UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

# RESISTÊNCIA DE VARIEDADES LOCAIS DE CACAU A ANTRACNOSE AVALIADA EM MUDAS POR INOCULAÇÃO NATURAL

EUGENIO ENRIQUE TIRADO DELFÍN

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL

SETEMBRO DE 2024

**EUGENIO ENRIQUE TIRADO DELFÍN**

# RESISTÊNCIA DE VARIEDADES LOCAIS DE CACAU A ANTRACNOSE AVALIADA EM MUDAS POR INOCULAÇÃO NATURAL

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

**Área de concentração:** Genética e Biologia Molecular

**ILHÉUS-BAHIA-BRASIL**

**SETEMBRO 2024**

T776 Tirado Delfín, Eugenio Enrique.
Resistência de variedades locais de cacau a antracnose avaliada em mudas por inoculação natural / Eugenio Enrique Tirado Delfín. – Ilhéus, BA: UESC, 2024.
64 f.: il.

Orientador: Ronan Xavier Corrêa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.
Inclui referências e apêndices.

1. Fitopatologia. 2. Cacau – Melhoramento genético. 3. Antracnose. I. Título.

CDD 581.2

**EUGENIO ENRIQUE TIRADO DELFÍN**

# RESISTÊNCIA DE VARIEDADES LOCAIS DE CACAU A ANTRACNOSE AVALIADA EM MUDAS POR INOCULAÇÃO NATURAL

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

**Área de concentração:** Genética e Biologia Molecular

Aprovado em:

Prof. Dr. Raphael Ricon de Oliveira
(UESC)

Profa. Dra. Thais Marcelo Souza
(UESC)

Dra. Ivanildes Conceição Santos
(CIC/Mondelez)

Dr. Ronan Xavier Corrêa
(UESC – Orientador)

# AGRADECIMENTOS

A Deus e à minha família, pela fortaleza sempre concedida.

Ao professor Dr. Ronan Xavier Corrêa, pelo apoio inestimável e incondicional em todas as minhas metas acadêmicas e profissionais.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, por proporcionar um ambiente tão propício para a aprendizagem, a pesquisa e o crescimento profissional e pessoal. Todos os professores e colaboradores são excelentes, e suas convicções, inspiradoras.

À Universidade Estadual de Santa Cruz, pelas oportunidades oferecidas no momento certo.

À Nação Brasileira, à CAPES, à OEA e ao GCUB pela oportunidade de estudos concedida.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização desta conquista.

**ÍNDICE**

## RESUMO

TIRADO DELFÍN, Eugenio Enrique, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, setembro de 2024. **Resistência de variedades locais de cacau a antracnose avaliada em mudas por inoculação natural.** Orientador: Ronan Xavier Corrêa.

Os problemas fitossanitários causados por fungos e oomicetos totalizam as maiores perdas na cacauicultura mundial. Dentre os grandes problemas fitopatológicos do cacaueiro, a antracnose causada por o complexo *Colletotrichum gloeosporioides* apresenta grande relevância, entretanto é pouco estudada. Nesse contexto, a reação de resistência à antracnose foi explorada e quantificada em 20 progênies de polinização livre de variedades locais de cacaueiro da Bahia, pertencentes aos genótipos Comum, Maranhão, Cabeça de Macaco e Parazinho. Os genótipos analisados neste estudo foram previamente selecionados com base em sua variabilidade genética para resistência à vassoura de bruxa, podridão parda e murcha de *Ceratocystis*, sendo ainda necessária a avaliação para antracnose. Essa análise poderá ampliar seu potencial como fonte de resistência múltipla às principais doenças do cacaueiro. O material vegetal foi obtido de seleções de cacaueiro mantidas *on farm,* estabelecendo o experimento em casa de vegetação distribuído sob delineamento inteiramente casualizado, com 24 repetições (mudas) por genótipo, seguindo as devidas diretrizes de manejo para mudas de cacaueiro. Como comparadores, utilizaram-se os clones modernos PS 1319 e CCN 51. Avaliações morfométricas, morfofisiológicas e fitossanitárias foram realizadas de maneira intercalada durante os 5 meses de duração do experimento. Nas análises morfométricas e morfofisiológicas de qualidade de mudas foram avaliadas: altura da parte aérea, diâmetro de colo, número de folhas, índice de robustez e área foliar funcional. Nas análises fitopatológicas, realizou-se a determinação e identificação da doença e de seu agente causal, com a patometria da incidência, progresso da doença, severidade, índice de recuperação vegetativa e percentual de plantas viáveis, por meio de métodos não destrutivos. Os dados foram submetidos a análises estatísticas para dados não paramétricos, incluindo análise de correlação, de componentes principais (PCA) e análise de clusters. C. *gloeosporioides sensu lato* foi identificado como agente causal da infecção natural por meio de isolamento indireto e direto de amostras do material vegetal acometido, determinando como a fonte de inóculo o solo utilizado para estabelecer o experimento, após serem feitas caracterizações culturais e morfológicas micro e macroscópicas dos isolados. Posteriormente, foi registrado e quantificado um progresso da doença propiciado por fatores ambientais, e mediante o desenvolvimento e aplicação de uma escala de notas de intensidade de doença, uma chave de campo e uma escala descritiva dos graus de infecção foi inferida a resistência das progênies. Trinta por cento das progênies avaliadas foram identificadas como resistentes ou moderadamente resistentes à antracnose por *C. gloeosporioides*, as quais podem ser consideradas como potenciais fontes de resistência, e as progênies 2001, 2037, 4054, 4060, 2075, 2076 destacaram-se como superiores. Neste particular, a escala de notas e a chave de campo mostraram-se eficientes para a avaliação fenotípica, e a escala de graus de resistência permitiu catalogar adequadamente as distintas progênies de acordo com suas reações de resistência. A análise conjunta dos dados das distintas avaliações permitiu reportar o efeito da doença e sustentar os resultados obtidos após estimação da reação de resistência, permitindo confirmar a existência de variabilidade genética nos materiais avaliados. Finalmente, foi elaborado um protocolo de revisão sistemática e metanálise para um estudo integrador dos relatos e caracterizações de *Quantitative Traits Loci* (QTL's) para resistência a espécies dos gêneros *Moniliophthora*, *Ceratocystis* e *Phytophthora patogênicas ao* cacaueiro. Nesta revisão, objetiva-se a sistematização do acesso e utilização dessa valiosa informação que potencialmente auxiliará na seleção genômica, após sua extração e sumarização.

**Palavras-chave:** Fitopatologia, Melhoramento genético, Resistência, *Theobroma cacao*, Variabilidade genética.

## ABSTRACT

TIRADO DELFÍN, Eugenio Enrique, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, September of 2024. **Resistance of local cacao varieties to anthracnose evaluated in seedlings through natural inoculation.** Advisor: Ronan Xavier Corrêa.

The phytosanitary issues caused by fungi and oomycetes account for the greatest losses in global cocoa production. Among the major phytopathological challenges affecting cacao, anthracnose caused by the *Colletotrichum gloeosporioides* complex is particularly relevant; however, it remains understudied. In this context, resistance to anthracnose was explored and quantified in 20 open-pollinated progenies of local cacao varieties from Bahia, representing the genotypes Comum, Maranhão, Cabeça de Macaco, and Parazinho. The genotypes analyzed in this study were previously selected based on their genetic variability for resistance to witches' broom, black pod rot, and wilt caused by *Ceratocystis*, yet their resistance to anthracnose has not been assessed. This evaluation may enhance their potential as sources of multiple disease resistance for cacao breeding. The plant material was obtained from on-farm maintained cocoa tree selections, and the experiment was established in a greenhouse, arranged in a completely randomized design, with 24 replicates (seedlings) per genotype, following the appropriate management guidelines for cocoa seedlings. As comparators, the modern clones PS 1319 and CCN 51 were included. Morphometric, morphophysiological, and phytosanitary assessments were performed at alternating intervals over the five-month duration of the experiment. Morphometric and morphophysiological seedling quality analyses included measurements of aboveground part height, stem diameter, number of leaves, robustness index, and functional leaf area. In phytopathological evaluations, disease identification and causal agent determination were conducted, alongside assessments of disease incidence, progression, severity, vegetative recovery index, and percentage of viable plants using non-destructive methods. Data were subjected to statistical analyses for non-parametric data, including correlation analysis, principal component analysis (PCA), and cluster analysis. *C.*

*gloeosporioides sensu lato* was identified as the causal agent of natural infection through both direct and indirect isolation from symptomatic plant material. The inoculum source was determined to be the soil used to establish the experiment, following micro- and macroscopic morphological and cultural characterizations of the isolates. Subsequently, disease progression was recorded and quantified, influenced by environmental factors. Resistance of the progenies was inferred through the development and application of a disease intensity scoring scale, a field key, and a descriptive infection severity scale. Thirty percent of the evaluated progenies were identified as resistant or moderately resistant to anthracnose caused by *C. gloeosporioides s. l.*, which can be considered potential sources of resistance, and the progenies 2001, 2037, 4054, 4060, 2075, and 2076 stood out as superior. Notably, the scoring scale and field key proved efficient for phenotypic evaluation, while the resistance degree scale enabled proper classification of the progenies according to their resistance reactions. The combined analysis of the various evaluations provided insights into disease effects and validated the resistance estimates, confirming the presence of genetic variability among the assessed materials. Finally, a systematic review and meta-analysis protocol was developed to integrate existing reports and characterizations of Quantitative Trait Loci (QTLs) associated with resistance to the genera *Moniliophthora, Ceratocystis*, and *Phytophthora* in cacao. This review aims to systematize access to and utilization of this valuable information, which could potentially aid genomic selection following data extraction and summarization.

**Keywords:** Phytopathology, Genetic improvement, Resistance, *Theobroma cacao*, Genetic variability.

# INTRODUÇÃO

O cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) é uma pequena árvore americana que representa um dos cultivos tropicais mais importantes do mundo por ser a fonte do cacau, a matéria prima que se obtém a partir do processamento das suas amêndoas fermentando-as e secando-as e que são usadas para elaborar o chocolate e diversos subprodutos que sustentam as mais diversas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas. Até 70% dos grãos de cacau do mundo são produzidos na África Ocidental, e o resto se distribui entre Ásia e as Américas (Motilal et al., 2016; Lopes et al., 2022).

Segundo a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira-CEPLAC (2022) e a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação-FAO (2023), o Brasil ocupa a posição de sétimo maior produtor mundial de cacau, com uma produção superior a 270 mil toneladas de amêndoas/ano, com cerca de 600 mil hectares cultivados, 75 mil produtores (60% vinculados à agricultura familiar), e uma cadeia produtiva do cacau das maiores do mundo, com capacidade para o processamento superior a 300 mil toneladas de amêndoas/ano.

Com a produção anual de cacau no Brasil abaixo da capacidade de processamento instalada, as indústrias brasileiras precisam importar amêndoas de países africanos para manter sua estrutura funcionando e, desta forma, o Brasil é o único país que produz e importa cacau; e por estas e outras razões, diferentes instâncias governamentais, em combinação com as da iniciativa privada, vêm unificando e construindo esforços que tem como meta atingir a autossuficiência em produção de amêndoas/ano até 2025 (CEPLAC, 2022).

Para alcançar a autossuficiência em produção de amêndoas no Brasil de um jeito sustentável, o país precisaria propiciar a resolução de diversos problemas que afetam à cacauicultura nacional de um modo progressivo, escalável e em todos os níveis, sendo os problemas fitossanitários representados pelas doenças do cacau uns dos maiores pontos críticos a superar neste caminho.

Neste contexto, não apenas trata-se de incrementar a produção, mas também de reduzir os custos e a poluição ambiental (Borém, Miranda e Fritsche-Neto, 2017). Por tudo isso, a resistência a doenças constitui um dos principais objetivos dos programas de melhoramento da maioria das espécies agronômicas e olerícolas, e os sucessos obtidos nessa área têm sido de grande importância para a estabilização da produtividade das culturas de safra para safra (Borém, Miranda e Fritsche-Neto, 2017).

Mas, antes de fazer frente aos desafios encaixados em incrementar a produção reduzindo a incidência das principais doenças sem acrescentar a poluição por agrotóxicos, há que considerar também como um obstáculo importante o caso de que o cacaueiro é uma espécie arbórea perene com longos ciclos de geração (3-5 anos). Por causa disso, são requeridas extensas áreas experimentais necessárias para realizar qualquer empreendimento. Além disso, esta é uma espécie majoritariamente alógama e, portanto, tendente à heterozigose mostrando alta variabilidade de árvore para árvore (Lopes et al., 2022), em que a segregação genética imprevisível resultante pode gerar dificuldade para a fixação de genes de resistência e estabilização da característica desejada.

Como contribuição para superar as dificuldades inerentes aos estudos genéticos do cacaueiro mencionadas anteriormente, é necessário recorrer-se à análise, estudo e validação de estratégias que têm sido usadas para a seleção de materiais superiores (Gutiérrez et al, 2021), levando em consideração que para o sucesso da cultura do cacaueiro é necessário aproveitar todo seu *pool* genético (Da Silva et al. 2022; Solís et al. (2021). E o aproveitamento de todo o *pool* genético do cacaueiro para a prospecção de materiais superiores resistentes requer sua caracterização, particularmente através de estudos que identifiquem e quantifiquem a resposta de diferentes grupos populacionais da espécie aos principais patógenos que afetam seu desenvolvimento e rendimento.

Como grupo populacional, ressaltam as variedades locais de cacaueiro da Bahia, as quais foram introduzidas há mais de dois séculos na Região Cacaueira de Mata Atlântica da Bahia (Diaz et al., 2023). Portanto, estão aclimatadas às condições locais de cultivo, além de serem consideradas pelos agricultores como produtivas. Por causa disso, se infere que têm um grande potencial para formar parte dos programas de melhoramento focados na resistência a doenças, pelo que a confirmação da existência de plantas resistentes nessas variedades estudadas tem um significado prático muito importante: possibilita realizar melhoramento dentro de cada variedade. Em razão disso, os genótipos resistentes devem ser utilizados para constituir as populações de melhoramento genético e a conservação de germoplasma (Diaz et al., 2023).

Apesar desse potencial, as variedades locais (e todo o *pool* genético do cacaueiro) enfrentam desafios fitossanitários significativos, como as principais doenças: vassoura de bruxa (*Moniliophthora perniciosa*), a podridão parda (*Phytophthora* spp.) e a murcha de *Ceratocystis* (*Ceratocystis cacaofunesta*), seguidas em importância pela antracnose (*Colletotrichum* spp.) e pela monilíase (*Moniliophthora roreri*). Esta última foi introduzida recentemente no Brasil (2021), e atualmente, é considerada uma praga quarentenária pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA, 2024).

Dessa forma, compreende-se que a antracnose representa um dos principais desafios fitopatológicos do cacaueiro no Brasil, sendo, no entanto, uma das doenças menos estudadas em comparação com outras patologias da cultura. A doença é altamente prevalente em regiões com condições ambientais favoráveis para o seu aparecimento e pode ser causada por diferentes patógenos, sendo o gênero *Colletotrichum* o mais relevante. Destaca-se especialmente o complexo *Colletotrichum gloeosporioides*, cuja prevalência pode atingir até 39% em algumas regiões produtoras, como relatado em Camarões (PUIG, 2023 e VILLA-RIVERA et al. 2017). Além disso, espécies de *Colletotrichum* estão entre os endófitos mais comuns nos tecidos do cacaueiro, e acredita-se que esses microrganismos possam se tornar patogênicos sob determinadas condições ambientais e fisiológicas da planta (PUIG, 2023).

Com base nas premissas anteriormente expostas, objetivou-se no presente estudo comprovar e avaliar a existência de variabilidade genética para a resistência à antracnose causada por infecção natural de *C. gloeosporioides s. l.* em condições de casa de vegetação, acompanhada de planificação para compilação de todos os relatos e descrições dos Quantitative Trait Loci (QTL) de resistência a doenças fúngicas e oomicéticas visando auxiliar a seleção genômica.

# REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## O cacaueiro e seus problemas fitossanitários

A árvore do cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma cultura tropical de importância social, econômica e ambiental a nível mundial, por ser a fonte da matéria prima chave na indústria do chocolate e seus derivados (Fister et al., 2020), assim como para outras indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas. Além disso, destaca-se como a principal cultura produzida sob sistemas agroflorestais na África e nas Américas, contribuindo significativamente para a sustentabilidade ambiental (Lima e Rocha, 2020). Portanto, essa cultura não representa apenas uma *commodity* com mais de 5,8 milhões de toneladas métricas produzidas em mais de 50 países e que sustenta milhões de pessoas anualmente (FAO, 2023; Livingstone et al., 2015; Allegre et al., 2012), senão que é um agronegócio que envolve inúmeros serviços ambientais que devem ser preservados e promovidos massivamente (Lima e Rocha, 2020).

Do ponto de vista biológico, o cacaueiro é uma espécie alvo de uma longa história de domesticação e reprodução seletiva (Lopes et al., 2022). Trata-se de uma planta diploide (2n = 20), pertencente à família botânica Malvaceae, com um genoma variando em tamanho de 411 a 494 Mb e com centro de origem na América Tropical, especificamente na floresta amazônica (Motilal et al., 2016; Allegre et al., 2012).

Nesse contexto, o melhoramento genético atualmente é objeto de ativa investigação, ao representar uma estratégia essencial para conferir proteção contra as principais doenças, além de viabilizar aumento da produtividade e a melhoria na qualidade do chocolate (Allegre et al., 2012).

Entretanto, os desafios fitossanitários continuam sendo uma das principais limitações para a cultura. As doenças representam a maior ameaça para a cultura do cacaueiro, sendo que até 40% da safra global anual de cacau é perdida devido ao ataque de patógenos (Ploetz, 2016). Dependendo do contexto, muitos patógenos podem ser considerados como ameaças antigas e/ou emergentes para essa cultura (Marelli et al., 2019).

Os agentes causais de doenças na cacauicultura correspondem tanto a patógenos geograficamente restritos como a globalmente distribuídos, dentre os quais, alguns individualmente, podem ser responsáveis por até 100% de perdas nos plantios afetados (Ploetz, 2016). Ao entendimento desse enorme potencial disruptivo e desafiador das doenças do cacaueiro, deve acrescentar-se que pode ser exacerbado tanto pelas atividades humanas, especialmente para sua disseminação, como pelas mudanças climáticas ou novos ambientes, para a intensificação de ameaças localizadas ou incremento dos seus impactos (Marelli et al., 2019; Singh, Jahagirdar e Sarma, 2021).

De acordo com Ploetz (2016) e Marelli et al. (2019), dentre os fitopatógenos do cacaueiro com distribuições geograficamente restritas, mas consideravelmente disseminados, encontram-se *Ceratobasidium theobromae* no Sudeste Asiático e no Pacífico, *Phytophthora megakarya* e *Cacao swollen shoot virus* (CSSV) na África Ocidental, *Moniliophthora perniciosa* e *M. roreri* na América Latina e no Caribe; e distribuídos globalmente acham-se *P. palmivora* e *Colletotrichum* spp. (Weir, Johnston e Damm, 2012). Além dos gêneros e espécies mencionadas existem muito mais, igualmente patogénicas com impactos maiores ou menores, mas com localizações ainda mais restritas (Ploetz, 2016), destacando nestes últimos a murcha de Ceratocystis, assim como os gêneros *Fusarium* e *Rosellinia;* e *Verticillium dahliae*, causador da murcha-de-verticílio (End et al, 2017).

