               | -      |
|                    | $p$ -valor                                 | -     | -                | -      | -               | -      | -               | -      | -                | -      | -               | -      |
| <b>M</b> $r_{xy}$  | -  | -     | -0,098           | -      | -0,379          | -0,893 | -               | -      | 0,268            | 0,597  | -               | 0,121  |
|                    | $p$ -valor                                 | -     | 0,874            | -      | 0,528           | 0,04   | -               | -      | 0,662            | 0,287  | -               | 0,845  |
| <b>S</b> $r_{xy}$  | -  | -     | -                | -      | -0,698          | -0,678 | -               | -      | -                | -      | -               | -      |
|                    | $p$ -valor                                 | -     | -                | -      | 0,189           | 0,208  | -               | -      | -                | -      | -               | -      |
| <b>T</b> $r_{xy}$  | 0,408                                      | 0,395 | 0,166            | -0,534 | 0,060           | -0,575 | 0,021           | -0,936 | -0,133           | 0,562  | -0,243          | -0,055 |
|                    | $p$ -valor                                 | 0,495 | 0,510            | 0,788  | 0,353           | 0,923  | 0,310           | 0,973  | 0,830            | 0,323  | 0,692           | -0,929 |
| <b>V8</b> $r_{xy}$ | -0,838                                     | 0,272 | -0,971           | 0,021  | 0,00            | -0,932 | -0,310          | 0,406  | 0,266            | -0,215 | -0,343          | 0,404  |
|                    | $p$ -valor                                 | 0,076 | 0,657            | 0,005  | 0,973           | 1,00   | 0,021           | -0,610 | 0,664            | 0,727  | 0,572           | 0,499  |

$p$ -valor - Prob > |r| under H0: Rho = 0<sup>1</sup> Meios - **B** = berinjela; **C** = cenoura; **F** = feijão; **M** = mandioca; **S** = soja; **T** = tomate; **V8** = suco de vegetais<sup>2</sup> Fotoperíodo/dias de incubação - **E**<sub>10</sub> = ausência de luz em 10 dias de incubação; **LE**<sub>10</sub> = alternância luminosa de 12h em 10 dias de incubação; **L**<sub>10</sub> = luz constante; **E**<sub>15</sub> = ausência de luz em 15 dias de incubação; **LE**<sub>15</sub> = alternância luminosa de 12h em 15 dias de incubação; **L**<sub>15</sub> = luz constante em 15 dias de incubação.

a condição nutricional ótima para o crescimento micelial não é necessariamente a melhor para produção de esporos e frequentemente inibe a reprodução (Véras, et al., 1997). Isto foi observado em relação aos meios (m) e (b), e ao meio (V8) neste trabalho.

A interferência negativa de certos componentes, incluindo a glicose e vários aminoácidos como a leucina, valina e asparagina foram relatadas por Leal et al. (1966) e Leal e Gomez-Miranda (1967). A inibição do crescimento e da reprodução sexual foi atribuída a acumulação de ácidos orgânicos no meio e a produção de níveis tóxicos de amônia.

Segundo Nozaki et al. (2004), nem sempre as condições que favorecem o crescimento do fungo são as mesmas para esporulação. Sabe-se ainda que, alguns meios de cultura são mais favoráveis para a esporulação de fungos que outros. Os meios a base de tomate (V8 e suco de tomate) proporcionaram o menor desenvolvimento das colônias, entretanto induziram a formação de esporângios, obtendo consequentemente as maiores concentrações de zoósporos dos isolados testados quando cultivados nestes substratos. Os vegetais que compõem tais meios possuem alto valor nutricional, por isso são citados por diversos autores como capazes de induzir a reprodução de muitos fungos “mitospóricos” (Queiroz et al., 2004; Brunelli et al., 2006; Dias Neto et al., 2010) e oomicetos (Guo; Ko, 1993; Luz et al., 2008). Existem variações na composição de meios formados a partir do (V8), com diferentes porcentagens destes componentes, bem como adição de  $\text{CaCO}_3$ , esteróis e vitaminas (Menezes; Assis, 2004). Este é um meio de cultura muito utilizado para o cultivo de *Phytophthora* spp. (Luz et al., 2008).

Para Ribeiro (1983), a esporulação é um processo complexo que envolve o potencial hídrico; nutrientes; esteróis; aeração; luz; temperatura; cátions como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ ; a idade da cultura; exudatos radiculares; e extratos de solo, com importância destes fatores variando entre espécies e isolados da mesma espécie de *Phytophthora*.

Segundo Caldwell (1998), algumas moléculas biológicas essenciais podem ser degradadas por radiações, que são fortemente absorvidas pelas células e ocasionam uma variedade de fotoprodutos incompatíveis com a função celular. Na maioria dos meios avaliados, a presença de luz foi inversamente proporcional ao crescimento vegetativo, sendo, no

entanto, fator importante para a esporulação em meios a base de cenoura e mandioca. A exceção foi o meio (V8), que mesmo tendo inibido o crescimento dos patógenos em presença de luz, proporcionou as maiores concentrações de zoósporos quando cultivados em (E).

A literatura tem revelado que existe uma grande variação em relação ao efeito da luz sobre o crescimento e esporulação de *Phytophthora* spp., bem como entre isolados da mesma espécie. Alguns autores utilizam metodologias para esporulação de *P. nicotianae*, onde os isolados são cultivados na ausência de luz (Santos et al., 2004; Taylor; Pasche, 2008), outros sob luz constante (Widmer et al., 1998; Lamour et al., 2003). A ausência de luz para indução da esporulação já foi relatada para diversos fungos fitopatogênicos como *Alternaria brassicae* (Rotem et al., 1989), *Alternaria solani* (Lukens, 1963) e *Mycosphaerella fijensis* (Hanada et al., 2002).

Algumas espécies de *Phytophthora* possuem uma boa esporulação em meios sólidos quando submetidas a estímulos, já outras apresentam baixa produção de esporângios quando cultivadas nestes meios, demonstrando a influência de líquidos na produção de esporângios de várias espécies (Zentmyer e Erwin, 1970; Ribeiro, 1983). As maiores esporulações foram identificadas quando os isolados foram cultivados em meios líquidos, apesar de haver concentrações acima de  $10^4$  zoósporos/mL do isolado 1405 nos meios sólidos de (c), (b), (t) e (V8).

As baixas concentrações de zoósporos obtidas através do cultivo em meios sólidos são decorrentes da aeração, um fator que influencia significativamente a formação de esporângios. A espécie *P. nicotianae* raramente produz esporângios em micélio submerso, provavelmente devida à falta de oxigênio. Mesmo quando há a produção de esporângios nestas condições, a liberação e obtenção de suspensões de zoósporos também são dificultadas pela caducidade dos esporângios (Ribeiro, 1983).

Outro fator que influenciou a esporulação foi a idade da cultura. Em todos os meios analisados, as maiores concentrações de zoósporos foram obtidas após 15 dias de incubação. A formação de esporângios decresce com o tempo de cultivo em condições axênicas (Ayers; Zentmyer, 1971), entretanto, há variações nos tempos de cultivo ideais para a

esporulação até mesmo dentre isolados da mesma espécie. *Phytophthora nicotianae* possui esporulação tardia em comparação com espécies como *P. palmivora* que produz esporângios em abundância ao 5º dia de incubação. Isto pode ser atribuído a não caducidade dos esporângios de *P. nicotianae*, que algumas vezes se formam intercaladamente no micélio.

Os meios que induziram a formação das menores colônias possuíam pH inicial mais ácidos, entretanto os maiores crescimentos foram verificados em meios mais próximos da neutralidade. A concentração de  $H^+$  nos meios testados também influenciou a esporulação, sendo observado que a acidez induziu a maior produção de zoósporos. Este fator de indução foi corroborado quando os isolados após cultivo nos meios anteriormente testados foram imersos em soluções salinas com pH 4,8 e mantidos nestas condições por 24h, verificando-se produção de zoósporos em todos os meios. A quantidade de zoósporos obtida através da imersão da massa micelial nos diferentes sais não diferiu significativamente.

O pH dos meios de cultivo testados correlacionou-se de forma positiva em relação a esporulação e negativamente em relação ao crescimento, corroborando a necessidade de fatores injuriantes ou estimulantes para a esporulação em grande parte dos fungos fitopatogênicos (Pulz; Massola Jr., 2009). Assim como a luz, o pH ótimo para a formação de esporângios é muito variável até mesmo entre isolados da mesma espécie (Ribeiro, 1983).

Devido o requerimento nutricional de *Phytophthora* spp., alguns trabalhos aliam a adição de sais como  $KNO_3$  (Santos et al., 2004), com o ajuste do pH dos meios. Os meios (f) e (s), que possuem pH inicial de 6,10 e 6,27 respectivamente, apesar de induzirem os maiores crescimentos, não proporcionaram a formação de esporângios. Entretanto, quando a massa micelial formada nestes meios foi transferida para soluções com pH ácido, 24h nestas condições foi suficiente para produzir as maiores concentrações de zoósporos. Estes resultados indicam que dentre os fatores que induzem maior esporulação de *P. nicotianae*, o pH pode ter grande influência.

Os resultados deste estudo permitem corroborar a influência estimuladora de líquidos, dos requerimentos nutricionais, da luminosidade, do pH e idade da cultura na produção de esporângios, e consequentemente na obtenção de altas

concentrações de suspensões de zoósporos de *P. nicotianae*. A combinação do meio líquido a base do suco de vegetais (V8), o qual possui pH ácido em torno de 4,7, a ausência de luz e culturas com idade a partir de 15 dias induziram a esporulação em isolados desta espécie. Apesar de proporcionarem uma menor produção de zoósporos em relação ao (V8), os meios obtidos de berinjela e tomate aparecem como alternativa, podendo futuramente ser testadas formulações através da união dos mesmos.

A deficiência de métodos padrões eficazes para a esporulação desta espécie, induz a utilização de metodologias de inoculação que não permitem a quantificação e qualificação dos propágulos infectivos, reunindo em discos de meio de cultura vários propágulos infectivos como o micélio (conjunto de hifas), clamidósporos (estrutura vegetativa de sobrevivência), esporângios (estruturas reprodutivas assexuais) e zoósporos (esporos assexuais móveis formados no interior dos esporângios). A partir destes resultados, novos estudos poderão ser norteados, na tentativa de se obter as concentrações de zoósporos de várias espécies de *Phytophthora* necessárias para testes de patogenicidade com *P. nicotianae*, tornando-os mais apropriados à realidade de cultivo no campo, bem como aqueles que visam o controle da doença.

### Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de estudo. À Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC, pela estrutura e recursos concedidos. Ao CNPq, pela concessão de recursos para a execução deste trabalho. A Lindolfo Pereira dos Santos Filho, pela colaboração nas análises estatísticas. Aos amigos do Laboratório de *Phytophthora* do CEPEC/CEPLAC, pelo convívio e ajuda nos experimentos.

### Literatura Citada

- ABDANUR, A.; SANTOS, A. F.; TRATCH, R. 2003. Crescimento micelial e esporulação de isolados de *Phytophthora* sp. patogênicos a Acácia-negra. Boletim de Pesquisa Florestal (Brasil) 47:33-42.



- AYERS, W. A.; ZENTMYER, G. A. 1971. Effect of soil solution and two soil on sporangium production by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 61:1188-1193.
- BRUNELLI, K. R. et al. 2006. Effect of culture media and light exposure on the sporulation of *Cercospora zeae-maydis*. *Summa Phytopathologica (Brasil)* 32:92-94.
- CALDWELL, M. M. et al. 1998. Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 46:40-52.
- COOPERMAN, C. J.; JENKINS, S. F. 1986. Conditions influencing growth sporulation of *Cercospora asparagi* and *Cercospora* blight development in Asparagus. *Phytopathology* 76:617-622.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. 1995. Basic plant pathology methods. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida, Lewis Publishers.
- DIAS NETO, J. J. et al. 2010. Hot spots for diversity of *Magnaporthe oryzae* physiological races in irrigated rice fields in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45:252-260.
- ELLIOTT, E. S. 1949. The effect of the sugar concentration on conidial size of some species of *Helminthosporium*. *Phytopathology* 39:953-958.
- GRIFFIN, D. H. 1993. *Fungal Physiology*. 2<sup>ed</sup>. New York, Wiley-Liss.
- GUO, L. Y.; KO, W. H. 1993. Two widely accessible media for growth and reproduction of *Phytophthora* and *Pythium* Species. *Applied and Environmental Microbiology* 59:2323-2325.
- HANADA, R. E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. 2002. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. *Fitopatologia Brasileira* 27:170-173.
- HAWKER, L. E. 1957. *The physiology of reproduction in fungi* Cambridge: Cambridge University Press.
- HOHL, H. R. 1983. Nutrition of *Phytophthora*. In: Erwin, D. C.; BartinickI-Garcia, S.; Tsao, P. H. eds. *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*, APS, Minnesota. pp. 41-54.
- LAMOUR, K. H. et al. 2003. Etiology of *Phytophthora drechsleri* and *P. nicotianae* (= *P. parasitica*) diseases affecting oriculture crops. *Plant Disease* 87:854-858.
- LEAL, J. A.; GOMEZ-MIRANDA, B. 1967. Effect of amino acids and organic acids on the sexual reproduction of species of *Phytophthora* and *Pythium*. *Transactions of the British Mycological Society* 50:77-84.
- LEAL, J. A.; GOMEZ-MIRANDA, B.; NICOLAS, G. 1966. Formation of toxic substances by fungi in the degradation of some amino acids. *Canadian Journal of Microbiology* 12:1073-1076.
- LUKENS, R. J. 1963. Photo-inhibition of sporulation in *Alternaria solani*. *American Journal of Botany* 50:721-724.
- LUZ, E. D. M. N. 2006. O gênero *Phytophthora* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 31:80-81.
- LUZ, E. D. M. N.; MATSUOKA, K. 2001. *Phytophthora*: fungo, protista ou chromista? In: Luz, E. D. M. N.; Santos, A. F. dos; Matsuoka, K.; Bezerra, J. L. eds. *Doenças causadas por Phytophthora no Brasil*. Campinas, SP, Livraria e Editora Rural. pp. 1-14.
- LUZ, E. D. M. N. et al. 2008. Glossário ilustrado de *Phytophthora*: técnicas especiais para o estudo de Oomicetos. Itabuna BA, FAPESB/CEPLAC 204 p.
- MASANGKAY, R. F. et al. 2000. Characterization of sporulation of *Alternaria alternata* f.sp. *sphenocleae* *Biocontrol Science and Technology* 10:385-397.
- MENEZES, M.; ASSIS, S. M. P. 2004. Guia prático para fungos fitopatogênicos. 2<sup>a</sup>. ed. Recife, PE. UFRPE. 106 p.
- NOZAKI, M. H.; CAMARGO, M.; BARRETO, M. 2004. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. *Fitopatologia Brasileira* 29:429-432.
- PELCZAR, M. J.; CHANG, E. C. S.; KRIEG, N. R. 1996. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2ed. São Paulo, SP. Makron Books. Vol.2.

