



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

**DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR DE MATRIZES E PROGÊNIES DE  
VARIEDADES LOCAIS DE CACAU**

**LUANA FERREIRA DOS SANTOS**

**ILHÉUS – BAHIA– BRASIL**  
**Novembro de 2019**

**LUANA FERREIRA DOS SANTOS**

**DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR DE MATRIZES E PROGÊNIES DE  
VARIEDADES LOCAIS DE CACAU**

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

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

Orientador: Dr. Ronan Xavier Corrêa

Co-orientadora: Dra. Edna Dora Martins  
Newman Luz

**ILHÉUS – BAHIA– BRASIL**  
**Novembro de 2019**

S237

Santos, Luana Ferreira dos.

Diversidade genética molecular de matrizes e  
progênes de variedades locais de cacau / Luana  
Ferreira dos Santos. – Ilhéus, BA: UESC, 2019.  
xii, 54f. : il.

Orientador: Ronan Xavier Corrêa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual  
de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Biologia Molecular.

Inclui referências.

1. Cacaueiro. 2. Estrutura do DNA. 3. Marcador  
molecular. 4. Phytophthora. 5. Inoculação. 6. Plantas  
– Melhoramento genético. I. Título.

CDD 633.74

**LUANA FERREIRA DOS SANTOS**

**DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR DE MATRIZES E PROGÊNIES DE  
VARIEDADES LOCAIS DE CACAU**

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

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

APROVADA: 25 de novembro de 2019.

Dra. Mariana Araújo Barreto  
(UNICAMP)

Dra. Francisca Feitosa Jucá Santos  
(UESC)

Dr. Leandro Lopes Loguércio  
(UESC)

Dr. Ronan Xavier Corrêa  
(UESC - Orientador)

## **DEDICO**

Aos meus amados pais, Catarina e José, pelo amor, dedicação, confiança e atenção que me criaram. Por serem os maiores incentivadores dos meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que me fortalece diariamente;

À minha família, que me apoia em todas minhas decisões;

Ao meu orientador, Dr. Ronan Xavier Corrêa, pela excelente orientação, ensinamentos e confiança;

À minha co-orientadora, Dra. Edna Dora Martins Newman Luz, por sempre me receber tão bem e pelo apoio científico e técnico nos experimentos fitopatológicos;

Ao Dr. Cláudio Antônio Ferreira de Melo, pelo apoio nas análises laboratoriais e nas análises dos dados e por toda amizade construída durante esse período;

À Universidade Estadual de Santa Cruz e ao programa de pós-graduação de Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade do mestrado;

Às secretárias do programa da pós-graduação, Fabrícia e Mara, por toda dedicação com a qual exercem seus trabalhos;

Aos professores do programa que contribuíram para minha formação;

À Capes, pela concessão da bolsa de mestrado;

Ao CNPq, pelo suporte financeiro à pesquisa (processo número 309841/2015-1);

À CEPLAC e ao CEPEC, pela autorização da utilização do espaço físico laboratorial;

Ao Centro de Biotecnologia e Genética, pela infra-estrutura e suporte técnico na realização da pesquisa;

Ao meu grupo de pesquisa, por sempre estar disposto em ajudar. Augusto e Nadia, pelo apoio durante as coletas. Jonathan, por toda boa vontade em esclarecer dúvidas e apoio nas coletas e avaliações fenotípicas. Alice, Alberto e Eullaysa, pela disponibilidade em responder alguma dúvida laboratorial. Thaynara, Joana e Jocilene, pelo apoio nas atividades na casa de vegetação. Angra, pelo acompanhamento inicial nas atividades realizadas na

CEPLAC/CEPEC. E à minha irmã acadêmica, Elináira, pela ajuda nas análises laboratoriais, por fazer com que a rotina ficasse mais leve, por estar presente nos momentos felizes e tristes e por sempre me fazer acreditar que tudo daria certo. Vocês são demais!

Ao Regis, pelo apoio durante as coletas na Fazenda Santa Cruz;

À Cenilda Serra e Elisangela dos Santos, pela paciência e apoio nos experimentos fitopatológicos;

À Daniela, Lidiane e Francine, por me receberem tão bem e trazer paz nos meus dias;

À Nayara e Maria Luiza, pela entrega de documentos quando eu não pude estar presente;

E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho. Muito Obrigada!

## ÍNDICE

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| EXTRATO.....                                                                                                        | IX |
| ABSTRACT.....                                                                                                       | XI |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                  | 13 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....                                                                                       | 15 |
| 2.1 <i>Theobroma cacao</i> (Cacaueiro) .....                                                                        | 15 |
| 2.2 Importância econômica.....                                                                                      | 16 |
| 2.3 A doença Podridão parda.....                                                                                    | 17 |
| 2.4 Sistema de avaliação dos sintomas causados por Podridão parda.....                                              | 18 |
| 2.5 Melhoramento e genoma do cacaueiro na resistência a Podridão parda.....                                         | 19 |
| 3. CAPÍTULO I: genetic diversity and resistance to black pod disease in local cocoa varieties from Bahia state..... | 23 |
| ABSTRACT.....                                                                                                       | 23 |
| 3.1 Introduction.....                                                                                               | 24 |
| 3.2 Material and method.....                                                                                        | 25 |
| 3.2.1 <i>Plant Material and Analysis of Cocoa's Resistance to Phytophthora citrophthora</i> .....                   | 25 |
| 3.2.2 <i>Molecular Analysis</i> .....                                                                               | 27 |
| 3.3 Results.....                                                                                                    | 31 |
| 3.3.1 <i>Infection Levels in Cocoa Accessions Inoculated with Phytophthora citrophthora</i> .....                   | 31 |
| 3.3.2 <i>Molecular genetic diversity in relationship the resistance to Black Pod</i> .....                          | 35 |
| 3.3.3 <i>Association Mapping, Genetic Distance, and Structure Associated with Black Pod Resistance</i> .....        | 36 |
| 3.4 Discussion.....                                                                                                 | 40 |
| 3.5 Conclusions.....                                                                                                | 43 |
| 3.6 Acknowledgements.....                                                                                           | 43 |
| 3.7 References.....                                                                                                 | 45 |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 4. CONCLUSÃO GERAL .....           | 49 |
| 5. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES..... | 50 |

## DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR DE MATRIZES E PROGÊNIES DE VARIEDADES LOCAIS DE CACAU

### EXTRATO

A podridão parda é considerada uma das principais doenças que afetam o cacau no Brasil, reduzindo a produção de cacau em regiões cuja cultura possui importância econômica e social, como por exemplo, no Sul da Bahia onde as condições climáticas favorecem o crescimento e disseminação de espécies de *Phytophthora*. A espécie *P. citrophthora* é considerada a mais virulenta no fitopatossistema *Phytophthora*-cacau. Contudo, as variações genéticas em genótipos e cultivares indicam que a resistência genética a esse fitopatógeno pode ser explorada para a seleção de plantas resistentes. Neste sentido, na presente dissertação, objetivou-se analisar a diversidade genética de plantas matrizes de cacau no sul da Bahia, conciliando informações genômicas baseadas em marcadores microssatélites (SSR) e dados fenotípicos obtidos na avaliação do índice de doença. Para isso foram analisados 48 genótipos quanto à análise genômica-molecular e suas progênies quanto à resposta fenotípica a inoculação artificial de *P.citrophthora*. Para obtenção dos dados fenotípicos a inoculação das mudas foi realizada com uma suspensão do isolado *Phytophthora citrophthora* 1893 (Centro de Pesquisa de Cacau - CEPLAC). As folhas foram borrifadas com a suspensão do inóculo e protegidas com uma lona plástica, formando uma câmara úmida, por 36 h. A avaliação dos sintomas causados pela inoculação artificial de *Phytophthora citrophthora* ocorreu após sete dias da inoculação, sendo propostos oito descritores qualitativos dos sintomas de podridão-parda. Diferenças significativas foram verificadas pela ANOVA ( $P < 0,005$ ) e a distinção de classes estatísticas com base no nível de infecção foi obtida utilizando o teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para os dados moleculares foi realizada extração de DNA genômico. As amostras de DNA foram amplificadas com 23 locos microssatélites (SSR) por reação em cadeia da polimerase (PCR), identificados na literatura como relacionados com os QTLs de resistência a *Phytophthora palmivora*. Os parâmetros de diversidade genética foram estimados usando o MS Excel v. 2007 com o suplemento GenAIEx 6.5. A avaliação de alelos / loci comuns entre indivíduos dos acessos testados foi analisada usando o software STRUCTURE 2.3.1 para definir o número de grupos genéticos (K). A correlação e o efeito do alelo marcador, foram analisados quanto aos valores fenotípicos de cada indivíduo usando o TASSEL® GLM. Não foi observada associação desses marcadores com a variabilidade no germoplasma avaliado quanto à resistência a *P.citrophthora*, indicando que as variações genômicas na presente população não coincidem com os polimorfismos presentes nas populações em que esses marcadores foram associados à resistência a *P. palmivora*. Elevada diversidade genética foi observada no germoplasma analisado para as regiões genômicas avaliadas, indicando variabilidade em regiões internas e

flanqueadoras dos QTLs de resistência à podridão parda. Quatro populações foram observadas englobando o germoplasma analisado, mas com poucos genótipos sem mistura subpopulacional. Os resultados da avaliação dos descritores fenotípicos associados aos sintomas causados pela inoculação artificial das mudas com o fitopatógeno, bem como as informações genotípicas que subsidiam a análise da variação entre o germoplasma analisado são úteis para seleção de plantas para trabalhos futuros e também para a formação de populações segregantes pode ser realizada com base.