### O gênero *Colletotrichum* e a antracnose do cacaueiro

No caso de *Colletotrichum* spp., especialmente *C. gloeosporioides*, ele causa a doença conhecida como antracnose, que constitui a principal doença na etapa de viveiro do cacaueiro e uma das mais importantes no plantio definitivo, no que as plantas que são severamente afetadas por este patógeno produzem poucos frutos, de modo que o rendimento é reduzido (Khaeruni et al., 2019).

A distribuição global da antracnose causada por *Colletotrichum* spp, que tem mais de 600 espécies patogênicas, não se restringe apenas a todas as regiões tropicais, senão que também se estende às subtropicais e temperadas, e não unicamente ao cacaueiro, tendo a enorme quantidade de mais de 3200 hospedeiros acometidos, de praticamente todos os grupos botânicos e agronômicos (Weir, Johnston e Damm, 2012; Sharma e Kulshrestha, 2015; Joshi, 2018). Desta forma, *Colletotrichum* spp. é categorizado como o oitavo patógeno mais importante do mundo pelas grandes perdas que ocasiona (Joshi, 2018), e um dos 10 principais patógenos fúngicos em patologia molecular de plantas com base na sua importância científica e agrobiológica (Villa-Rivera et al., 2017).

Esse gênero, segundo o Mycobank (2024) taxonomicamente pertence ao reino Fungi, divisão Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Glomerellales, da família Glomerellaceae, sendo seu único gênero; no que a espécie tipo e a mais representativa inclusive em termos socioeconômicos é precisamente *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo (1882) e que corresponde à fase anamórfica, assexuada ou imperfeita, sendo a teleomórfica, sexuada ou perfeita denominada *Glomerella cingulata* (Cannon et al., 2012; Weir, Johnston e Damm, 2012; Sharma e Kulshrestha, 2015; Joshi, 2018). *C. gloeosporioides* é um saprófito e parasita facultativo, podendo viver dentro do tecido vegetal de forma assintomática como endofítico por longos períodos.

Segundo Weir, Johnston e Damm (2012), como muitos dos táxons aceitos dentro desse clado são morfologicamente mais ou menos típicos do *C. gloeosporioides* e muitas das espécies não podem ser distinguidas de forma confiável usando apenas o Internal Transcribed Spacer (ITS) (Espaçador Interno Transcrito) que é o gene oficial de codificação para fungos, existe atualmente o consenso de agrupá-los no complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides* de acordo às suas definições genéticas com base em filogenias de múltiplos genes, tendo assim 22 espécies e uma subespécie inclusa.

Além disso, os outros maiores complexos de espécies de *Colletotrichum* são o *C. acutatum* (Damm et al., 2012a), o *C. boninense* (Damm et al., 2012b) e o *C. graminicola* (Cannon et al., 2012), até agora só com representantes descritos como endofíticos para o cacaueiro, mas patogênicos para outras culturas.

No cacaueiro, a antracnose também foi relatada sendo causada pelas seguintes espécies do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*: *C. fructicola*, *C. theobromicola* (Weir, Johnston e Damm, 2012), *C. aeschynomenes* (Nascimento et al., 2019), *C. tropicale* (Weir, Johnston e Damm, 2012;Serrato-Diaz et al., 2020), *C. siamense* (Weir, Johnston e Damm, 2012;Mohali-Castillo; Stewart, (2022); (Huda-Shakirah; Mohd, 2023) e possivelmente por outros táxons não designados de *Colletotrichum* sp. pertencentes ao complexo de espécies *C. gloeosporioides.*

Devido à ambiguidade taxonômica, Weir, Johnston e Damm (2012) esclarecem que o nome *Colletotrichum gloeosporioides* é atualmente usado em dois sentidos: um sentido amplo, tanto genética quanto biologicamente, seguindo mais ou menos von Arx (1957, 1970) e Sutton (1992), que inclui todo o complexo de espécies; e outro sentido estrito, que abrange apenas os espécimes que geneticamente correspondem ao epitipo selecionado para este nome por Cannon et al. (2008). Dependendo do contexto, o uso do nome em qualquer dos sentidos pode ser útil. Quando usado em um sentido amplo, ele é referido como o complexo de espécies *C. gloeosporioides* ou *C. gloeosporioides* sensu lato.

Damm et al. (2010) e Menezes (2006) mencionam que dos principais aspectos da macro e micro-morfologia de *C. gloeosporioides* ressaltam as células conidiogênicas (produtoras de conídios) que habitualmente se situam aglomeradas em conidiomas (ou conidiomatas), tipo acérvulos, e também podem ser formadas em ramificações laterais do micélio. Os acérvulos têm forma de disco achatado, subepidérmico, com espinhos ou setas, conidióforos simples e alongados, conídios hialinos unicelulares, geralmente em forma de bastonete. Além disso, tanto as setas (estruturas alongadas, pontiagudas, escurecidas e estéreis), típicas deste gênero, como as células conidiogênicas aparentam ter origem homóloga.

Os conídios produzidos nos acérvulos estão embebidos em uma matriz ou massa mucilaginosa, na que permanecem aderidos, constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água, cuja função, sugere-se, é protegê-los da dissecação, aumentar a eficiência de germinação e de penetração no hospedeiro. Os conídios deste gênero não são estruturas de resistência porque sua viabilidade apresenta redução rápida; embora, em contraposto, o micélio possa permanecer viável por longos períodos em sementes infectadas, em resíduos da planta ou ainda em infecções latentes (Menezes, 2006).

Em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), *C. gloeosporioides* tem crescimento rápido formando colônias concêntricas, de coloração que varia de branco, cinza, verde-oliva, marrom a preto, podendo ocorrer a formação ou não de setores (Menezes, 2006; Pardo-De La Hoz et al., 2016).

Na colonização do hospedeiro, o esporo produz uma hifa germinativa que em contato com a superfície do hospedeiro desenvolve uma estrutura especializada de fixação nomeada apressório, através de um orifício nele é emitido uma delgada hifa infectiva para a infecção do tecido da planta hospedeira. Além disso, o apressório também apresenta função de sobrevivência por ser resistente às condições adversas e de propagação por ser capaz de germinar outros apressórios em cadeia. As estratégias de infecção variam de hemibiotrófico intracelular a necrotrófico subcuticular. Com o avanço do crescimento do fungo no tecido vegetal de folhas, flores e frutos, surgem os sintomas de antracnose (Jayawardena et al., 2021; Menezes, 2006; Pardo-De La Hoz et al., 2016).

Na antracnose por *Colletotrichum* spp. no cacaueiro, na etapa de viveiro ou de mudas, a doença apresenta-se na folhagem, onde as infecções ocorrem principalmente nas folhas novas, que são as mais suscetíveis. Os sintomas iniciam-se com manchas marrom-escuras, visíveis na face inferior, avançando geralmente ao longo do ápice e ao longo da nervura central, até atingir 1/3 das folhas. Estas se enrolam de maneira característica e apresentam aspecto seco, seguindo à desfolhação acontece a morte regressiva da planta de maneira descendente (Hyde, 2009).

Asare et al. (2021) descreve que nas árvores adultas afeta folhas, flores, frutos e galhos jovens, manifestando manchas marrons aquosas e delimitadas em folhas jovens, manchas marrons escuras com margens de halo amarelo em folhas maduras que coalescem até formar grandes lesões, nos frutos ocorre o aparecimento de manchas escuras que podem ter corpos de frutificação laranja (acérvulos) do patógeno (e que aparecem também nas folhas), e as folhas podem permanecer mortas e aderidas nas copas de árvores afetadas e/ou ser acompanhado de desfolha maciça e seca dos galhos, que ficam nus sem frutos ou flores.

A maioria das espécies de *Colletotrichum* são transmitidas tanto por sementes quanto pelo solo. Seus ascósporos podem ser espalhados pelo ar, enquanto os conídios podem ser dispersos por respingos de água, especialmente durante a estação chuvosa (Joshi, 2018).

*C. gloeosporioides* desenvolve-se bem na faixa de pH de 5,8-6,5 e temperatura de 25-28 °C, mas tolera bem os extremos de 10 a 35 °C, sendo as temperaturas mais altas aparentemente favoráveis à infecção, e geralmente não está ativo durante períodos secos, mas passa para o modo ativo quando as condições ambientais se tornam favoráveis, especialmente ante alta umidade ambiental, devido a que a germinação dos conídios ocorre somente na presença de água livre ou em elevada umidade relativa (>90%) (Soares; Lourenço; Amorim, 2008;Menezes, 2006). Para este patógeno os fatores ambientais são decisivos, e a sua relação com a Mudança Climática (MC) é uma preocupação atualmente objeto de ativa pesquisa, igualmente como acontece para outros patossistemas.

Peralta-Ruiz et al. (2023), reafirmam que a MC está diretamente ligada às alterações na incidência e severidade de doenças em plantas, e que é provável que as mudanças climáticas alterem a distribuição geográfica e temporal das doenças das plantas. Consequentemente, novos problemas surgirão, enquanto outros problemas serão reduzidos, tudo a depender de como plantas e patógenos se adaptam às condições ambientais em mudança e como a interação pode ser prejudicial no novo cenário climático. Assim, *C. gloeosporioides* e a antracnose serão altamente influenciados pelos fatores climáticos, mudando seu aparecimento e distribuição, seja aumentando ou diminuindo, de acordo com o cultivo alvo e os seus requerimentos agroecológicos. Além disso, a MC poderia reduzir a efetividade dos agentes de controle biológico para *C. gloeosporioides*, o que poderia constituir um problema significativo em futuros programas de manejo de doenças.

Esses mesmos autores, com base na análise de diversos estudos, explicam que a MC e seus prováveis efeitos em *C. gloeosporioides* e na doença da antracnose sejam possivelmente favoráveis para este patógeno, atendendo especialmente à observação dos parâmetros meteorológicos que preveem a ocorrência de doenças nas culturas como temperatura do ar, umidade das folhas, precipitação e umidade relativa. Devendo também considerar disponibilidade de luz, velocidades do vento, concentrações de dióxido de carbono ($CO_2$), entre outros.

Entre todos os parâmetros, se confere mais atenção à temperatura do ar e a precipitação, pois, são os mais determinantes na regulação do crescimento, desenvolvimento e reprodução de *C. gloeosporioides,* mas outros menos estudados também serão decisivos. Nos estudos analisados por Peralta-Ruiz et al. (2023) e Moraes et al. (2011), destacam os relacionados às concentrações de $CO_2$ atmosférico, fator que é capaz de modular a interação hospedeiro–patógeno e as epidemias de doenças relacionadas, sendo que os resultados analisados são relevantes não apenas para a genética da interação *C. gloeosporioides*–hospedeiro, mas também para a epidemiologia da doença, porque demonstraram que o patógeno pode se adaptar a um novo ambiente; assim, isso pode tornar a expansão da área geográfica de *C. gloeosporioides* mais preocupante, além de propiciar incrementos na suscetibilidade dos hospedeiros das mais diversas formas.

Moraes et al. (2011) detalham que esses fatores contribuem para uma evolução mais rápida e agressiva deste e de todos os patógenos, devido ao aumento da fecundidade, aumento das gerações dos patógenos por ciclo da cultura e microclima mais adequado para o desenvolvimento da doença.

Uma vez que se apresenta as condições ambientais favoráveis e um hospedeiro suscetível, ocorre a infecção, na qual *C. gloeosporioides* possui um modo de infecção hemibiotrófico, onde tanto as fases biotróficas quanto necrotróficas ocorrem em sucessão (hemibiotrofia intracelular e necropatia subcuticular), dispondo de diferentes estratégias para invadir com sucesso as plantas, apesar de suas propriedades antimicrobianas (Joshi, 2018; Gautam, 2014 ; Pardo-De La Hoz et al., 2016; Jayawardena et al, 2021).

Desta forma, os conídios aderem às superfícies das plantas, germinam, produzem tubos germinativos e, em seguida, formam apressórios que penetram diretamente na cutícula, após a penetração, o patógeno se desenvolve sob a cutícula formando uma rede intramural de hifas, antes de se espalharem rapidamente por todo o tecido, com hifas inter e intracelulares, causando morte celular antes da propagação do micélio (Perfect et al., 1999).

A infecção bitrófica de *C. gloeosporioides* se compõe de vários estágios, sendo o desenvolvimento do apressório o que auxilia na fixação, liberação química e enzimática para degradação e penetração da cutícula, levando posteriormente à necrotrofia (Perfect et al., 1999; Joshi, 2018; Gautam, 2014; Pardo-De La Hoz et al., 2016; Jayawardena et al, 2021). Também foi descoberto que, para uma infecção bem-sucedida e a capacidade de causar a doença antracnose por *Colletotrichum*, a produção de metabólitos fitotóxicos é auxiliada pela planta hospedeira e pela espécie de *Colletotrichum*. Ademais, de que exsudam enzimas maceradoras que permitem a infecção bem-sucedida de plantas hospedeiras, como a celulase, que catalisa a degradação das paredes celulares hospedeiras (Joshi, 2018; Gautam, 2014; Pardo-De La Hoz et al., 2016; Jayawardena et al, 2021).

## O melhoramento genético do cacaueiro para a resistência à antracnose e as noções gerais para sua implementação

Uma vez entendido o potencial de *C. gloeosporioides* para ocasionar perdas na cultura do cacaueiro, assim como a eventual intensificação dos seus efeitos pelas mudanças nas condições ambientais, torna-se evidente a importância do melhoramento genético como estratégia crucial no manejo da doença. Desta forma, especificamente sob o enfoque do triângulo das doenças de plantas, o vértice do hospedeiro se torna o centro das atenções no que se denomina controle genético ou varietal das doenças (Moraes et al., 2011).

Moraes et al. (2011) também relatam que o emprego de variedades resistentes no controle genético de doenças de plantas representa um dos mais significativos avanços tecnológicos na agricultura, posicionando-se como o método ideal de controle de doenças, com as seguintes vantagens: baixo custo, fácil utilização pelo produtor, alta eficiência e ecologicamente desejável.

Dantas Neto et al. (2005) ressaltam que para o melhoramento genético do cacaueiro visando a resistência a doenças é necessário identificar novas fontes de resistência, objetivando a ampliação da base genética, sendo fundamental para isso a avaliação fenotípica acurada de populações de mapeamento. O desenvolvimento ou seleção de variedades que comportam um número maior de genes ligados à resistência também é uma estratégia interessante para uma resistência mais estável, durável e efetiva, dificultando o aumento da população e a evolução do patógeno sobre tais materiais.

Segundo Moraes et al. (2011) e Fritsche-Neto e Borém (2012), a estabilidade e durabilidade da resistência é explicada pela classificação feita por Van der Plank (1963), tendo duas categorias: vertical e horizontal. A resistência vertical ou qualitativa tem natureza monogênica ou oligogênica sendo condicionada por um ou poucos genes de efeito maior que não sofrem influência ambiental, e é específica, portanto, pouco durável, mas resulta completa para subconjuntos do patógeno. Esse tipo de resposta depende da interação entre patógeno e hospedeiro. Por outro lado, a resistência horizontal ou quantitativa é poligênica, baseada na presença de genes de efeito menor, é geral e fortemente modulada pela influência ambiental, e, portanto, parcial, sendo considerada como efetiva contra todas as raças do patógeno.

O anterior, se traduz em que cultivares com resistência vertical podem favorecer a evolução rápida de epidemias ante a presença de novas raças virulentas do patógeno no campo, capazes de superar e suplantar a série de genes maiores (genes R) que a controlam, e que só são trazidos à ação por uma raça distinta do patógeno; em contraste com os cultivares com resistência horizontal em que a evolução da doença é mais lenta e mostra resistência mais durável ao patógeno.

Essa rápida ineficácia da resistência vertical, devido às mudanças nas populações dos patógenos, estimulou a concentração de esforços no melhoramento para resistência na obtenção de cultivares não unicamente baseada nestes genes R. Ou seja, concentrando esforços na busca da resistência horizontal, que é medida como o grau de resistência exibido por uma planta a todas as raças ou variantes de um patógeno e, por conseguinte, tende a ser mais estável e durável. Desta forma, diversos componentes específicos de resistência contribuem para reduzir a severidade da doença, porém variam entre espécies e dentro de espécie. Por exemplo, no caso dos genes R de resistência qualitativa, embora possam ser superados, ainda podem contribuir para a resistência quantitativa (Fritsche-Neto e Borém, 2012). Assim, a resistência quantitativa a doenças (QDR) tem sido descrita e entendida como a resistência da planta hospedeira que leva a uma redução na doença, em vez da ausência da doença (St. Clair, 2010).

Fritsche-Neto e Borém (2012) também reafirmam o enorme potencial da resistência varietal, dada sua eficácia e sustentabilidade ambiental para reduzir as perdas econômicas causadas pelas doenças das plantas, e propõem um esquema de implementação de estratégias aplicáveis ao melhoramento para resistência a fungos e oomicetos de maneira geral, concebido para populações de plantas segregantes.

Assim, de acordo com o contexto anterior, e atendendo às considerações de Dantas Neto et al. (2005) e Fritsche-Neto e Borém (2012), parte-se da premissa de que o acesso e a exploração da variabilidade genética contida no germoplasma de uma espécie são fundamentais para se ter progresso no desenvolvimento de novos cultivares, sendo que o processo de melhoramento genético é altamente dependente da amplitude da base genética disponível. Toda vez que no caso da resistência quantitativa, ela caracterizada por uma variação fenotípica contínua e uma herança poligênica complexa, o que torna o melhoramento para um caráter como este bastante difícil. Por isso, para estudar sua herança e identificar genitores superiores para o melhoramento tem sido proposta a avaliação de progênies.

Martins, Shimizu e Ferreira (2020) sinalam que os testes de progênies visam a conservação genética das populações, a determinação da estrutura genética, e do valor genotípico de matrizes selecionadas nestas populações, estimação de parâmetros genéticos, produção de sementes melhoradas e geração de indivíduos para a seleção recorrente, e para o qual, os métodos mais eficazes e confiáveis para a seleção de germoplasma resistentes são, geralmente, aqueles que usam a infecção natural ou inoculação artificial em campo, tomando em conta os escores de doença, que é provavelmente a forma mais eficiente de seleção (Fritsche-Neto e Borém, 2012).

Testes em condições controladas, tais como em laboratório e em casa de vegetação, que oferecem rapidez e precisão na avaliação da resistência, particularmente os efeitos da resistência parcial, em um grande número de plântulas no início do processo de seleção, são úteis e economizam tempo. No entanto, estes métodos precisam ser eficientes em prever as reações dos clones em campo. Também, testes in vitro têm sido usados para avaliar a resistência dos genótipos das plantas cultivadas aos patógenos. Ressalta-se que os testes em plântulas são úteis na eliminação de material suscetível de uma população, havendo correlação entre os ensaios feitos em casa de vegetação e testes de campo (Fritsche-Neto e Borém, 2012).

E devido à sua natureza quantitativa, a resistência geral não pode ser tão facilmente avaliada como a resistência específica, embora a avaliação fenotípica confiável da resistência geral seja importante para programas de melhoramento. No entanto, é especialmente crucial para análises genéticas tais como a detecção e o mapeamento de loci de caracteres quantitativos (QTLs) (Fritsche-Neto e Borém, 2012).