- PULZ, P.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. 2009. Efeito de meios de cultura e fatores físicos no crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani*. *Summa Phytopathologica* 35:119-124.
- QUEIROZ, F. M.; BATISTA, U. G.; BROMMNSCHENKEL, S. H. 2004. Avaliação de meios de cultura no crescimento micelial e esporulação de *Alternaria brasiliensis*. *Fitopatologia Brasileira* 29:541-543.
- RIBEIRO, O. K. 1983. Physiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*. In: Erwin, D. C.; Bartnicki-Garcia, S.; Tsau, P. H. eds. *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*. Saint Paul, Minissota, American Phytopathological Society. pp.139-147.
- ROTEM, J.; BICKLE, W.; KRANZ, J. 1989. Effect on environment and host on sporulation of *Alternaria macrospora* in cotton. *Phytopathology* 79:263-266.
- SANTOS, A. F.; LUZ, E. D. M. N.; SOUZA, J. T. 2004. *Phytophthora boehmeriae* causando a gomose da acácia-negra no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 29:144.
- SAS INSTITUTE. 2004. SAS/STAT 9.1 user's guide. 1 ed. Sas Institute, Cary. 5136p.
- TARIQ, V. N. 1990. Factors influencing zoosporangia formation by *Phytophthora fragariae* *in vitro*. *Mycological Research* 94:205-210.
- TAYLOR, R. J.; PASCHE, J. S. 2008. A Foliar blight and tuber rot of potato caused by *Phytophthora nicotianae*: New occurrences and characterization of isolates. *Plant Disease* 92:492-503.
- VÉRAS, S. M.; GASPARROTO, L.; MENEZES, M. 1997. Variabilidade fisio-morfológica de *Colletotrichum guaranicola* em diferentes substratos. *Arquivos de Biologia e Tecnologia (Brasil)* 40:297-305.
- WIDMER, T. L.; GRAHAM, J. H.; MITCHELL, D. J. 1998. Histological comparasion of fibrous root infection of disease- tolerant and susceptible citrus hosts by *Phytophthora nicotianae* and *P. palmivora*. *Phytopathology* 88:389-395.
- ZENTMYER, G. A.; ERWIN, D. C. 1970. Development and reproduction of *Phytophthora*. *Phytopathology* 60:1120-1127.
-

## COLEÓPTEROS ASSOCIADOS A DENDEZEIROS E PIAÇAVEIRAS EM MUNICÍPIOS DA REGIÃO SUL DA BAHIA<sup>1</sup>

*Gildeir Braga de Souza Santos<sup>2</sup>, Elisângela Alves Santos Félix Melo<sup>2</sup>, Alexandre da Silva Lima<sup>2</sup>, Olivia Oliveira dos Santos<sup>3</sup> e Maria Aparecida Leão Bittencourt<sup>2\*</sup>*

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, Brasil, gilbrasou@yahoo.com.br, elis01agro@yahoo.com.br, alchandr@gmail.com, malbitte@uesc.br

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Goiás, Posse-GO, Brasil, olvagro@yahoo.com.br

\*Autor para correspondência

<sup>1</sup>Pesquisa financiada com recursos CNPq (406662/2013-4) e Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)

O objetivo deste estudo foi registrar a diversidade de coleópteros associados a plantios de dendzeiros e piaçaveiras na região Sul da Bahia, com enfoque na determinação de espécies pragas e predadoras. As atividades foram realizadas de junho/14 a setembro/15 em áreas de Una, Itacaré e Igrapiúna. Em campo, foram distribuídas armadilhas (n) do 'tipo PET', com toletes de cana-de-açúcar (atrativo alimentar) (n=8) e feromônio de agregação (RMD-1<sup>®</sup>) (n=2) que foram amarradas no estipe, entre 0,80 a 1,0m de altura do solo. Em laboratório, os insetos capturados foram mortos, contabilizados e armazenados (álcool 70%) até a identificação. Foram calculados os índices populacionais (abundância, constância, dominância e frequência) dos coleópteros capturados. Nas áreas de dendzeiros (Una e Igrapiúna) foi capturado maior número de coleópteros-pragas e de predadores em relação às áreas com piaçaveiras (Una e Itacaré). *Metamasius hemipterus* foi o curculionídeo com maior número de exemplares capturados nas duas culturas, seguido por *Rhynchophorus palmarum*, *Metamasius canalipes* e *Dynamis borassi*. Exemplares de *Pachymerus nucleorum* (Chrysomelidae), *Rhinostomus barbirostris* e *Paradiophorus crenatus* (Curculionidae), *Hoplopyga ocellata* e *H. liturata* (Cetoniidae), *Leucothyreus suturalis* (Melolonthidae), *Deltotilum* aff. *irroratum* (Scarabaeidae) também foram capturados. *Metamasius hemipterus* e *R. palmarum* foram as espécies que atingiram os índices máximos de dominância, abundância, frequência e constância em dendzeiros e piaçaveiras. Os predadores *Hololepta quadridentata* e *Omalodes foveola* (Histeridae) foram capturados nas áreas com dendzeiros e piaçaveiras, e atingiram os índices máximos de dominância, abundância, frequência nas áreas com dendzeiros.

**Palavras-chave:** Arecaceae, *Attalea funifera*, Curculionidae, *Elaeis guineensis*.

**Coleoptera associated with oil palm and Piaçaveiras in municipalities of the Southern Region of Bahia.** The aim of this study was to record of diversity of coleopteran associations between in oil palm and piassava palm crops in the Southern Region of Bahia State, with focus on the determination of pest and predator species. Field activities during the period of June/14 to September/15 in areas of the municipalities of Una Itacaré and Igrapiúna. 'PET type' traps (n) were placed, with sugarcane stalks (food attractiveness) (n=8) and pheromone (RMD-1<sup>®</sup>) (n=2) that were tied in the stipe, between 0.80 and 1.0m of height of the ground. In laboratory, the insects captured were died, counted and packed (70% ethanol), until identification. Population indexes (abundance, constancy, dominance and frequency) were calculated for the coleopteran captured. In oil palm crops (Una e Igrapiúna) were captured greater number of coleopteran-pests and predators in relation to piassava palm crops (Una e Itacaré). *Metamasius hemipterus* was the coleopteran with the highest number of specimens captured in the two cultures, followed by *Rhynchophorus palmarum*, *Metamasius canalipes* and *Dynamis borassi*. The coleopteran captured were *Pachymerus nucleorum* (Chrysomelidae), *Rhinostomus barbirostris* and *Paradiophorus crenatus* (Curculionidae), *Hoplopyga ocellata* and *H. liturata* (Cetoniidae), *Leucothyreus suturalis* (Melolonthidae), *Deltotilum* aff. *irroratum* (Scarabaeidae). *Metamasius hemipterus* and *R. palmarum* were the species to with the highest index of dominance, abundance, frequency, and constancy in both oil palm and piassava palm crops. The predators *Hololepta quadridentata* and *Omalodes foveola* (Histeridae) were captured in areas with oil palm and piassava palm crops, and reached the maximum indexes of dominance, abundance and frequency in areas with oil palm.

**Key words:** Arecaceae, *Attalea funifera*, Curculionidae, *Elaeis guineensis*.

## Introdução

Representantes da família Arecaceae, popularmente conhecidos como palmeiras, são produzidos comercialmente tanto para exploração agrícola como para o paisagismo (Lorenzi et al., 2010). Na região Sul da Bahia, as principais espécies que são exploradas pelo agronegócio são o coqueiro (*Cocos nucifera* L.), o dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), a pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth), a piaçaveira (*Attalea funifera* Mart.) e o açazeiro (*Euterpe oleraceae* Mart.), sendo que problemas fitossanitários como a alta incidência de insetos pragas, vêm sendo um dos fatores limitantes para a exploração de diversas palmeiras, causando perdas consideráveis na produtividade (Brazílio et al., 2012; Casali, 2012; Guimarães; Silva, 2012; Montoya et al., 2015).

Os coleópteros são os principais insetos associados às palmeiras, com destaque para *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Curculionidae), denominada comumente de broca-do-olho-do-coqueiro, considerado praga-chave em diversas regiões, pois se alimentam dos tecidos da planta, podendo o adulto ser vetor do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard causador da doença anel-vermelho (Magalhães et al., 2008; Molin; Barreto, 2012; Pinho et al., 2016; Ruiz et al., 2013; Sánchez-Soto; Nakano, 2002; Soliman et al., 2009; Torre et al., 2010; Yasuda, 2005), como também do fungo *Ceratocystis paradoxa* (Dade), causador da resinose (Costa-Carvalho et al., 2011). Além de areáceas, há registros da sua ocorrência em plantios de cana-de-açúcar, mamão, banana, e helicônias (Almeida et al., 2010; Batista Filho et al., 2002; Broglio et al., 2014; Rocha, 2012).

Espécies do gênero *Metamasius* Horn (Curculionidae) também são relatadas como pragas de importância econômica, sendo associadas às espécies de Arecaceae, Musaceae e Poaceae, no continente Americano e no Brasil (Arroyo-Oquendo et al., 2004; Fancelli et al. 2012; Zorzenon et al., 2000). Larvas e adultos de *Metamasius* foram observados causando danos e injúrias em plantas, como broqueamento do caule, a redução do perfilho e abertura de orifícios, que favorecem a entrada de fitopatógenos. *Metamasius hemipterus* (L.), denominada de broca-rajada, está associada à disseminação de nematoides em diversas culturas,

devido a sua mobilidade e distribuição, e na Venezuela, foi relatada como responsável pela dispersão do nematóide do anel-vermelho em plantações de dendezeiros (León-Brito et al., 2005). No Brasil, sua ocorrência já foi registrada em plantios de flores tropicais, bananeiras, coqueiros, palmito-juçara, pupunheira, entre outras (Fancelli et al., 2012; Molin; Barreto, 2012; Rocha, 2012; Zorzenon et al., 2000).

Os coleópteros da família Histeridae são insetos frequentemente encontrados em matéria orgânica em decomposição, mas tanto os adultos quanto as larvas são predadores de várias ordens de insetos sendo considerados generalistas. Estes aproveitam locais na planta onde já foram feitas galerias para se alimentar das larvas dos insetos presentes (Coletto-Silva; Freire, 2006; Leivas; Grossi; Almeida, 2013; Lopes et al., 2006; Triplehorn; Johnson, 2011). *Hololepta quadridentata* (Olivier) e *Omalodes foveola* Erichson (Histeridae) foram relatadas como predadoras de larvas do moleque-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus* Germar – Curculionidae) (Fancelli; Mesquita, 2000; Goitiá; Cerda, 1998), e de larvas de *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Curculionidae) que é praga de plantas da família Agavaceae na Europa (Lencina; Gallego, 2014). Exemplares de *Hololepta* foram capturados em áreas de bananeiras na Venezuela onde foram coletados exemplares da broca-rajada e da broca-do-olho-do-coqueiro (Vergara; Ramírez, 2000), em plantios de dendezeiro no Estado do Pará (Tinôco, 2008), e em plantio comercial de helicônias na região Sul da Bahia (Rocha, 2012).

O estudo sobre a entomofauna associada ao cultivo do dendezeiro e da piaçaveira torna-se importante para ampliar o conhecimento das pragas que afetam a produção, facilitando o manejo e uma maior eficiência no emprego de métodos de controle. O objetivo deste estudo foi registrar a diversidade de coleópteros associados a estas culturas, em municípios da região Sul da Bahia, com enfoque na determinação de espécies pragas e seus predadores.

## Material e Métodos

O estudo foi desenvolvido no período de junho de 2014 a setembro de 2015 em áreas de dendezeiros e piaçaveiras, localizadas nos municípios de Una [Faz. Guarujá - 15°14,5'S; 39°04'W; 60 m) e na Estação



Experimental Lemos Maia da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) – 15°16'S; 39°05'W; 58m]; em Igrapiúna (Sítio São Jorge - 13°50'S; 39°08'W; 41m) e (Fazenda Limeira – 13°52'S; 39°08'W; 22m) e em Itacaré (Fazenda São Miguel- 14°23'S; 39°03'W; 109m), região Sul da Bahia.

Na Estação Experimental da CEPLAC as armadilhas foram alocadas no banco de germoplasma de dendezeiros, com área de aproximadamente 16 ha, sendo também encontradas outras espécies de palmeiras próximas ao local. Também no município de Una, as armadilhas foram alocadas na Fazenda Guarujá que possui um total de 66 hectares, sendo 35 ha de piaçaveiras nativas e 31 ha com cultivos de pupunheiras, de coqueiros e mata nativa. No município de Igrapiúna, o estudo foi realizado em uma propriedade de cinco hectares (Fazenda Limeira) em plantio de dendezeiros e piaçaveira, que fica próxima a área de manguezal, e em outra propriedade (Sítio São Jorge), com cinco hectares, que é mais diversificada, com dendezeiros nativos, seringueiras, guaraná, cupuaçu, cacau, entre outras. No município de Itacaré (Fazenda São Miguel), as armadilhas foram alocadas em áreas de piaçaveiras nativas (60 anos) e de piaçaveiras cultivadas (20 anos). Com 800 hectares, a área está dividida em quadras, sendo que a maior parte é ocupada pelas piaçaveiras, sendo que também há cacaueiros, bananeiras, coqueiros, seringueiras e uma área de reserva ecológica. As áreas onde estudo foi conduzido estão situadas em ambiente de Mata Atlântica de clima tropical úmido.