**Palavras chave:** *Theobroma cacao*, Estrutura genética, Marcadores moleculares, *Phytophthora*.

## MOLECULAR GENETIC DIVERSITY OF MATRICES AND PROGENIES OF LOCAL COCOA VARIETIES

### ABSTRACT

The Black Pod is considered one of the main diseases that affect cocoa in Brazil, reducing cocoa production in regions whose culture has economic and social importance, such as in the south of Bahia State where climatic conditions favor the growth and spread of *Phytophthora* species. The *P. citrophthora* is considered the most virulent in the phytophosphystem *Phytophthora*-cacao. However, genetic variations in genotypes and cultivars indicate that genetic resistance to this phytopathogen can be explored for the selection of resistant plants. In this sense, the present dissertation aimed at inferring the diversity and genetic structure of cacao matrix plants in southern Bahia, reconciling genomic information based on microsatellite markers (SSR) and phenotypic data obtained through the evaluation of the disease index. In this way, 48 genotypes were analyzed for genomic-molecular analysis and their progenies for the phenotypic response to artificial inoculation of *P. citrophthora*. To obtain the phenotypic data, an alternative method of inoculating and evaluated disease was used. The *Phytophthora citrophthora* 1893 isolate was obtained from the Centro de Pesquisa de Cacau - CEPLAC. The leaves of cocoa seedlings were sprayed with the suspension of the inoculum and protected with a plastic tarpaulin, forming a humid chamber. The evaluation of the symptoms caused by the artificial inoculation of *Phytophthora citrophthora* occurred after seven days of the inoculation, being proposed eight qualitative descriptors for brown rot. Significant differences were verified by ANOVA ( $P < 0.005$ ) and the distinction of statistical classes based on the level of infection was obtained using the Scott-Knott cluster at 5% probability. For the molecular data, genomic DNA was extracted. The DNA samples were amplified with 23 microsatellite loci (SSR) by polymerase chain reaction (PCR), previously associated in literature as related to QTLs of resistance to *Phytophthora palmivora*. The genetic diversity parameters were estimated using MS Excel v. 2007 with the supplement GenA1Ex 6.5. The evaluation of common alleles / loci among individuals from the tested accessions was analyzed using the STRUCTURE 2.3.1 software to define the number of genetic groups (K). The correlation and the effect of the marker allele were analyzed for the phenotypic values of each individual using the TASSEL® GLM. There was no association of SSR markers in the germplasm evaluated for resistance to *P. citrophthora*, indicating that the genomic variations in relation to the mechanisms of resistance to both pathogens. High genetic diversity was observed in the analyzed germplasm for the evaluated genomic regions, indicating variability in internal and flanking regions of the brown rot resistance QTLs. Four populations were observed encompassing the analyzed germplasm, but with few genotypes without subpopulation admixture. The results from the evaluation of phenotypic descriptors

associated with the symptoms caused by the artificial inoculation of seedlings with phytopathogen and of genotypic information that support the analysis of the variation between the analyzed germplasm are useful in selection of plants for future work as well as the formation of segregating populations.

**Keywords:** *Theobroma cacao*, Genetic structure, Molecular markers, *Phytophthora*.

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Theobroma cacao* é pertencente da família Malvaceae Juss (APG, 2016) e possui grande importância econômica por ser matéria-prima de diversos produtos, por exemplo, a produção do chocolate (HENDERSON et al., 2007). É na África que se encontram os principais produtores mundiais de cacau, sendo eles Costa do Marfim e Gana (WESSEL et al., 2015). Contudo, o Brasil ocupa a sexta posição na produção mundial de cacau, tendo a Bahia e o Pará como os Estados maiores produtores de cacau do país, respectivamente (ICCO, 2018; CONAB, 2018; RAMOS, 2019).

A produtividade de cacau tem sido afetada por diferentes doenças, sendo a podridão parda considerada a principal por atingir todas as regiões produtoras no Brasil (LANAUD et al., 2009; AKAZA et al., 2016). A podridão parda é causada pelo fitopatógeno *Phytophthora* spp., um Oomyceto que pertence à família Peronosporaceae e afeta diversas culturas de importância econômica mundial (BEAKES et al., 2014). Sete espécies de *Phytophthora* estão relacionadas com doenças em países produtores de cacau, porém, no Brasil foram identificadas até o momento três espécies: *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora capsici* e *Phytophthora citrophthora*, sendo a última a mais virulenta (SANTOS et al., 2009; BAHIA et al., 2015). A retirada dos frutos infectados não é uma estratégia de manejo suficiente para diminuir os impactos da podridão parda, sendo essencial a obtenção de variedades geneticamente resistentes (MICHELMORE, 2003; MACAGNAN, 2005; ZHANG; MOTILAL, 2016).

Diferentes métodos de inoculação artificial têm sido utilizados para avaliar fenotipicamente os sintomas das doenças do cacaueiro com o intuito de avaliar as relações genéticas da resistência e posterior seleção de genótipos e variedades resistentes (CAMPELO; LUZ, 1981; IWARO et al., 2006; BAHIA et al., 2015). Os métodos comumente utilizados de inoculação artificial de espécies de *Phytophthora* em cacaueiros ocorrem por meio do uso de disco foliar e frutos com sistemas de avaliações em nota ou índices contínuos (CAMPELO; LUZ, 1981; NYASSÉ et al., 1995; LUZ; SILVA, 2001; NYASSÉ et al., 2002; BAHIA et al.,

2015), porém novas propostas de métodos podem ser executadas, desde que sigam os requisitos metodológicos necessários para a garantia de uma avaliação adequada da doença (CZERMAINSKI, 1999).

Em diversos trabalhos foram identificados loci para características quantitativas (QTL) que estão associados à resistência da podridão parda (AKAZA et al., 2016; BARRETO et al., 2018; BROWN et al., 2007; CLEMENT et al., 2003; CROUZILLAT et al., 2000; FLAMENT et al., 2001; LANAUD et al., 2004; RISTERUCI et al., 2003), podendo ser relacionados resultados fenotípicos e moleculares para verificar se ocorre associação entre os dados verificados (MUÑOZ, 2019).

Marcadores moleculares são utilizados para a identificação de polimorfismo e análises de diversidade e estrutura genética (SCHNELL et al., 2007). Os marcadores microssatélites possuem aplicabilidade em estudos genômicos, sendo aplicáveis na prospecção de regiões genômicas importantes para a expressão de características agronomicamente úteis, como os QTLs (LANAUD et al., 1999; LIMA et al., 2013). A utilização de marcadores moleculares para identificar regiões genômicas relacionadas com a resistência à podridão parda têm sido discutida em outros estudos, demonstrando variações nos QTLs associados à resistência a essa doença (BROWN et al., 2007; AKAZA et al., 2016; BARRETO et al., 2018). No trabalho de Barreto et al. (2018) foram identificados diferentes QTLs associados à resistência à podridão parda causada por *P. palmivora*, no grupo de ligação 6, *P. citrophthora*, também no grupo de ligação 6, e *P. capsici* nos grupos de ligação 1,2,3 e 4.

A variação de QTLs é influenciada pela espécie relacionada, pois cada uma apresenta expressividade diferente em seus hospedeiros (MASANTO et al., 2019). Tais variações reforçam a importância de mais estudos que possibilitem a identificação de regiões genômicas associadas à resistência da podridão parda. Neste sentido, este trabalho objetivou a inferência da diversidade e estrutura genética de plantas matrizes de cacaueteiro no sul da Bahia, conciliando informações genômicas baseadas em marcadores microssatélites e dados fenotípicos obtidos via a avaliação do índice de doença.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Theobroma Cacao* (cacaueiro)

A espécie *Theobroma cacao* (cacaueiro) pertencente à família Malvaceae Juss (APG, 2016) é diplóide ( $2n=20$ ) e possui genoma com aproximadamente 430 Mb de comprimento (ARGOUT et al., 2011; MOTAMAYOR et al., 2013). O centro de origem do cacaueiro está localizado no Alto Amazonas, sendo a região identificada como o centro de diversidade tanto morfológica como genética (CHEESMAN, 1944). É uma planta perene, alógama, dicotiledônea e cauliflora, tendo a formação das flores no caule e também nos ramos secundários e terciários, apresentando almofadas florais, constituída por flores hermafroditas e pentâmeras, com pétalas, sépalas, estames e estaminóides (ENGELS, 1981; FIGUEIRA et al., 1992; ALVERSON et al., 1999).

O cacaueiro é classificado em três grupos genéticos: o grupo Criollo, originalmente cultivados na América Central, representando as variedades com amêndoas grandes, formato arredondado, cotilédones de coloração branca ou rosa claro, frutos com casca enrugada de coloração verde ou vermelha ainda imaturos e coloração roxa ou amarela quando tornam-se maduros. O grupo Forastero, que pode ser subdividido em dois subgrupos: o Baixo e Alto Amazônico. Essa subdivisão se dá de acordo com a origem do material. O grupo Forastero possui sementes com coloração violeta, seus frutos são ovais e a casca diferente do grupo anterior é lisa, possui cor verde quando imaturos e amarela quando maduros. O grupo Trinitário apresenta características de ambos os grupos citados anteriormente (CHEESMAN, 1944). Uma recente classificação proposta por Motamayor et al. (2008) sugere a existência de 10 grupos, sendo eles: Nacional, Marañon, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Curaray, Guiana e Purús, possibilitando novas estratégias para o melhoramento genético.

## 2.2 Importância econômica

O cacauzeiro possui importância econômica pela ampla utilidade de suas sementes após torradas, que são utilizadas para a produção de diferentes produtos, por exemplo, chocolates, manteiga de cacau, cocadas e cosméticos. Adicionalmente, outras partes dos frutos também são utilizadas na produção de sucos, geléias e até fertilizantes orgânicos (HENDERSON et al., 2007). A África abrange os principais produtores mundiais de cacau, sendo eles Costa do Marfim e Gana (WESSEL et al., 2015). O Brasil até os anos 80 encontrava-se na segunda posição em relação à produção mundial; atualmente, o país ocupa a sexta posição com aproximadamente 200 mil toneladas de amêndoas produzidas em 2018 (ICCO, 2018; CONAB, 2018; RAMOS, 2019). O recurso genético do cacauzeiro no Brasil tem sua maior produção na Bahia com produção mundial de amêndoas de 125,2 mil toneladas, seguido pelo Pará com aproximadamente 73 mil toneladas (ICCO, 2018; CONAB, 2018; RAMOS, 2019).

Na Bahia, o cacauzeiro foi introduzido na região Sul em 1746 pelo Francês Frederico Warneau, encontrando condições favoráveis e similares ao centro de origem, propiciando uma boa produção (ANDRADE, 2003). Devido ao desenvolvimento e manejo do cacauzeiro, a região baiana destacou-se nacionalmente com a produção de 70% do gerado para o mercado no país (IBGE, 2018). As variedades locais de cacau da Bahia demonstraram características únicas, classificando grupos genéticos diferentes dos clones e variedades internacionais e também de variedades aprimoradas utilizadas tanto na região baiana como em outras regiões produtoras do cacau (SANTOS et al., 2015).

Atrelada a importância econômica e social do cacauzeiro, está a redução da produtividade pela influência de diversos fatores, dentre os quais inclui-se a ocorrência de doenças (LUZ ET AL., 2005; LANAUD et al., 2009; AKAZA et al., 2016). O cacauzeiro pode ser afetado por doenças causadas por oomicetos, fungos, vírus e nematoides. Essas doenças afetam a maioria dos países produtores de cacau, sendo exemplo delas a podridão parda causada por *Phytophthora* spp., a vassoura-de-bruxa causada por *Moniliophthora perniciosa*, e a Monilíase causada por *M. roreri* (EVANS, 2007; OLIVEIRA; LUZ, 2005; BARRETO, 2014). Outras doenças de menor impacto também foram identificadas, como a Murcha de *Ceratocystis* causada pelo fungo *Ceratocystis*, a Murcha de *Verticillium* causada por *Verticillium*, e o mal-rosado causado por *Erythricium salmonicolor* (OLIVEIRA; LUZ, 2005). Na Bahia, as lavouras de cacauzeiro vêm sofrendo redução da produção, principalmente pela existência dos problemas fitossanitários como a podridão parda e a

vassoura-de-bruxa, que promovem danos significativos e consideradas as doenças mais devastadoras da região (OLIVEIRA; LUZ, 2012).