Para o caso das doenças policíclicas, elas têm na sua taxa de progresso o determinante do aumento em severidade (percentagem de doença) na planta afetada. Então se teria como principal objetivo dos cultivares com resistência quantitativa reduzir essa taxa, sendo que as diferenças em intensidade da doença servem para mostrar a efetividade dos cultivares resistentes. Mas é necessário realizar sua quantificação.

Cuoto e Goçalves (2016) detalham que a quantificação de doenças ou patometria objetiva avaliar a intensidade, ou seja, a quantidade de doença numa população de plantas, seus órgãos ou os seus produtos. O que é composto pela incidência e a severidade. A incidência é a proporção ou porcentagem de plantas ou órgãos doentes, e a severidade consiste na proporção ou porcentagem de área ou de volume de tecido doente. A severidade é uma resposta quantitativa, que pode variar em valores contínuos.

Os referidos autores propõem diversos métodos diretos para quantificar a intensidade de doenças, levando em consideração a severidade, nos que o sucesso depende de um esquema de amostragem bem idealizado, da acuidade visual do pesquisador e da correta e profunda utilização da literatura que sustenta o método. Tendo-se então os métodos: a. Medição das dimensões, da área, do volume e, ou, do número de lesões; e b. Utilização de escalas descritivas que podem ser nominais e de graus de infecção, de escalas de notas, aritméticas ou logarítmicas, ou de escalas diagramáticas (chaves de campo).

Dentre as escalas descritivas, as nominais estão fortemente desaconselhadas para sua utilização, devido a problemas de subjetividade e falta de repetibilidade. E as de graus de infecção, resultam úteis ao estar acompanhadas da respectiva descrição e, ou diagramas, e comumente são implementadas para a avaliar a resistência de cultivares de diversas culturas a doenças, pois permitem levantar os valores de reação dos cultivares aos patógenos de interesse (Cuoto e Goçalves, 2016).

As escalas de notas, por sua parte, contêm notas equivalentes a classes de severidade de doença, que são atribuíveis e, posteriormente, convertíveis em porcentuais de severidade da doença. Quando as classes de severidade são estabelecidas seguindo uma progressão aritmética, a escala resulta fácil de usar. Mas o cérebro humano não reconhece os estímulos quantitativos de forma aritmética, com a potencial impossibilidade de distinguir classes muito próximas, pelo que, em geral, as escalas aritméticas não são muito apropriadas (Cuoto e Goçalves, 2016).

Com relação às logarítmicas, Cuoto e Goçalves (2016) recomendam seu uso, por representar a porcentagem de tecido vegetal doente a intervalos variáveis, espaçados suficientemente. Assim, elas resultam mais adequadas por estarem baseadas na escala de Horsfall e Barrat (1945), que atende as características da acuidade visual do ser humano, o que é mais acurado para detectar valores extremos de severidade que valores intermediários. A mesma recomendação e observações fazem quanto às escalas diagramáticas ou chaves de campo, que consistem em representações esquemáticas dos órgãos doentes com diferentes níveis de severidade e que são bastante úteis quando se procede a avaliações no campo.

Partindo desses pressupostos, diante da ausência de estudos prévios e da inexistência de escalas de avaliação e chaves de campo desenvolvidas especificamente para antracnose em mudas de cacaueiro de variedades locais na Bahia, considerando-se conveniente a abordagem direta baseada no uso de uma chave diagramática de campo. Essa escolha pode fundamentar-se na necessidade de um método mais preciso e replicável, considerando que as escalas diagramáticas permitem avaliações mais consistentes em condições experimentais.

Para garantir maior acurácia na quantificação da severidade da doença, a chave diagramática deve ser ajustada aos valores mínimos e máximos de severidade observados, sendo construída a partir da elaboração prévia de uma escala de notas com progressão logarítmica. Essa abordagem se justifica pelo fato de que as escalas logarítmicas apresentam melhor adaptação à percepção visual humana e proporcionam maior precisão na distinção entre diferentes níveis de severidade, especialmente nos extremos da distribuição. Assim, a metodologia adotada assegura uma avaliação mais robusta e confiável da antracnose no cacaueiro, permitindo sua aplicação em estudos de resistência genética e manejo fitossanitário da cultura.

## CAPÍTULO I

## Variability of resistance to anthracnose in local cocoa cultivars in Bahia due to natural infection by *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato*

Variabilidade da resistência à antracnose em cultivares locais de cacau na Bahia por infecção natural por *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato*

Eugênio Enrique Tirado Delfin[1,2], Luiza Silva Santos[3], Félix Ramón Fernández Molina[2,4], Ronan Xavier Corrêa[5*]

[1]Universidade Estadual de Santa Cruz, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, BA, Brasil

[2]Universidad de Los Andes, Departamento de Ciencias Agrarias, Núcleo Universitario Rafael Rangel, Trujillo, Pampanito, Venezuela

[4]Universidade Estadual de Santa Cruz, Programa de Pós-graduação em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos, Ilhéus, BA, Brasil

[5]Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Biotecnologia e Genética, Ilhéus, Bahia, Brasil.

*Corresponding author: ronanxc@uesc.br

Artigo submetido à Ciência e Agrotecnologia em 31/05/2024

### ABSTRACT

Anthracnose has become a concern for cocoa (*Theobroma cacao* L.), a crop of great importance for many countries. In progenies from local varieties of cocoa tree in Bahia, morphometric and phytosanitary parameters or resistance to natural infection of *Colletotrichum gloeosporioides s. l.* were evaluated: aboveground part height (APH), stem diameter (SD), number of leaves (NL), robustness index (RID), and functional leaf area (FLA), incidence, disease progression, severity, vegetative recovery index (VRI),

and percentage of viable plants (PVP). Twenty-four seminal seedlings were used for each of the 20 accessions that correspond to the cultivars locally known as Comum, Maranhão, Parazinho, and Cabeça de Macaco, as well as for the commercial clones PS 1319 and CCN 51. The experiment was set up following a completely randomized design. By means of direct and indirect isolation tests, it was confirmed that *C. gloeosporioides s.l.* was the causal agent of anthracnose, which, in turn, originated from the soil used for the formation of these seedlings. Through correlation, Principal Component Analysis (PCA), and cluster analysis, it was demonstrated that 30% of the accessions of local varieties are resistant or moderately resistant to this disease. The morphometric evaluations allowed us to understand the vigor and reaction of the different progenies against anthracnose, as well as the morphophysiological effects of the disease. Based on pathometric assessments, diagrammatic and descriptive scales were developed to assess the disease intensity and degrees of resistance. Finally, the set of evaluations allowed us to infer which genotypes are promising for use in cocoa breeding for anthracnose resistance.
**Index terms**: Phytopathology, Genetic improvement, Resistance, *Theobroma cacao*, Genetic variability.

**RESUMO**

A antracnose vem-se tornando preocupante para o cacau (*Theobroma cacao* L.), uma cultura de grande importância para muitos países. Em progênies provenientes de variedades locais de cacaueiro da Bahia foram avaliados parâmetros morfométricos e fitossanitários ou de resistência à infecção natural de *Colletotrichum gloeosporioides s. l.*: altura da parte aérea (APH), diâmetro do caule (SD), número de folhas (NL), índice de robustez (RID) e área foliar funcional (FLA), incidência, progressão da doença, severidade, índice de recuperação vegetativa (VRI) e percentual de plantas viáveis (PVP). Foram utilizadas 24 mudas seminais para cada um dos 20 acessos que correspondem aos cultivares localmente conhecidos como Comum, Maranhão, Parazinho e Cabeça de Macaco, bem como para os clones comerciais PS 1319 e CCN 51. O experimento foi estabelecido seguindo um delineamento inteiramente casualizado. Por meio dos testes de isolamento direto e indireto, foi comprovado que *C. gloeosporioides s. l.* foi o agente causal da antracnose, o qual, por sua vez, provinha do solo utilizado na formação dessas mudas. Através de análises de correlação, de Componentes Principais (PCA) e de agrupamento (clusters), demonstrou-se que 30% dos acessos de variedades locais são resistentes ou moderadamente resistentes a essa doença. As avaliações morfométricas

permitiram conhecer o vigor e a reação das distintas progênies frente a antracnose assim como os efeitos morfofisiológicos da doença. Com base nas avaliações patométricas, foram desenvolvidas escalas diagramáticas e descritivas para a avaliação da intensidade da doença e graus de resistência. Finalmente, o conjunto de avaliações permitiu inferir quais genótipos são promissores para uso no melhoramento genético visando resistência do cacau à antracnose.

**Termos para indexação**: Fitopatologia, Melhoramento genético, Resistência, *Theobroma cacao*, Variabilidade genética.

## 1. INTRODUCTION

Anthracnose (antrak "coal" + nosos "disease") is a disease with worldwide distribution and prevalence, with a wide variety of hosts and pathogens capable of causing it. Among them, *Colletotrichum* (tel. *Glomerella*) stands out as the eighth most crucial fungal genus regarding economic losses worldwide. A variety of diseases, including fruit rot, shoot blight, and wilt, are related to *Colletotrichum* species that affect different parts of the plants, such as leaves, flowers, and stems (De Souza Junior et al., 2021; Grice et al., 2023; Saini et al., 2023)

In cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivation, cocoa beans are the source for making chocolate and, therefore, of great commercial importance in tropical countries; a high mortality rate of planting materials is one of the main causes of low cocoa production, a situation in which the genus *Colletotrichum* plays a preponderant role (Takata et al., 2024). To date, all species causing the disease in cocoa registered belong to the species complex *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., which comprises *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. tropicale*, and *C. aeschynomenes*. Additionally, as a possible aggravating factor, several consortia of *Colletotrichum* and other microorganisms have been reported to cause anthracnose, not only in cocoa but also in different crops (Poletto et al., 2024; Takata et al., 2024).

Anthracnose in cocoa, caused by *Colletotrichum* spp., manifests itself as lesions on leaves, fruits, and stems, traditionally being of great importance in the nursery stage and currently having a vast potential to cause significant losses in adult trees in total production, causing outbreaks of sufficient extent and severity to be considered severe and with critical effects (Asare et al., 2021; Takata et al., 2024). This worsening of the disease in crops is increasingly clearly linked to climate change, which, especially with increases in temperature, has a favorable impact on all biological processes of the pathogen, which is why its appearance is expected to be exacerbated (Poletto et al., 2024; Zapparata, 2023).

In order to deal with the anthracnose disease and guarantee cocoa chain sustainability, the genetic control has been reported as the most efficient, sustainable, and promising management strategy for anthracnose, both in cocoa and in other crops, where the characterization and selection of germplasm is a fundamental premise. (De Souza Junior et al., 2021; Grice et al., 2023; Poletto et al., 2024; Takata et al., 2024; Zapparata, 2023). In this context, the present study was carried out to identify the causal agent of anthracnose in progenies of local cocoa varieties from Bahia and, subsequently, to evaluate resistance to natural infection by *C. gloeosporioides s. l.* using non-destructive methods. We developed and applied a disease intensity rating scale, a field key, and a descriptive scale of infection degrees to infer resistance of different cocoa (Couto e Gonçalves, 2016; Vieira et al., 2011; Ling et al., 2017; Thakur et al., 2019). Additionally, we aimed to evaluate the variability of anthracnose resistance in different cocoa accessions previously selected for resistance to multiple diseases, an analysis that may further enhance their potential and prospects as a source of multiple resistance to the main cocoa diseases.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Establishment of the experiment with selected cocoa genotypes

The 20 cocoa accessions used to produce the seedlings used in this study are trees belonging to on-farm breeding populations located in three municipalities in Bahia, with the selection made for proven multi-resistance to black pod – *Phytophthora palmivora* (Mucherino-Muñoz et al., 2021), witches broom – *Moniliophthora perniciosa* (Marssaro et al., 2020) and *Ceratocystis* wilt – *Ceratocystis cacaofunesta* (Diaz et al., 2023), based on their genetic variability.

All 20 progenies of each accession are a product of free pollination, distributed according to the following varietal composition: six accessions of the Comum variety (2011, 2013, 2021, 2025, 2037, 4054), nine from Maranhão (2001, 2056, 2058, 2075, 2076, 2078, 4060, 4065, 4102), one Parazinho (4203), coming from the municipality of Arataca, and four from Cabeça de Macaco (1006, 1007, 1008, 1012), of the municipality Gandu. For each progeny, 24 seedlings or replicates were used, additionally, 24 rooted seedlings of each clonal variety (CCN 51 and PS 1319) were tested because they are widely used in modern commercial plantations in Brazil. The experiment was conducted using a completely randomized design.

Over five months, morphometric and morphophysiological characters associated with seedling quality and pathometric parameters were monitored, with measurements and counts carried out every 30 days. The experiment was conducted in a greenhouse, where the seedlings were subjected to irrigation and fertilization by the recommendations established for cocoa seedlings. Initially, the seeds pre-germinated in water for 48 hours were sown in 280 $cm^3$ tubes containing a substrate of a 1:1:1 mixture of organic soil, clayey soil, and commercial substrate tropstratum forest. These three materials were fertilized with N, P, and K and homogenized. After 45 days, the seedlings were transferred to plastic bags filled with 2.5 L of this same substrate. The application of foliar fertilizer and insecticide was carried out every 60 days. Irrigation was carried out daily by sprinkler.

The seedlings were transferred to the bags in December 2023 and evaluated until May 2024 at the Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia. Additionally, the clonal cultivars PS 1319 and CCN 51 were evaluated for phytosanitary and pathometric parameters of *C. gloeosporioides* infection and used as comparators.

The selection of the described comparators is justified by the lack of references in the literature identifying cultivars as formally classified as susceptible or resistant to anthracnose caused by *Colletotrichum*. Based on the performance of these modern clones, it is inferred that they exhibit appropriate resistance patterns to foliar fungal diseases, given their long-standing interaction with cocoa cultivation in the region. Notably, the CCN 51 clone, recognized for its performance, will be used as the resistance standard, while PS 1319 will serve as the susceptibility standard.

### 2.2 Assessment of morphometric and morphophysiological characteristics of seedling quality

The selected morphometric and morphophysiological seedling quality traits, as components of vigor analysis, were: aboveground part height (APH), stem diameter (SD), number of leaves (NL), robustness index (RID), and functional leaf area (FLA) as defined by Santos et al. (2017), Aguiar et al. (2005), and Cherobini, Muniz, and Blume (2008). These measurements were conducted *in situ.*

The aboveground part height (APH) was expressed in centimeters (cm) from the substrate level to the apical meristem with the aid of a graduated stainless-steel ruler. The stem diameter (SD) was measured at the substrate level with a digital caliper and expressed in millimeters (mm). The leaves were directly counted, and the robustness index was calculated by dividing the height of the plant by the diameter of the stem.

The functional leaf area refers to the portion of the leaf surface that is physiologically active and directly involved in processes such as photosynthesis, respiration, and transpiration, indicating the plant's capacity to capture light and perform gas exchanges efficiently (Winter and Ohlrogge, 1973; Lales et al., 2008).

Based on this assumption, the functional leaf area conservation rate was quantified for each progeny, as the estimation of the percentage of functional leaf area relative to the total foliage provides a quantification of the actual contribution of the leaf area to the plant's physiological processes, rather than just its total physical dimension. This was possible because healthy tissue is easily distinguishable from diseased tissue by the contrast of its green color with the yellow and brown colors of the diseased tissue.

The number of leaves in diseased plants is a quantitative morphometric indicator that does not effectively allow for inferences about the impact of the disease and the condition of the host plants, as plants may lose leaves very late, and therefore, the count may include non-functional leaves that are still attached to the plant.

For its quantification, a direct visual estimation of the non-diseased tissue area of the leaves was carried out, based directly on the perception of the unaffected area, following the methodology described in Nita et al. (2008). This method did not require external physical control, but instead used as a comparator the seedling from the progeny with the highest number of leaves and the lowest severity score.

According to the nature of this study, the methodology used in Nita et al. (2008) was selected, as they demonstrated high reliability and accuracy in visual severity estimates, specifying its composition as a valid and effective approach comparable to the use of software for functional leaf area quantification.

### 2.3 Assessment of phytosanitary and pathometric characteristics

*Detection of the disease and characterization of symptoms and signs*

Interspersed and concomitantly with the measurement surveys of morphometric characters, daily monitoring was carried out during irrigation, and systematic measurements were carried out every seven days, which allowed tracking of the phytosanitary status of the seedlings, taking records from the first symptoms. Based on these observations, the determination of the existence of a phytopathological problem was complemented with a review and comparison with that described in the literature as indicated (Menten, 2016).

*Isolation of putative fungal pathogens*

After determining the biotic nature of the disease, indirect and direct isolation were performed from a leaf with advanced symptoms, collected randomly from a diseased plant in each progeny, as well as from the PS 1319 and CCN 51 clones, following the methods described by Couto and Gonçalves (2016). To distinguish and rule out the presence of endophytic microorganisms in indirect isolation, it was also carried out on healthy leaves of plants that were still visibly healthy.

*Isolate processing*

The different microorganisms found in the isolations were initially categorized according to their frequency of appearance, with monosporic cultures being established for all of them for their morphological and cultural characterization. A preliminary screening was applied in the same way as in De Souza Junior et al. (2021) for identification based on the morphological characteristics of colonies and conidia, with the help of the previous specifications (Gonçalves et al., 2022).

*Cultural and morphological characterization*

For the cultural characterization of the most frequently occurring fungal isolate, colonies were cultured on Potato Dextrose Agar (PDA) medium and incubated at 28 ± 5°C. Daily assessments were made of the color of the front, back, and center of the colony, the texture of the mycelium, the shape of the colony, conidial masses, the size and shape of the conidia, and the diameter of the colony (Trinidad-Ángel et al., 2017).

Once the entire Petri dish was covered and the maximum sporulation rate was observed, observations were carried out using a stereoscopic magnifying glass. Furthermore, microbiological slides were prepared according to the previous guidelines (Gonçalves et al., 2022) to carry out the morphological characterization of the species by observing reproductive structures. Such structures were visualized under an optical microscope, and the shape and size of the conidia were evaluated according to the identification key proposed for the species of the *C. gloeosporioides* complex (Weir; Johnston; Damm, 2012).

*Pathogenicity Test*

For the pathogenicity test, an inoculum was obtained from a 7-day-old monosporic culture, morphologically categorized as *C. gloeosporioides sensu lato*, corresponding to the most frequently detected microorganism, and incubated in PDA medium at 26°C. The surface of the plate was scraped with a Drigalski loop containing 10 mL of autoclaved distilled water. After filtration through filter paper, the resulting suspension was reserved in a conical centrifuge tube. The purified had a concentration of $1.1267 \times 10^7$ spores, diluted until obtaining a spore suspension at a concentration of $1.0 \times 10^6$/mL, determined using a Neubauer camera.

The pathogenicity test was carried out in a greenhouse for eight days, under conditions of maximum temperature of 39°C and minimum of 26°C, with a 12-hour photoperiod. Healthy seedlings with asymptomatic leaves of the same age and varietal constitution used in the study were used in 288 $cm^3$ conical tubes, with progenies 2037, 2075, 2076, 4060, 4065, and 4203 selected based on their contrasting reactions manifested under natural infection.