Em campo, foram distribuídas 10 armadilhas tipo 'PET' (politereftalato de etileno) confeccionadas com garrafas plásticas de 1,5 litros (Ferreira, 2007) (Figura 1). Como atrativos de captura foram utilizados, o alimentar (quatro toletes de cana-de-açúcar com 20 cm de comprimento), e o feromônio de agregação (produto comercial RMD-1<sup>®</sup>). As armadilhas tipo 'PET' foram amarradas no tronco de cada planta de forma suspensa, entre 0,80 a 1,0m de altura do solo visando à captura de insetos. Em cada área de estudo, foram alocadas oito armadilhas contendo apenas o atrativo alimentar, e duas armadilhas com atrativo alimentar mais um sachê de feromônio, o qual foi pendurado internamente nas armadilhas. Os atrativos alimentares foram trocados a cada 15 dias, no momento das coletas, e o feromônio a cada 60 dias, seguindo as recomendações do fabricante. As armadilhas foram



Figura 1. Armadilha 'tipo PET' alocada em áreas de dendezeiros e piaçaveiras para captura de coleópteros.

dispostas no interior da área de forma aleatória, com distância de aproximadamente 10 metros uma das outras. Os insetos capturados nas armadilhas foram acondicionados em potes plásticos, identificados com a espécie vegetal, data e local da coleta.

Em laboratório, foi realizada a triagem; os coleópteros capturados nas armadilhas foram mortos, contabilizados, separados por gênero ou espécie, data de coleta, planta hospedeira, e armazenados em álcool 70% até a identificação com base na coleção de referencia do laboratório de Controle Biológico da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), estudos de Vaurie (1966) e pelo Prof. Dr. Sérgio Antônio Vanin, do Museu de Zoologia do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP).

Os índices populacionais (abundância, constância, dominância, e frequência) bem como os índices de equitabilidade e diversidade, foram calculados com base no programa ANAFAU desenvolvido no Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/USP.

## Resultados e Discussão

Foi capturado nas áreas de estudo, um total de 6.177 exemplares de coleópteros-praga, sendo que 4.615 foram capturados em dendezeiros localizados nos

municípios de Una e Igrapiúna e 1.562 em piaçaveiras localizadas em Itacaré e Una.

*Metamasius hemipterus* correspondeu à maior percentagem, com 81,37% exemplares em áreas de dendezeiros e com 68,44% em áreas de piaçaveiras (Figura 2), sendo predominante nas duas culturas, semelhante ao observado em cultivos de pupunheira na Costa Rica por Arroyo-Oquendo et al. (2004) e em cultivos de coqueiro (Molin; Barreto, 2012).

*Metamasius canalipes* (Gyllenhal), *Dynamis borassi* (Fabr.) (Curculionidae) e a broca-do-olho-do-coqueiro (*R. palmarum*) ocorreram nas áreas com dendezeiros e com piaçaveiras (Figura 2).

*Rhynchophorus palmarum*, considerada uma das principais pragas das arecáceas, ocorreu em menor quantidade em relação à broca-rajada (*M. hemipterus*) (Figura 2). Resultados semelhantes foram registrados em cultivos de pupunheiras (Arroyo-Oquendo et al., 2004) e em plantios de coqueiros (Molin; Barreto, 2012).

Um menor número de exemplares de *M. canalipes* foi capturado nas áreas de dendezeiros e piaçaveiras (Figura 2) quando comparado à broca-do-olho-do-coqueiro e a broca-rajada. Esta colebroca já foi observada atacando plantios de bananeiras (Broglia et al., 2014) e plantios de flores tropicais (Carneiro et al., 2014).

*Dynamis borassi* foi capturada em baixa quantidade tanto nas áreas de dendezeiros quanto nas

áreas de piaçaveiras (Figura 2). Esta espécie já foi constatada causando perfurações em estipes, bainhas foliares, brácteas e inflorescências de arecáceas (Couturier et al., 2000), podendo também estar relacionada à transmissão do nematoide do anel-vermelho (*B. cocophilus*) (Gerber et al., 1990).

Apenas nas áreas com dendezeiros foram capturados poucos exemplares de *Pachymerus nucleorum* (Fabr.) (bicho-do-coco) (Chrysomelidae), *Rhinostomus barbirostris* (Fabr.) (broca-do-estipe) (Curculionidae), *Hoplopyga ocellata* (Gory & Percheron) (Cetoniidae), *Leucothyreus* sp. e *L. suturalis* Castelnau (Melolonthidae) (Figura 2). A broca-do-estipe e o bicho-do-coco causam injúrias em diferentes espécies de palmeiras (Andrade et al., 2013; Jordão; Silva, 2006; Moura, 2017).

*Deltochilum* aff. *irroratum* (Castelnau) (Scarabaeidae), *Hoplopyga liturata* (Olivier) (Cetoniidae) e *Paradiophorus crenatus* (Billberg) (Curculionidae), foram capturados apenas nas áreas com piaçaveiras e em menor número (Figura 2). Os coleópteros *D. aff. irroratum* e *H. liturata* atuam como decompositores e na ciclagem de nutrientes (Costa et al., 2013; Di Iorio, 2013).

Nas áreas com dendezeiros, foi observado que *M. hemipterus*, *M. canalipes* e *R. palmarum* foram os coleópteros-praga que apresentaram os maiores

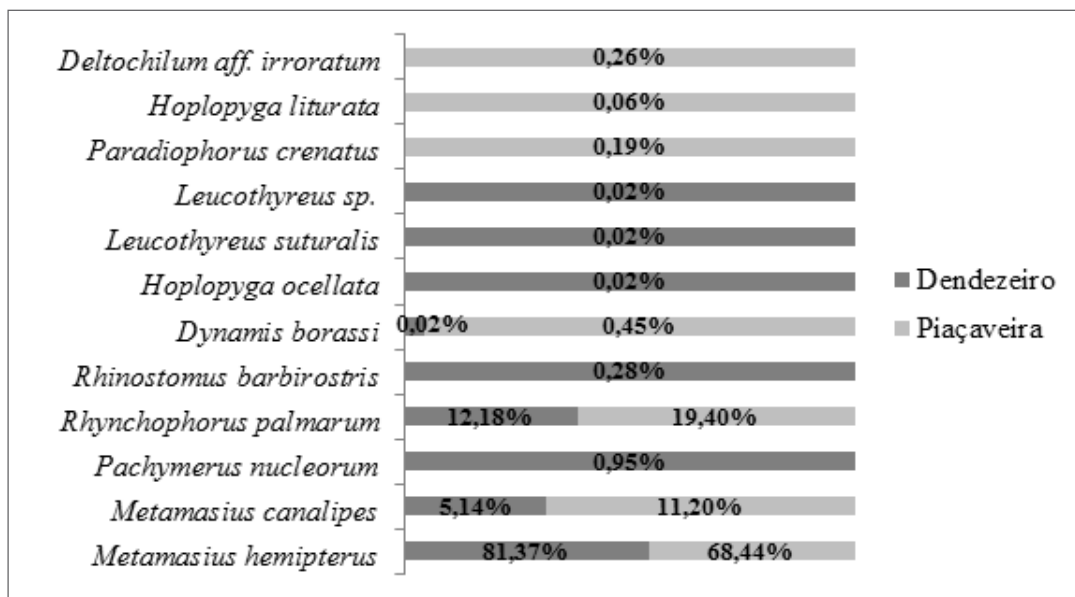


Figura 2. Percentual de espécies de coleópteros-praga capturados em armadilhas tipo “Pet” em áreas de dendezeiros e piaçaveiras no Sul da Bahia.

índices de dominância, abundância, frequência e constância (Tabela 1), mas foi observado a predominância de *M. hemipterus* em comparação ao *R. palmarum*, pelo maior número de adultos capturados. Provavelmente pelo fato do ciclo biológico de *M. hemipterus* ser mais rápido em comparação a *R. palmarum* e pelo hábito polífago da espécie, fatores que podem ter favorecido o aumento da sua população (Broglia et al., 2014; Carneiro et al., 2014; Cysne et al., 2013; León-Brito et al., 2005).

A broca-do-estipe (*R. barbirostris*) foi classificada como acidental (Tabela 1), possivelmente pelo fato das armadilhas terem sido distribuídas próximas a uma área com plantio de coqueiro, que é um hospedeiro de importância primária para essa praga, na região Nordeste (Moura, 2017). No Sul da Bahia, a doença da resinose (*C. paradoxa*) em plantio comercial de dendezeiro foi associada ao ataque desta espécie (Moura et al., 2013; Moura, 2017).

Em relação à constância, *P. nucleorum* foi considerada como acessória (Tabela 1). As armadilhas foram distribuídas em local com diversas palmeiras e seus frutos são utilizados como fonte de alimento e repositório para esse coleóptero, que se alimenta de frutos ou sementes de diferentes espécies de areáceas como licuri [*Syagrus coronata* (Martius)], babaçu, dendê, piaçava, entre outras (Andrade et al., 2013; Garcia et al., 1980; Grenha et al., 2008; Silva, 2001).

Foram classificadas como não dominantes e acidentais, *Leucothyreus* sp., *L. suturalis*, *D.*

*borassi* e *H. liturata*, pois apenas um exemplar destas espécies foram capturados nas áreas de dendezeiros (Tabela 1).

*Metamasius hemipterus* e *R. palmarum* foram as únicas espécies que atingiram os índices máximos de dominância, abundância, frequência e constância nas áreas com piaçaveiras (Tabela 2). O resultado obtido refletiu às condições das áreas de estudo, local de mata fechada com grande diversidade de areáceas e outras culturas como bananeira que também é hospedeira dessas coleobrocas (Broglia et al., 2014; Fancelli et al., 2012; Ruiz et al., 2013). *Metamasius canalipes* foi classificada como dominante, muito abundante, muito frequente e constante (Tabela 2), provavelmente pela diversidade de plantas hospedeiras presentes no local onde foram instaladas as armadilhas. Há registro de ocorrência dessa espécie no Sul da Bahia causando danos em cultivo comercial de helicônias (Carneiro et al., 2014), e em cultivo de bananeira em Alagoas e Bahia (Broglia et al., 2014; Fancelli et al. 2012).

Classificada também como acidental nas áreas com piaçaveiras (Tabela 2), *D. borassi* é considerada como praga de diversas espécies de palmeiras, como o açazeiro, a bacabeira, (*Oenocarpus mapora* H. Karsten), dentre outras (Beserra et al., 2006; Couturier et al., 2000). *Deltotilum* aff. *irroratum*, *H. liturata* e *P. crenatus* foram capturados em baixa quantidade, sendo classificados como não dominantes e acidentais (Tabela 2). As larvas destas espécies se alimentam na madeira podre e detritos orgânicos, e desempenham importante

Tabela 1. Análise faunística de coleópteros capturados em armadilha tipo 'PET' em área de dendezeiros na região Sul da Bahia

| Espécies                        | Nº de adultos capturados | Nº de coleta | Dominância | Abundância | Frequência | Constância |
|---------------------------------|--------------------------|--------------|------------|------------|------------|------------|
| <i>Metamasius hemipterus</i>    | 3.755                    | 72           | SD         | Sa         | SF         | W          |
| <i>Rhynchophorus palmarum</i>   | 562                      | 53           | SD         | Sa         | SF         | W          |
| <i>Metamasius canalipes</i>     | 237                      | 39           | SD         | Sa         | SF         | W          |
| <i>Rhinostomus barbirostris</i> | 13                       | 7            | SD         | Sa         | SF         | Z          |
| <i>Pachymerus nucleorum</i>     | 44                       | 19           | SD         | Sa         | SF         | Y          |
| <i>Hololepta quadridentata</i>  | 864                      | 57           | SD         | Sa         | SF         | W          |
| <i>Hololepta cerdo</i>          | 02                       | 01           | ND         | ma         | MF         | Z          |
| <i>Omalodes foveola</i>         | 99                       | 25           | SD         | Sa         | SF         | Y          |
| <i>Leucothyreus</i> sp.         | 01                       | 01           | ND         | c          | F          | Z          |
| <i>Leucothyreus suturalis</i>   | 01                       | 01           | ND         | c          | F          | Z          |
| <i>Dynamis borassi</i>          | 01                       | 01           | ND         | c          | F          | Z          |
| <i>Hoplopyga ocellata</i>       | 01                       | 01           | ND         | c          | F          | Z          |

Índice de Shannon-Weaner = 0.8792; Intervalo de confiança (P = 0,005) = [0.878068; 0.880235]; Índice de uniformidade ou equitabilidade = 0.4518; **SD** = Super Dominante; **ND** = Não Dominante; **sa** = Super Abundante; **ma** = Muito Abundante; **a** = Abundante; **SF** = Super frequente; **MF** = Muito Frequente; **F** = Frequente;; **W** = Constante; **Y** = Acessória; **Z** = Acidental.