### 2.3 A doença Podridão parda

Podridão parda é uma doença causada por espécies de oomicetos do gênero *Phytophthora spp.*; esse grupo é conhecido como "destruidor de plantas" devido aos efeitos causados na produção de cacau, com perda que podem chegar a 100%, aliados a fatores como clima e espécie de *Phytophthora* envolvida a interação cacaueiro-*Phytophthora* (AKROFI et al., 2003; PLOETZ, 2007; POKOU et al., 2008). O ciclo biológico de *Phytophthora spp.* compreende duas fases: a fase conhecida como vegetativa ou assexual, que é caracterizada pela formação dos esporângios através de um talo micelial, uma condição essencial para a germinação ou formação de estruturas que promova resistência, e, a fase sexual que é caracterizada pela formação de órgãos sexuais femininos e masculinos (oogônios e anterídios, respectivamente) (BLAHA, 1976).

Na Bahia, a doença ficou conhecida desde 1927, sendo o motivo da diminuição de 30% da produção anual. Todas as partes da planta são afetadas, tendo os maiores prejuízos nos frutos que podem apresentar suscetibilidade em qualquer uma das fases de desenvolvimento (BASTOS et al., 2016). A proporção do sintoma varia de acordo com a variedade que foi infectada e o quanto a cepa é agressiva (NYASSÉ et al., 1995; ÉRSEK; RIBEIRO, 2010). O patógeno penetra nos tecidos hospedeiros por aberturas naturais como as células epidérmicas e os estômatos, a fase inicial da infecção é caracterizada pelo aparecimento de pequenas manchas cloróticas com poucos dias após a infecção, com o passar dos dias elas se tornam mais escuras e amplia-se com rapidez, podendo se espalhar por todo o fruto no período de 14 dias. (LUZ; SILVA, 2001; CAMPELO; LUZ, 1981; BOWERS et al., 2001).

Após infectados, os frutos se tornam gradualmente escuros e com um cheiro ruim quando o estágio está mais avançado. O patógeno penetra no tecido interno dos frutos ocasionando descoloração, modificando também as características das sementes (BOWERS et al., 2001) que passam a ser descartadas para o uso em indústrias. A infecção nos frutos ocorre através dos oósporos liberados de esporângios, sendo fundamental uma superfície úmida no fruto para que comece o processo de germinação e penetração (BASTOS et al., 2016). Os efeitos ocasionados em demais partes do cacaueiro muitas vezes são ignorados pela irrelevância econômica (APPIAH et al., 2004). (MEDEIROS, 1969).

Sete espécies de patógeno estão envolvidas com a doença nos países produtores de cacau, no entanto, três delas foram identificadas no Brasil: *Phytophthora palmivora*, caracterizada por ser cosmopolita e possuir ocorrência em todas as regiões produtoras de cacau; *P. citrophthora*, uma espécie rara e mais virulenta; e *P. capsici*, sendo uma espécie comum no continente Americano; Essas três espécies compõem o complexo podridão parda (OLIVEIRA; LUZ, 2005; LAWRENCE; LUZ, 1982; LUZ; SILVA, 2001). Na Bahia, a espécie *P. capsici* teve a predominância de 95% das infecções nos frutos entre os anos de 1977 e 1981, porém no início da década de 1980, também foi observada a predominância de *P. citrophthora*, espécie que agride frutos, folhas, caules e raízes, necessitando de um curto tempo para a germinação e penetração dos zoósporos (CAMPÊLO et al., 1982; PRIA; CAMARGO, 1997; LUZ et al., 2003). O controle da doença feito a partir de retirada de frutos contaminados não é suficiente para controlar a doença, sendo necessário o desenvolvimento de cultivares geneticamente resistentes, sendo uma estratégia mais eficaz e durável (MICHELMORE, 2003; MACAGNAN, 2005; ZHANG; MOTILAL, 2016).

## **2.4 Sistema de avaliação dos sintomas causados por podridão parda**

A avaliação de doenças do cacaueiro tem sido realizada com a utilização de diferentes métodos de inoculação, contribuindo para a seleção de plantas resistentes (CAMPELO; LUZ, 1981; IWARO et al., 2006; BAHIA et al., 2015). De modo geral, a avaliação das respostas fenotípicas a inoculação artificial em cacaueiro envolvendo a interação deste com espécies do gênero *Phytophthora* têm sido realizada para a obtenção de um perfil contínuo da resistência utilizando notas ou índices de severidade (BAHIA et al., 2015). Os diferentes sistemas propostos para a avaliação da resistência a podridão parda não consideram a simples análise dicotômica (0 e 1) que permitem apenas a verificação de plantas resistentes e susceptíveis sem a variação contínua dos efeitos fenotípicos relacionados aos sintomas e aos diferentes níveis de resistência. Neste caso, a análise de notas que variam de 0 a 5 têm sido utilizada para a avaliação sistemática dos efeitos da podridão parda em cacaueiro, indicando uma variação de escala qualitativa, pois esses valores estão associados a denominações de resistência (0 = sem sintomas; 1 = sintomas isolados com manchas pequenas marrons; 2 = manchas pequenas marrons com interconexões entre elas; 3 = manchas marrons formando lesões coalescentes de área intermediária; 4 = lesões coalescentes largas com manchas cor marrom claro ou escuro; 5 = lesão necrótica larga (BAHIA et al., 2015).

As avaliações da resistência a podridão parda em cacauieiro têm sido analisadas utilizando em geral o método clássico de inoculação em disco foliar (NYASSÉ et al., 1995; NYASSÉ et al., 2002; BAHIA et al., 2015). Essa metodologia alternativa exige padronizações em relação à qualidade do material vegetal, volume e concentração do inóculo, e também da estrutura anatômica do disco foliar, principalmente em relação à disposição e o número de nervuras foliares (NYASSÉ et al., 2002; BAHIA et al., 2015). Adicionalmente, a verificação da resistência à podridão parda também tem sido realizada com a inoculação em frutos verdoengos, mas esse método também exige a padronização máxima entre os estados de maturação, tamanho e volume das amostras vegetais (CAMPELO; LUZ, 1981; LUZ; SILVA, 2001). Ambos os métodos têm sido discutidos na literatura, quanto à eficácia em relação a permitir a detecção do perfil de resistência de acessos, clones e cultivares. Outra questão relevante entre os métodos de avaliação é a possibilidade da inclusão de repetições experimentais e da utilização da estatística indutiva para a avaliação dos dados patométricos (SANTOS et al., 2009).

A avaliação dos níveis de resistência do cacauieiro aos agentes causadores da podridão parda por meio da avaliação de discos foliares e/ou frutos incluem diversas variáveis técnicas e das repetições, que aliadas à laboriosidade da produção das repetições experimentais podem exigir métodos alternativos de inoculação. A proposta de novos métodos de inoculação e avaliação dos descritores fitopatológicos pode ser realizada, desde que seguindo a descrição precisa do modo de condução experimental e de avaliação. Juntamente com a avaliação de descritores, a descrição dos índices de doença ou de notas para a posterior análise estatística também são exigências metodológicas necessárias para a inclusão de novos métodos avaliativos (CZERMAINSKI, 1999).

## **2.5 Melhoramento e genética da resistência do cacauieiro a podridão parda**

O cacauieiro possui resistência genética a diversas doenças, que no geral é uma característica quantitativa no âmbito da interação planta oomiceto ou planta fungo (CLAIR, 2010; McELROY et al., 2019). Atualmente, há um consenso entre os melhoristas sobre a utilização da resistência genética intraespecífica como a melhor estratégia para vencer os problemas fitossanitários relacionados à resistência quantitativa (NYADANU et al., 2012). No cacauieiro, a seleção de plantas resistentes tem sido comumente relacionada à identificação de genótipos resistentes a fitopatógenos por meio da inoculação artificial em experimentos controlados, fato que reduz a influência de parâmetros ambientais nas respostas fenotípicas a

infecção. Desta forma, genótipos podem ser selecionados com base nas características genômicas e de expressão gênica para a resistência, subsidiando diversos estudos aplicados à análise fitopatológica (NYADANU et al., 2012; MCELROY et al., 2018).

A seleção de genótipos resistentes não é o único objetivo dos projetos que intencionam o estudo global da interação planta-patógeno, mas também a indicação de plantas contrastantes para a resistência, ou seja, plantas susceptíveis que possam ser utilizadas como controle experimental para a suscetibilidade. Neste caso, a utilização de plantas contrastantes para a resistência permite maior precisão experimental em qualquer análise fitopatológica, principalmente as que envolvem o procedimento metodológico de inoculação artificial. Os acessos TSH1188 e CCN-51 têm sido utilizados não apenas como controles para a suscetibilidade (resistência moderada) e resistência, respectivamente, mas também como genitores contrastantes para a obtenção de populações segregantes visando a análise da resistência podridão parda. Contudo, ambos os acessos têm sido susceptíveis a *P.citrophthora*, espécie considerada a mais virulenta em relação às demais, sendo a variedade de cacaueiro Sca 6 a mais resistente (BAHIA et al., 2015).

Os marcadores moleculares são considerados ideais para a identificação do polimorfismo genômico e a subsequente análise da diversidade e estrutura genética de populações naturais, e também a seleção baseada em marcadores moleculares (SCHNELL et al., 2007). Ultimamente os marcadores moleculares do tipo microssatélites (SSR) têm sido os mais aplicáveis ao estudo das relações genéticas entre germoplasma contrastantes, populações segregantes e progênies obtidas de polinização aberta ou controlada (LANAUD et al., 1999; CLAIR, 2010). Muito embora os marcadores de polimorfismo de sequência única (SNPs) também tenham uma importante aplicabilidade no estudo das relações genômicas e de expressão de características agronomicamente importantes em cacaueiro, os marcadores SSR são menos laboriosos e igualmente informativos para a análise da diversidade em um locus de característica quantitativa (QTLs) (LANAUD et al., 1999; LIMA et al., 2013).