The material was distributed in six blocks with three replications and a control. In all of them, the marked leaves were wounded at two equidistant points with the aid of a sterilized puncture needle. The inoculation method was used by spraying the spore suspension, in which the controls were sprayed with autoclaved distilled water and placed with sufficient spatial separation to avoid any possible secondary infection. Finally, to form the humid chamber for 72 hours, moistened autoclaved cotton was placed at the base of the stem and covered with moistened five-liter plastic bags on wireframes that acted as support.

New indirect isolations from the lesions observed were carried out to comply with Koch's Postulates.

## 2.4 Proof of the origin of the inoculum

To prove the origin of the *C. gloeosporioides s. l.* inoculum from the soil used to establish the seedlings, with representative samples preserved from that same soil, an adaptation of the method was implemented to isolate pathogenic microorganisms based on the use of baits from different tissues of the host plant (Brito et al., 2019).

The test was distributed in three blocks to isolate the pathogen, with three replications and a control. For all blocks, the soil was distributed in transparent plastic boxes of the gearbox type (100g/box), moistened to field capacity with autoclaved sterilized water, followed by the deposition of leaf tissue fragments from healthy seedlings belonging to one of the progenies of cocoa proven susceptible to the *Colletotrichum* species in the present study. The distribution in blocks corresponded to the arrangement of the leaf tissue, which was made as follows: one block with leaf discs measuring 15 mm in diameter, another with quadrangular leaf sections measuring approximately 9 $cm^2$, and finally, whole leaves. In all cases, the same autoclaved soil was used as a control.

Indirect isolation was performed in the PDA medium when necrotic symptoms were detected. Among the isolates, with the one morphologically compatible with *C. gloeosporioides s. l.*, a pilot test was applied to prove pathogenicity in the same susceptible variety.

**2.5 Disease assessment**

Subsequent to the determination and identification of the disease and its causal agent, using the technical and procedural guidelines of (Couto; Gonçalves, 2016), (Menten, 2016), (UNESP, [n.d.]), and (Almeida de Moraes, 2024), disease pathometry was performed on the seedlings to evaluate and compare the different progenies under study regarding the intensity of the disease. This involved measuring the incidence, disease progression, severity, vegetative recovery index (VRI), and percentage of viable plants (PVP).

The incidence was evaluated through surveys every 30 days, counting the number of diseased seedlings in each progeny and calculating their proportion. Simultaneously, using such data, it was possible to establish the progress of the disease in the entire population, correlating it with the climatic conditions in agreement with previous guidelines (Ferreira et al., 2024)

In the case of severity, it was evaluated successively between 120 and 150 days after transplanting (DAT) when the incidence reached 100% in all progenies, measuring the proportion or percentage of both diseased plant tissue and defoliation.

Due to the lack of previous studies and rating scales and field keys developed for anthracnose in cocoa seedlings of local varieties in Bahia, we opted for the direct assessment using a diagrammatic field key adjusted to the minimum and maximum disease values observed and constructed from the previous elaboration of a logarithmic grade scale, as proposed by Vieira et al. (2011) in studies of *Leucoptera coffeella* Guérin-Mèneville in conilon coffee tree (*Coffea canephora* Pierre). The detected severity values were converted into a descriptive scale, allowing the establishment of infection degrees to measure the different reaction levels of the progenies and assess resistance, following the methodologies of Ling et al. (2017) and Thakur et al. (2019).

As in Vieira et al. (2011), the logarithmic rating scale and the diagrammatic field key are based on adaptations of the Horsfall and Barrat scale based on Weber and Fechner's law of visual acuity, obtaining 6 levels of disease intensity, from 0 to 5, where 0 is the lowest level or value of the disease, and 5 is the maximum value.

These levels, in turn, allowed the categorization of seedlings into six degrees of resistance according to the descriptive scale of infection by Ling et al. (2017), with an enlargement made based on the method established by Thakur et al. (2019). According to the adaptation of this scale, the degrees defined for classifying the resistance reaction were: 0 – highly resistant (HR), 1 – resistant (R), 2 – moderately resistant (MR), 3 – moderately susceptible (MS), 4 – susceptible (S), and 5 – highly susceptible (HS).

The VRI of each progeny was quantified, regardless of the disease stages individually presented in each seedling. VRI is a parameter used in the epidemiological modeling of infectious diseases, which corresponds to the proportion or percentage of recovering seedlings among the total accumulated diseased seedlings (Acosta, Ramírez, and Albertazzi, 2007; Alegría et al., 2015), and is additionally used in evaluations that measure incidence and severity, mainly because it constitutes an indicator of tolerance in perennial crops (Alegría et al., 2015), as a higher VRI means less negative effect on the production (of seedlings) (Chinchilla et al., 2007).

To determine what technically represented a seedling in vegetative recovery, a condition that can be natural or induced, considering in this case the induced by the application of chemical defensives, those diseased seedlings were considered where apical or lateral leaf shoots of healthy sprouts occurred after the application of the selected fungicide for disease remission, with the maintenance of such healthy sprouts for more than 15 days, and therefore no extension of infection to the new photosynthetic tissue, in addition to the maintenance or no reduction of more than 50% of the functional leaf area in the affected leaves with visible symptoms (Acosta, Ramírez, and Albertazzi, 2007; Alegría et al., 2015; Chinchilla et al., 2007). In the last condition, in the case of leaf loss induced by the fungicide, the functional leaf area of leaves with more than 75% of the blade diseased was disregarded.

The accumulated percentage of viable plants (PVP) (seedlings) was quantified for each progeny, obtained from the remaining total seedlings minus the physiologically dead seedlings and those with descending death. For the marker's formulation, a physiologically dead plant was defined as a seedling without recognizable green wood externally up to the plant's collar level. Additionally, seedlings with descending death were considered physiologically dead, as it was found during the entire follow-up of the experiment that this condition was irreversible and led to the plant's death.

In the study by Yamada (2015), when evaluating the percentage of dead plants in a definitive field planting, it was concluded that the percentage of viable plants is a reliable and relevant indicator in selecting parents that confer resistance and in evaluating the efficiency of crosses.

### 2.6 Statistical and analytical procedures

From the morphometric, morphophysiological, and phytosanitary data of the 20 genotypes of local varieties from Bahia and the comparators PS 1319 and CCN 51, some variables were assessed with 24 repetitions (APH, SD, NL, RID, and Severity), while others considered only the means (FLA, PVP, and VRI).

The initial statistical analysis included descriptive statistics to characterize the data, followed by normality tests (Shapiro-Wilk) and homogeneity of variances tests (Levene) to check for parametric assumptions. Given the non-normality and heteroscedasticity observed, non-parametric statistical methods were chosen for genotype comparison. Additionally, a correlation matrix was built, and a Principal Component Analysis (PCA) and cluster analysis were performed.

The analyses were conducted in RStudio (version 2024.12.0.467) with the R programming environment (version 4.4.2), using specific packages for descriptive statistics, assumption tests, and graphical visualization.

The correlation between variables was analyzed using the Spearman coefficient, which measures the monotonic relationship between two variables and is the appropriate method for non-parametric data when normality and homogeneity of variances assumptions are not met. The significance level adopted was $p < 0.001$. The correlation matrix was represented by a correlation heatmap, highlighting the significant correlations.

Correlation values range from -1 to +1, where positive values indicate a direct relationship between variables, while negative values indicate an inverse relationship. The color scale ranges from blue (positive correlations) to red (negative correlations). Darker colors indicate stronger correlations (positive or negative). Only correlations with $p < 0.001$ were highlighted.

For PCA, the function *prcomp*() in R was used, which performs a data decomposition by calculating the principal components that explain the most variability. The technique involved constructing linear combinations of the original variables, so the principal components (PCs) were ordered by the amount of variance they explain, based on the cumulative explained variance. A scree plot was generated, showing the variance explained by each component. The "elbow" in the plot indicated the point where the additional variance brought by new components became minimal. Based on this criterion, the first two components were retained, as they together explained about 80% of the total variability of the data.

Subsequently, from the singular value decomposition of the standardized data matrix, using the correlation matrix to avoid scale effects between the variables, the PCA biplot was generated.

The analysis involved obtaining the eigenvalues and eigenvectors of the matrix, allowing for the transformation of the data into a new dimensional space. The principal components were determined based on the explained variance, and the coordinates of observations and variables in the biplot were calculated from the linear combinations of the original variables. This approach allowed visualizing the relationship between genotypes and variables, facilitating the interpretation of variability patterns in the data.

The biplot was generated to visually represent the principal components and how the variables and genotypes are distributed in the principal component space, observing both the dispersion of observations (genotypes) and the direction of the variables in the new dimensional space.

In the plot, the points represent the genotypes (progenies), and the lines represent the variables. The proximity of variables on the lines indicates a positive correlation between them, while the direction of the lines shows the contribution of each variable to the principal components. Genotypes that are close to each other in the plot have similar characteristics in the analyzed variables.

Cluster analysis was performed based on the dissimilarity matrix between genotypes, calculated from the standardized Euclidean distance. Hierarchical cluster analysis was carried out to group progenies based on their similarities. The grouping was done using the agglomerative linkage method with the Euclidean distance. The generated dendrogram allowed a clear visualization of the genotype groups with similar characteristics.

The Ward's linkage method was applied because it tends to produce compact clusters, minimizing the sum of squared differences within each group. The clustering performed by Ward minimizes the intra-group variance at each cluster merging, ensuring the formation of more homogeneous groups. The dendrogram was generated to visualize the hierarchical structure of the clusters, allowing identification of patterns of similarity between genotypes. The optimal number of clusters was defined based on the dendrogram cut-off criterion, considering the greatest variation in the height of the merges. This approach allowed the identification of groups with similar characteristics or similar performance.

Finally, integration with PCA was made, where the dendrogram was superimposed on the PCA biplot, allowing observation of how the groups formed by the cluster analysis are distributed in the principal component space. The goal was to identify which progenies belong to similar groups and how these groups relate to the variables explaining the variability.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Descriptive statistics of the experiment

The descriptive statistical analysis allowed the characterization of the distribution of the data collected from the 22 cacao genotypes, considering measures such as mean, median, standard deviation, minimum and maximum values, and coefficient of variation (Table 1). The results indicated significant variation among the genotypes for the analyzed variables, reflecting the phenotypic diversity present in the experiment. The high variation coefficients observed are consistent with those typically found in experiments assessing natural infection (Leite et al., 2013).

### 3.2 Phytosanitary parameters

Periodic phytosanitary assessments made it possible to monitor the appearance of a single important phytopathological problem, which was initially characterized by presenting symptoms commonly associated with physiological disorders or of abiotic origin with sporadic and inconsistent manifestation.

Subsequent epidemiological analysis allowed it to be associated with anthracnose, although initially, the disease manifested a mixture of atypical and typical symptoms and signs (Figure 1), which made a differential diagnosis difficult. Only when the disease showed a spread consistent with infectious disorders was it reviewed and compared with the symptoms described in the literature to definitively identify it.

**Table 1. Descriptive Statistics of the Experiment**

| | APH | SD | NL | RID | FLA | VRI | PVP | Severity |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Mean** | 27.39 | 6.21 | 7.95 | 3.74 | 40.77 | 52.87 | 69.70 | 3.94 |
| **Standard dDeviation** | 14.53 | 2.92 | 6.24 | 1.81 | 31.56 | 37.81 | 31.57 | 1.40 |
| **Standard eError** | 0.63 | 0.13 | 0.27 | 0.08 | 1.37 | 1.65 | 1.37 | 0.06 |
| **Maximum** | 60.6 | 10.08 | 29.0 | 8.47 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 5.0 |
| **Minimum** | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| **Coefficient of Variation (%)** | 53.05 | 47.07 | 78.48 | 48.42 | 77.43 | 71.52 | 45.29 | 35.69 |

APH: aboveground part height; SD: stem diameter; NL: number of leaves; RID: robustness index; FLA: functional leaf area; VRI: vegetative recovery index; PVP: percentage of viable plants.

In many cases, it began with dark brown or reddish necrotic spots surrounded by a chlorotic halo, visible on both the abaxial and adaxial sides of the leaf. The spots generally advanced towards the apex and avoided the central vein until reaching 1/3 of the leaf, where they curled in a characteristic way and presented a dry appearance.

Also, on many occasions, the spots appeared anywhere on the leaf, similar to sunburn. In most cases, as the only observable sign in the dry-looking tissue, dark spots with fungal reproductive structures were formed on the abaxial face of the leaf. These spots were easily identifiable as not belonging to members of the *Colletotrichum* genus when observed using a stereoscopic magnifying glass. These dark spots were not observed in leaves that fell due to natural senescence, so it was possible to associate them with opportunistic necrotrophic microorganisms instead of saprophytic ones.

The disease often caused older leaves to fall and induced the sprouting of new leaves that also became ill. These leaves withered until total defoliation of the plant caused descending death characterized by rapid advancement.


Figure 1. Overview of the main types of symptoms in cocoa seedlings. A. Typical rapidly advancing necrosis that begins at the leaf apex. B. Atypical leaf damage caused by the infection, similar to several micronutrient nutritional deficiencies. C. Necrotic tissue with manifestation of atypical signs not associated with *C. gloeosporioides*. D. Initiation of typical die-back (according to descriptions in the literature). E. General appearance of progeny widely affected by *C. gloeosporioides* infection.

After determining the presence of anthracnose, indirect and direct isolations showed the appearance of isolates morphologically and culturally compatible with *C. gloeosporioides sensu lato* in all progenies, individually or in combination with other diverse microorganisms, some of them morphologically and culturally candidates to be identified as belonging to the genera *Guignardia*, *Cladosporium* and the *Pestalotiopsis* complex, based on the screening carried out for a first macro and microscopic characterization (Supplementary material 1). In comparators PS 1319 and CCN 51, only isolates of *C. gloeosporioides s. l.* were found.

The consortium of microorganisms found in the samples was unknown, and its role in the *C. gloeosporioides s. l.* infection described here was unknown; only a statistical correlation was established that allowed us to identify that in the most affected progenies, the greatest biotic diversity was found in the indirect isolation carried out, particularly in the progenies belonging to the cultivating Cabeça de Macaco.

In terms of cultural and morphological characterization, *C. gloeosporioides s. l.* colonies coincided with results from Tozze Junior et al. (2015), revealing in its macroscopic characteristics (Figure 2), the mycelium on the back is creamy-white to gray with an orange center and white edges, with the mycelium being abundant, compact and fuzzy, with abundant orange-salmon conidial masses, with concentric distribution; the reverse was cream-colored alternating with dark brown concentric stripes. The conidia were straight, hyaline, unicellular, oblong and with rounded apices.

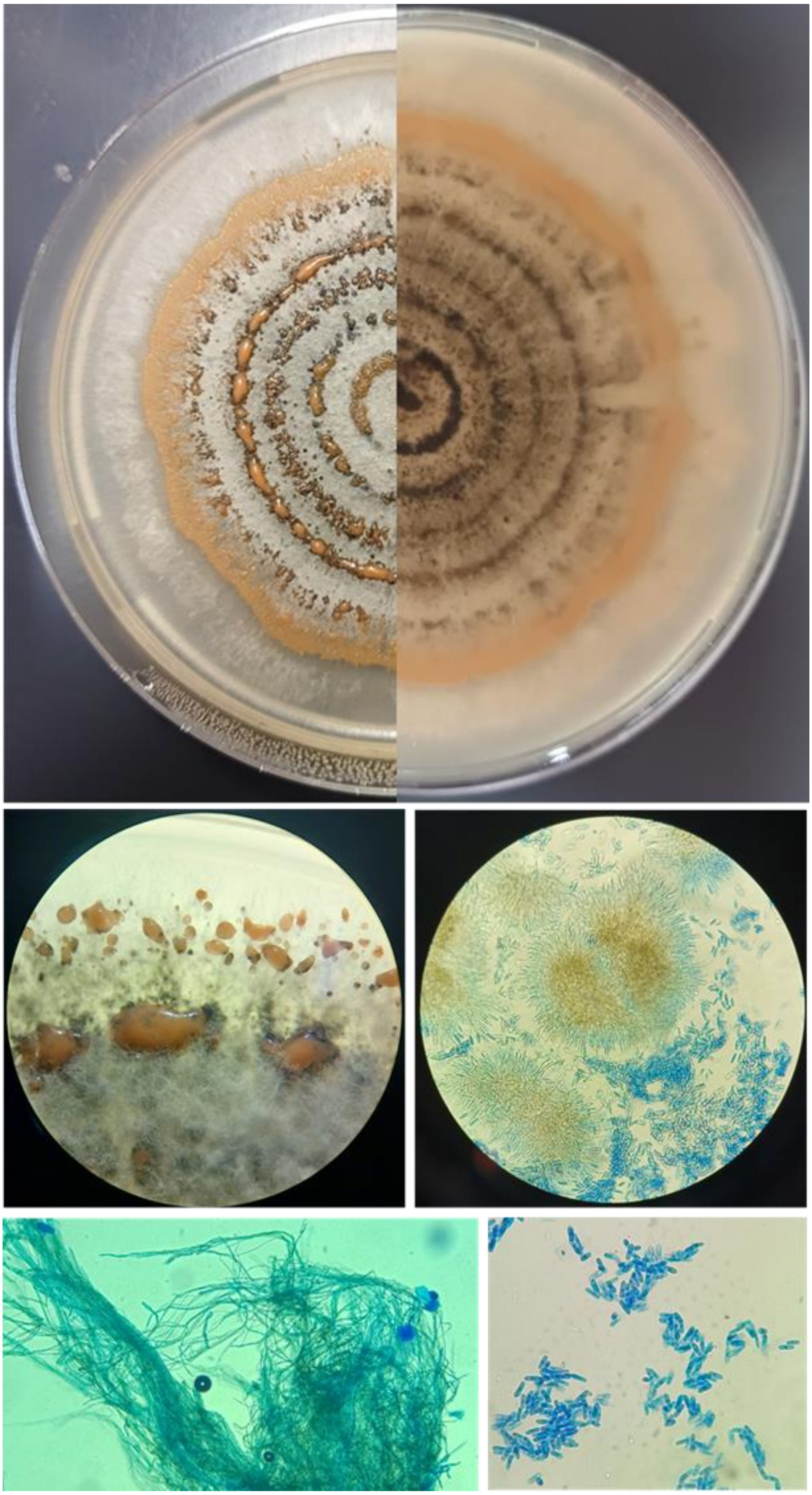

Figure 2. Morphocultural characteristics of the pathogenic isolate of *Colletotrichum gloeosporioides s. l.* identified in the present study. A-B. Culture in PDA at seven days

of age (A-verse, B-reverse). C. Colony sporulating in PDA, with orange conidial masses highlighted. D-Conidiophore and conidia. E- Mycelial mass. F- Conidia.

The pathogenicity test implied compliance with Koch's Postulates, revealing the appearance of the disease's characteristic symptoms in all sets of plants used. The disease was detectable in all wounds made six days after inoculation, with the occasional manifestation of necrotic spots surrounded by chlorotic halos without coalescing. In the case of younger leaves, the pathogen caused damage without a wound.