Tabela 2. Análise faunística de coleópteros capturados em armadilha tipo 'PET' em área de piaçaveiras na região Sul da Bahia

| Espécies                                 | Nº de adultos capturados | Nº de coleta | Dominância | Abundância | Frequência | Constância |
|--|--------------------------|--------------|------------|------------|------------|------------|
| <i>Metamasius hemipterus</i>             | 1069                     | 31           | SD         | Sa         | SF         | W          |
| <i>Rhynchophorus palmarum</i>            | 303                      | 22           | SD         | Sa         | SF         | W          |
| <i>Metamasius canalipes</i>              | 175                      | 22           | D          | ma         | MF         | W          |
| <i>Hololepta quadridentata</i>           | 171                      | 24           | D          | a          | MF         | W          |
| <i>Omalodes foveola</i>                  | 40                       | 14           | D          | c          | F          | Y          |
| <i>Dynamis borassi</i>                   | 07                       | 04           | D          | c          | F          | Z          |
| <i>Omalodes</i> sp.1                     | 04                       | 02           | ND         | c          | F          | Z          |
| <i>Deltochilum</i> aff. <i>irroratum</i> | 04                       | 01           | ND         | c          | F          | Z          |
| <i>Paradiophorus crenatus</i>            | 03                       | 01           | ND         | c          | F          | Z          |
| <i>Hoplopyga liturata</i>                | 01                       | 01           | ND         | c          | F          | Z          |

Índice de Shannon-Weaner = 0.8792; Intervalo de confiança (P = 0,005) = [0.878068; 0.880235]; Índice de uniformidade ou equitabilidade = 0.4518; **SD** = Super Dominante; **ND** = Não Dominante; **sa** = Super Abundante; **ma** = Muito Abundante; **a** = Abundante; **SF** = Super frequente; **MF** = Muito Frequente; **F** = Frequente;; **W** = Constante; **Y** = Acessória; **Z** = Acidental.

função na decomposição e reciclagem de nutrientes no meio ambiente (Costa et al., 2013; Garcia et al., 2013; Puker et al., 2012; Silva, 2012). A broca-do-abacaxizeiro (*P. crenatus*) foi classificada como acidental, provavelmente sua captura foi devido aos odores emitidos pela cana-de-açúcar presente nas armadilhas.

Além dos coleópteros que causam injúrias às arecáceas, predadores (Histeridae) também foram capturados nas armadilhas nas áreas de dendezeiros e de piaçaveiras. *Hololepta quadridentata* (Olivier) foi a única espécie que atingiu os índices máximos de dominância, abundância, frequência e constância nas áreas com dendezeiros, e poucos exemplares de *Hololepta cerdo* Marseul foram capturados, sendo classificados como não dominante (Tabela 1). *Omalodes foveola* Erichson também atingiu os índices máximos de dominância, abundância e frequência, porém é uma espécie acessória (Tabela 1).

Nas áreas com piaçaveiras, *H. quadridentata* foi dominante, abundante, muito frequente e constante, demonstrando sua importância como predador, e *O. foveola* foi dominante, comum, frequente e acessória (Tabela 2).

A ocorrência e captura de coleópteros-predadores na área em estudo estão relacionados à disponibilidade de alimento e ao ambiente, presença de mata nativa, plantio de outras culturas além de palmeiras, propício ao aumento de matéria orgânica em decomposição que libera odores que atraem os adultos. Os histerídeos são predadores de várias ordens de insetos

sendo considerados generalistas (Coletto-Silva Freire, 2006; Costa et al., 1988; Lopes et al., 2006; Triplehorn; Johnson, 2011).

## Conclusões

*Metamasius hemipterus* e *Rhynchophorus palmarum* são espécies que atingem os índices máximos de dominância, abundância, frequência e constância em áreas de dendezeiros e piaçaveiras na região Sul da Bahia.

*Hololepta quadridentata* e *Omalodes foveola* são os principais predadores em áreas de dendezeiros e piaçaveiras na região.

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) pelo suporte financeiro e bolsas concedidas, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelas bolsas de iniciação científica e de mestrado concedida.

Ao Prof. Dr. Sérgio Antônio Vanin e a MSc. Daniela de Cássia Bená, do Museu de Zoologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), e ao Dr. Paschoal Coelho Grossi pesquisador da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela identificação dos coleópteros. Aos produtores de arecáceas da região, que gentilmente permitiram a realização das coletas em seus cultivos.



## Literatura Citada

- ALMEIDA, A. M. B. et al. 2010. Susceptibilidade de *Rhynchophorus palmarum* à ação de *Metarhizium anisopliae* e compatibilidade do entomopatógeno com agrotóxicos utilizados na cultura da banana. Arquivo do Instituto Biológico (Brasil) 77(4):661-668.
- ANDRADE, M. B. et al. 2013. Registro de *Pachymerus nucleorum* (Fabricius) (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae) predando sementes de licuri em Caetés, Pernambuco, Brasil. EntomoBrasilis (Brasil) 6(3):239-241.
- ARROYO-OQUENDO, C.; MEXZÓN, R. G.; MORA-URPI, J. M. 2004. Insectos fitófagos en peñibaye (*Bactris gasipaes* k.) para palmito. Agronomía Mesoamericana (Costa Rica) 15 (2):201-208.
- BATISTA FILHO, A. et al. 2002. Controle biológico da broca da bananeira. In: Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico, 6, Anais. São Bento do Sapucaí-SP. São Paulo, SP e Arquivos do Instituto Biológico (Brasil) 1:1-16.
- BESERRA, P.; COUTURIER, G.; PADILHA, M. S. 2006. Cultivated açai palm (*Euterpe oleracea*) and associated weevils: *Foveolus maculatus* and *Dynamis borassi* (Coleoptera: Dryophthoridae). Palms 50(3):120-122. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/38940/1/SP7174.pdf>.
- BRAZÍLIO, M. et al. 2012. Revisão: O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). Bioenergia em Revista: Diálogos (Brasil) 2(1):27-45.
- BROGLIO, S. M. F. et al. 2014. Registro de espécies de coleobrocas atacando bananeiras da cultivar 'Terra'. Revista Caatinga (Brasil) 27(1):200-204.
- CARNEIRO, J. R.; MELO, E. A. S. F.; BITTENCOURT, M. A. L. 2014. Iscas atrativas na captura de *Metamasius* spp. (Coleoptera: Curculionidae) em plantio comercial de helicônias. Iniciação Científica CESUMAR (Brasil) 16(2): 139-145.
- CASALI, B. L. 2012. Piaçaveira desponta como cultura de destaque na economia da região do Sul da Bahia. 2012. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/piacava.htm>>.
- COLETTI-SILVA, A.; FREIRE, D. C. B. 2006. *Hololepta (Leionota) reichii* Marseul (Coleoptera: Histeridae), um nuevo enemigo natural para la meliponicultura em la Amazonía Central, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia (Brasil) 23(2):588-591.
- COSTA, C.; VANIN, S. A.; CASARI-CHEN, S. A. 1988. Larvas de Coleoptera do Brasil. São Paulo, SP, FAPESP. 165p.
- COSTA, F. C. et al. 2013. What is the importance of open habitat in a predominantly closed forest area to the dung beetle (Coleoptera, Scarabaeinae) assemblage? Revista Brasileira de Entomologia 57(3):329-334.
- COSTA-CARVALHO, R. R. et al. 2011. Longevidade de *Thielaviopsis paradoxa*, agente causal da resinose do coqueiro em *Rhynchophorus palmarum*. Scientia Plena (Brasil) 7 (4):1-6.
- COUTURIER, G.; OLIVEIRA, M. S. P.; BESERRA, P. 2000. Besouros nocivos à bacabeira: *Dynamis borassi* e *Foveolus aterpes*. Belém, Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado Técnico n. 19. 5p.
- CYSNE, A. Q. et al. 2013. Flutuação populacional de *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) em palmeiras oleíferas no Amazonas. Acta Amazonica (Brasil) 43(2):197-202.
- DI IORIO, O. 2013. A review of the Cetoniinae (Coleoptera: Scarabaeidae) from Argentina and adjacent countries: systematics and geographic distributions. Zootaxa 3668 (1):1-87.
- FANCELLI, M. et al. 2012. *Metamasius hemipterus* L. como pragas de bananeira cv. Terra. Revista Brasileira de Fruticultura 34(3):944-946.
- FANCELLI, M.; MESQUITA, A. L. M. 2000. Pragas. In: Cordeiro, Z. J. M. org. Banana: Fitossanidade. Brasília, DF, EMBRAPA. pp.21-35. (Frutas do Brasil, 8).
- FERREIRA, J. M. S. 2007. Sistema de captura do *Rhynchophorus palmarum* com armadilha tipo Pet. Aracajú, SE, EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS. 2p. Disponível em: [http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes\\_2007/f\\_02\\_2007.pdf](http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2007/f_02_2007.pdf).
- GARCIA, F. P. et al. 2013. Survey of saproxylophagous Melolonthidae (Coleoptera) and some biological aspects in Aquidauana, MS. Biota Neotropica (Brasil) 13(3):38-43.
- GARCIA, A. H.; ROSA, J. A. M.; COSTA, M. G. G. 1980. Contribuição ao conhecimento do ataque do *Pachymerus nucleorum* Fabr., 1972 (Bruchidae – Coleoptera) em *Syagrus oleraceae* Mart. (Palmae). Pesquisa Agropecuária Tropical (Brasil) 1:14-19.
- GERBER, K.; GIBLIN-DAVIS, R. M.; ESCOBAR, J. 1990. Association of the red ring nematode and other nematodes species with the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (L.). Journal of Nematology (EUA) 22:143-149.
- GOITÍA, W.; CERDA, H. 1998. Hormigas y otros insectos asociados a musáceas (*Musa* spp.) su relación con *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera, Curculionidae). Agronomía Tropical (Venezuela) 48 (2):209-224.
- GRENHA, V.; MACEDO, M. V.; MONTEIRO, R. F. 2008. Predação de sementes de *Allagoptera arenaria* (Gomes) O Kuntze (Arecaceae) por *Pachymerus nucleorum* Fabricius (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae). Revista Brasileira de Entomologia 52(1):50-56.
- GUIMARÃES, C. A. L.; SILVA, L. A. M. 2012. Piaçaveira da Bahia (*Attalea funifera* Martius): do extrativismo à cultura agrícola. Ilhéus, BA, Editus. 262p.
- JORDÃO, A. L.; SILVA, R. A. 2006. Guia de pragas agrícolas para o manejo integrado no Estado do Amapá. Ribeirão Preto, Holos. 182p.

- LEIVAS, F. W. T.; GROSSI, P. C.; ALMEIDA, L. M. 2013. Histerídeos (Staphyliniformia: Coleoptera: Histeridae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. *Biota Neotropical* (Brasil) 13(2):196-204.
- LENCINA, J. L.; GALLEGOS, D. 2014. Una nueva especie invasora en el continente europeo, *Hololepta (Leionota) quadridentata* (Olivier 1789) (Coleoptera: Histeridae). *Arquivo Entomológico Galego* (Espanha) 12:161-163.
- LEÓN-BRITO, O. et al. 2005. Ciclo de vida y longevidad de *Metamasius hemipterus* L. (Coleoptera: Curculionidae), una plaga de la palma aceitera em el estado Monagas, Venezuela. *Bioagro* (Venezuela) 17(2):115-118.
- LOPES, W. D. Z. et al. 2006. Abundância e sazonalidade de histerídeos (Coleoptera) associados ao esterco de granja aviária da região Nordeste do estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* (Brasil) 50(4):492-497.
- LORENZI, H.; NOBLICK, L.; KAHN, F. 2010. Flora brasileira: Arecaceae (Arecaceae). Nova Odessa, Plantarum. 378p.
- MAGALHÃES, J. A. S.; MORAES-NETO, A. H. A.; MIGUENS, F. C. 2008. Nematodes of *Rhynchophorus palmarum*, L. (Coleoptera:Curculionidae), vector of the red ring disease in coconut plantations from the north of the Rio de Janeiro State. *Parasitology Research* 102(6):1281-1287.
- MOLIN, I. L. D.; BARRETO, M. R. 2012. Ocorrência e controle de Curculionidae em *Cocos nucifera* L. em Sinop, Mato Grosso. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde* (Brasil) 33(1):53-64.
- MONTOYA, S. G. et al. 2015. Registro da presença e danos causados por coleópteros em macaúba. *Pesquisa Florestal Brasileira* (Brasil) 35 (82):159-162.
- MOURA, J. I. L. 2017. *Rhinostomus barbirostris* Fabricius (Coleoptera, Curculionidae) Broca do estipe. In: Moura J.I.L, Argôlo, R.C eds. Manejo integrado das pragas das palmeiras. Ilhéus, BA, MAPA/CEPLAC. pp.49-56.
- MOURA, J. I. L. et al. 2013. Weevil associated to gummosis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Brazil. *Revista de Agricultura* (Brasil) 88(2):87-89.
- PINHO, R. C. et al. 2016. Distribuição espacial de *Rhynchophorus palmarum* em palma de óleo no Estado do Pará, Amazônia. *Revista de Ciências Agrárias* (Brasil) 59(1):22-31.
- PUKER, A. et al. 2012. New records of termite hosts for two species of *Hoplopyga*, with notes on the life cycle of *Hoplopyga brasiliensis* (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae). *Annals of the Entomological Society of America* 105(6):872-878.
- ROCHA, R. B. 2012. *Metamasius* spp. Horn (Coleoptera: Curculionidae) em helicônias (Zingiberales: Heliconiaceae): monitoramento, organismos associados e táticas de controle com *Beauveria bassiana* e inseticidas a base de nim. Dissertação Mestrado, Ilhéus,BA, UESC. 90p.
- RUIZ, B. A.; MARTÍNEZ, M.; MEDINA, H. H. 2013. Reconocimiento de insectos potencialmente perjudiciales en *Bactris gasipaes* H.B.K. (Arecaceae) en el corregimiento El Tapón, municipio de Tadó-Chocó, Colombia. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* (Argentina) 39 (2):1-9.
- SÁNCHEZ-SOTO, S.; NAKANO, O. 2002. Registro de *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) no Estado de Mato Grosso do Sul. *Neotropical Entomology* (Brasil) 3(4):659-660.
- SILVA, F. A. B. 2012. Sistemática, biogeografia e comportamento em *Deltotichilum* (Aganhyboma) (Coleoptera: Scarabaeidae). Tese Doutorado. Lavras, MG, UFLA. 225p.
- SILVA, P. H. S. 2001. Insetos associados ao babaçu (*Orbignya* spp.) no estado do Piauí. Teresina,PI, EMBRAPA MEIO-NORTE. Documentos, 63. 12p.
- SOLIMAN, E. P. et al. 2009. Diferentes iscas para o monitoramento populacional de *Metamasius* sp. (Coleoptera: Curculionidae) no cultivo da pupunheira. *Revista Eletrônica de Agronomia* (Brasil) 16(2):1-6.
- TINÔCO, R. S. 2008. Inimigos naturais e lepidópteros desfolhadores associados a *Elaeis guineensis* Jacq., na Agropalma, Amazônia brasileira. Dissertação Mestrado. Viçosa, MG, UFV. 51p.
- TORRE, R. C. A.; TORRE, J. A. A.; MOYA, O. M. 2010. Biología, hábitos y manejo de *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Bogotá, CENIPALMA. Boletim Técnico, 23. 56p.
- TRIPLEHORN, C. A. JOHNSON, N. F. 2011. Estudo dos insetos. São Paulo,SP, Cengage Learning. 809p.
- VAURIE, P. 1966. A revision of the neotropical genus *Metamasius* (Coleoptera, Curculionidae, Rhynchophorinae) Species Group I and II. *Bulletin of the American Museum of Natural History* (EUA) 131 (3): 211-337. Disponível em: <<http://www.cro.ots.ac.cr/rdmcnfs/datasets/biblioteca/pdfs/nbina-6362.pdf>>.
- VERGARA, A. J. B.; RAMÍREZ, W. 2000. Diagnóstico de insectos coleoptera asociados a las plantaciones de plátano en el Sur del Lago de Maracaibo-Venezuela. *Revista Forestal Venezolana* 44(1):93-99.
- YASUDA, M. E. 2005. Levantamento de potenciais pragas associadas à cultura da palmeira-real-da-austrália *Archontophoenix* spp. (Arecaceae) no Médio Vale do Itajaí. Dissertação Mestrado. Blumenau, SC, URB. 94p.
- ZORZENON, F. J.; BERGMANM, E. C.; BICUDO, J. E. A. 2000. Primeira ocorrência de *Metamasius hemipterus* (Linnaeus, 1758) e *Metamasius ensirostris* (German, 1824) (Coleoptera: Curculionidae) em palmiteiros dos gêneros *Euterpe* e *Bactris* (Arecaceae) no Brasil. *Arquivo do Instituto Biológico* (Brasil) 67(2):265-268.