A formação de populações segregantes visa à análise conjunta de dados genômicos, como dos marcadores moleculares, com informações acerca do sintoma associado à infecção promovida pelo fitopatógeno, a fim de identificar possíveis associações entre as informações genômicas e os dados fenotípicos. Neste sentido, subsidiam-se os mapeamentos genômicos e sua relação com o fenótipo, e também o efeito de QTLs na variação fenotípica associada à determinada característica, como, por exemplo, resistência a doenças (BROWN et al., 2007; BARRETO et al., 2015). Em paralelo aos QTLs de resistência a doenças propostos no

cacaueiro, nesta espécie, genes não relacionados à locus quantitativos também são responsáveis ao efeito da variação fenotípica (BARRETO et al., 2015).

A associação de dados fenotípicos e moleculares para a análise da resistência e dos fatores genômicos relacionados a esse efeito podem ser abordados por uma análise integradora. Informações relacionadas ao genoma, expressão de proteínas de resistência e avaliações de sistemas fenotípicos de índices de doenças ou notas de sintoma, são dados úteis à realização de associações com o uso de algoritmos específicos em uma abordagem bioinformática (MUÑOZ, 2019). Em cacaueiro a análise de associação de dados moleculares e fenotípicos, indicou à associação de locos SSR com a resistência à podridão parda, explicando de 7,33 a 3,72% da variação. Adicionalmente genes candidatos também foram indicados, mas neste caso, com a utilização de domínios funcionais no sistema de análise de bioinformática. Essas informações permitem não apenas a localização de regiões genômicas em potencial para a variação fenotípica associada à resistência a podridão parda, mas possibilitam também a investigação genômica comparativa entre acessos e cultivares (MUÑOZ, 2019).

A aplicação de marcadores moleculares para investigação de regiões genômicas associadas à variação da expressão da resistência a podridão parda tem sido reportada em estudos anteriores, indicando variação nos QTLs de resistência propostos para essa doença (BROWN et al., 2007; AKAZA et al., 2016; BARRETO et al., 2018) que representam juntos a maior porção dos grupos de ligação de *T. cacao*. A prospecção de regiões genômicas de resistência à podridão parda tem sido realizada pela utilização da espécie *P. palmivora* como patógeno para a geração de sistemas de avaliações fenotípicas e a conciliação de informações genéticas (BARRETO et al., 2018).

Em *P. palmivora* apenas um QTL (q1.BP.Pp) foi identificado por Barreto et al. (2018), localizado no grupo de ligação 6 com 73,00 cM explicando 2,543% da variação fenotípica associada a podridão parda promovida por esse patógeno. A interação entre o cacaueiro as espécies *P. citrophthora* e *P. capsici* tem permitido a identificação de poucos QTLs que influenciam a variação fenotípica da resistência (BARRETO et al., 2018). Um exemplo é o único QTL identificado através dos resultados genômicos e fenotípicos do cacaueiro frente à infecção de *P. citrophthora*, o QTL 'q1.BP.Pct' na posição do marcador mTcCIR006. Essa região genômica é responsável por explicar 3.299% da variação em uma população segregante (BARRETO et al., 2018). Para a espécie *P. capsici* na interação com o cacaueiro, as informações genômicas indicam a existência de quatro QTLs com efeitos de 9.889% na variação fenotípica para a resistência. Os grupos de ligação que englobam esses

QTLs com efeito aditivo são 2, 3 e 4, e QTL por dominância é o grupo 1 (BARRETO et al., 2018).

A identificação de QTLs e o seu efeito na variação da resistência se relacionam diretamente com o patógeno, pois a espécie e sua variação genética promovem sintomas diferentes em relação, principalmente a expressividade nos diferentes germoplasmas analisados (MASANTO et al., 2019). Adicionalmente, a elevada variância genotípica da resistência a *P. citrophthora* em relação às outras três espécies presentes no sul da Bahia também resultam em diferentes respostas sintomáticas observados em ensaios de inoculação (BAHIA et al. 2015). As variações genéticas no patógeno e nos hospedeiros reforçam a necessidade de novos estudos genômicos do cacaueiro visando à identificação de outras regiões cromossômicas responsáveis pela variação e expressão da resistência a podridão parda.

### 3. CAPITULO I

#### Genetic Diversity and Resistance to Black Pod Disease in Local Cocoa Varieties from Bahia State

Luana Ferreira Santos<sup>1</sup>; Cláudio Antônio Ferreira de Melo<sup>2</sup>; Jonathan Javier Mucherino Muñoz<sup>1</sup>; Edna Dora Martins Newman Luz<sup>3</sup>; Ronan Xavier Corrêa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais. Rod. Jorge Amado, Km 16, s/n, 45662-900, Ilhéus, BA, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Biotecnologia e Genética. Rod. Jorge Amado, Km 16, s/n, 45662-900, Ilhéus, BA, Brasil.

<sup>3</sup>MAPA/CEPEC/CEPLAC, Rodovia Ilhéus/Itabuna, Km 22, CEP 45.600-970, Ilhéus/BA, Brasil.

\*Corresponding author. E-mail addresses: ronanxc@uesc.br (R.X. Corrêa ORCID 0000-0002-4010-1565)

Short Running title: Resistance to Black Pod Disease in Cocoa

#### Abstract

Black Pod is one of the main phytosanitary problems in cocoa-producing regions around the world, causing losses in fruit production and quality, especially in regions with favorable weather conditions and virulent pathogen. We aimed to evaluate the resistance to black pod disease caused by *Phytophthora citrophthora* in local cocoa varieties, and determine their genetic diversity based on simple sequence repeat (SSR) loci polymorphisms. Three resistance classes were inferred from the disease symptoms observed in the phytopathological assays. No association was observed between SSR polymorphisms and resistance to these phytopathogens, as compared to the responses obtained by inoculating cocoa accessions with *Phytophthora citrophthora*. Higher genetic diversity was observed in resistant compared to susceptible local plant varieties, indicating subpopulation genetic variations in these cocoa varieties. Four subpopulations were observed by genetic structure analysis of SSR loci, but it shows no association with resistance patterns in these varieties. The descriptors used here, in conjunction with the genetic diversity information can be used to select resistant plants for forming segregating populations, plant genotypes for use in genetic improvement.

**Keywords:** artificial inoculation; molecular marker; plant breeding; phytopathology; *Phytophthora citrophthora*; *Theobroma cacao*.

### 3.1 Introduction

*Theobroma cacao* L. (Malvaceae) (APG, 2016) is a socially and economically important plant, being the raw material for chocolate and providing a livelihood resource for millions of people worldwide (Green America, 2014). The world's leading cocoa producers are Ivory Coast, Ghana, Indonesia, Nigeria, Brazil, Ecuador, and Cameroon (Wessel et al., 2015). In Brazil, southern Bahia stands out by representing 70% of national production, making it the country's largest cocoa producer (IBGE, 2018). Until 2003, local cocoa varieties prevailed in Bahia, being equivalent to 50% of cocoa cultivation in the State (Pires, 2003; Santos et al., 2015). However, the productivity of these varieties has decreased in recent years due to influences from different factors, including black pod disease, which directly affects cocoa plants and fruits, and thus, reduces production (Lanaud et al., 2009; Akaza et al., 2016). This disease is caused by *Phytophthora* spp., an Oomycota belonging to the Peronosporaceae family (Beakes et al., 2014). Bahia's local cocoa varieties are unique materials forming different genetic groups based on international clones and improved varieties used in the cocoa region of Bahia and other producing regions (Santos et al., 2015). On the other hand, these varieties are adapted to these regions and have the potential to produce flavored chocolate for different consumer markets. Because of this, it is relevant to identify genotypes with resistance levels that make their cultivation viable.

The three species of *Phytophthora* causing black pod in Brazil are *Phytophthora palmivora*, *P. capsici*, and *P. citrophthora*, with the latter being the most devastating one (Bahia et al., 2015; Santos et al., 2009). However, many resistance studies have conducted tests with *Phytophthora palmivora*, as it is the most widespread species in Brazilian producing regions (Valbuena, 2017; Santos, 2019).

Black pod disease occurs during the colder months, at temperatures below 20 °C and humidity above 85% (Luz & Silva 2001; Oliveira & Luz 2005). Infection begins with small patches that develop a dark brown color, reaching the total fruit area within 10 to 14 days, depending on the cocoa variety and *Phytophthora* species (Luz & Silva 2001). The removal of diseased fruits and cacao pruning are used to control the disease but do not provide full control, as these methods do not decrease the source of inoculum (Akaza et al., 2016). One strategy aimed at preventing the disease is developing genetically resistant cultivars, which is an effective possibility in controlling black pod (Barreto et al., 2018).

Several studies have identified the quantitative trait loci (QTL) associated with resistance to *Phytophthora* (Akaza et al., 2016; Barreto et al., 2018; Brown et al., 2007; Clement et al., 2003; Crouzillat et al., 2000; Flament et al., 2001; Lanaud et al., 2004; Risteruci et al., 2003). Brown et al. (2007) found three QTLs from a population of 256 individuals from the Pound7 x UF273 crossing, with QTLs found in the linkage groups (LGs) 4, 8, and 10. Subsequently, in another study, Akaza et al., (2016) detected eight QTLs for fruit resistance and three QTLs for leaf resistance.

Genetic diversity in genomic regions associated with resistance to black pod (*Phytophthora palmivora* and *P. capsici*) was analyzed by amplification and analysis of SSR markers located on the QTLs proposed by Brown et al. (2007), Akaza et al. (2016), and Barreto et al. (2018), covering seven of the 10 cocoa linkage groups (Pugh et al., 2004; Brown et al., 2007; Fouetet al., 2011; Akaza et al., 2016; Barreto et al., 2018). The last cacao genomic mapping related to identifying QTLs for resistance to black pod disease species with phytosanitary importance in Brazil allowed the identification of six QTLs, one for resistance to *Phytophthora palmivora*, one for *Phytophthora citrophthora* and four to resistance to *Phytophthora capsici* (Barreto et al., 2018). Therefore, it is justified to investigate whether these QTLs could explain the resistance in local cocoa cultivars in Bahia, especially for the most virulent species *P. citrophthora*.

The present study aimed at evaluating the resistance to black pod disease in local cocoa varieties from commercial plantations in southern Bahia, determine the molecular genetic diversity of these cocoa accessions, and verify whether resistance levels are associated with microsatellite (SSR) locus polymorphisms in genomic regions previously associated with black pod disease resistant QTLs.