The method of Brito et al. (2019) allowed confirmation that the soil used to propagate the seedlings and clones was the source of the *C. gloeosporioides s. l.* inoculum. The whole leaf method generated results at the earliest possible time, after ten days of exposure, with the greatest consistency in the appearance of necrotic symptoms for anthracnose and isolates morphologically compatible with established cultures from leaf lesions. In controls, there was no appearance of necrotic symptoms or growth in subsequent indirect isolation. The pilot pathogenicity and re-isolation test proved the isolate's ability to cause the appearance of the same symptoms detected in the seedlings, in compliance with Koch's Postulates.

## 3.3 Disease assessment

### 3.3.1 Incidence and progress of the disease

The progress of the disease began with a slow and sporadic appearance in the first 60 days after the transplant DAT (December – January, and January – February), without the apparent influence of the temperatures recorded in that first quarter of the year 2024, and showing a low incidence in most progenies.

Subsequently, in March, from 60 DAT the incidence increased continuously until finally reaching between 98 and 100% in all progenies at 150 DAT, showing itself to be highly influenced by the increase in environmental temperature since Climate records allow us to explain the behavior observed in the curve shown by the disease, where the point of greatest spread and appearance of symptoms coincides with the period of highest temperature recorded for the area by CPTEC (2024), which is observable in Figure 3.

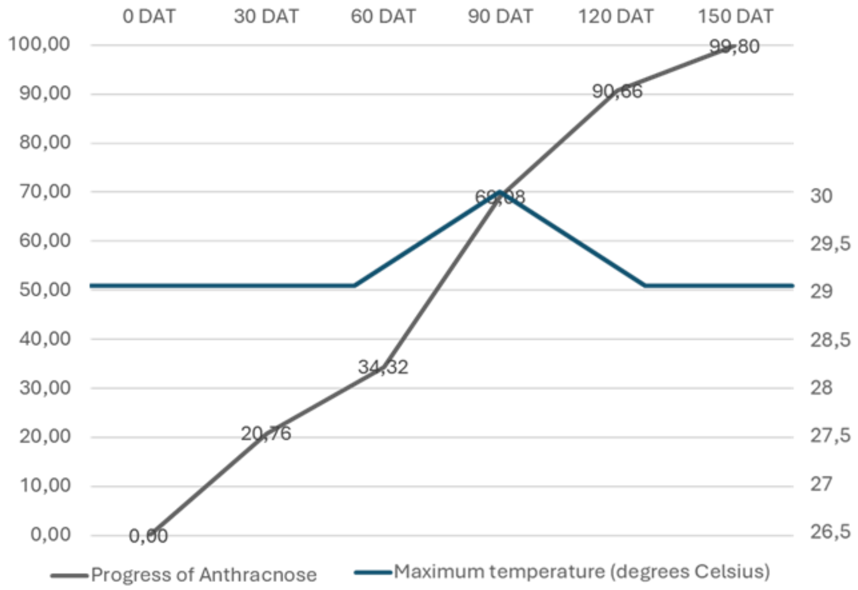


Figure 3. Incidence of the anthracnose disease in cocoa seedlings over time (curve with numbers) and increase in ambient temperature during the experiment.

### 3.3.2 Severity

The rating scale and classification degrees of the resistance reaction made it possible to generate robust criteria for analyzing different cocoa genotypes' resistance (Figura 4). Below is represented this logarithmic rating scale for evaluating disease intensity and the diagrammatic field key for anthracnose by *C. gloeosporioides s. l.* with the 6 intensity levels defined for the disease applied to each seedling of the progenies of local cocoa varieties in Bahia, representing 0% to 100% damage to leaf tissue and defoliation; which at the same time illustrates the 6 degrees in which it was possible to classify the resistance reaction of each seedling, and subsequently the progenies. The field diagram key was obtained by applying chromatic stylization to the logarithmic scale. The colors were adjusted to enhance certain tones and contrasts, with the aim of highlighting disease patterns through saturation and high contrast.

The scale allowed for the non-destructive quantification of the disease, generating values for each seedling that were used in a correlation analysis, followed by a Principal Component Analysis (PCA), and then integrated with a cluster analysis to classify the genotypes based on their resistance reaction.

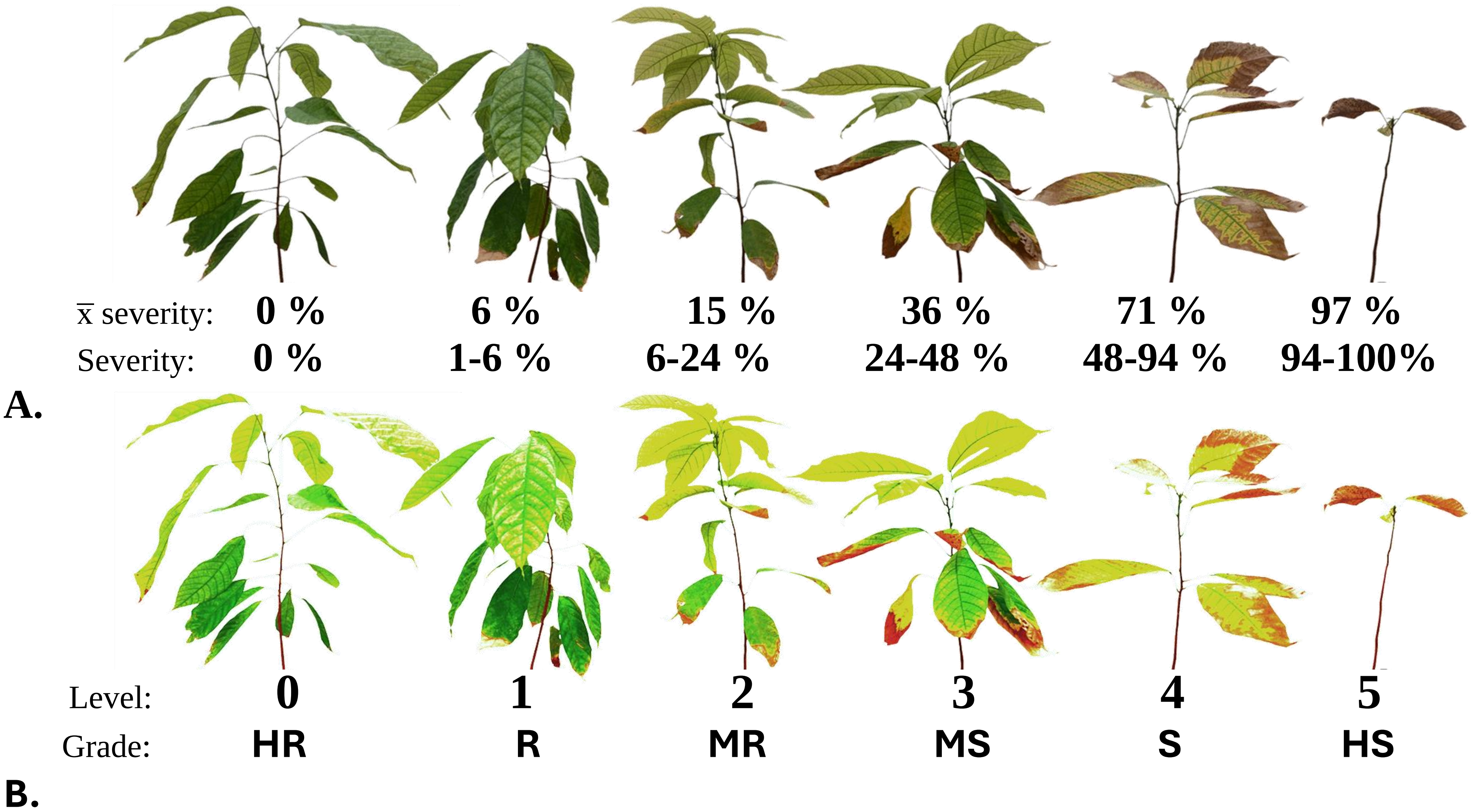


**Figure 4. A.** Logarithmic scale to assess anthracnose intensity, showing the average severity and severity (range of percentages of affected leaf surface covered), and **B.** Field key diagrammatic with disease intensity levels detected in seedlings and the assigned resistance reaction grades: 0highly resistant (HR); 1 resistant (R); 2 moderately resistant (MR); 3 moderately susceptible (MS); 4 susceptible (S); and 5 highly susceptible (HS).

### 3.3.3 Correlations, principal components, and clusters

In the correlation matrix (Figure 5), all morphometric and morphophysiological traits showed a negative correlation with the severity of anthracnose (the main phytosanitary indicator), indicating that the overall growth and development state of the seedling strongly influences the resistance response of the local varieties to this disease.

As expected, the correlation matrix revealed a strongly negative correlation between the conservation of the FLA and severity, followed by the number of leaves, both cases biologically expected since it is a foliar disease.

The weakest negative correlation with severity was observed with the SD and RID, which aligns with the observations and records in the experiment, showing a detectable trend of shorter plants with thicker stems being infected first and more affected as the disease progresses.

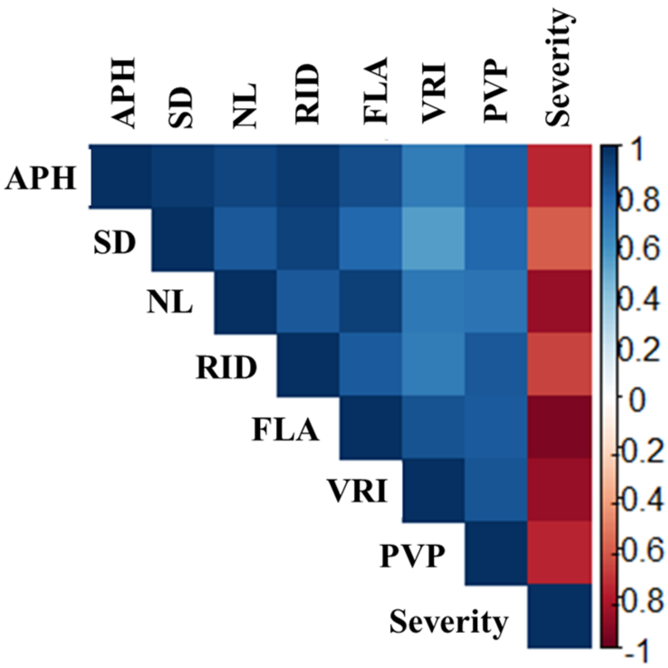


Figure 5. Heatmap of the correlation matrix for the morphometric, morphophysiological, and phytosanitary variables of the 22 cocoa genotypes. The intensity of the colors indicates the strength and direction of the Spearman correlations, with shades of blue representing positive correlations and shades of red representing negative correlations. Only significant correlations ($p < 0.001$) are highlighted.

Regarding the SD and RID, weaker positive correlations were also identified in the matrix, where progenies with higher SD and RID showed lower VRI, explaining why progenies with shorter height and thicker stems exhibited the lowest VRI (or percentage of plants showing recovery signs).

Among the morphometric markers, which are less influenced by the disease, a stronger positive correlation was observed between APH and NDF, FLA and VRI, and consistently a stronger negative correlation with severity, which was clearly differentiated from the observation for SD (the other morphometric marker) in relation to the markers mentioned. The correlation matrix also revealed that matrices with taller plants had greater RID and, therefore, higher vigor, which resulted in lower severity.

As for the PCA results (the Biplot) (Figure 6), they showed that the variability among progenies was largely explained by the first two principal components. The analysis indicated that some progenies were grouped closer together, suggesting similarities in morphological and phytosanitary characteristics. Variables such as severity and plant height were identified as the most influential in the principal components, with high loadings in Dim1 (PC1) and Dim2 (PC2), respectively.

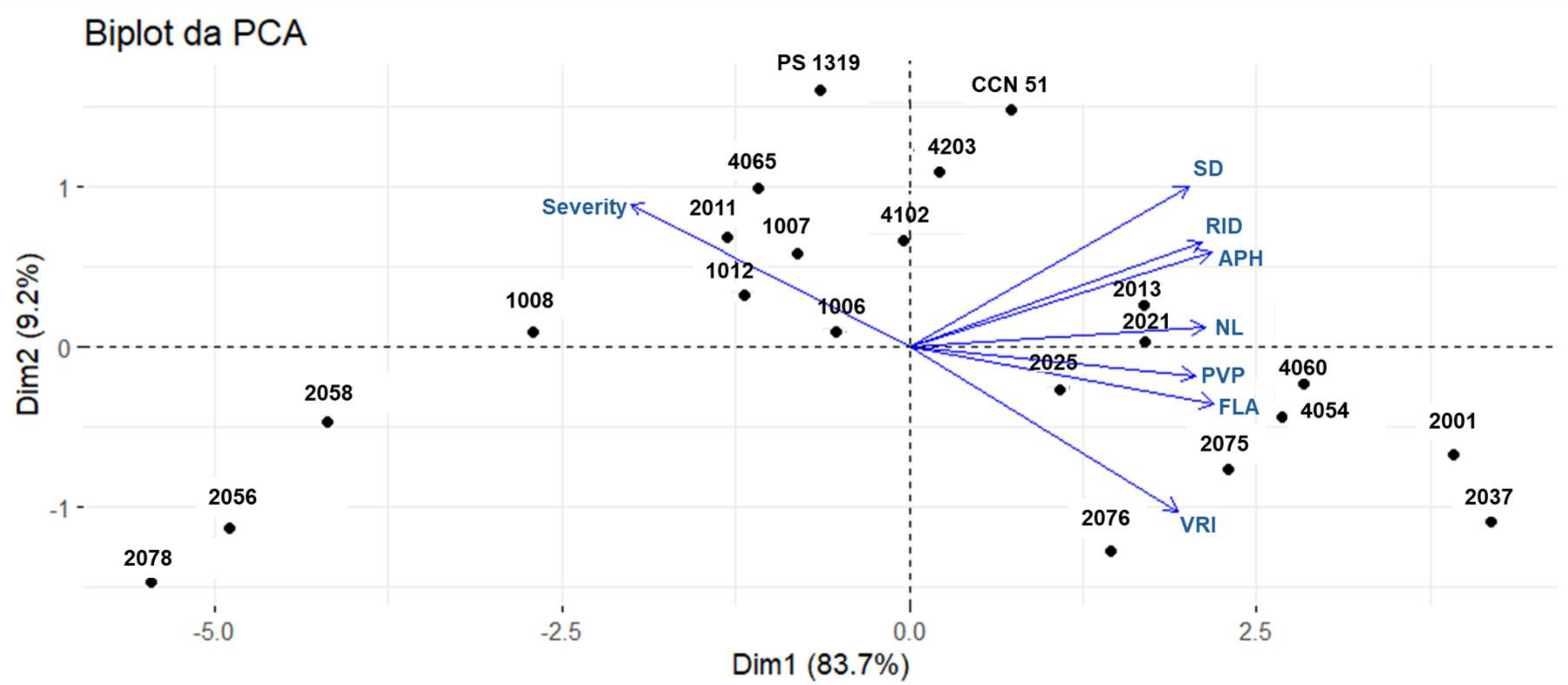


**Figure 6.** Biplot of the Principal Component Analysis (PCA) of the morphometric, morphophysiological, and phytosanitary variables of the 22 cacao genotypes. The points represent the genotypes, while the arrows indicate the contribution of the variables to the first two principal components (Dim1 [PC1] and Dim2 [PC2]). The proximity between genotypes suggests similarity in the analyzed characteristics, and the length and direction of the arrows reflect the influence of the variables on the variation in the data.

The PCA revealed that the variability among the progenies was well explained by the first two principal components, which accounted for about 80% of the total variability of the data. Variables such as disease index and plant height had high loadings on the first component (PC1), while the number of leaves had the greatest contribution to the second component (PC2). From this analysis, it was observed that some progenies form groups that are closer together, suggesting that they share similar morphometric and phytosanitary characteristics.

The biplot, in essence, allowed the visualization of the dispersion of the progenies based on the first two principal components. The biplot shows both the progenies and the variables in the space of the principal components, which allows observing clusters and identifying which variables are most influential in the components.

The trend shown in the PCA regarding disease severity and VRI, PVP, and FLA allowed observing how anthracnose in the local varieties has the potential to mainly compromise the physiological markers of the seedlings, as these are the most directly affected. This can be explained by the fact that the greater the severity, the lower the FLA, and once the infectable leaf tissue is exhausted and the downward death process begins, the seedling's recovery capacity is severely affected, which implies high mortality.

The combination of Principal Component Analysis (PCA) and Cluster Analysis provided a comprehensive view of the variability among cacao progenies (Figure 7). The cluster analysis was crucial for identifying the relationships between the progenies and how they group based on their similarities in the collected variables. The combination of the dendrogram result with the PCA biplot provided an integrated view of the progeny groupings.

PCA allowed for the reduction of data dimensionality, retaining most of the variability, and assisting in the visualization of patterns, while the cluster analysis provided a clear method for grouping progenies with similar characteristics. Both methods, along with the generated plots, provided a robust data analysis, essential for genotype selection in cacao genetic improvement, with six distinguishable groups observable at the different resistance levels defined for this study.

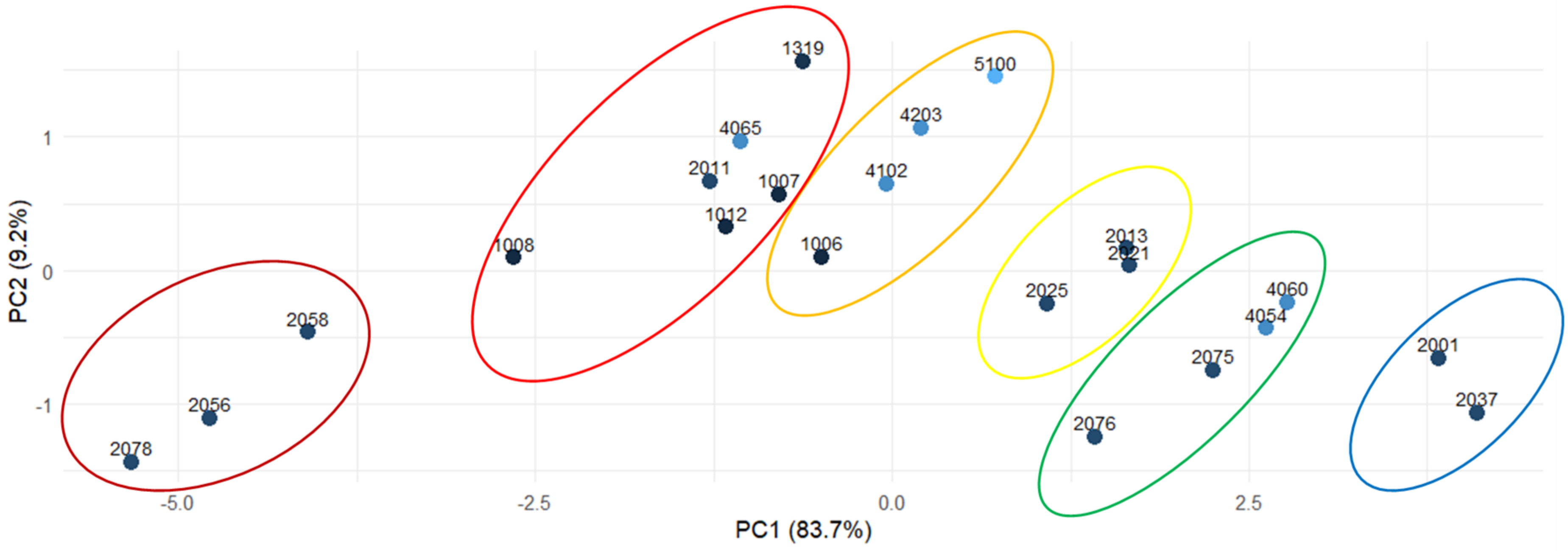


Figure 7. Integration of PCA and cluster analysis, showing the dispersion of the 22 cacao genotypes in the space of the first two principal components (PC1 and PC2), with the groupings defined by the dendrogram. The formed groups, according to their performance, are highlighted by ellipses of different colors, representing the similarity among the genotypes based on the dissimilarity matrix calculated using standardized Euclidean distance and Ward's clustering method. The blue ellipse contains the genotypes that, in correspondence and coupling with their average severity values, can be recognized as Resistant; the green, as Moderately Resistant; the yellow, as Moderately Susceptible; the orange, as Susceptible; and the red and burgundy, as Highly Susceptible. No Highly Resistant genotypes were identified. In the graph, 1319 corresponds to PS 1319, and 5100 to CCN 51.