## REGENERAÇÃO DE ESPÉCIES ARBÓREAS EM AMBIENTE DE MATA CILIAR DO RIO CATOLÉ NO MUNICÍPIO DE ITAPETINGA, BAHIA, BRASIL \*

**Fernando George Freitas Damasceno<sup>1,6</sup>, Paulo Sávio Damásio da Silva<sup>1,2</sup>, Lucas Cardoso Marinho<sup>3</sup>, Alessandro de Paula<sup>4</sup>, Raymundo José de Sá Neto<sup>5</sup>, Michele Martins Corrêa<sup>1,5</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Centro de Ensino Pesquisa e Extensão Socioambiental, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, BR 415, km 03, 45700-000, Itapetinga, Bahia, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina, Novo Horizonte, 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brasil. <sup>4</sup>Departamento de Engenharia Agrícola e Solos - DEAS - UESB, Estrada do Bem Querer, km 04, 45083-900, Vitória da Conquista, Brasil.

<sup>5</sup>Laboratório de Biodiversidade do Semiárido, Departamento de Ciências Naturais, UESB.

<sup>6</sup>Autor para correspondência: fernandobiodamasceno@hotmail.com

\*Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

A avaliação da diversidade vegetal em áreas de mata ciliar é importante para o entendimento da dinâmica de regeneração de áreas perturbadas. Neste sentido, este estudo analisou a composição florística, a diversidade e a estrutura da vegetação lenhosa de um trecho de mata ciliar em regeneração do rio Catolé, município de Itapetinga, estado da Bahia, Brasil. Essa área foi cercada em 2003, e em 2006 foram introduzidas mudas da espécie *Sebastiania brasiliensis*. Em 2014, parcelas de 400 m<sup>2</sup> foram estabelecidas na área e todas as árvores com perímetro à altura do peito maior ou igual a 2,5 cm foram identificadas. Foram identificados 241 indivíduos distribuídos em 15 espécies e sete famílias. Das espécies registradas, 47% são zoocóricas e 73,3% pioneiras. Além disto, 93,3% das espécies são provenientes de regeneração natural e 49,3% dos indivíduos são *S. brasiliensis*. A similaridade florística com um fragmento florestal urbano próximo foi de apenas 6%. Os resultados demonstraram que a área em regeneração após 11 anos de isolamento encontra-se em estágio inicial de sucessão ecológica e que *S. brasiliensis*, mesmo sendo espécie exótica para o estado da Bahia, pode ter atuado como espécie facilitadora, auxiliando no estabelecimento de outras espécies.

**Palavras-chave:** mata de galeria, reflorestamento, regeneração florestal, *Sebastiania brasiliensis*, sucessão ecológica.

**Regeneration of tree species in a riparian forest of catolé river, in the municipality of Itapetinga, Bahia State, Brazil.** The evaluation of plant diversity in areas of riparian forest is important for the understanding of the regeneration dynamics of disturbed areas. Thus, this study analysed the floristic composition, diversity and structure of the woody vegetation from one section in regeneration of the riparian forest of the Catolé River, Itapetinga, Bahia State, Brazil. This area was fenced in 2003 and, in 2006, seedlings from the species of *Sebastiania brasiliensis* were introduced. In 2014, plots of 400 m<sup>2</sup> were established in the area and all trees possessing perimeter at chest height greater than or equal to 2.5 cm were identified. There were identified 241 individuals distributed in 15 species and seven families. From the registered species, 47% are zoochoric and 73.3% are pioneer. In addition, 93.3% of the species are originated from natural regeneration and 49.3% of the individuals are *S. brasiliensis*. The floristic similarity with a nearby urban forest fragment was only 6%. The results showed that the area in regeneration, after 11 years of isolation, is in an initial stage of ecological succession and that *S. brasiliensis*, despite being an exotic species for the state of Bahia, may have acted as a “nurse plant”, assisting in the establishment of other species.

**Key words:** gallery forest, reforestation, forest regeneration, *Sebastiania brasiliensis*, ecological succession.

## Introdução

As matas ciliares, vegetação que ocupa as margens dos corpos d'água, cumprem importantes funções na manutenção do regime hídrico da bacia hidrográfica, contribuindo para a recarga dos aquíferos subterrâneos, abrigo e alimentação da fauna e estabilidade dos ambientes, além de servirem como barreira física para a entrada de sedimentos e filtragem de nutrientes e/ou agrotóxicos (Lima e Zakia, 2001).

Ao longo da história do desenvolvimento do Brasil, a construção de hidrelétricas, abertura de estradas em regiões com topografia acidentada e implantação de culturas agrícolas e de pastagem foram fragmentando a cobertura florestal nativa (Martins, 2001). A restauração dessas áreas é uma atividade que exige custos consideráveis que vão desde o planejamento até a manutenção, sendo a regeneração natural uma alternativa mais viável e de baixo custo. A condução da regeneração natural, por exigir menos mão-de-obra e insumos, pode reduzir, significativamente, o custo de implantação de uma floresta de proteção (Botelho e Davide, 2002). Além disso, neste processo podem ser utilizadas espécies que aumentem a chance de encontros interespecíficos, como as facilitadoras, as quais aceleram o processo de regeneração das áreas a serem restauradas (Reis et al., 2003; Melo et al., 2015).

O tema regeneração de matas ciliares no Brasil tem sido estudado ao longo dos anos sempre buscando avaliar e refinar as estratégias adotadas para o sucesso do processo de regeneração (Budke et al., 2004; Nunes e Pinto, 2007; Aquino e Barbosa, 2009; Ferreira et al., 2010; Daronco et al., 2013). Estes estudos fornecem dados que podem ser usados em projetos de recuperação nas áreas de abrangência onde foram realizadas, e também como base para a aplicação da metodologia em áreas as quais ainda não possuem estudos. O monitoramento das comunidades que se formam em áreas recuperadas é uma atividade muito importante, devendo ser efetuada tanto para permitir a correção de eventuais problemas quanto para a criação de uma base de dados sobre a dinâmica da estrutura vegetal nestas áreas (Vieira e Gandolfi, 2006).

A Bahia ainda possui poucos trabalhos sobre a recuperação de áreas de mata ciliar (Cordeiro e Cunha, 2014). Para tanto, e buscando fechar esta lacuna, este estudo de caso avaliou a composição florística arbórea

e a fitossociológica de uma área de mata ciliar em regeneração há cerca de 11 anos à margem do rio Catolé, Itapetinga, Bahia. Esta área, pertencente a uma empresa privada, foi cercada em 2003 e em 2006 os proprietários introduziram mudas de *Sebastiania brasiliensis* Spreng. (Euphorbiaceae), espécie exótica na Bahia (Flora do Brasil 2020, em construção). De posse destes dados, as perguntas a serem respondidas neste estudo são: i) Qual a diversidade florística arbórea e estágio de regeneração desta área após 11 anos de isolamento? ii) Quanto a diversidade arbórea local é similar a de um fragmento florestal urbano próximo, possível fonte de espécies vegetais para a área em regeneração? iii) *Sebastiania brasiliensis* atuou como espécie facilitadora na regeneração desta área?

## Material e Métodos

### Área de estudo

O estudo foi realizado em 2014 em um trecho de mata ciliar do rio Catolé, situado na zona urbana do município de Itapetinga, Bahia, sob as coordenadas 15°14'9.66"S 40°13'68.48"O. A Bacia hidrográfica do rio Catolé possui área de 3.101 km<sup>2</sup> e 80 Km de extensão e cruza cinco municípios. O relevo plano da região atinge cerca de 800m e o clima varia de semiárido a subúmido. A estação quente e chuvosa vai de outubro a março, com temperatura média de 23 °C e precipitação de 1.057 mm, e a estação seca está compreendida entre de abril a setembro, com temperatura variando entre 18 e 22 °C e precipitação de 325 mm. O solo é do tipo Latossolo coberto por porções de floresta estacional decidual e semidecidual (Lima e Pinto, 2011).

O trecho em regeneração de mata ciliar do rio Catolé (aqui referido como MCRC) possui 235 m de comprimento e largura variando entre 30 a 45 m. Essa área faz parte de uma propriedade privada. Em 2003, a empresa por iniciativa própria, cercou a área com arame farpado com o objetivo de diminuir a erosão no solo, despejo de lixo e seu uso como pastagem. A cobertura vegetal no ano do isolamento era composta basicamente por gramíneas. Em 2006, a empresa também plantou aleatoriamente na área cerca de 50 mudas de *Sebastiania brasiliensis* (Euphorbiaceae), espécie nativa do Brasil, mas que não ocorre na Bahia (Flora do Brasil 2020, em construção). A espécie foi



escolhida devido ao rápido desenvolvimento, resistência a solos pobres e presença de espinhos, com o intuito de repelir o acesso do gado e de pessoas ao local. A área manteve-se isolada e não houveram interferências desde 2006.

### Coleta de dados

No MCRC foram estabelecidas 21 parcelas contíguas de 400 m<sup>2</sup> ao longo da margem do rio, totalizando uma área amostrada de 8.400 m<sup>2</sup>. Todas as plantas com perímetro à altura do peito (PAP, neste caso, cerca de 1,3 m), maior ou igual a 2,5 cm foram marcadas, georreferenciadas e tiveram material vegetal coletado para posterior identificação. O material botânico coletado foi identificado e depositado no herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

As espécies foram classificadas quanto à síndrome de dispersão, como: anemocórica, zoocórica, autocórica e hidrocórica (terminologia adotada por Pijl, 1982) e quanto ao nicho de regeneração, sendo categorizadas como pioneiras, secundárias (iniciais ou tardias), e climáticas, utilizando-se literatura disponível (Reitz, 1988; Lorenzi et al., 2006; Carvalho, 2007; Melo & Reis, 2007; Lorenzi, 2008) e observações em campo das espécies e características dos diásporos. Os espécimes não identificados em nível genérico não foram categorizados.

### Fragmento de mata ciliar em área urbana

A composição florística arbórea do MCRC foi comparada a diversidade vegetal de um fragmento de mata ciliar em área urbana, conhecido como Parque Municipal da Matinha (PMM), distante aproximadamente 1100 m área de estudo, com coordenadas centrais 15°14'21"S, 40°14'02"O. O PMM possui 24 ha, dos quais apenas 10 ha são florestados. Os dados sobre a vegetação deste fragmento florestal foram obtidos do Plano de Manejo da área (SMMAI, 2010). As espécies arbóreas deste fragmento florestal também foram categorizadas quanto à síndrome de dispersão e ao nicho de regeneração.

### Análise de dados

Para MCRC foram calculados os parâmetros fitossociológicos: área basal (AB), densidade (D),

frequência (F) e dominância (Do), absolutas (A) e relativas (R), para a composição dos índices de valor de cobertura (VC) e importância (VI). Os dados foram processados por meio dos programas do pacote FITOPAC 2.1 (Shepherd, 2010).

Foram analisados a similaridade, índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') e a equabilidade pelo índice de Pielou (J). A similaridade entre a composição de espécies vegetais do MCRC e do PMM foi determinada com base no índice de Jaccard (Krebs, 1999). O índice de diversidade de Shannon-Wiener (uso do Ln) e a equabilidade pelo índice de Pielou (J) (Kent & Coker, 1992) foram calculados para toda a comunidade vegetal (CVT) encontrada no MCRC, e também para a comunidade vegetal proveniente da regeneração natural (RN), a qual excluindo-se a espécie *Sebastiania brasiliensis*. Essas análises foram necessárias para o entendimento do efeito da introdução da espécie *S. brasiliensis* na diversidade vegetal da área em regeneração estudada. Adicionalmente, as classes de altura e de diâmetro foram delimitadas de acordo com Sturges (1926) para os dois conjuntos, CVT e RN.