## 3.2 Material and Methods

### 3.2.1 Plant material and analysis of Cocoa's resistance to *Phytophthora citrophthora*

Fruits from open pollination of cocoa tree matrices were collected at Santa Cruz Farm, Arataca, Bahia, Brazil (15° 15.781 S, 39° 31.038 W) and were used to analyze resistance to *Phytophthora citrophthora*. The plants were selected to represent the local cocoa varieties of Bahia, commonly referred to by farmers as “*comum*” and “*maranhão*,” which are grown in an agroforestry system locally called “*cabruca*”, in which shade for cocoa trees is provided by native trees of the Atlantic forest in southern Bahia. For the production of cocoa seedlings, we sampled fruits from 25 *comum* cocoa trees, 26 *maranhão*, one resistant control (hybrid 7004),

and three susceptible controls (TSH1188, SIC23, and Catongo). Seeds from the collected fruits were washed, pre-germinated for 48 h in water changed every 12 h, and then planted in 1.5 L plastic bags, obtaining 13 plants to represent the statistical repetitions for the phytopathological evaluations.

*Phytophthora citrophthora* isolate 1893 was obtained from the Mycological Collection of the Cocoa Research Center (CEPEC at the Executive Commission for Cocoa Cultivation Planning – CEPLAC) and multiplied according to previous standard procedures for inoculum production (Luz & Silva 2001). The concentration of the inoculum suspension was standardized by light microscope observation using a plate with a concentration of  $3.0 \times 10^5$ /mL or higher. The seedlings were kept under greenhouse conditions at  $25 \pm 2$  °C, relative humidity around 80% until 60 days after seed germination. These plants at the fully expanded 4-leaf stadium were protected with a plastic tarp (cultivation tunnel over the bench in the greenhouse), thus forming a humid chamber equipped with distilled water-powered humidifiers to obtain moisture above 95%, and were then submitted to inoculation with the pathogen. These seedlings were sprayed with the inoculum suspension and remained under these conditions for 36 h. During inoculation, the abaxial and adaxial regions of leaves received two sprays of approximately 2 mL of inoculum suspension per plant.

Symptoms caused by manual inoculation of the *Phytophthora citrophthora* were evaluated at 7 days after inoculation. The following qualitative descriptors for black pod disease were proposed: remnant leaves (RL), with 1 to 4 leaves remaining after infection, and the presence or absence of necrotic leaf (NL), withered leaf (WL), dry leaf (DL), generalized chlorosis (GC), necrosis stem (NS), dry stem (DS), and dead plant (DP). The descriptors were evaluated by binary values of 0 or 1, where 1 is characterized by the presence of the analyzed lesion. However, for the RL descriptor statistical weight was assigned proportional to the remnant of each leaf, where for the remnant of four, three, two, one and zero leaves were assigned weight 0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1, respectively. The sum of the qualitative values with equal statistical weight was used to obtain the infection level value, which must be proportional to the resistance to black pod based on the experimental controls for resistance and susceptibility. Significant differences were verified by ANOVA ( $P < 0.005$ ) using the phytopathological symptoms observed in the 13 replicates per access. The distinction of statistical classes based on the infection level was obtained using the Scott-Knott cluster at 5% probability. The verification of the difference between the groups generated in the previous test was performed using t-test in excel 2013 software.

### 3.2.2 Molecular Analysis

Leaves collected from 48 cacao trees and also the susceptibility controls were washed with distilled water and used for genomic DNA extraction using the protocol proposed by Doyle and Doyle (1990) with modifications. Plant material was macerated with liquid nitrogen, and the resulting powder was conditioned in 2% CTAB extraction buffer (1.5 M NaCl; 100 mM Tris-HCl; 20 mM EDTA; 0.2% B-Mercaptoethanol) and set in a water bath at 65 °C for 40 min. Nucleic acids were isolated with a solution of phenol, chloroform, and isoamyl alcohol (25:14:1), and the precipitation was done with ice-cold isopropanol. Genomic DNA was resuspended in Tris-EDTA pH 8.0 buffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA), and the extracted DNA concentration and quality were then evaluated by electrophoresis (100V for 20 min) in 1.0% agarose gel. DNA from each sample was diluted to 5 ng/μL in ultrapure water.

The DNA samples were amplified with 23 microsatellite loci (SSR) developed for *Theobroma cacao* and associated with black pod resistance caused by *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora capsici* (Brown et al. 2007; Akaza et al. 2016; Barreto et al. 2018) (Table 1). The SSR loci were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using 1x DNA *Taq* polymerase buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, MgCl<sub>2</sub> at 2 mM, pH 8.5); 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 250 μM dNTP; 0.2 μM primer; 0.2 μM M13 primer (FAM, NED, VIC or M13-tailed PET); 1U *Taq* polymerase; and 15 ng of genomic DNA from each sample in a final reaction volume of 13 μL. Reactions were performed in Applied Biosystems thermal cyclers in the following conditions: 35 cycles of 94 °C for 45 s, 56 °C for 45 s, 72 °C for 45 s, 72 °C for 10 min, and then 4 °C until use. The amplification products were analyzed with SYBR-stained 1.5% agarose gel electrophoresis to confirm the amplification quality. Genotyping was performed on an ABI 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Allele length was determined using the standard size of GeneScan TM – 500 LIZ<sup>®</sup> with the aid of the Genemapper<sup>®</sup> program (Applied Biosystems).

The genetic-diversity parameters were estimated using MS Excel v. 2007 with the GenAlEx 6.5 supplement (Peakall & Souse 2012). The general population was analyzed, then the mean values for the subdivided resistant and susceptible subpopulations were estimated following the parameters: average allele size per locus (M<sub>s</sub>); Number of alleles per locus (N<sub>a</sub>); effective number of alleles (N<sub>e</sub>); Shannon information index (I); observed heterozygosity (H<sub>o</sub>); expected heterozygosity (H<sub>e</sub>); fixation index (F); and polymorphic information content (PIC).

A dendrogram based on SSR loci variation in the population was produced using the simple matching coefficient of similarity and the weighted neighbor-joining cluster through the DARwin software (Perrier & Jacquemoud-Collet 2006).

The assessment of common alleles/loci among individuals from the accessions tested was analyzed using the STRUCTURE 2.3.1 software (Pritchard, 2000) to define the number of genetic groups (K). Then, 10,000 Markov Monte Carlo chain simulations were performed with 10,000 burns-in using Bayesian methods. The admixture ancestry was evaluated for K values 1 to 10 with 10 interactions.

The correlation representing allelic and phenotypic variations as well as the effect of the marker allele were analyzed for the phenotypic values of each individual using TASSEL<sup>®</sup> GLM (Casstevens & Wang 2015). A phenotypic and genotypic matrix and structure data were applied as inputs. A total of 1000 permutations were tested by calculating the predicted and residual values of the reduced model and then exchanging the residuals and entering the predicted values (Anderson & TerBraak 2003).

**Table 1.** Characterization of microsatellite loci using 23 SSR markers flanking QTLs associated with resistance to black pod disease caused by *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora capsici*.

| Marker Namer | Marker Reference | LG | QTL                | QTL Reference                           | Forward Primer       | Reverse Primer        | RS                 |
|--------------|------------------|----|--------------------|-----------------------------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|
| mTcCIR37     | USDA             | 10 | Phytoph3           | Brown et al. 2007                       | CTGGGTGCTGATAGATAAT  | AATACCCTCCACACAAAT    | (GT)15             |
| mTcCIR61     | CIRAD/USDA       | 10 | Phytoph3           | Brown et al. 2007                       | GCAGTCTGAAACAAGATAA  | TGACTATAATATAAGGCGAA  | (CA)18             |
| mTcCIR81     | Pugh et al. 2004 | 3  | q3.BP-Pc FOL/100/3 | Barreto et al 2018<br>Akaza et al. 2016 | ACAATCTGTCCATTATTCTG | TGAAACTCCCATACTACTGA  | (CT)15             |
| mTcCIR95     | Pugh et al. 2004 | 4  | q4.BP-Pc PRR/100/4 | Barreto et al 2018<br>Akaza et al. 2016 | CATCGTCTTCCTCTCATC   | CTCCTTCCCTTTCTCTC     | (TC)4 CC           |
| mTcCIR118    | Pugh et al. 2004 | 1  | PRR/H/1            | Akaza et al. 2016                       | TCTGCCTGAAAATGTCTC   | TGGGGCACTAACTTTTG     | (GA)10             |
| mTcCIR131    | Pugh et al. 2004 | 3  | q3.BP-Pc           | Barreto et al 2018                      | GATCATCGGTAAAGTAAAAT | TGAGTAAGAAAAAGTAGAAAA | (GA)9 C (GA)4      |
| mTcCIR152    | Pugh et al. 2004 | 2  | q2.BP-Pc           | Barreto et al 2018                      | CAGTAGTCAAAACATCAAA  | GTAATCCAAATAATAAGCAT  | (TC)9 CC (TC)15    |
| mTcCIR168    | Pugh et al. 2004 | 4  | Phytoph1           | Brown et al. 2007                       | GGTAGTATTGAGGTGCGTAT | GTGAATGAATGGATGTGAAA  | (TC)9              |
| mTcCIR176    | Pugh et al. 2004 | 2  | q2.BP-Pc           | Barreto et al 2018                      | TCACCAATTCTCTGCTC    | AATGAAATTACCTCCTTAC   | (TG)16             |
| mTcCIR184    | Pugh et al. 2004 | 1  | PRR/H/1            | Akaza et al. 2016                       | GGTTTTCTAGCTCCTCC    | AGGAAAGAATGACTCATACTA | (CA)8 (CT)13       |
| mTcCIR200    | Pugh et al. 2004 | 8  | Phytoph2           | Brown et al. 2007                       | CTTAAATAAGCCCAAATAC  | GCCAATTTCTGACCCA      | (TG)8              |
| mTcCIR213    | Pugh et al. 2004 | 4  | PRR/95/4           | Akaza et al. 2016                       | GATCTCGCAAACTAACA    | TAAGTAAATGAAGGTGTGA   | (CT)26             |
| mTcCIR237    | Pugh et al. 2004 | 4  | q4.BP-Pc           | Barreto et al 2018                      | GAAGACAAGGATGGAGACT  | GCAAAGAGAGCAGGAGA     | (TC)10             |
| mTcCIR240    | Pugh et al. 2004 | 2  | PRR/95/2           | Akaza et al. 2016                       | AGTGATTTATGGGACTTT   | CATACCTACTACTGCTCTCT  | (CT)22             |
| mTcCIR255    | Pugh et al. 2004 | 6  | q1.BP-Pp           | Barreto et al 2018                      | TTTACCTCCACCATCTT    | TGGCACTTATCTATTACTGT  | (AC)11             |
| mTcCIR268    | Pugh et al. 2004 | 2  | q2.BP-Pc PRR/95/2  | Barreto et al 2018<br>Akaza et al. 2016 | CAGTGAAGAGGCAAGAGA   | TGTAATCCAAATAATAAGCAT | (GA)17 GG (GA)9    |
| mTcCIR273    | Pugh et al. 2004 | 1  | FOL/100/1 q1.BP-Pc | Akaza et al. 2016<br>Barreto et al 2018 | ACGGCATTAGAGAGAGA    | AGAATGATCGCAGAGAG     | (CT)4 AC (CT)13 TT |
| mTcCIR275    | Pugh et al. 2004 | 1  | q1.BP-Pc           | Barreto et al 2018                      | GGTTTGTTTTTGTAAGAC   | TAAGAGAGAGTGATGCTGACA | (CT)11             |
| mTcCIR282    | Pugh et al. 2004 | 8  | PRR/H/8            | Akaza et al. 2016                       | AGCAAAGGCAATAATAATG  | TGGTGAGGGGAGAGAA      | (GA)2 GG (GA)6     |