### 3.3.4 Categorization and selection of seedlings

Based on the evaluation of the reaction of seedlings from progenies of local cocoa varieties from Bahia under study, it was found that there was a significant effect on the analyzed genotypes. In the PCA and Cluster analysis, the genotypic distinction distributed the progenies into the 6 resistance levels defined for anthracnose, confirming the existence of different resistance levels. The genotypes 2001 and 2037 were identified as Resistant, 4060, 4054, 2075, and 2076 as Moderately Resistant, 2013, 2021, and 2025 as Moderately Susceptible, 4203, 4102, 1006, and CCN 51 (5100) as Susceptible, 4065, 2011, 1007, 1008, 1012, PS 1319, 2056, 2058, and 2078 as Highly Susceptible. No Highly Resistant genotypes were identified.

The genetic effect of the varieties is considered the main component of the variation in the expression of disease intensity as an analyzed trait, due to the uniformity of both the greenhouse conditions and the fulfillment of agronomic requirements.

Observing the data distribution, it is noted that progenies 2001, 2037, 4054, 4060, 2075, and 2076 tend to have higher values, followed by progenies 2013, 2021, and 2025. These observations suggest that the first group can be classified as vigorous plants, consisting exclusively of the Maranhão (2001, 4060, 2075, and 2076) and Comum (2037 and 4054) varieties.

The remaining progenies, as well as the comparators PS 1319 and CCN 51, exhibited lower vigor, reflecting a weaker resistance reaction to anthracnose. Furthermore, the lower expression of vigor may be related to genetic differences that influence the response to the disease. These genotypes may require additional management practices to optimize their growth and performance.

In this way, it was possible to understand the tendency of the cultivars Maranhão and Comum to concentrate the manifestation of the reaction of resistance to anthracnose by *C. gloeosporioides s. l.*, in contrast to the cultivars Cabeça de Macaco and Parazinho tending to concentrate the display of susceptibility. A notable fact is the existence of contrasting resistance reactions between the progenies belonging to the Maranhão cultivar, resulting in more resistant ones coming from the locality of Arataca as opposed to those from Gandu, which, although called Cabeça de Macaco, are one of the types of Maranhão. These names given locally by farmers to local cocoa varieties in Bahia correspond to different periods of cocoa introduction in Bahia around 200 years ago (Santos et al., 2015). For all cases, the resistance and susceptibility reaction of local cocoa varieties from the cocoa region of Bahia to anthracnose by *C. gloeosporioides* s. l. was not reported.

The comparators PS 1319 and CCN 51 have been widely reported as resistant to various diseases caused by fungi and oomycetes (Silveira et al., 2019; Alexandre, 2015). However, there are no specific reports on their reaction to anthracnose, which is why they could only be used as resistance or susceptibility standards within the present study, in comparison with local varieties. This made it evident and noteworthy that modern clones exhibited lower resistance to anthracnose compared to some of the local cocoa varieties from Bahia, despite the fact that the latter are older and have a narrow genetic base (Santos et al., 2015).

The resistance reaction is directly linked to, or can be understood as, the ability to withstand the influence or repercussions of the disease on cocoa seedlings. For all the progenies studied, the characteristics most negatively affected by anthracnose in local cocoa varieties from Bahia, in descending order, were the number of leaves, functional leaf area, aerial height, robustness index, and stem diameter. Each of these traits was notably less affected in the Maranhão and Comum genotypes and more so in the Cabeça de Macaco and Parazinho genotypes.

The correlations and analyses applied to the vigor test data and phytosanitary tests allowed the identification that less vigorous plants were more affected by the disease, which caused economic losses reflected in delayed growth and development, as well as increasing production costs. The key trait identified in the manifestation of the strongest resistance reaction was aerial height, likely because it directly supports a greater number of leaves and larger functional leaf area. It also became evident that taller plants were the most vigorous.

Although the different accessions varied in terms of resistance to anthracnose, the productive attributes of all of them, along with their resistance to important diseases, stand out as crucial factors in providing additional care in the establishment of cocoa nurseries. This information is also critical to communicate to producers to help ensure their success in seedling production and establishing cocoa plantations, ultimately contributing to a higher cocoa bean yield, and therefore to the production of chocolate.

## 4. CONCLUSIONS

*Colletotrichum gloeosporioides s. l.* affects seedlings of the progeny of local cocoa varieties from Bahia under greenhouse conditions. A significant influence of temperature increase on the occurrence of anthracnose was observed, with variation in the resistance response of different genotypes inferred from their genetic characteristics. Under these conditions, the disease exhibited great potential to destroy plant material and compromise the successful generation of seminal seedlings of local cocoa varieties, highlighting the impact on fundamental components of growth and development.

Thirty percent of the progenies evaluated are as resistant or moderately resistant to anthracnose by *C. gloeosporioides s. l.*, which can be considered potential sources of resistance, with progenies 2001, 2037, 4054, 4060, 2075, and 2076 standing out as superior. In this regard, the rating scale and field key proved to be effective for phenotypic evaluation, and the resistance degree scale allowed for proper cataloging of the different progenies according to their resistance reactions.

The joint analysis of data from the different evaluations allowed reporting the disease's effect and supporting the results obtained after estimating the resistance reaction, confirming the existence of genetic variability in the materials evaluated. While the evaluation of morphometric characters in this study, in relation to the natural infection of this pathogen, confirmed a highly disruptive effect on the growth and development of genetic materials with moderate to high susceptibility.

The rating scale and the field key proved efficient in assessing the intensity of the disease, and the resistance degree scale allowed the different progenies to be adequately cataloged according to their resistance reactions. Thus, both evaluation methodologies under greenhouse conditions are good predictors of anthracnose resistance levels.

Therefore, given all the previous considerations, it is essential to continue selecting local varieties of cocoa trees in Bahia resistant to anthracnose and to carry out further studies to identify genes with effects on resistance in this population, especially for genotypes that showed resistance or moderate resistance.

## 5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the logistical support and permission to collect biological material on a farm located in the municipality of Arataca, BA, especially technicians Reginaldo Barbosa Gomes and Idelbrando de Jesus Fernandes, as well as, in the municipality of Uruçuca, BA, especially Dr. Luiz Augusto Grimaldi and Dr. Davi Theodoro Junghans. Thanks are also to Dr. Thaís Marcelo for the initial guidelines on the use of the identification key of the etiological agent of the disease, and Professor Eduardo Gross for the use of the Laboratório de Química e Fertilidade do Solo da UESC. We thank

Luzia Almeida Couto and Jéssica Brenda Magalhães Borges for their initial assistance in establishing the experiment in the greenhouse.EETD would like to thank the Brazil PAEC-OEA-GCUB, UESC, and CAPES scholarship program for the master's scholarship at Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular in UESC. RXC thanks CNPq (process 315913/2023-1) for the scientific productivity grant.

## 6. REFERENCES

**ACOSTA, A.; RAMÍREZ, F.; ALBERTAZZI, H.** (2007). El papel del silicio en el desempeño de palmas con flecha seca en una plantación comercial de palma aceitera en Quepos, Costa Rica. *Palmas*, 28(Especial, Tomo 1), 389. Available at: https://www.revistapalmas.org. Accessed on: 13 Feb. 2025.

**AGUIAR, F. F. A.; KANASHIRO, S.; TAVARES, A. R.; PINTO, M. M.; STANCATO, G. C.; AGUIAR, J. de; NASCIMENTO, T. D. R.** (2005). Germinação de sementes e formação de mudas de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil): Efeito de sombreamento. *R. Árvore*, 29(6), 871-875. https://doi.org/10.1590/S0100-67622005000600005

**ALEGRÍA, M.; VÉLEZ, D.; VARÓN, F.; MARTÍNEZ, G.; TORRES, G.; CORREDOR, J.** (2015). Comportamiento frente a la Pudrición del cogollo (PC) de palmas derivadas de cruzamientos entre palmas *Elaeis guineensis* sobrevivientes a la epidemia en Tumaco, Nariño. *Palmas*, 36(2), 69-77. Available at: https://www.revistapalmas.org. Accessed on: 13 Feb. 2025.

**ALEXANDRE, R. S. et al.** (2015). Caracterização de frutos de clones de cacaueiros na região litorânea de São Mateus, ES. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 19(8), 785–790. Available at: https://www.scielo.br/j/rbeaa/a/myJFDL5FCw77mDBLzNJjFBN/?format=pdf&lang=p

**ALMEIDA DE MORAES, S.** (2024). Quantificação de Doenças de Plantas. [s.l: s.n.]. Available at: https://www.infobibos.com.br/artigos/2007_1/doencas/index.htm. Accessed on: 21 May. 2024.

**ASARE, E.; DOMFEH, O.; AVICOR, S.; POBEE, P.; BUKARI, Y.; AMOAKO-ATTAH, I.** (2021). *Colletotrichum gloeosporioides s.l.* causes an outbreak of anthracnose of cacao in Ghana. *South African Journal of Plant and Soil*, 38(2), 107–115. https://doi.org/10.1080/02571862.2020.1863485

**BRITO, I.; DIAMANTINO, M.; HOHENFELD, C.; ALVES, S.** (2019). Uso de iscas para isolamento de patógenos causadores de podridão radicular da mandioca (*Manihot esculenta*). In *Jornada Científica – Embrapa Mandioca e Fruticultura*, 13. Available at: https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1123063/1/ANAIS-2019-Ainfo-63.pdf

**CHEROBINI, E. A. I.; MUNIZ, M. F. B.; BLUME, E.** (2008). Avaliação da qualidade de sementes e mudas de cedro (*Cedrela fissilis*). *Ciência Florestal*, 18(1), 65-73. https://doi.org/10.5902/19805098511

**CHINCHILLA, C.; ALVARADO, A.; ALBERTAZZI, H.; TORRES, R.** (2007). Tolerancia y resistencia a las pudriciones del cogollo en fuentes de diferente origen de *Elaeis guineensis*. *Palmas*, 28(Especial, Tomo 1), 273. Available at: https://www.revistapalmas.org. Accessed on: 13 Feb. 2025.

**COUTO ALFENAS, A.; GONÇALVES, R.** (2016). *Métodos em fitopatologia* (2nd ed.). Viçosa, MG: Ed. UFV.

**CPTEC.** (2024). Previsão numérica de tempo (Ilhéus/BA). Available at: https://previsaonumerica.cptec.inpe.br/

**DE SOUZA JUNIOR, F. J. C. et al.** (2021). *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* associated with anthracnose in *Bauhinia forficata*. *European Journal of Plant Pathology*, 160(3), 745–751. https://doi.org/10.1007/s10658-021-02277-w

**DIAZ, A.M. et al.** (2023). Há variabilidade para resistência à Murcha de *Ceratocystis* em variedades locais de cacau na Bahia. *Summa Phytopathologica*, 49, 1-7. https://doi.org/10.1590/0100-5405/245935

**FERREIRA, D.F.** (2019). SISVAR: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. *Revista Brasileira de Biometria*, 37(4), 529-535. Available at: http://www.biometria.ufla.br/index.php/BBJ/article/view/450. Date accessed: 10 Feb. 2020. https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450.

**FERREIRA, J. et al.** (2024). Progresso da antracnose em folhas de cafeeiros no campo. Available at: http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb_anais/simposio4/p156.pdf. Accessed on: 29 May. 2024.

**GONÇALVES, M. P. et al.** (2022). Guia de diagnose para aulas práticas de fitopatologia: LFN 0424 - Fitopatologia. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Available at: https://www.esalq.usp.br/biblioteca/pdf/Guia-Pratico-de-Diagnose.pdf

**GRICE, K. R. E. et al.** (2023). Mango germplasm screening for the identification of sources of tolerance to anthracnose. *Australasian Plant Pathology*, 52(1), 27–41. https://doi.org/10.1007/s13313-022-00899-0

**LALES, J. H.; STA CRUZ, P. C.; LALES, J. S.; VILLEGAS, G. M.** (2008). Simulated functional leaf area of USM var 5, DK 818 & Los Baños Glutinous corn at grain filling stage. *Philippine Journal of Crop Science*, 33(2), 37-50. Available at: https://www.cabidigitallibrary.org/doi/epdf/10.5555/20083218952. Accessed on: 13 Feb. 2025.

**LEITE, H. A. C.; SILVA, A. B.; GOMES, F. P.; GRAMACHO, K. P.; FARIA, J. C.; SOUZA, J. T.; LOGUERCIO, L. L.** (2013). *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* endophytes from healthy *Theobroma cacao* L. trees can systemically colonize seedlings and promote growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(6), 2639–2651. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4574-2. Accessed on: 24 Feb. 2025.

**MARSSARO, A. L. et al.** (2020). Resistance to witches' broom in adult plants and progeny of local varieties of cacao in Southern Bahia. *Bragantia*, 79, 421-432. https://doi.org/10.1590/1678-4499.20200341

**MENTEN, J. O.** (2016). Diagnose e Manejo de Doenças de HFF. Available at: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1840409/mod_resource/content/2/Aula%203%20-%20diagnose%20e%20manejo%20de%20doen%C3%A7as%20de%20HFF%202016.pdf. Accessed on: 29 May. 2024.

**MUCHERINO-MUÑOZ, J.J. et al.** (2021). Structural and Functional Genomics of the Resistance of Cacao to Phytophthora palmivora. Pathogens, 10, 961. https://doi.org/10.3390/pathogens10080961.

**NITA, M.; ELLIS, M. A.; MADDEN, L. V.** (2003). Reliability and accuracy of visual estimation of *Phomopsis* leaf blight of strawberry. Phytopathology, 93(8), 995-1001. DOI: https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.8.99. Accessed on: 13 Feb. 2025. doi: 10.1094/PHYTO.2003.93.8.995.

**POLETTO, T. et al.** (2024). What's in my Pot? Six *Colletotrichum* Species Causing Anthracnose in Brazilian Pecan Orchards. Current Microbiology, 81(4), 1 Apr. DOI: 10.1007/s00284-024-03622-y

**SAINI, T. J. et al.** (2023). Identification, prevalence and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with chilli anthracnose in India. Journal of Plant Pathology. 107, 3–22. https://doi.org/10.1007/s42161-023-01558-z

**SANTOS, E. S. L. et al.** (2015). Genetic structure and molecular diversity of cacao plants established as local varieties for more than two centuries: The genetic history of cacao plantations in Bahia, Brazil. PLoS ONE, 10(12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145276

**SANTOS, S. M. S. dos; CUNHA, D. V. P. da; SILVA, R. de A.; TEIXEIRA, E. C.; CARVALHO, F. D.** (2017). Avaliação morfofisiológica em mudas de clones de eucalipto em viveiros comerciais na etapa de expedição. Revista Cultivando o Saber, 10(2), 238-250. ISSN 2175-2214. Available at: https://cultivandosaber.fag.edu.br/index.php/cultivando/article/view/793/720

**SILVEIRA, S. S. et al.** (2019). Growth and Quality of Genotype PS-1319 Cacao Seedlings Produced Under Different Irrigation Depths. Journal of Agricultural Science, 11(16), 238, 30 Sep. DOI:10.5539/jas.v11n16p238

**TAKATA, Y. et al.** (2024). Description and Pathogenicity of *Colletotrichum kapreanum* sp. nov, a Cherelle Wilt Pathogen Belonging to the *Gigasporum* Species Complex. Journal of Fungi, 10(3), 1 Mar. https://doi.org/10.3390/jof10030204

**TOZZE JÚNIOR, H. J. et al.** (2015). Characterization of *Colletotrichum* spp. isolates associated with fruit trees in the state of São Paulo. Summa Phytopathologica, 41(4), 270-280, 1 Oct. https://doi.org/10.1590/0100-5405/2021

**TRINIDAD-ÁNGEL, E. et al.** (2017). Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, Pub. Esp., 19, 3953-3964. https://doi.org/10.29312/remexca.v0i19.664

**UNESP.** (2024). Patometria-avaliação de doenças. [s.l: s.n.]. Available at: https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/fitossanidade/ANTONIODEGOES/patometria-240907.pdf. Accessed on: 29 May. 2024.

**VIEIRA JÚNIOR, J. R. et al.** (2011). Elaboração de escala diagramática de severidade para o bicho-mineiro do cafeeiro. Comunicado Técnico 373. EMBRAPA, Porto Velho, RO, September. Available at: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/925196/1/cot373cafeescaladiagramaticabichomineiro.pdf

**WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U.** (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Studies in Mycology, 73, 115-180. https://doi.org/10.3114/sim0011

**WINTER, S. R.; OHLROGGE, A. J.** (1973). Leaf angle, leaf area, and corn (*Zea mays* L.) yield. Agronomy Journal, 65(3), 161-165. DOI: https://doi.org/10.2134/agronj1973.00021962006500030013x. Accessed on: 13 Feb. 2025.

**ZAPPARATA, A.** (2023). Grape ripe rot disease caused by *Colletotrichum* spp.: current status, concerns and future perspectives. Journal of Plant Pathology, Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 1 May. https://doi.org/10.1007/s42161-023-01531-w

## CAPÍTULO II

### Os *Quantitative Trait Loci* (QTLs) de resistência às doenças causadas por fungos e oomicetos em *Theobroma cacao* L. Uma Revisão Sistemática e Metanálise


**Resumo**

Inúmeras indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas dependem inteiramente do agronegócio sustentado pelo cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) e o cacau, matéria prima da qual até o 40 % ou mais da safra mundial é perdida por doenças. A resistência a doenças fúngicas e oomicéticas é uma das características agronômicas mais importantes para o melhoramento do cacaueiro. Mas o conhecimento da genética para promover alta resistência, e portanto, a alta produtividade, ainda não está totalmente elucidada e sua utilização totalmente sistematizada. Por tratar-se de uma característica quantitativa, relaciona-se inteiramente com a resistência horizontal e consequentemente às regiões do genoma denominadas *Quantitative Trait Loci* (QTL). Na presente proposta de revisão sistemática e metanálise, foi elaborado um protocolo como roteiro a seguir para materializar a compilação de todas as publicações e caracterizações de QTLs do cacaueiro subjacentes à resistência as doenças ocasionadas pelos gêneros *Moniliophthora*, *Ceratocystis e Phytophthora* no período 2009-2024 e os correspondentes avanços na seleção, estudo e aprimoramento destas características complexas para um melhoramento genético robusto e de alta resolução contra esses estressantes bióticos. Objetiva-se descrever e analisar a base genética dessas características complexas e quantitativas, contribuindo para a aceleração da seleção e o avanço genético dessa cultura. Para isso, busca-se compilar, a partir da literatura científica, os diferentes relatos, identificações ou caracterizações de QTLs, regiões genômicas ou genes de interesse do cacaueiro responsáveis ou associados à resistência às doenças causadas pelos principais fungos e oomicetos de importância econômica.