A partir das coordenadas geográficas dos espécimes amostrados em campo, foram gerados Mapas de densidade de Kernel com o uso do software Arc Map, o qual desenha uma vizinhança circular ao redor de cada ponto do espécime que corresponde ao raio de influência (célula) deste indivíduo (Souza e Silva, 2013). O valor para a célula é a soma dos valores Kernel sobrepostos, e divididos pela área de cada raio de pesquisa (Silverman, 1986). Foram classificados por níveis de densidade vegetal as variações entre a escala de cores em tons de cinza, variando da cor preta, que representa as áreas com maior densidade vegetal, até a branca, que representa áreas com menor densidade vegetal.

## Resultados

### Área em regeneração

No total foram encontradas 15 espécies pertencentes a 15 gêneros distintos, distribuídas em sete famílias botânicas (Tabela 1). Fabaceae foi a mais representativa na composição florística, com sete morfo-espécies, seguida por Boraginaceae com três. Euphorbiaceae foi composta exclusivamente por *Sebastiania brasiliensis*, a qual obteve os maiores

Tabela 1 - Composição florística, parâmetros fitossociológicos e características ecológicas de espécies vegetais de um trecho em regeneração de mata ciliar do rio Catolé em Itapetinga- BA, Brasil

| Espécie                                     | Ni  | DA    | DR    | DoA     | DoR   | FA    | FR    | VC     | VI     | Síndrome de dispersão | Categoria sucessional |
|---|-----|-------|-------|---------|-------|-------|-------|--------|--------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Sebastiania brasiliensis</i> Spreng.     | 119 | 141,7 | 49,38 | 35861   | 62,54 | 57,14 | 12,37 | 111,92 | 124,29 | Autocoria             | Pioneira              |
| <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi*       | 30  | 35,7  | 12,45 | 2086,38 | 3,64  | 76,19 | 15,46 | 15,67  | 31,14  | Zoocoria              | Pioneira              |
| <i>Mimosa caesalpinhiifolia</i> Benth.*     | 14  | 16,7  | 5,81  | 8027,57 | 14,00 | 42,86 | 9,28  | 19,81  | 29,09  | Autocoria             | Pioneira              |
| <i>Desmanthus virgatus</i> (L.) Willd.      | 17  | 20,2  | 7,05  | 4985,43 | 8,69  | 47,62 | 10,31 | 15,75  | 26,06  | Autocoria             | Pioneira              |
| <i>Sesbania virgata</i> (Cav.) Poir.        | 12  | 14,3  | 4,98  | 859,63  | 1,50  | 42,86 | 9,28  | 6,48   | 15,76  | Autocoria/Hidrocoria  | Pioneira              |
| <i>Pithecellobium diversifolium</i> Benth.  | 11  | 13,1  | 4,56  | 1061,91 | 1,85  | 42,86 | 9,28  | 6,42   | 15,69  | Zoocoria              | Pioneira              |
| <i>Acacia</i> sp. *                         | 7   | 8,3   | 2,90  | 778,53  | 1,69  | 23,81 | 7,22  | 4,68   | 11,89  | -                     | -                     |
| <i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC.         | 7   | 8,3   | 2,90  | 967,53  | 1,36  | 33,33 | 7,22  | 4,59   | 11,81  | Autocoria             | Pioneira              |
| <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.          | 7   | 8,3   | 2,90  | 390,88  | 0,68  | 23,81 | 5,15  | 3,59   | 8,74   | Zoocoria              | Pioneira              |
| <i>Celtis pubescens</i> Spreng.             | 5   | 6     | 2,07  | 1822,13 | 3,18  | 14,29 | 3,09  | 5,25   | 8,35   | Zoocoria              | Pioneira              |
| <i>Cordia</i> sp.                           | 5   | 6     | 2,07  | 345,4   | 0,60  | 19,05 | 4,12  | 2,68   | 6,8    | -                     | -                     |
| <i>Machaerium aculeatum</i> Raddi           | 4   | 4,8   | 1,66  | 117,19  | 0,20  | 19,05 | 4,12  | 1,86   | 5,99   | Anemocoria            | Pioneira              |
| <i>Varronia curassavica</i> Jacq.           | 1   | 1,2   | 0,41  | 21,32   | 0,02  | 4,76  | 1,03  | 0,45   | 1,48   | Zoocoria              | Secundária            |
| <i>Eugenia glazioviana</i> Kiaersk. *       | 1   | 1,2   | 0,41  | 9,47    | 0,04  | 4,76  | 1,03  | 0,43   | 1,46   | Zoocoria              | Secundária            |
| <i>Tournefortia rubicunda</i> Salzm. ex DC. | 1   | 1,2   | 0,41  | 2,87    | 0,00  | 4,76  | 1,03  | 0,42   | 1,45   | Zoocoria              | Pioneira              |

\*Espécies também registradas no Plano de Manejo do Fragmento urbano. Ni - número de indivíduos; DA - densidade absoluta (ind./ha); DR - densidade relativa; DoA - dominância absoluta (m²/ha); DoR - dominância relativa; FA - frequência absoluta; FR - frequência relativa (%); VI - índice de valor de importância e VC - índice de valor de cobertura. \*Espécies registradas no Plano de Manejo do Fragmento urbano.

valores dos parâmetros fitossociológicos avaliados, exceto para a frequência, uma vez que *Schinus terebinthifolia* Raddi foi predominante (Tabela 1). Das 47 espécies registradas para o PMM, apenas quatro foram encontradas no MCRC: *Acacia* sp., *Eugenia glazioviana* Kiaersk., *Mimosa caesalpinhiifolia* Benth. e *Schinus terebinthifolia*, resultando em apenas 6% de similaridade.

Quanto à síndrome de dispersão, 47% das espécies são zoocóricas, 27% autocóricas e as demais distribuídas entre anemocóricas e hidrocóricas. No que diz respeito aos grupos ecológicos, 73,3% são pioneiras, 13,3% são secundárias e nenhuma espécie foi considerada como climácicas. No PMM, 54,5% foram classificadas como secundárias, 40% como pioneiras, e 9,5% como climácicas (Tabela 1).

### Regeneração natural

Das espécies registradas no MCRC, 93,3% são regenerantes naturais. Dos 241 indivíduos catalogados, 119 são da espécie *Sebastiania brasiliensis* (49,3 %), e 122 indivíduos (50,3 %) são resultantes da regeneração natural (Tabela 1). O índice de Shannon-Wiener foi de 1,87 para CVT e de 2,32 para RN. O valor encontrado para a equabilidade de Pielou (J) foi de 0,67 para CVT e 0,85 para RN.

Quanto à média de altura da formação vegetal, a CVT obteve uma média de 3,28 m enquanto que os indivíduos em RN obtiveram a média de 3,34 m. Os maiores valores para altura máxima e média foram obtidos pela espécie *Desmanthus virgatus* (L.) Willd., com 7,0 m e 4,03 m, respectivamente. Em relação à distribuição, foi observada maior densidade de indivíduos na porção nordeste da área estudada, acerca de 24 m do leito do rio, onde ocorre maior concentração da espécie *Sebastiania brasiliensis* (Figura 1A e C). A porção sudoeste apresentou distribuição mais uniforme e maior densidade de espécies que regeneraram naturalmente (Figura 1B).

### Discussão

Em 11 anos de isolamento, 14 espécies colonizaram naturalmente o trecho de mata ciliar do rio Catolé e a composição florística é composta

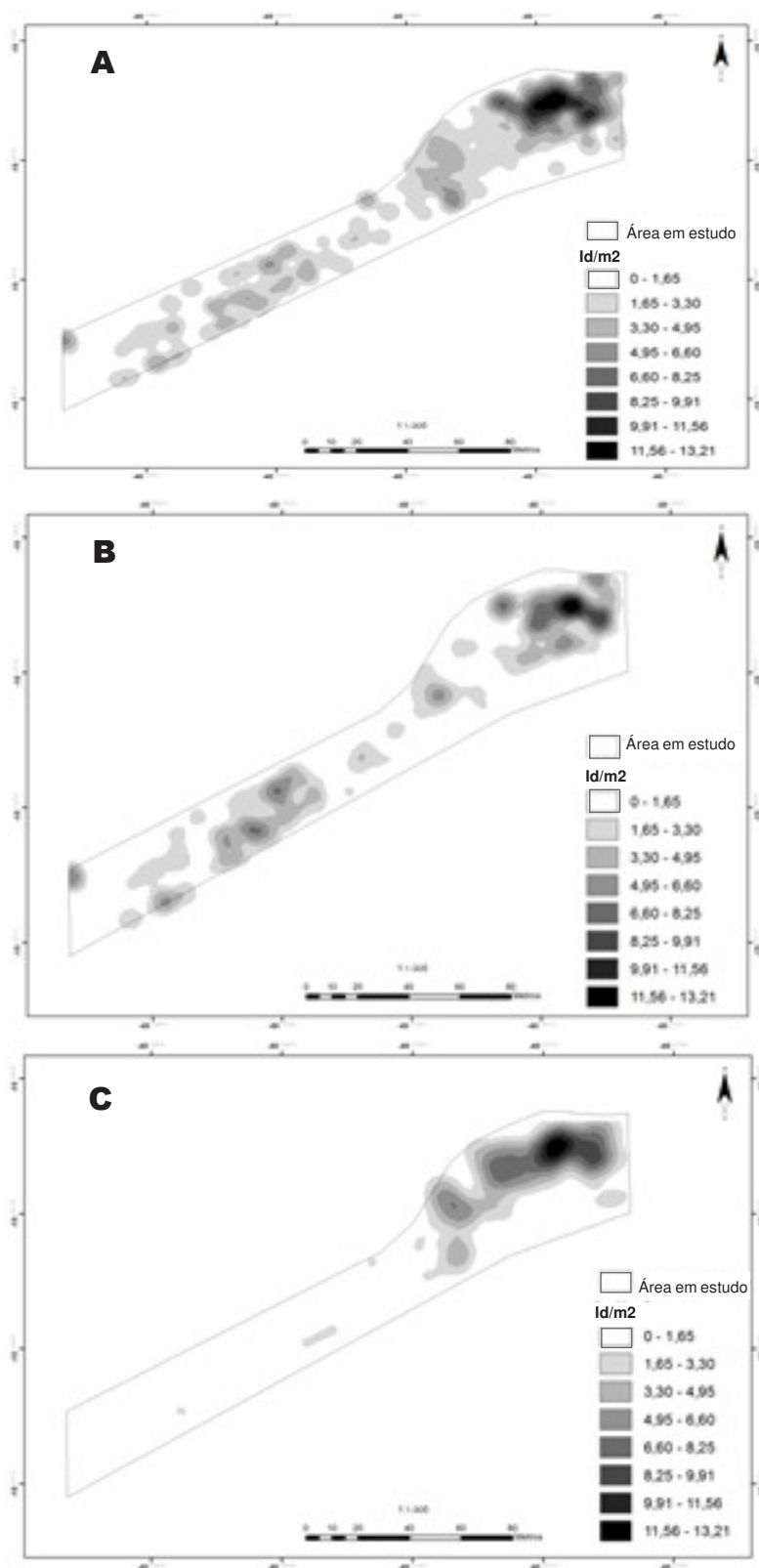


Figura 1. Mapa de densidade de Kernel mostrando a densidade e distribuição arbórea das espécies vegetais em uma área em regeneração do rio Catolé, município de Itapetinga-BA, nordeste do Brasil. Densidade e distribuição: total (A), sem a espécie *Sebastiania brasiliensis* (B) e apenas os dados de *S. brasiliensis* (C).

principalmente por espécies pioneiras e de dispersão zoocórica. A maior riqueza da família Fabaceae já era esperada, fato comum em inventários florísticos realizados em diversas fisionomias brasileiras (Lima e Lima, 1998; Paula et al., 2002; Munhoz e Felfili, 2006; Andrade et al., 2009; Aquino e Barbosa, 2009; Paula & Soares, 2011; LPWG, 2017).

A diversidade de espécies foi baixa quando comparada a observada em estudos realizados em outras florestas ripárias no Brasil (Dias et al., 1998; Carvalho, 2005; Paula et al., 2009), mas superior ao observado em trabalhos como o de Ferreira *et al.* (2010). Contudo, 93,3% das espécies registradas no local recrutaram por regeneração natural, um aumento de um para 15 no número de espécies em cerca de uma década. Esse aumento no número de espécies resultou em uma riqueza de espécies e uma fisionomia vegetal muito diferente da inicial do ano de isolamento, uma vez que a vegetação da área era composta basicamente por espécies herbáceas, principalmente por gramíneas invasoras.

Além disso, foram encontradas no trecho em regeneração, espécies também registradas no PMM. Esse resultado indica que o PMM provavelmente é uma das fontes de espécies vegetais para a área estudada e que os mecanismos de dispersão estão atuando e permitindo a colonização do trecho de mata ciliar em regeneração. Entretanto, o número de espécies pioneiras é quase duas vezes maior na área em regeneração do que no PMM. Em contraste, o número de espécies secundárias no PMM é quase quatro vezes maior do que na área em regeneração. Isso indica que a área em regeneração após os anos de isolamento e inserção artificial de uma espécie, encontra-se em estágio inicial de sucessão ecológica, fato corroborado pelo predomínio de espécies pioneiras e ausência de espécies climáticas no local. Adicionalmente, a média de altura de três metros encontrada na vegetação da área em regeneração é considerada comum em formações em início de sucessão ecológica (Brasil, 1994).

Considerando que a sucessão ecológica é um processo dinâmico (Paula et al., 2002; Narvaes et al., 2005; Oliveira e Felfili, 2005; Aquino e Barbosa, 2009; Ferreira et al., 2010; Campos e Martins, 2016) é esperado que nos próximos anos, a vegetação da área em regeneração tenha maior similaridade florística e de categorias de sucessão com a vegetação do PMM, ou seja, espera-se que o número de espécies pioneiras

diminua e o de secundárias e climáticas aumentem, processo semelhante ao observado por Oliveira e Felfili (2005). Neste estudo, os autores avaliaram a regeneração de uma mata de galeria no Distrito Federal com levantamentos florísticos em intervalo de 13 anos, e registraram um aumento de 24% da população de espécies tolerantes à sombra, paralelo ao decréscimo de espécies pioneiras (64%), identificando que o fragmento passou por processo de fechamento do dossel, havendo diminuição da incidência de luminosidade, o que implicou em menor presença de mudas de espécies pioneiras. Os autores verificaram que a presença de um fragmento adjacente foi fundamental no processo da regeneração, proporcionando distribuição das espécies até 75 m de distância da borda.