|           |                  |   |                        |                                       |                    |                      |        |
|-----------|------------------|---|------------------------|---------------------------------------|--------------------|----------------------|--------|
| mTcCIR291 | Pugh et al. 2004 | 6 | PRR/H/6<br>PRR/100/6.2 | Akazaet al. 2016<br>Akaza et al. 2016 | AGTCCCATAGGTTCCAAT | CGAGGTTATCCCCAAA     | (CT)12 |
| mTcCIR337 | Fouetet al. 2011 | 6 | PRR/H/6                | Akazaet al. 2016                      | ACGAAGCCGTAACCTGG  | TGCAGGACTCTCTGTCACT  | (GGA)5 |
| mTcCIR410 | Fouetet al. 2011 | 3 | FOL/100/3              | Akazaet al. 2016                      | TTTGCCTCCCTTGTTCT  | TGAATCGTTGAGCGAAAG   | (TA)10 |
| mTcCIR444 | Fouetet al. 2011 | 8 | PRR/H/8                | Akazaet al. 2016                      | TGAACCGGATTGTTGGA  | GGGACTTAATCTGGACATGC | (TC)15 |

---

LG:linkagegroup, QTL:quantitative trace loci, RS:repeating sequence.

### 3.3 Results

#### 3.3.1 Infection Levels in Cocoa Accessions Inoculated with *Phytophthora citrophthora*.

The evaluation of symptoms using the phytopathological descriptors proposed in the present study indicated significant differences in the black pod infection level among local cocoa cultivars (ANOVA,  $P < 0.001$ ) (Table 2; Figures 1). The Scott-Knott cluster showed the formation of three statistical classes by infection level: Class C, with a mean infection level statistically similar to the susceptibility controls (TSH1188, SIC23, and Catongo); Class B, with intermediate infection level between the two extreme classes, and Class A, distributing the accesses together with the resistance control (7004) (Table 2 and Figura 2).

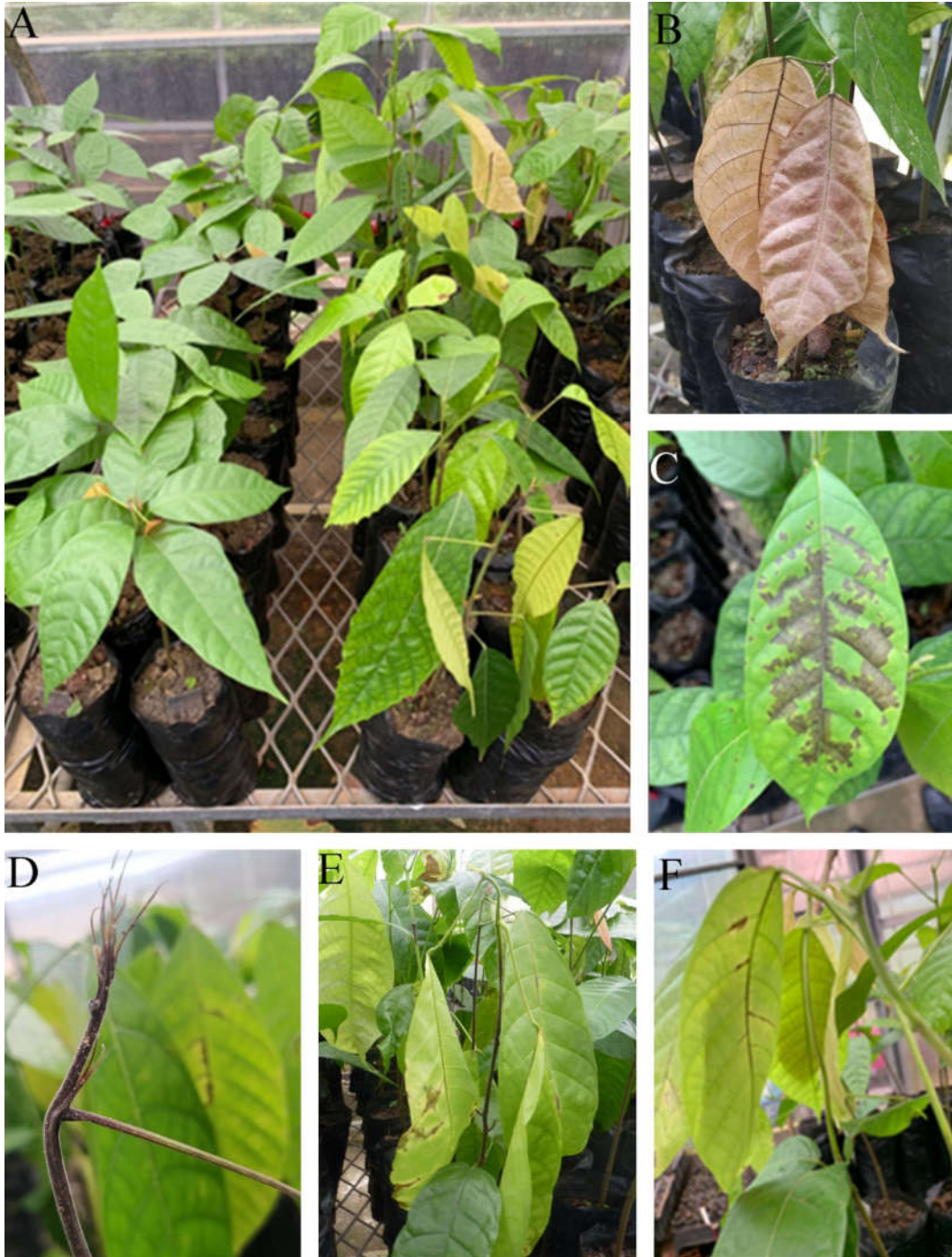
Class C represented 56.6% of the germplasm analyzed under field conditions, except for the control accessions. Class B accounted for 35.85% of the accessions, while only 7.55% of the field germplasm were in class A. In class C, the group for susceptibility to black pod included 14 accessions from the *comum* variety and 13 from the *maranhão* variety (Table 2). In class A, the group for resistance, the *comum* variety was represented by two statistically similar accessions at infection levels to 7004, while the *maranhão* variety had just one accession in this class. Among the *comum* variety, only seven accessions were arranged in class B, which had more representation of the *maranhão* variety, with 11 accessions present in this class.

**Table 2.** Grouping of inferred cocoa accessions based on the infection levels of seedlings (leaves and stems) inoculated with *Phytophthora citrophthora*.

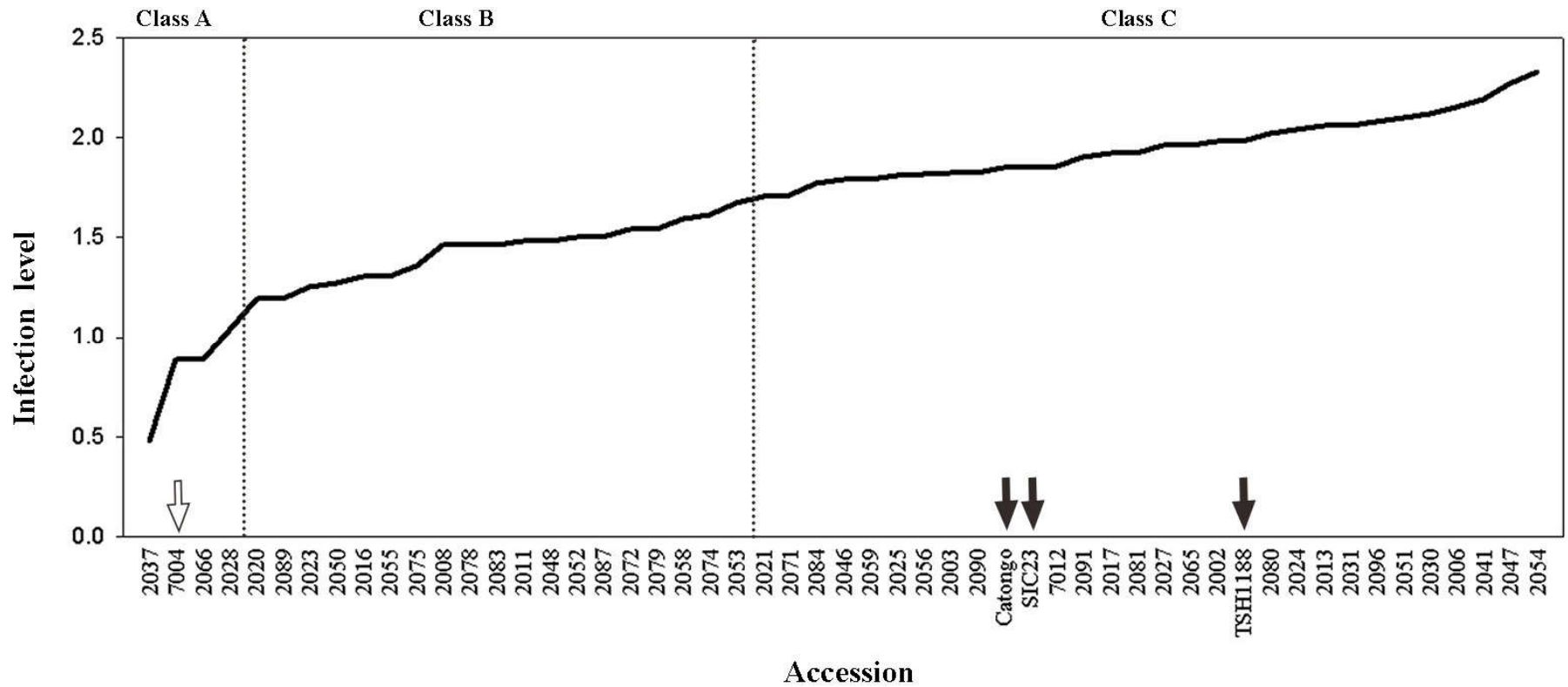
| Variety              | Accession | Infection level | Class/Group* |
|----------------------|-----------|-----------------|--------------|
| "Comum" mutant       | Catongo   | 1.846           | C            |
| Low Amazons          | SIC23     | 1.846           | C            |
| Scavina Hybrid       | TSH1188   | 1.980           | C            |
| Intervarietal Hybrid | 7004      | 0.884           | A            |
| "comum"              | 7012      | 1.854           | C            |
|                      | 2002      | 1.979           | C            |
|                      | 2003      | 1.826           | C            |
|                      | 2006      | 2.153           | C            |
|                      | 2008      | 1.461           | B            |
|                      | 2011      | 1.480           | B            |