**Abstract**

Numerous food, pharmaceutical, and cosmetic industries rely entirely on agribusiness sustained by the cacao tree (*Theobroma cacao* L.) and cocoa, a raw material from which up to 40% or more of the global crop is lost to diseases. Resistance to fungal and oomycete diseases is one of the most important agronomic traits for cacao breeding. However, the genetic dissection for high resistance formation, and therefore high productivity, remains largely unexplored and its application fully systematized. Since this is a quantitative trait, it is entirely related to horizontal resistance, with the basis of this being regions of the genome known as Quantitative Trait Loci (QTL). In this systematic review and meta-analysis proposal, a protocol was developed as a guide to compile all publications and characterizations of cacao QTLs underlying resistance to diseases caused by the genera *Moniliophthora, Ceratocystis,* and *Phytophthora* from 2009 to 2024, along with the corresponding advances in the selection, study, and improvement of these complex traits for robust and high-resolution genetic improvement against these biotic stressors. The objective is to describe and analyze the genetic basis of these complex and quantitative traits, contributing to the acceleration of selection and the genetic advancement of this crop. To achieve this, the aim is to compile, from the scientific literature, different reports, identifications, or characterizations of QTLs, genomic regions, or genes of interest in cacao that are responsible for or associated with resistance to diseases caused by the main fungi and oomycetes of economic importance.

## 1. Introdução

O manejo agronômico das principais doenças do cacaueiro é complexo e desafiador, exigindo medidas combinadas para uma gestão eficiente. O que se baseia principalmente em restrições quarentenárias, escolha adequada das áreas de plantação conforme suas características climáticas, correto espaçamento e poda das árvores, remoção e destruição dos frutos infectados, controle biológico e químico (muitas vezes impraticáveis) e uso de cultivares com resistência genética (Ploetz, 2016; Puig et al., 2021; Surujdeo-Maharaj et al., 2016; Vanegtern; Rogers; Nelson, 2015).

A estratégia de utilização de cultivares resistentes oferece os melhores, mais consistentes e promissores resultados. Porém, a resistência a doenças no cacaueiro é expressa como uma característica mensurável em uma escala quantitativa, quer dizer, que apresenta uma variação contínua em qualquer população de estudo; sendo influenciada por QTLs (*Quantitative Trait Loci* em inglês, ou Locos de Caracteres Quantitativos), ou seja, as regiões do genoma onde se concentram os genes responsáveis por essa variação.

Neste contexto, deve acrescentar-se que o conceito de QTL guarda importância a nível agronômico, já que a identificação de um QTL é um guia na busca do gene ou genes de interesse em uma população de estudo, facilitando seu acompanhamento e detecção, permitindo acumular nas populações as variantes dos genes de interesse gerando possibilidade de projetar populações que atendam a um interesse agronômico específico (Dallagnol, 2018). Isso é possível através da chamada seleção assistida por marcadores moleculares, uma estratégia de melhoramento vegetal na qual a detecção e seleção de sequências de DNA (alelos e/ou genes) em estágios precoces, como em estágios iniciais de crescimento de mudas, permitem escolher o material vegetal mais promissor em diferentes fases do processo de melhoramento de plantas.

Com o estudo proposto, a sistematização da informação existente permitiria que esses fatos sejam amenizados no momento de conceber e aplicar seleção genômica ao cacaueiro, a qual destaca-se por permitir identificar precocemente genótipos superiores sem utilizar métodos destrutivos, aumentando os ganhos com a seleção e diminuindo o intervalo entre gerações, e por meio desse método, a predição e a seleção podem ser realizadas em fases muito juvenis das plantas, acelerando assim o processo de melhoramento genético, já que alguns dos métodos convencionais de melhoramento, como o da seleção recorrente, demandam muito trabalho e resultam em baixos ganhos por unidade de tempo, tornando-se frequentemente economicamente e tecnicamente inviáveis (Borém, Miranda e Fritsche-Neto, 2017).

A seleção genômica consiste na predição simultânea dos efeitos genéticos de grande número de marcadores dispersos em todo genoma de um organismo, de forma a capturar os efeitos de todos os *loci* e explicar grande parte da variação genética de um caráter quantitativo. Após a obtenção desses marcadores, seus efeitos são estimados com base em dados fenotípicos de uma população conhecida como população de estimação ou treinamento. Uma vez estimados os efeitos, eles são testados em uma população de validação e, então, selecionados os marcadores que explicam grande parte da variância genética do caráter em estudo, a fim de que sua informação seja efetivamente incorporada à etapa de seleção do programa de melhoramento (Borém, Miranda e Fritsche-Neto, 2017).

Por estas e outras razões, objetiva-se então compilar, a partir da literatura científica, os diferentes reportes, identificações ou caracterizações de QTLs, regiões genômicas ou genes de interesse do cacaueiro responsáveis ou associados à resistência às doenças causadas pelos principais fungos e oomicetos de importância econômica.

## 2. Materiais e métodos

Será realizada uma revisão de literatura abrangente e metodologicamente rigorosa que ofereça um ponto de partida sólido sobre o conhecimento atual referido aos QTLs de resistência identificados e descritos no cacaueiro para às principais doenças ocasionadas por fungos e oomicetos, nos últimos 15 anos. Recorrendo especificamente à revisão sistemática, materializada como um estudo secundário que utilizará dados de estudos primários, ou seja, artigos científicos que apresentam resultados de pesquisas originais, e posteriormente combinados usando técnicas de metanálise, após verificar que seguem procedimentos homogêneos (Galvão; Pereira, 2014; Roever, 2017).

A revisão sistemática com suas três etapas fundamentais: planejamento, execução e sumarização (*planning, execution* e *summarization)* (Da Silva et al., 2012), perseguirá pesquisar, selecionar, avaliar, sintetizar e relatar as evidências relacionadas às perguntas e o tópico específico, buscando aplicar a abordagem mais racional e imparcial para organizar, avaliar e integrar as evidências científicas, e que contribui a uma compreensão mais completa e confiável do assunto estudado(Galvão; Pereira, 2014; Roever, 2017). Finalmente, para o cumprimento desse roteiro se propõe o seguinte protocolo de revisão sistemática e metanálise:

### 2.1 Protocolo de Revisão Sistemática e Metanálise:

**Os Quantitative Trait Loci (QTL's) de resistência aos fungos e oomicetos dos gêneros** ***Moniliophthora, Ceratocystis*** **e** ***Phytophthora*** **em** ***Theobroma cacao*** **L.**

**Tema e título:** Os Quantitative Trait Loci (QTL's) de resistência aos fungos e oomicetos dos gêneros *Moniliophthora*, *Ceratocystis* e *Phytophthora* em *Theobroma cacao* L. (período 2009 – 2024).

Nota: no caso de terem sido relatadas regiões genômicas para outros fungos e oomicetos patogênicos (como *Colletotrichum* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Phytopythium* spp.), bem como para outros patógenos importantes, como vírus e bactérias, estes possivelmente seriam incluídos na revisão, ampliando seu alcance e objetivo original.

**Objetivo:** compilar, a partir da literatura científica, os diferentes relatos, identificações ou caracterizações de QTL's, regiões genômicas ou genes de interesse do cacaueiro responsáveis ou associados à resistência às doenças causadas pelos principais fungos e oomicetos de importância econômica.

**Perguntas norteadoras de pesquisa:**

1. Quais são os QTL's, regiões genômicas ou genes de interesse descritos ou detectados no cacaueiro responsáveis ou associados à resistência às principais doenças causadas por fungos e oomicetos de importância econômica?
2. Quais genótipos de *Theobroma cacao* estudados mediante mapeamento de ligação genética, sequenciamento de nova geração, análise de expressão gênica, análise de associação genômica (GWAS) e edição de genoma apresentam QTL's, regiões genômicas ou genes responsáveis ou associados à resistência às doenças fúngicas e oomicéticas?

**Métodos de busca de fontes:** utilização de palavras-chave devidamente inclusas e concatenadas no apartado *Strings de busca a utilizar* para a localização de literatura científica disponível e accessível nas plataformas e motores de busca de textos científicos.

**Critérios de seleção de fontes e sua listagem:** serão exploradas as principais plataformas e motores de busca de literatura e textos científicos disponíveis na World Wide Web, as quais, se mostram a continuação acompanhados da sua direção web:

- PubMed®: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/
- Scopus®: https://www.scopus.com/home.uri
- Web of Science™: https://clarivate.com/products/scientific-and-academic-research/research-discovery-and-workflow-solutions/webofscience-platform/
- ScienceDirect: https://www.sciencedirect.com/
- Elsevier: https://www.elsevier.com/pt-br
- EBSCOhost: https://www.ebsco.com/es/products/plataforma-de-investigacion-ebscohost
- Cochrane Library: https://www.cochranelibrary.com/
- Scielo: https://www.scielo.br/
- Periódicos CAPES: https://www-periodicos-capes-gov-br.ezl.periodicos.capes.gov.br/index.php?
- MDPI: https://www.mdpi.com/

Este número de plataformas é justificado pelo fato de que é necessário ampliar a exploração como medida adicional para resolver um possível viés pela aparente escassez de publicações percebida.

**Strings a utilizar:** a localização de termos para as *strings* de busca foi feita mediante à técnica da observação das palavras-chave de artigos sentinela e a utilização do tesauro de vocabulário controlado MeSH do PUBMED-NCBI. A continuação se mostra a proposta inicial de *string* de busca “pura” feita a partir da sugestão da plataforma Parsif.al, devidamente modificada quanto a ordem dos termos agrupados e depurada para o idioma inglês:

(("Theobroma cacao" OR "cacao" OR "cacau" OR "cocoa" **AND** ("Genetic linkage mapping" OR "Composite interval mapping" OR "Gene expression analysis" OR "Genet map" OR "Genetic mapping" OR "Genome editing" OR "Genome-Wide Association Analysis (GWAS)" OR "GWAS" OR "Marker assisted selection" OR "Microsatellite markers" OR "Molecular markers" OR "Multipoint genetic map" OR "Next-generation sequencing (NGS)" OR "NGS" OR "QTL mapping" OR "Simple Sequence Repeats (SSR)" OR "SSR" OR "Single nucleotide polymorphisms (SNP)") OR "SNP" **AND** ("Quantitative Trait Locus (QTL)" OR "Chromosomal regions" OR "Genes" OR "Genomics regions" OR "Quantitative Trait Loci" OR "Resistance" OR "Disease resistance" OR "Disease tolerance" OR "Pathogen defense" OR "Pathogen resistance" OR "Pathogen response" OR "Plant immunity") **AND** ("Black pod” OR “witch's broom” OR “cacao wilt" OR "Ceratocystis" OR "Moniliophthora" OR "Phytophthora" OR "cacaofunesta" OR "capsici" OR "citrophthora" OR "cocoa black pod disease" OR "fimbriata" OR "megakarya" OR "palmivora" OR "perniciosa" OR "roreri"))

Numa exploração inicial, esta *string* mostrou um número reduzido de resultados, mas compilou diversos estudos de qualidade que são alvo da revisão sistemática.

Adicionalmente, se comparte a *string* que mais resultados retornou no buscador PUBMED do NCBI, a qual foi construída com as ferramentas do campo de busca:

(((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((Theobroma cacao[Title/Abstract]) OR (cacao[Title/Abstract])) OR (cacau[Title/Abstract])) OR (cocoa[Title/Abstract])) AND (Genetic linkage mapping[Title/Abstract])) OR (Composite interval mapping[Title/Abstract])) OR (Gene expression analysi[Title/Abstract])) OR (Genet map[Title/Abstract])) OR (Genetic mapping[Title/Abstract])) OR (Genome editing[Title/Abstract])) OR (Genome-Wide Association Analysis[Title/Abstract])) OR (GWAS[Title/Abstract])) OR (Marker assisted selection[Title/Abstract])) OR (Microsatellite markers[Title/Abstract])) OR (Molecular markers[Title/Abstract])) OR (Multipoint genetic map[Title/Abstract])) OR (Next-generation sequencing[Title/Abstract])) OR (NGS[Title/Abstract])) OR (QTL mapping[Title/Abstract])) OR (QTL[Title/Abstract])) OR (Simple Sequence Repeats[Title/Abstract])) OR (SSR[Title/Abstract])) OR (Single nucleotide polymorphisms[Title/Abstract])) OR (SNP[Title/Abstract])) AND (Quantitative Trait Locus[Title/Abstract])) OR (QTL[Title/Abstract])) OR (Chromosomal regions[Title/Abstract])) OR (Genes[Title/Abstract])) OR (Genomics regions[Title/Abstract])) OR (Quantitative Trait Loci[Title/Abstract])) OR (Resistance[Title/Abstract])) OR (Disease resistance[Title/Abstract])) OR (Disease tolerance[Title/Abstract])) OR (Pathogen defense[Title/Abstract])) OR (Pathogen resistance[Title/Abstract])) OR (Pathogen response[Title/Abstract])) OR (Plant immunity[Title/Abstract])) AND (Black pod[Title/Abstract])) OR (witch's broom[Title/Abstract])) OR (cacao wilt[Title/Abstract])) OR (Ceratocystis[Title/Abstract])) OR (Moniliophthora[Title/Abstract])) OR (Phytophthora[Title/Abstract])) OR (cacaofunesta[Title/Abstract])) OR (capsici[Title/Abstract])) OR (citrophthora[Title/Abstract])) OR (cocoa black pod disease[Title/Abstract])) OR (fimbriata[Title/Abstract])) OR (megakarya[Title/Abstract])) OR (palmivora[Title/Abstract])) OR (perniciosa[Title/Abstract])) OR (roreri[Title/Abstract])

**Idioma dos textos científicos:** principalmente serão selecionados e sumarizados os textos científicos escritos em inglês, português, espanhol e francês (será mantida esta ordem prioritária na hora de fazer as buscas). Não se descarta a possibilidade de incluir outros artigos redigidos em outras línguas indoeuropeias (italiano, alemão, por exemplo). Para todos os casos, serão implementadas a traduções textuais e/ou equivalentes das palavras-chave para abranger a literatura disponível em cada idioma.

**Critério de inclusão e exclusão dos textos científicos:**

**Inclusão:**

- Estudos que abordem relatos, identificações ou caracterizações de QTL's, regiões genômicas ou genes de interesse do cacaueiro responsáveis ou associados à resistência às doenças causadas pelos principais fungos e oomicetos de importância econômica mundial ou regional (para qualquer das espécies dos gêneros *Phytophthora, Moniliophthora* e *Ceratocystis)*.
- Estudos que tratam sobre QTL's ou regiões genômicas associados à resistência a outros gêneros de fungos e/ou oomicetos reportados na literatura afetando cacau

(*Lasiodiplodia, Phytopythium,* por exemplo), embora que não sejam de importância económica mundial ou regional.

**Exclusão:**

- Quaisquer textos científicos sobre estudos que incluem QTL's reportados para qualquer característica genética quantitativa não relacionados com cacau.
- Quaisquer textos científicos sobre estudos que tratem QTL's reportados para qualquer característica genética quantitativa do cacau não relacionada com a resistência a fungos e oomicetos (rendimento, resistência a outros patógenos e pragas artrópodes, resistência a fatores abióticos, por exemplo).

**Critério de qualidade dos estudos primários:** obrigatoriamente, os textos científicos selecionados deverão estarem publicados em jornais ou periódicos arbitrados por pares e devidamente indexados.

**Processo de seleção dos estudos primários:** a seleção dos textos científicos inicialmente será feita com base no seu título e seu resumo, aplicando os critérios de inclusão e exclusão. Posteriormente, dos artigos selecionados na filtragem inicial será realizada a leitura e estudo integral do conteúdo procurando que efetivamente dê resposta à questão norteadora da pesquisa, para finalmente proceder à extração e sumarização da informação.

**Estratégia de extração de informação:** com base no seu conteúdo, os textos científicos serão catalogados mediante uma "tabela dinâmica" ou um "formulário de extração de conteúdo", o que também permitirá a classificação dos dados para serem coletados, tabelados e analisados. Seguindo ao processo de análise será feito o de síntese.

As informações a preencher incluirão as gerais de publicação, as pertencentes aos metadados do texto, tipos de estudos, e as específicas aos estudos realizados.

**Sumarização dos resultados:** será realizada a análise qualitativa e quantitativa dos estudos e conteúdo dos textos científicos selecionados, caracterizando-os, avaliando a qualidade deles, identificando conceitos importantes, comparando as análises estatísticas apresentadas e concluir sobre o que a literatura informa em relação a determinada intervenção, entre outros aspectos relevantes, interessantes e inovadores.

## 3. Referências bibliográficas

BORÉM, Aluízio; MIRANDA, Glauco; FRITSCHE-NETO, Roberto. **Melhoramento de Plantas**. 7. ed. Viçosa: Editora UFV, 2017.

DA SILVA, Camila; MUZETTI, Cecília; MAZZOCATO, Michele; MOTTA, Pedro; DAHDAL, Andreia; BATISTA, Janir; HIRAYAMA, Márcio; PERES, Silvia; BARROS, Nelson. Planejamento e execução de revisões sistemáticas da literatura. **Brasília Med**, Brasília, v. 49, n. 2, p.104-110. 2012. Disponível em: https://cdn.publisher.gn1.link/rbm.org.br/pdf/v49n2a06.pdf

DALLAGNOL, Leandro. **Resistência Genética de Plantas a Patógenos.** Pelotas: Editora UFPel, 2018. Disponível em: https://guaiaca.ufpel.edu.br/bitstream/handle/prefix/4207/RESIST%c3%8aNCIA%20GEN%c3%89TICA%20DE%20PLANTAS%20A%20PAT%c3%93GENOS_EBOOK.pdf?sequence=1&isAllowed=y

GALVÃO, Taíz; PEREIRA, Maurício. Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. **Epidemiologia e Serviços de Saúde,** Brasília, v. 23, n. 1, p. 183–184. 2014. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/pdf/ess/v23n1/v23n1a18.pdf

PLOETZ, Randy. The Impact of Diseases on Cacao Production: A Global Overview. *In:* Bailey, B.; Meinhardt, L. (Eds.) **Cacao Diseases**. Springer International Publishing. 2016. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2_2

PUIG, Alina; QUINTANILLA, Wilber; MATSUMOTO, Tracie; KEITH, Lisa; GUTIERREZ, Osman; MARELLI, Jean-Philippe. *Phytophthora palmivora* Causing Disease on *Theobroma cacao* in Hawaii. **Agriculture,** Switzerland, v. 11, n. 5, p. 396, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/agriculture11050396

ROEVER, Leonardo. Compreendendo os estudos de revisão sistemática. **Revista da Sociedade Brasileira de clínica médica,** Uberlândia, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2017. Disponível em: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2017/11/875614/152_127-130.pdf

SURUJDEO-MAHARAJ, S., SREENIVASAN, T. N., MOTILAL, L. A., UMAHARAN, P. Black pod and other *Phytophthora* induced diseases of cacao: History, biology, and control. *In:* Bailey, B.; Meinhardt, L. (Eds.) **Cacao Diseases.** Springer International Publishing. 2016. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2_2

VANEGTERN, Benjamin; ROGERS, Michael; NELSON, Scot. Plant Disease Black Pod Rot of Cacao Caused by *Phytophthora palmivora*. **College of Tropical Agriculture and Human Resources**, Honolulu, 2015. Disponível em: https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PD-108.pd

## CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

As diversas e cada vez mais preocupantes ameaças bióticas que comprometem o suprimento mundial de cacau, em conjunto com a demanda da sociedade por sistemas produtivos sustentáveis, ambientalmente harmônicos e que gerem produtos que não representem riscos à saúde, faz imperativa a identificação de variabilidade genética em materiais genéticos que podem constituir fonte de resistência aos problemas fitossanitários preponderantes, além de um máximo aproveitamento de seus atributos agronômicos. Uma vez que a seleção possa ser feita para o desenvolvimento de cultivares com resistência horizontal, isso satisfaria a necessidade da possibilidade real da produção e aquisição de plantas de cacaueiro com um elevado nível de resistência estável e durável à antracnose por *C. gloeosporioides s. l.* que já têm o precedente de ter tido seleção para outros problemas fitopatológicos de importância.