A zoocoria foi a síndrome de dispersão mais comum na área em regeneração, ocorrendo em cerca de metade das espécies estudadas, um padrão comum em florestas tropicais e em áreas em regeneração (Aquino e Barbosa, 2009; Ferreira et al., 2010; Negrini et al., 2012; Campos e Martins, 2016). Esses resultados, além de destacarem a importância da fauna na regeneração de florestas tropicais, estão de acordo com Carmo e Morellato (2000), que afirmam que em florestas semidecíduas, como é o caso da área estudada, a proporção de espécies zoocóricas é próxima a 60%.

Os valores de equabilidade de Pielou (J) indicaram uma alta dominância específica ocasionada pelo grande número de indivíduos de *Sebastiania brasiliensis* em relação ao registrado para as outras espécies. Quando a análise é feita apenas com a RN, a diferença entre o número de indivíduos cai para apenas 1,24%. Desde sua introdução, *S. brasiliensis* aumentou 2,4 vezes seu número de indivíduos. Essa predominância reflete, não apenas o manejo realizado pelos proprietários, mas também suas características biológicas. Essa espécie é bastante resistente à extrema umidade ou seca e dispõe de denso sistema radicial com caules rijos e flexíveis, suportando a força das águas em possíveis enchentes (Reitz, 1988). Além disso, a característica anemocórica das sementes possibilita maior dispersão e, consequentemente, maior ocupação do ambiente.

Os mapas de Kernel mostram que as áreas com maior densidade de indivíduos da comunidade vegetal coincidem com as áreas de maior densidade de ocorrência de *Sebastiania brasiliensis*. Considerando que espécies exóticas também podem representar papel



catalisador da regeneração natural (Parrotta, 1999), esse resultado indica que *S. brasiliensis* pode ter auxiliado no processo sucessional da área atuando como espécie facilitadora, aumentando o recrutamento e sobrevivência de espécies com nichos específicos de regeneração. Espécies facilitadoras modificam as condições ambientais onde ocorrem de forma que promovam um maior sucesso de estabelecimento de outras espécies (Reis et al., 2003; Melo et al., 2015). Neste caso, a contribuição como espécie facilitadora de *S. brasiliensis* pode ter ocorrido (1) pelo auxílio na manutenção do isolamento da área, devido à presença de espinhos; (2) maior sombreamento do solo nas áreas de ocorrência e/ou (3) no uso como poleiro para aves e morcegos, espécies eficazes na dispersão de sementes e agentes efetivos na promoção de regeneração de áreas degradadas (Reis et al., 2003). Além disto, mais da metade dos indivíduos (122 ou 50,3 %) registrados são resultantes da regeneração natural. Isso indica que pioneirismo dessas espécies que se estabeleceram ao longo do tempo também contribuiu para o aumento da diversidade local, reduzindo a dominância de *S. brasiliensis*, que é frequentemente encontrada como uma das espécies com maior Valor de Importância (VI) e densidade em florestas (Budke et al., 2004; Narvaes et al., 2005; Callegaro et al., 2018).

Neste sentido, embora a diversidade de espécies arbóreas que povoaram e se desenvolveram naturalmente no trecho em regeneração de mata ciliar do rio Catolé estudado tenha sido pequena e pouco similar à do PMM, o registro de espécies nativas aponta para a ocorrência de um processo sucessional em curso no local. Além disso, a introdução da espécie *Sebastiania brasiliensis*, mesmo sendo exótica para o estado, possivelmente contribuiu como espécie facilitadora para o aumento da diversidade arbórea local, criando núcleos de regeneração e fornecendo sítios seguros para o recrutamento de novas espécies.

### Agradecimentos

Nós agradecemos à UESB pelo apoio logístico, à CAPES pela bolsa de mestrado concedida à Fernando George Freitas Damasceno, à Indústria de Laticínios Palmeira dos Índios – VALEDOURADO/ALIMBA pelo apoio logístico e à Avaldo Soares Filho pelo auxílio na identificação das espécies.

### Literatura Citada

- ANDRADE, M. V. M. et al. 2009. Levantamento florístico e estrutura fitossociológica do estrato herbáceo e subarbustivo em áreas de caatinga no Cariri Paraibano. *Revista Caatinga* (Brasil) 22(1):229-237.
- AQUINO, C.; BARBOSA, L. M. 2009. Classes sucessionais e síndromes de dispersão de espécies arbóreas e arbustivas existentes em vegetação ciliar remanescente (Conchal, SP), como subsídio para avaliar o potencial do fragmento como fonte de propágulos para enriquecimento de áreas revegetadas no rio Mogi-Guaçu, SP. *Revista Árvore* (Brasil) 33(2):349-358.
- BOTELHO, S. A.; DAVIDE, A. C. 2002. Métodos silviculturais para recuperação de nascentes e recomposição de matas ciliares. In: Simpósio Nacional sobre Recuperação de Áreas Degradadas: Água e Biodiversidade, Belo Horizonte, Minas Gerais. Anais. Belo Horizonte, MG, SOBRADE. pp.123-145.
- BRASIL. 1994. Resolução nº 5, de 04 de maio de 1994. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA.
- BUDKE, J. C. et al. 2004. Florística e fitossociologia do componente arbóreo de uma floresta ribeirinha, arroio Passo das Tropas, Santa Maria, RS, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 18(3):581-589.
- CALLEGARO, R. M. et al. 2018. Influência de fatores ambientais sobre espécies vegetais em floresta estacional para uso potencial em restauração. *Nativa* (Brasil) 6(1):91-99.
- CAMPOS, W. H.; MARTINS, S. V. 2016. Natural regeneration stratum as an indicator of restoration in area of environmental compensation form mining limestone, municipality of Barroso, MG, Brazil. *Revista Árvore* (Brasil) 40(2):189-196.
- CARMO, M. R. B.; MORELLATO, L. P. C. 2000. Fenologia de árvores e arbustos das matas ciliares da Bacia do rio Tibagi, Estado do Paraná, Brasil. In: Rodrigues, R.R.; Leitão Filho, H.F. ed.. *Matas Ciliares: conservação e recuperação*. São Paulo. pp.125-141.
- CARVALHO, F. A. 2005. Efeitos da fragmentação florestal na florística e estrutura de fragmentos de Mata Atlântica submontana na região de Imbaú, Município de Silva Jardim, RJ. Dissertação Mestrado. Campos de Goytacazes, RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense. 124p.
- CARVALHO, P. E. 2007. Sabiá – *Mimosa caesalpinhiifolia*. Colombo: Circular Técnica, EMBRAPA, 135:01-09.
- CORDEIRO, K. A.; CUNHA, D. V. P. 2014. Análise da capacidade de regeneração natural em duas áreas de mata ciliar do rio verruga em Vitória da Conquista – Bahia. *Enciclopedia Biosfera* 10(18):224-235.
- DARONCO, C. et al. 2013. Ecossistema em restauração versus ecossistema de referência: estudo de caso da comunidade vegetal de mata ciliar em região de Cerrado, Assis, SP, Brasil. *Hoehnea*, 40(3):485-498.

- DIAS, M. C. et al. 1998. Composição florística e fitossociologia do componente arbóreo das florestas ciliares do rio Iapó, na bacia do rio Tibagi, Tibagi, PR. *Revista Brasileira de Botânica* 21:183-195.
- FERREIRA, W. C. S. et al. 2010. Regeneração natural como indicador de recuperação de área degradada a jusante da usina hidrelétrica de Camargos, MG. *Revista Árvore (Brasil)* 34(4): 651-660.
- FLORA DO BRASIL 2020 EM CONTRUÇÃO. 2018. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br>> Acesso em 15 de fev. de 2018.
- KENT, M.; COKER, P. 1992. *Vegetation description and analysis*. London, Belhaven Press. 363p.
- KREBS, C. J. 1999. *Ecological Methodology*. New York, Ed. Harper & Row. 620p.
- LIMA, E. M.; PINTO, J. E. S. S. 2011. Bacia do Rio Catolé, Bahia - Brasil: bases geoambientais e socioeconômicas para a gestão da água e do solo. *Revista Geográfica de América Central* 1:1-11.
- LIMA, P. C. F.; LIMA, J. L. S. 1998. Composição florística e fitossociologia de uma área de caatinga em Contendas do Sincorá, Bahia, microrregião homogênea da Chapada Diamantina. *Acta Botânica Brasilica* 12(3):441-450.
- LIMA, W. P.; ZAKIA, M. J. B. 2001. Hidrologia de matas ciliares. In: Rodrigues, R.R.; Leitão Filho, H.F. ed. *Matas ciliares: conservação e recuperação*. São Paulo, SP, EDUSP/FAPESP:33-44.
- LORENZI, H. 2008. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa, SP, Instituto Plantarum. 368p.
- LORENZI, H. et al. 2006. *Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura*. São Paulo, SP, Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 672p.
- LPWG - THE LEGUME PHYLOGENY WORKING GROUP. 2017. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* 66(1):44-77
- MARTINS, S. V. 2001. *Recuperação de matas ciliares*. Viçosa, MG, Aprenda Fácil. 146p.
- MELO, A. C. G. et al. 2015. Atributos de espécies arbóreas e a facilitação da regeneração natural em plantio heterogêneo de mata ciliar. *Scientia Forestalis (Brasil)* 43(106):333-344.
- MELO, H. M. M.; REIS, A. 2007. Levantamento de Lianas do Vale do Itajaí com potencialidade para uso em restauração ambiental. *Revista Brasileira de Biociências* 5(1):642-644.
- MUNHOZ, C. B. R.; FELFILI, J. M. 2006. Fitossociologia do estrato herbáceo-subarbustivo de uma área de campo sujo no Distrito Federal, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 20(3):671-685.
- NARVAES, I. S. et al. 2005. Estrutura da regeneração natural em floresta ombrófila mista na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, RS. *Ciência Florestal (Brasil)* 15(4):331-342.
- NEGRINI, M. et al. 2012. Dispersão, distribuição espacial e estratificação vertical da comunidade arbórea em um fragmento florestal no planalto catarinense. *Revista Árvore (Brasil)* 36(5):919-929.
- NUNES, F. P.; PINTO, M. T. C. 2007. Produção de serapilheira em mata ciliar nativa e reflorestada no alto São Francisco, Minas Gerais. *Biota Neotropica* 7(3):97-102.
- OLIVEIRA, E. C. L.; FELFILI, J. M. 2005. Estrutura e dinâmica da regeneração natural de uma mata de galeria no Distrito Federal, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 19(4):801-811.
- PARROTTA, J. A. 1999. Productivity, nutrient cycling, and succession in single and mixed-species plantations of *Casuarina equisetifolia*, *Eucalyptus robusta*, and *Leucaena leucocephala* in Puerto Rico. *Forest Ecology and Management* 124:45-77.
- PAULA, A. et al. 2002. Alterações florísticas ocorridas num período de quatorze anos na vegetação arbórea de uma Floresta Estacional Semidecídua em Viçosa, MG. *Revista Árvore (Brasil)* 26(6):743-749.
- PAULA, A. et al. 2009. Florística e fitossociologia de fragmentos florestais no entorno da lagoa Juparanã, Linhares, Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão (Brasil)* 26:5-23.
- PAULA, A.; SOARES, J. J. 2011. Estrutura horizontal de um trecho de floresta ombrófila densa das terras baixas na Reserva Biológica de Sooretama, Linhares, ES. *Floresta (Brasil)* 41(2):321-334.
- PIJL, V.D.L. 1982. *Principles of dispersal in higher plants*. Berlin, Springer-Verlag. 218p.
- REIS, A. et al. 2003. Restauração de áreas degradadas: a nucleação como base para incrementar os processos sucessionais. *Natureza e Conservação (Brasil)* 1(1):28-36.
- REITZ, R. 1988. Euforbiáceas. In: Reitz, R. ed.. *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí, SC, Herbário Barbosa Rodrigues. 377p.
- SECRETARIA MUNICIPAL DE MEIO AMBIENTE DE ITAPETINGA - SMMAI. 2010. *Plano de Manejo do Parque Municipal da Matinha*, Agosto.
- SHEPHERD, G. J. 2010. *Fitopac 2.1*. Campinas, SP, Universidade Estadual de Campinas.
- SILVERMAN, B. W. 1986. *Density Estimation for Statistics and Data Analysis*. London – New York: Chapman & Hall. 175p.
- SOUZA, N. P.; SILVA, E. M. 2013. Aplicação do Estimador de Densidade Kernel em Unidades de Conservação na Bacia do Rio São Francisco para análise de focos de desmatamento e focos de calor. In: *Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, 16°. Foz do Iguaçu. Anais. SBSR, INPE.
- STURGES, H. A. 1926. The choice of a class interval. *Journal of the American Statistical Association*, 21(153):65-66.
- VIEIRA, D. C. M.; GANDOLFI, S. 2006. Chuva de sementes e regeneração natural sob três espécies arbóreas em uma floresta em processo de restauração. *Revista Brasileira de Botânica* 29:541-554. ●

## MÉTODO EMPÍRICO DE PREVISÃO DE SAFRAS DE CACAU

*Lindolfo Pereira dos Santos Filho*

CEPLAC/CEPEC - km 22, Rod. Ilhéus/Itabuna, 45600-970, Ilhéus, Bahia Brasil  
lindolfo.filho@agricultura.gov.br

A produção da lavoura cacaueira da Bahia exerce forte influência no comportamento econômico nacional do setor e, em especial, no dinamismo das economias regionais. Sendo assim, informação confiável é elemento essencial. A Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) se alia aos esforços de obter estimativas confiáveis da produção de cacau da Bahia e com razoável antecedência ajustar ou desenvolver métodos que atendam especialmente a cadeia produtiva do cacau. No presente trabalho analisou-se o uso de uma constante de correção na estimativa da produção de cacau, referida por Zaroni (1981) citando o Informe Técnico da FAO (1967). Determinou-se que essa constante é um indicador da igualdade entre dois tipos de cálculos empíricos da eficiência produtiva dos cacaueiros: o primeiro indicador é a relação entre o fator número médio de frutos adultos por cacaueiro, na safra agrícola *s* e o fator número médio de frutos adultos necessários para obter 1,0 kg de amêndoas secas de cacau na safra agrícola *s*; o segundo indicador é a relação entre o fator produção de amêndoas secas em kg na safra agrícola *s* e a população de cacaueiros na safra agrícola *s*. O emprego da formulação empírica possui vantagem pela sua simplicidade de uso e atende às demandas dos produtores do cacau.