|            |      |       |   |
|------------|------|-------|---|
| "maranhão" | 2013 | 2.057 | C |
|            | 2016 | 1.307 | B |
|            | 2017 | 1.923 | C |
|            | 2020 | 1.192 | B |
|            | 2021 | 1.704 | C |
|            | 2023 | 1.250 | B |
|            | 2024 | 2.038 | C |
|            | 2025 | 1.807 | C |
|            | 2027 | 1.961 | C |
|            | 2028 | 1.038 | A |
|            | 2030 | 2.115 | C |
|            | 2031 | 2.057 | C |
|            | 2037 | 0.479 | A |
|            | 2041 | 2.192 | C |
|            | 2046 | 1.788 | C |
|            | 2047 | 2.272 | C |
|            | 2048 | 1.480 | B |
|            | 2050 | 1.269 | B |
|            | 2051 | 2.096 | C |
|            | 2052 | 1.500 | B |
|            | 2053 | 1.673 | C |
|            | 2054 | 2.326 | C |
|            | 2055 | 1.307 | B |
|            | 2056 | 1.818 | C |
|            | 2058 | 1.596 | B |
|            | 2059 | 1.788 | C |
|            | 2065 | 1.961 | C |
|            | 2066 | 0.884 | A |
|            | 2071 | 1.708 | C |
|            | 2072 | 1.538 | B |
|            | 2074 | 1.615 | B |
|            | 2075 | 1.354 | B |
|            | 2078 | 1.461 | B |
|            | 2079 | 1.538 | B |
|            | 2080 | 2.019 | C |
|            | 2081 | 1.923 | C |
|            | 2083 | 1.461 | B |
|            | 2084 | 1.769 | C |
|            | 2087 | 1.500 | B |
|            | 2089 | 1.192 | B |
|            | 2090 | 1.826 | C |
|            | 2091 | 1.903 | C |
|            | 2096 | 2.076 | C |

\*Accessions followed by the same letter do not differ in infection level based the Scott-Knott cluster at 5% probability. Inferences: C, susceptible plants; B, medium resistant plants; A, resistant plants.



**Figure 1.** Symptoms of black pod in cocoa seedlings 7 days after inoculation. (A) General appearance in resistant (green) and susceptible (chlorotic) seedlings. (B and C) Dry leaf and adaxial limb necrosis, respectively. (D) Apical necrosis in the stem and petiole. (E and F) Withered leaf and vein necrosis, respectively.



**Figure 2.** Distribution of cocoa accessions in relation to the average infection levels to black pod (*Phytophthora citrophthora*) in cocoa plants (leaves and stem). The black arrows represent control accesses for susceptibility, and the white arrow indicate control access for resistance. The dotted lines indicate the boundary between classes/groups A, B, and C, based on Scott-Knott test at 5% probability.

### 3.3.2 Molecular genetic diversity in relationship the resistance to black pod

Genetic diversity was inferred by amplifying 23 SSRs in the general population sample, except for the controls for resistance to black pod (Table 1). In total, 122 alleles were detected in the whole sampled population (Table 3). The mTcCIR61 and mTcCIR410 markers allowed the detection of only two alleles, while the mTcCIR240 marker demonstrated variation among 13 alleles in this population. However, these markers did not reveal smaller or larger numbers of effective alleles (NE), as the markers mTcCIR237 and mTcCIR282 had the lowest (1.068) and highest (5.009) effective allele values in the whole accessed population, respectively. Genetic diversity parameters (Table 3) showed that the average Shannon information index (I) was 0.992 in the population sample but with great variation among the SSR marker (0.164–1.496). The observed heterozygosity ( $H_o$ ) presented low values, with an average of 0.081 in this sample. Heterozygotes for the marker loci mTcCIR410, mTcCIR61, and mTcCIR255 were absent ( $H_o = 0.000$ ), where as the mTcCIR240 marker showed the highest  $H_o$  (0.341). Expected heterozygosity ( $H_e$ ) revealed a mean value of 0.515, ranging from 0.064 (mTcCIR237) to 0.800 (mTcCIR282). The fixation index (F) presented a mean value of 0.852 in the general population sample, with lower values obtained for either resistant or susceptible subpopulations of both varieties (0.860 - 0.907). The average polymorphic information content (PIC) was 0.4648, ranging from 0.0632 (mTcCIR237) to 0.7707 (mTcCIR282).

The genetic diversity parameters were also evaluated in subsamples by variety (*comum* or *maranhão*), depending on the inferable infection level (C = susceptible or A + B = resistant + medium resistant). Thus, besides the smaller number of amplified alleles in the *maranhão* variety, lower values were observed for the parameters I and  $H_o$  in this variety in relation to the *comum* variety. In general, the genetic diversity parameters were higher in the subpopulations of classes A and B for resistance and moderate resistance, compared to the susceptible class C's subpopulations. However, this pattern was not observed in  $H_e$ , with the parameters being higher in the class C. Each resistance class varies, not only by Scott-Knott clustering, but also t-test assessment. In which it was observed that there is a statistical difference between the resistant, medium resistant and susceptible groups, because the infection rate calculated by the calculated t-test is 0.3408 lower than the critical t of 2.0075 and/or p-value of 0.73, higher than the alpha (0.05%).

**Table 3.** Variability and genetic diversity parameters in the germplasm analyzed via SSR markers that different authors previously associated with QTLs for resistance to *Phytophthora* spp.

| Locus     | Ms                                      | Na                    | Ne    | I     | Ho    | He    | F     | PIC    |
|-----------|-----------------------------------------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| mTcCIR37  | 176                                     | 4                     | 2.304 | 0.947 | 0.024 | 0.566 | 0.958 | 0.4765 |
| mTcCIR61  | 217                                     | 2                     | 1.189 | 0.295 | 0.000 | 0.159 | 1.000 | 0.1462 |
| mTcCIR81  | 225                                     | 5                     | 2.447 | 1.076 | 0.021 | 0.591 | 0.965 | 0.5296 |
| mTcCIR95  | 252                                     | 7                     | 3.593 | 1.496 | 0.214 | 0.722 | 0.703 | 0.6818 |
| mTcCIR118 | 188                                     | 5                     | 2.195 | 0.966 | 0.048 | 0.545 | 0.913 | 0.4717 |
| mTcCIR131 | 223                                     | 4                     | 2.379 | 1.001 | 0.021 | 0.580 | 0.963 | 0.4960 |
| mTcCIR152 | 300                                     | 6                     | 2.706 | 1.187 | 0.048 | 0.630 | 0.924 | 0.5755 |
| mTcCIR168 | 202                                     | 6                     | 2.472 | 1.201 | 0.043 | 0.595 | 0.927 | 0.5530 |
| mTcCIR176 | 122                                     | 4                     | 1.909 | 0.839 | 0.022 | 0.476 | 0.953 | 0.4166 |
| mTcCIR184 | 170                                     | 8                     | 3.060 | 1.377 | 0.217 | 0.673 | 0.677 | 0.6279 |
| mTcCIR200 | 281                                     | 6                     | 1.755 | 0.824 | 0.043 | 0.430 | 0.901 | 0.3821 |
| mTcCIR213 | 259                                     | 6                     | 2.831 | 1.215 | 0.283 | 0.647 | 0.563 | 0.5879 |
| mTcCIR237 | 120                                     | 3                     | 1.068 | 0.164 | 0.022 | 0.064 | 0.658 | 0.0632 |
| mTcCIR240 | 215                                     | 13                    | 3.767 | 1.852 | 0.341 | 0.735 | 0.536 | 0.7163 |
| mTcCIR255 | 220                                     | 3                     | 2.649 | 1.025 | 0.000 | 0.622 | 1.000 | 0.5438 |
| mTcCIR268 | 326                                     | 6                     | 3.108 | 1.315 | 0.089 | 0.678 | 0.869 | 0.6222 |
| mTcCIR273 | 182                                     | 4                     | 1.514 | 0.646 | 0.021 | 0.339 | 0.937 | 0.3102 |
| mTcCIR275 | 180                                     | 5                     | 2.181 | 0.928 | 0.042 | 0.541 | 0.923 | 0.4504 |
| mTcCIR282 | 201                                     | 7                     | 5.009 | 1.719 | 0.205 | 0.800 | 0.744 | 0.7707 |
| mTcCIR291 | 235                                     | 4                     | 1.126 | 0.283 | 0.023 | 0.112 | 0.792 | 0.1093 |
| mTcCIR337 | 218                                     | 5                     | 2.134 | 1.018 | 0.085 | 0.531 | 0.840 | 0.4813 |
| mTcCIR410 | 273                                     | 2                     | 1.980 | 0.688 | 0.000 | 0.495 | 1.000 | 0.3725 |
| mTcCIR444 | 160                                     | 7                     | 1.473 | 0.745 | 0.045 | 0.321 | 0.859 | 0.3071 |
| Average   | General population                      | 5.30 ( $\Sigma=122$ ) | 2.385 | 0.992 | 0.081 | 0.515 | 0.852 | 0.4648 |
|           | "comum"susceptible                      | 3.82 ( $\Sigma=88$ )  | 2.206 | 0.879 | 0.090 | 0.475 | 0.828 | 0.4021 |
|           | "comum"resistant + medium resistant     | 3.47 ( $\Sigma=80$ )  | 2.386 | 0.907 | 0.119 | 0.532 | 0.784 | 0.4464 |
|           | "maranhão"susceptible                   | 3.04 ( $\Sigma=70$ )  | 2.245 | 0.828 | 0.044 | 0.471 | 0.917 | 0.3902 |
|           | "maranhão" resistant + medium resistant | 3.08 ( $\Sigma=71$ )  | 2.310 | 0.860 | 0.074 | 0.495 | 0.521 | 0.4108 |