A variação significativa dos sintomas de antracnose apresentadas nas progênies testadas no presente estudo comprovam que existe variação genética para resistência à antracnose nos genitores utilizados. Progênies com esse *escopo* ou *roteiro percorrido* no âmbito do melhoramento genético contribuiriam à criação de cultivares encaminhados à acumulação de resistência poligênica durável a múltiplas doenças, ou seja, da tão desejada multirresistência, em auxilio do histórico misto de sucesso no melhoramento que tem tido a cultura do cacaueiro, para a implementação de um manejo estratégico da resistência em um sistema de manejo integrado de doenças - MID, e como germoplasma de reserva ante possíveis cenários climáticos desfavoráveis.

Desta forma, se propõem as progênies oriundas das seleções de cacaueiro 2001, 2037, 4054, 4060, 2075 e 2076 com a mais positiva classificação na escala de graus de resistência, como fontes de resistência quantitativa à antracnose, nas quais, na sua avaliação fenotípica os métodos de quantificação de doença mostraram-se como adequados preditores dos níveis de resistência à antracnose. Também, o isolado patogênico de *C. gloeosporioides s. l.* e outros microrganismos associados, figuram como um achado promissor no presente estudo, para a exploração e aprimoração da resistência e, portanto, do melhoramento genético, para estudos epidemiológicos e para entender ainda mais as interações patógeno-hospedeiro, para a avaliação de métodos de controle e até o desenvolvimento de marcadores moleculares, entre outras ferramentas genéticas e biotecnológicas. Os isolados patogênicos obtidos no presente estudo serão analisados por sequenciamento de regiões ITS do rDNA informativas para fungos e de outros genes que auxiliem eficientemente na sua identificação, visando a confirmação molecular das espécies envolvidas.

Finalmente, integrar os últimos estudos sobre todos os *Quantitative Trait Loci* (QTLs) na literatura científica disponível sobre resistência do cacaueiro a doenças fúngicas e oomicéticas, poderia constituir um aporte significativo para a sistematização do melhoramento para um grande conjunto de caracteres quantitativos que atualmente não está totalmente bem compreendido e que é difícil de abordar e materializar. Da mesma forma, uma futura análise integradora dos parâmetros genéticos associados à variabilidade da resistência à antracnose achada nas variedades locais se propõe como altamente pertinente, pois, permitiria entender a herança dessa característica, otimizar o processo de seleção, e acelerar as decisões no melhoramento genético alcançando os objetivos propostos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES


ALLEGRE, Mathilde; ARGOUT, Xavier; BOCCARA, Michel; FOUET, Olivier; ROGUET, Yolande; BE´RARD, Aure´lie; THE´VENIN, Jean Marc; CHAUVEAU, Aure´lie; RIVALLAN, Ronan; CLEMENT, Didier; COURTOIS, Brigitte; GRAMACHO, Karina; BOLAND-AUGE´, Anne; TAHI, Mathias; UMAHARAN, Pathmanathan; BRUNEL, Dominique; LANAUD, Claire. Discovery and mapping of a new expressed sequence tag-single nucleotide polymorphism and simple sequence repeat panel for large-scale genetic studies and breeding of *Theobroma cacao* L. **DNA Research**, v. 19, n. 1, p. 23–35, 2012. DOI: doi:10.1093/dnares/dsr039

ASARE, E., DOMFEH, O., AVICOR, S., POBEE, P., BUKARI, Y.; AMOAKO-ATTAH, I. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. causes an outbreak of anthracnose of cacao in Ghana. **South African Journal of Plant and Soil**, South Africa, v. 38, n. 2, p. 107–115, 2021. Disponível em: https://journals.co.za/doi/abs/10.1080/02571862.2020.1863485

Cannon, P.; Damm, U.; Johnston, P.; Weir, B. *Colletotrichum* - current status and future directions. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, p. 181–213, 2012. DOI: doi:10.3114/sim0014.

COUTO, Acelino; GONÇALVES, Reginaldo. **Métodos em Fitopatologia.** 2. ed. Viçosa (MG): Ed. UFV, 2016.

DAMM, Ulrike; BARONCELLI, Riccardo; CAI, Lei; KUBO, Yasuyuki; O'CONNELL, Richard; WEIR, Bevan; YOSHINO, Kae; CANNON, Paul F. **Colletotrichum: species, ecology and interactions**. IMA Fungus, v. 1, p. 161–165, 2010. DOI: https://doi.org/10.5598/imafungus.2010.01.02.08

Damm, U.; Cannon, P.; Woudenberg, J., Crous, P. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 37–113, 2012a. DOI: https://doi.org/10.3114/sim0010

Damm, U.; Cannon, P.; Woudenberg, J.; Johnston, P.; Weir, B.; Tan, Y.; Shivas, R.; Crous, P. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 1–36, 2012b. DOI: 10.3114/sim0002

DANTAS NETO, Alfredo; CORRÊA, Ronan X.; MONTEIRO, Wilson; MARTINS, Edna; GRAMACHO, Karina; LOPES, Uilson. Caracterização de uma População de Cacaueiro para Mapeamento de Genes de Resistência à Vassoura de bruxa e Podridão parda. **Fitopatol. bras.**, v. 30, n. 4, 2005. DOI: https://doi.org/10.1590/S0100-41582005000400007

END, Michelle J.; DAYMOND, Andrew J.; HADLEY, Paul (eds.). Directrices técnicas para el movimiento seguro del germoplasma del cacao. Versión revisada de las Directrices técnicas de FAO/IPGRI No. 20 (Tercera actualización, Octubre de 2017). Roma: Global Cacao Genetic Resources Network (CacaoNet), Bioversity International, 2017.

FISTER, Andrew; LEANDRO-MUÑOZ, Mariela; ZHANG, Dapeng; MARDEN, James; TIFFIN, Peter; dePAMPHILIS, Claude; MAXIMOVA, Siela; GUILTINAN, Mark. Widely distributed variation in tolerance to *Phytophthora palmivora* in four genetic groups of cacao. **Tree Genetics and Genomes**, Germany, v. 16, n. 1, 2020. DOI: https://doi.org/10.1007/s11295-019-1396-8

FRITSCHE-NETO, Roberto; BORÉM, Aluízio. Melhoramento de Plantas para Condições de Estresses Bióticos. Viçosa. Editora UFV, 2012.

GAUTAM, Ajay. *Colletotrichum gloeosporioides*: Biology, Pathogenicity and Management in India. **Journal of Plant Physiology & Pathology**, v. 02, n. 02, 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.4172/2329-955X.1000125

HUDA-SHAKIRAH, A.; MOHD, M. Morphology, phylogeny, and pathogenicity of *Colletotrichum siamense* associated with leaf blight and pod rot of *Theobroma cacao* in Malaysia. **Tropical Plant Pathology**, v. 48, n. 3, p. 319–331, 2023. DOI: https://doi.org/10.1007/s40858-023-00561-0

HYDE, K. *Colletotrichum*-names in current use. **Fungal Diversity**, v. *39*, p. 147-182, 2009. http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD39-7.pdf

JAYAWARDENA, R.; BHUNJUN, C.; HYDE, K.; GENTEKAKI, E.; ITTHAYAKORN P. *Colletotrichum*: lifestyles, biology, morpho-species, species complexes and accepted species. **Mycosphere**, v. 12, n. 1, p. 519–669, 2021. DOI: Doi 10.5943/mycosphere/12/1/7

JOSHI, Renu. A Review on *Colletotrichum* spp. Virulence mechanism against host plant defensive factors. **Journal of Medicinal Plants Studies**, Connecticut, v. 6, n. 6, p. 64–67, 2018. DOI: https://doi.org/10.22271/plants.2018.v6.i6b.02

KHAERUNI, A. In vitro test of endophytic antagonist activity for *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of antracnose **in cocoa**. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science,** 2019. DOI: 10.1088/1755-1315/260/1/012136

LIMA, Juocerlee; ROCHA, Rodrigo. A importância histórica, socioeconômica e ambiental da cacauicultura para o estado de Rondônia. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 2, p. 314–332, 2020. Disponível em: https://sustenere.inf.br/index.php/rica/article/view/CBPC2179-6858.2020.002.0030

LIVINGSTONE, Donald; ROYAERT, Stefan; STACK, Conrad; MOCKAITIS, Keithanne; MAY, Greg; FARMER, Andrew; SASKI, Christopher; SCHNELL, Ray; KUHN, David; MOTAMAYOR, Juan Carlos. Making a chocolate chip: development and evaluation of a 6K SNP array for *Theobroma cacao*. **DNA Research,** v. 22 n. 4, 279–291, 2015. DOI: https://doi.org/10.1093/dnares/dsv009

LOPES, Uilson; PIRES, José Luis; GRAMACHO, Karina Peres; GRATTAPAGLIA, Dario. Genome-wide SNP genotyping as a simple and practical tool to accelerate the development of inbred lines in outbred tree species: An example in cacao (*Theobroma cacao* L.). **PLoS ONE**, v. 17, n. 10, 2022. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270437

MARELLI, Jean-Philippe; GUEST, David I.; BAILEY, Bryan A.; EVANS, Harry C.; BROWN, Judith K.; JUNAID, Muhammad; BARRETO, Robert W.; LISBOA, Daniela O.; PUIG, Alina S. Chocolate under threat from old and new cacao diseases. **Phytopathology**, v. 109, n. 8, 2019. Disponível em: https://agroavances.com/img/publicacion_documentos/cover.pdf

MARTINS, Emerson; SHIMIZU, Jarbas; FERREIRA, Carlos. Cultivo da Grevílea nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil. 2020. Disponível em: https://sistemaSDeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Grevilea/CultivodaGrevileaSulSudeste/06_2_teste_de_progenie_Link2.htm.

MENEZES, Maria. Aspectos Biológicos e Taxonômicos de Espécies do Gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, vol. 3, p.170-179, 2006. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/34611/1/AAPCA-V3-Revisao-04.pdf

Ministério da Agricultura e Pecuária. MAPA confirma novo foco de monilíase do cacaueiro no Amazonas e adota medidas para conter a praga. 2024. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-confirma-novo-foco-demoniliase-do-cacaueiro-no-amazonas-e-adota-medidas-para-conter-a-praga. Acesso em: 21 sep. 2024.

MOHALI-CASTILLO, Sari; STEWART, Jane. First report of *Colletotrichum siamense* associated with anthracnose on *Theobroma cacao* fruits in Venezuela. **New Disease Reports,** 46, 2022. Disponível em: https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ndr2.12131

MORAES, Wanderson; JESUS JUNIOR, Waldir; BELAN, Leônidas; PEIXOTO, Leonardo; MORAES, Willian; CECÍLIO, Roberto. Mudanças Climáticas e seus Potenciais Impactos sobre os Métodos de Manejo de Doenças de Planta. **Nucleus**, v. 8, n. 1, p. 431–452, 2011. Disponível em: https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4040681.pdf

MOTILAL, Lambert; ZHANG, Dapeng; MISCHKE, Sue; MEINHARDT, Lyndel W.; BOCCARA, Michel; FOUET, Olivier; LANAUD, Claire; UMAHARAN, Pathmanathan. Association mapping of seed and disease resistance traits in *Theobroma cacao* L. **Planta**, Berlin, v. 244, n. 6, p. 1265–1276, 2016. DOI: https://doi.org/10.1007/s00425-016-2582-7

MYCOBANK. *Colletotrichum gloeosporioides.* 2024. Disponível em: https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/5976. Accesso em: 13 ago. 2024.

NASCIMENTO, Antonio D.; LIMA, Mayara O.; FEIJÓ, Frederico M.; JÚNIOR, Jaime H.; SOBRINHO, Roberto R.; ASSUNÇÃO, Iraildes P.; LIMA, Gaus S. A. First Report of *Colletotrichum aeschynomenes* Causing Anthracnose in Cacao (*Theobroma cacao*) in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 12, p. 3284–3284, 2019. DOI: https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-2047-PDN

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. Crops and livestock products. 2023. Disponível em: https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize. Acesso em: 26 ago. 2024.

PARDO-DE LA HOZ, C. J.; CALDERÓN, C.; RINCÓN, A. M.; CÁRDENAS, M.; DANIES, G.; LÓPEZ-KLEINE, L.; RESTREPO, S.; JIMÉNEZ, P. Species from the *Colletotrichum acutatum, Colletotrichum boninense and Colletotrichum gloeosporioides* species complexes associated with tree tomato and mango crops in Colombia. **Plant Pathology**, v. 65, n. 2, p. 227–237. 2016. DOI: https://doi.org/10.1111/ppa.12410

PERALTA-RUIZ, Yeimmy; ROSSI, Chiara; GRANDE-TOVAR, Carlos David; CHAVES-LÓPEZ, Clemencia. Green Management of Postharvest Anthracnose Caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Fungi**, Basel, v. 9, n. 6, 623 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/jof9060623

PERFECT, Sarah E.; HUGHES, H. Bleddyn; O'CONNELL, Richard J.; GREEN, Jonathan. *Colletotrichum:* A Model Genus for Studies on Pathology and Fungal-Plant Interactions. **Fungal Genetics and Biology,** v. 27, i. 2–3, p. 186-198, 1999. DOI: https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1143

PLOETZ, Randy. The Impact of Diseases on Cacao Production: A Global Overview. In: Bailey, B.; Meinhardt, L. (Eds.) Cacao Diseases. Springer International Publishing. 2016. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2_2

PUIG, A. S. Fungal Pathogens of Cacao in Puerto Rico. **Plants**, v. 12, n. 22, p. 3855, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.3390/plants12223855. Acesso em: 24 ago. 2024.

SERRATO-DIAZ, Luz M.; MARIÑO, Yobana A.; GUADALUPE, Ilandra; BAYMAN, Paul; GOENAGA, Ricardo. First Report of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Colletotrichum siamense* Causing Cacao Pod Rot, and First Report of *C. tropicale* Causing Cacao Pod Rot in Puerto Rico. **Plant Disease**, v. 104, n. 2, p. 592–592, 2020. DOI: https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1333-PDN

SHARMA, M.; KULSHRESTHA, S. *Colletotrichum gloeosporioides*: An Anthracnose Causing Pathogen of Fruits and Vegetables. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 12, n. 2, p. 1233–1246, 2015. Disponível em: https://www.biotech-asia.org/vol12no2/colletotrichum-gloeosporioides-an-anthracnose-causing-pathogen-of-fruits-and-vegetables/

SINGH, K.; JAHAGIRDAR, S.; SARMA, B. K. **Emerging Trends in Plant Pathology**. Springer Singapore. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-15-6275-4

SOARES, A.; LOURENÇO, S.; AMORIM, L. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento. **Trop. plant pathol,** v. 33, n. 4, 2008. DOI: https://doi.org/10.1590/S1982-56762008000400002

ST. CLAIR, D. A. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. **Annual Review of Phytopathology**, 48, 247–268, 2010. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081904

VILLA-RIVERA, Maria G.; CONEJO-SAUCEDO, Ulises; LARA-MARQUEZ, Alicia; CANO-CAMACHO, Horacio; LOPEZ-ROMERO, Everardo; ZAVALA-PARAMO, Maria G. The Role of Virulence Factors in the Pathogenicity of

Colletotrichum sp. **Current Protein & Peptide Science**, v. 18, n. 10, 2017. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27526925/

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 115–180, 2012. DOI: https://doi.org/10.3114/sim0011

# APÉNDICE

**Supplementary material 1.**. Microorganisms identified at each of the three inoculation points from a leaf of a seedling of each cocoa accession (cocoa genotypes of local and clonal varieties)

| Accession | Inoculation point 1 | Inoculation point 2 | Inoculation point 3 |
|---|---|---|---|
| **1006** | *C. gloeosporioides* | *C. gloeosporioides* | Bacteria |
| **1007** | *Guidnardia sp.* | *Cladosporium* sp. | *C. gloeosporioides* |
| **1008** | *C. gloeosporioides* | *C. gloeosporioides* | *C. gloeosporioides* |
| **1012** | *C. gloeosporioides* | *Cladosporium* sp. | *Neopestalotiopsis* sp. |
| **2001** | *C. gloeosporioides* | *Guidnardia* sp. | Point without growth |
| **2011** | *C. gloeosporioides* | *Cladosporium* sp. | *C. gloeosporioides* |
| **2013** | Bacteria | *C. gloeosporioides* | Point without growth |
| **2021** | *C. gloeosporioides* | *C. gloeosporioides* | *C. gloeosporioides* |
| **2025** | *C. gloeosporioides* | *C. gloeosporioides* | *Neopestalotiopsis* sp. |
| **2037** | Point without growth | *C. gloeosporioides* | Point without growth |
| **2056** | *C. gloeosporioides* | Point without growth | *C. gloeosporioides* |
| **2058** | *C. gloeosporioides* | *C. gloeosporioides* | Point without growth |
| **2075** | *C. gloeosporioides* | *C. gloeosporioides* | *Cladosporium sp.* |
| **2076** | *C. gloeosporioides* | *C. gloeosporioides* | Point without growth |
| **2078** | *C. gloeosporioides* | *C. gloeosporioides* | Point without growth |
| **4054** | Bacteria | Bacteria | *C. gloeosporioides* |
| **4060** | *C. gloeosporioides* | *C. gloeosporioides* | Point without growth |
| **4065** | *C. gloeosporioides* | *Cladosporium* sp. | Point without growth |
| **4102** | *C. gloeosporioides* | *Guidnardia* sp. | Point without growth |
| **4203** | *C. gloeosporioides* | *C. gloeosporioides* | Point without growth |
| **PS 1319** | *C. gloeosporioides* | *C. gloeosporioides* | *C. gloeosporioides* |
| **CCN 51** | *C. gloeosporioides* | *C. gloeosporioides* | *C. gloeosporioides* |

Note: In all cases, it corresponds to *C. gloeosporioides sensu lato*.