**Palavras-chave:** *Theobroma cacao*, previsão de safras, contagem de frutos

**Empirical method for forecasting cocoa safras.** The production of the cacao plantations of Bahia exerts a strong influence on the national economic behavior of the sector and, especially, the dynamism of the regional economies. Therefore, reliable information is an essential element. The Executive Committee of the Cocoa Plan (CEPLAC) joins efforts to obtain reliable estimates of Bahia's cocoa production with reasonable advance to adjust or develop methods that especially cater for the cocoa production chain. In the present work the use of a correction constant in the estimation of cocoa production, referred to by Zaroni (1981) was quoted in the FAO Technical Report (1967). It was determined that this constant is an indicator of the equality between two types of empirical calculations of the productive efficiency of the cacao trees: the first indicator is the relation between the factor average number of adult fruits, by cacao, in the agricultural harvest and the average number of fruits adults required to obtain 1.0 kg of dried cocoa beans in the sown crop; the second indicator is the relation between the dry almond production factor in kg in the agricultural crop *s* and the cacao population in the agricultural crop *s*. The use of the empirical formulation has an advantage in its simplicity of use and meets the demands of the cacao producers.

**Key words:** *Theobroma cacao*, crop forecast, pod counting

## Introdução

Informação confiável é elemento essencial em qualquer atividade, especialmente na agricultura, onde aos riscos e incertezas são elevados. Na cacauicultura da Bahia não é diferente. Contudo, considerando condições adequadas de crescimento deste cultivo, conforme Zaroni (1981) e Carzorla et al. (1989) o amadurecimento do fruto adulto pode ser predito “com boa precisão” com base no fruto bilro (fruto até 21 dias de crescimento). Neste contexto Zaroni (1981) informou que no Informe Técnico da FAO (1967) se utilizou da equação (1) para previsão de safra de cacau, com quatro meses de antecedência do resultado final da colheita. Entretanto, a constante  $c = 2240$  não foi definida naquele Informe Técnico.

$$Y_f = \frac{A_f}{2240} \times \frac{N_b}{R_f} \quad (Eq. 1)$$

Sendo,  $Y_f$  = previsão da produção de cacau (em libras), correspondente a uma safra  $f$  específica;  $N_b$  = número total de cacaueiros em idade de produzir;  $A_f$  = número médio de frutos que amadurecerão por árvores;  $R_f$  = número de frutos necessários para obter-se uma libra de cacau seco.

Este trabalho objetiva analisar matematicamente a constante da expressão (1).

## Material e Métodos

Para determinar o fator  $c$  utilizou-se a expressão (2) onde  $\bar{a}_s$  – número médio de frutos por cacaueiro na safra agrícola  $s$ ,  $\bar{b}_s$  – número médio de frutos necessários para obter 1,0 kg de amêndoas secas de cacau na safra agrícola  $s$ ,  $A_s$  – produção de amêndoas secas em kg na safra agrícola  $s$  e  $B$  – população de cacaueiros.

$$c = \frac{a_s}{b_s} \times \frac{B}{A_s} \quad (Eq. 2)$$

## Resultados

### 1. Cálculo de $c$

Convencionando a expressão (3) da igualdade das eficiências produtivas para  $X=Y$ ,

$$\frac{\bar{a}_s}{\bar{b}_s} = \frac{A_s}{B}, \quad \text{ou } X = Y \quad (Eq. 3)$$

onde:

$X$  é a relação entre o fator  $\bar{a}_s$  – número médio de frutos adultos por cacaueiro na safra agrícola  $s$ ; e o fator  $\bar{b}_s$  – número médio de frutos adultos necessários para obter 1,0 kg de amêndoas secas de cacau na

safra agrícola  $s$ .  $Y$  é a relação entre o fator  $A_s$  – produção de amêndoas secas em kg na safra agrícola  $s$ ; e  $B_s$  é população de cacaueiros na safra agrícola  $s$ .

Admitindo-se erro provável tanto em  $\bar{a}$  como em  $\bar{b}$ , assim como proximidade de concordância entre os resultados estimados e o real ou de referência, tem-se que:

$$\frac{X}{Y} = c, \quad Y > 0 \quad (4)$$

Ou seja, obtêm-se a expressão (5) de acordo com a expressão (1)

$$\frac{1}{c} \times \frac{a_s}{b_s} = \frac{A_s}{B} \implies A_s = \frac{a_s}{b_s} \times \frac{B}{c} \quad (5)$$

De acordo com a equação (3) ao substituir o fruto adulto sadio ( $\bar{a}_s$ ) pelo fruto bilro ( $\bar{a}_{s'}$ ) a igualdade da Eficiência Produtiva estimada ( $X$ ) e Eficiência Produtiva observada ( $Y$ ) pôde também ser representada da seguinte forma:

$$\frac{\bar{a}_{s'}}{\bar{b}_{s'}} = \frac{A_s}{B}, \quad \text{ou } X = Y \quad (Eq. 3)$$

onde:  $\bar{a}_{s'}$  – número médio de **frutos bilros** por cacaueiro na safra agrícola  $s$ ,  $\bar{b}_{s'}$  – número médio de **frutos bilros** necessários para obter 1,0 kg de amêndoas secas de cacau na safra agrícola  $s$  e  $Y$  é a relação entre o fator “ $A_s$  – produção de amêndoas secas em kg na safra agrícola  $s$  e  $B$  a população de cacaueiros.

## Considerações e Conclusão

A concepção teórica do método da Igualdade das Eficiências Produtivas para estimar a produção de cacau possui vantagem pela sua simplicidade se comparado com métodos semelhantes (Zaroni e Aidar, 1992) e pode atender efetivamente às demandas da cadeia produtiva do cacau. É importante destacar que caso se utilize o fruto bilro (fruto até 21 dias de crescimento) ao invés do fruto adulto (Zaroni, 1981), antecipa-se consideravelmente e de forma confiável o tempo de previsão de safra.

## Literatura Citada

- CAZORLA, I. M.; AIDAR, T.; MILDE, L. C. E. 1989. Perfis do lançamento foliar, da floração, da bilração e de estágios do fruto do cacaueiro no Estado da Bahia, no período 1977/78-1987/88.
- ZARONI, M. M. H. 1981. Previsão de safras de cacau no Estado da Bahia com base no número de frutos do primeiro estágio de frutificação. Piracicaba, SP. Dissertação Mestrado. USP/ESALQ. 157p.
- ZARONI, M. M. H. e AIDAR, T. 1992. Previsão de safras de cacau no Estado da Bahia com base em método de contagem de frutos. Pesquisa Agropecuária Brasileira 27(6):817:833. ●



## AGRADECIMENTOS AOS CONSULTORES CIENTÍFICOS

O sucesso de uma Revista depende não só da boa qualidade dos artigos submetidos para publicação, como também, dos comentários e sugestões dos assessores científicos, de cujos pareceres a Comissão Editorial não pode prescindir em suas decisões.

A revista *Agrotrópica*, através do seu conselho editorial, deseja expressar seu mais profundo agradecimento aos especialistas que, no ano de 2018, colaboraram na revisão de um ou mais artigos a eles enviados pelo editor. A publicação de seus nomes é um testemunho do nosso mais profundo reconhecimento pela sua valiosa colaboração com a revista.

Adonias de Castro Virgens Filho (1) CEPLAC/CEPEC – Ilhéus – BA  
 Alexandre Arnhold (1) UFSB – Itabuna - BA  
 Alfredo Kingo Oyama Homma (1) EMBRAPA – Belém – PA  
 Aline da Silva Bhering (1) Rio de Janeiro - RJ  
 Andrea Carla Dalmolin (1) UFSB – Itabuna – BA  
 Andréa da Silva Gomes (1) UESC – Ilhéus – BA  
 Antônio Alves Pimenta Neto (2) UESC – Ilhéus – BA  
 Antônio Carlos de Araújo (2) CEPLAC/CEPEC – Ilhéus – BA  
 Arlete José da Silveira (2) UESC – Ilhéus – BA  
 Augusto César Vieira Neves Junior (1) UEMA – São Luís - MA  
 Augusto Vaghetti Luchese (1) UTFPR – Medianeira – PR  
 Caio Márcio Vasconcelos Cordeiro de Almeida (2) CEPLAC/CEPEC – Rondônia – RO  
 Carlos Alberto Spaggiari Souza (1) CEPLAC/CEPEC – Linhares – ES  
 Carlos Eduardo Pereira (1) UFSB – Itabuna - BA  
 Carlos Newdmar Vieira Fernandes (1) IFCE – Ubajara – CE  
 Clayton Moura de Carvalho (1) FATECs – Cariri - CE  
 Cleber Novais Bastos (1) CEPLAC/CEPEC – Rondônia – RO  
 Dan Érico Petit Lobão (1) CEPLAC/CEPEC – Ilhéus – BA  
 Daniel Ornelas Ribeiro (1) Itabuna - BA  
 Dilze Argôlo Magalhães (1) CEPLAC/CEPEC – Ilhéus – BA  
 Edna Dora Martins Newman Luz (1) CEPLAC/CEPEC – Ilhéus – BA  
 Fábio Gelape Faleiro (1) EMBRAPA – Brasília - DF  
 Francisco Mendes Costa (1) UESC – Ilhéus – BA  
 George Andrade Sodré (2) CEPLAC/CEPEC – Ilhéus – BA  
 Gisele Lopes de Oliveira (1) UFSB – Itabuna - BA  
 Guilherme Amorim Homem de Abreu Loureiro (1) UAEMéx - Toluca - México  
 Henrique Nunes Parente (1) UFMA - São Luís – MA  
 Ivan Cardoso do Nascimento (1) UESB – Vitória da Conquista - BA  
 Ivan Crespo Silva (1) UFPR – Curitiba – PR  
 Jadergudson Pereira (1) UESC – Ilhéus – BA  
 Jaevesson da Silva (1) EMBRAPA – Cruz das Almas -BA

Janaína de Oliveira Melo (1) UFVJM – Diamantina – MG  
 Janiele Cássia Barbosa Vieira (1) Viçosa – MG  
 Jomar Gomes Jardim (1) UFSB – Itabuna - BA  
 Jomar Livramento Barros Furtado (1) UFMA - São Luís - MA  
 José Inácio Lacerda Moura (1) CEPLAC/CEPEC – Una – BA  
 José Luiz Bezerra (1) UESC – Ilhéus – BA  
 José Mauro da Cunha Castro (1) EMBRAPA – Petrolina – PE  
 José Raimundo Bonadie Marques (1) CEPLAC/CEPEC – Ilhéus – BA  
 José Torres Filho (1) UFERSA - Mossoró - RN  
 Josilda Cavalcante Amorim Damasceno (1) UFRB – Cruz das Almas – BA  
 Juliana Stracieri (1) UESC – Ilhéus – BA  
 Kenia Gracielle da Fonseca (1) EMBRAPA – Brasília – DF  
 Léo Duc Haa Carson Schwartzaupt da Conceição (1) EMBRAPA – Planaltina –DF  
 Livia Santos Lima Lemos (2) UFSB – Teixeira de Freitas - BA  
 Lúcia Massutti de Almeida (2) UFPR – Curitiba – PR  
 Luisa Julieth Parra-Serrano (1) UFMA - São Luís - MA  
 Marcos Vinicius Oliveira dos Santos (1) Itabuna - BA  
 Marcus Vinicius Sandoval Paixão (1) IFET – Santa Teresa – ES  
 Mário de Oliveira Rebouças Neto (1) IFCE – Ubajara – CE  
 Martielly Santana dos Santos (1) UESC – Ilhéus – BA  
 Mirelle Nayana de Sousa Santos (1) Viçosa – MG  
 Nadja Santos Vitória (1) UNEB – Paulo Afonso - BA  
 Nara Georgia Ribeiro Braz Patrocínio (1) CEPLAC/CEPEC – Ilhéus – BA  
 Neyde Alice Bello Marques Pereira (1) CEPLAC/CEPEC – Ilhéus – BA  
 Polyane Novais Pires (1) Ilhéus – BA  
 Quintino Reis de Araujo (3) UESC – Ilhéus – BA  
 Raúl René Melendez Valle (2) CEPLAC/CEPEC – Ilhéus – BA  
 Renato Andrade Teixeira (1) UFG – Goiânia - GO  
 Rodrigo Souza Santos (2) EMBRAPA – Rio Branco – AC  
 Ronaldo Costa Argôlo Filho (1) Itabuna – BA  
 Rones Flaspordes dos Santos (1) Uruçuca - BA  
 Stela Dalva Vieira Midlej Silva (4) CEPLAC/CEPEC – Ilhéus – BA  
 Taina Soraya Muller (1) UFSB – Teixeira de Freitas – BA  
 Thaís Emanuelle Feijó de Lima (1) UFRB – Cruz das Almas - BA  
 Ubirajara Russi Nunes (1) UFSM – Santa Maria - RS  
 Vander Mendonça (1) UFERSA - Mossoró – RN  
 Vanderlei da Silva Santos (1) EMBRAPA – Cruz das Almas -BA  
 Volmir Frandoloso (1) Xanxerê – SC  
 Wellington Souto Ribeiro (1) Viçosa - MG

\*Os números entre parênteses, após os consultores, indicam o número de trabalhos revisados.

## **POLÍTICA EDITORIAL**

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

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

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

Editor Chefe

## **EDITORIAL POLICY**

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

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

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

Editor-in-Chief