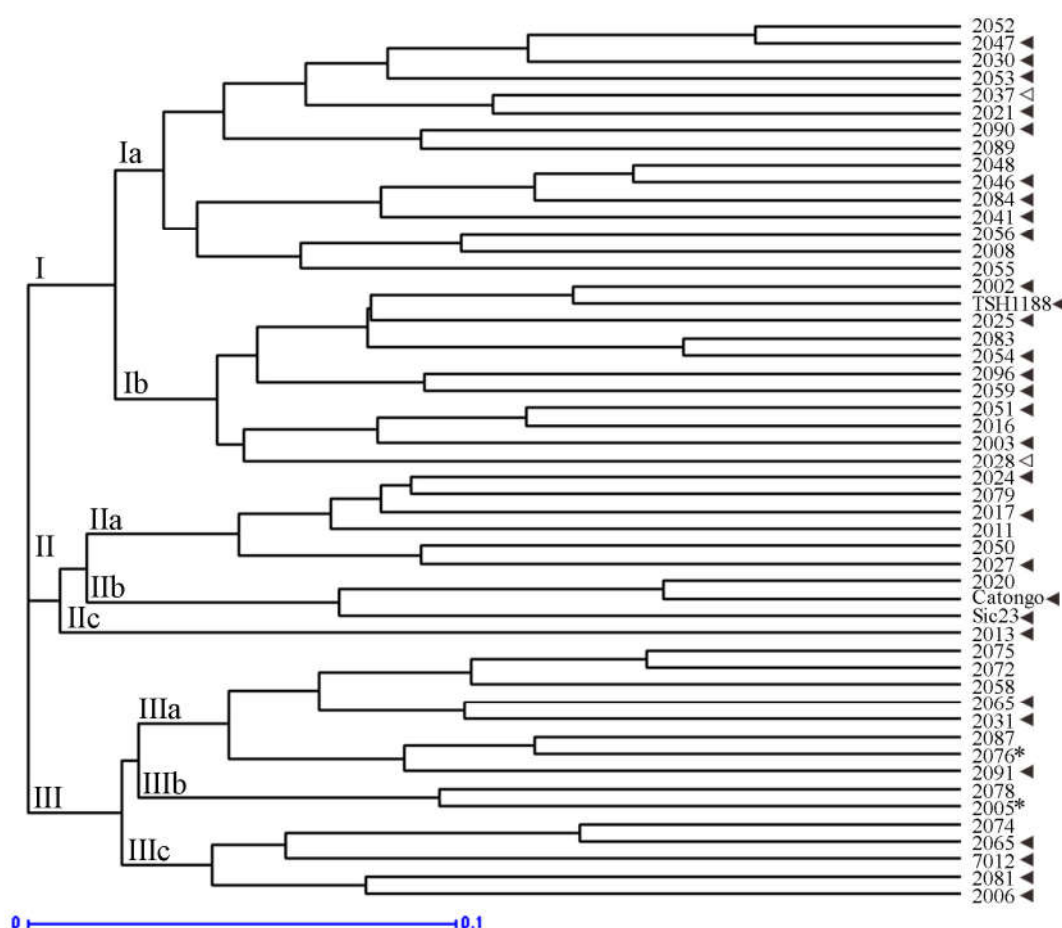
Ms, average allele size; Na, allele number per locus; Ne, number of effective alleles; I, Shannon information index; Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity; F, fixation index; PIC, polymorphic content information.

### 3.3.3 Association mapping, genetic distance, and structure associated with black pod resistance

The association mapping was done using infection level to the black pod disease data together with the allelic profile of SSR markers in the QTLs of black pod resistance. This

analysis did not show a significant threshold ( $P$ ) > 0.05 for all markers used in association with the infection level of *Phytophthora citrophthora* isolate 1893.

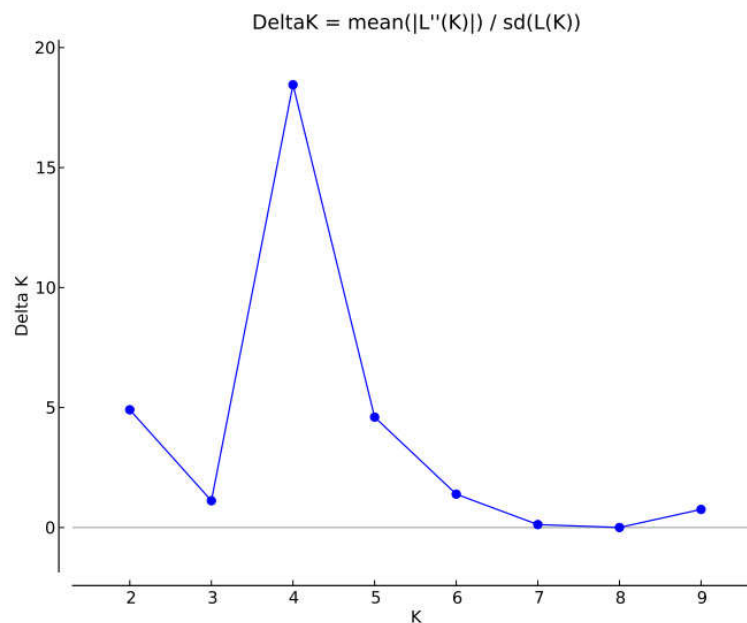
The graphical representation of genetic distance demonstrated the formation of three genetic groups (I, II, and III) (Figure 3). Group I presented two distinct subgroups (Ia and Ib), with 15 and 11 accessions, respectively. In subgroup Ib, the susceptible accession TSH1188 was distributed with high genetic distance in relation to the resistance accession from class A (2037), which was placed in group Ia. In group II, susceptible controls Catongo and SIC23 were placed close together, with eight further accessions. Only one accession represented group IIc, which is more distantly related to the others of group II. Group II contained 15 accessions, of which 11 were from the *maranhão* variety, arranged in subgroups IIIa, IIIb, and IIIc. The other groups and subgroups had variations in the access distributions of the two varieties.



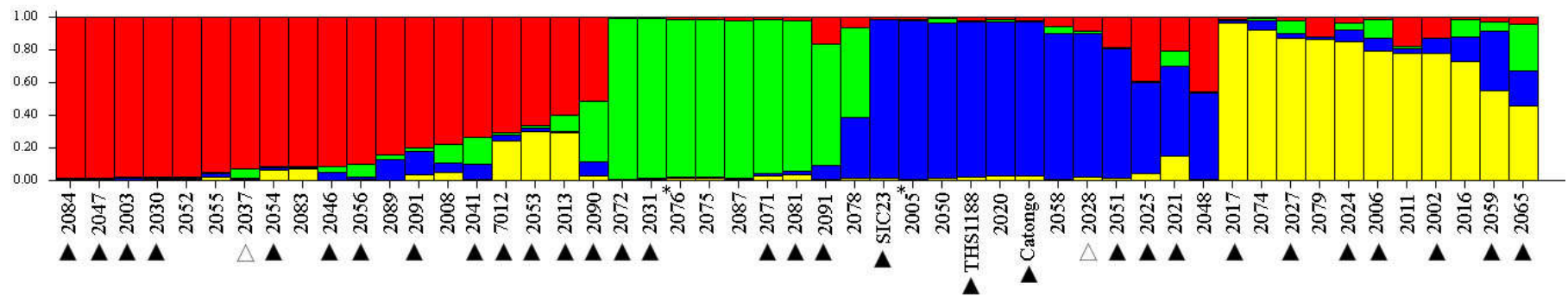
**Figure 3.** Representation of genetic distance in SSR loci using simple matching coefficients and weighted neighbor-joining clusters. The numbers I, II, and III correspond to the genetic groups. The empty arrowhead

indicates class A accessions, and the full arrowhead indicates class C accessions for the statistical groups shown in Figure 2. The other accessions belong to Class B. \* indicates a plant with no value for infection level.

The evaluation of the genetic structure (groups of alleles/loci in common) in the evaluated accessions indicated the existence of four subpopulations ( $\Delta K = 4$ ) (Figures 4 and 5). The control accessions for susceptibility had similar genetic structures but were distributed in the same subpopulation as resistant accession 2028 and three medium-resistant accessions (2020, 2050, and 2058). Resistant accession 2037 has a different genetic structure than the other resistant genotype 2028. A population with *maranhão* accessions was observed, except for the common accession 2031. In general, 19 plants were classified as admixture (Q values  $< 80\%$ ).



**Figure 4.** Determination of the ideal value by the  $\Delta K$  increment according to Evanno et al. (2005) inferring the existence of four ( $K = 4$ ) *Theobroma cacao* subpopulations.



**Figure 5.** Genetic-population structure for  $K = 4$ , indicating the existence of four cacao subpopulations. The empty arrowhead indicates class C accessions, and the full arrow indicates class A accessions to the statistical groups indicated in Figure 2. The other accessions belong to class B. \* indicates plants with no value for infection level.

### 3.4 Discussion

In the present study, 49 accessions of local cocoa varieties from a commercial plantation in southern Bahia, Brazil, together with four control accessions resistant to black pod disease, were characterized for the symptoms caused by artificial inoculation of *Phytophthora citrophthora*. Black pod disease is one of the main diseases that affects cacao trees, with the species *Phytophthora citrophthora* being more aggressive than other *Phytophthora* species that affect cacao in Bahia (Bahia et al., 2015). In general, the use of leaf discs has been the most common method used to evaluate *Phytophthora* resistance level (Santos et al., 2011; Bahia et al., 2015; Valbuena, 2017; Santos, 2019). However, in this study, symptoms were evaluated after 7 days of artificial inoculation of *Phytophthora citrophthora* in seedlings aged 60 days, and the infection level was calculated using eight phytopathological descriptors. Although variations in the quantitative results are observable between studies using different inoculation and evaluation methods, the inclusion of the control plants in the resistance groups made the present analysis sufficiently reliable. The accessions TSH1188, SIC23, and Catongo have been used in studies involving pathogens of the genus *Phytophthora* because they are susceptible to *Phytophthora citrophthora* (Lessa, 2017; Bahia et al., 2015). In the present study, such a susceptibility phenotype showed a high infection level in these control plants, in contrast to the low level of infection in the resistant control 7004.

The significant difference in infection levels of black pod disease suggests variability in relation to resistance levels in cocoa trees from southern Bahia, specifically within each of the *comum* and *maranhão* varieties. Additionally, the existence of three statistical classes for the infection levels indicates that at least three distinct groups exist regarding the resistance against *Phytophthora citrophthora*, being considered as resistant, medium resistant, and susceptible plants. The fact that most of the accessions analyzed in the present study were susceptible to this *Phytophthora* species reinforces a local problem regarding this phytopathogen in cocoa-producing regions. However, the existence of a source of genetic resistance was detected in three accessions (2028, 2037, and 2066), with no statistical differences from the control accession for resistance, 7004. Nineteen accessions formed a group with intermediate resistance. This fact reinforces the need to investigate plants in producing regions, in addition to germplasm banks, to detect variability related to disease resistance (Santos et al., 2015).

Both varieties analyzed in the present study had similar infection levels, indicating that the *comum* and *maranhão* varieties bear genetic variability in resistance and susceptibility to black pod disease. However, the resistant and susceptible plants can be selected from among any analyzed variety. Although plant selection was a good strategy for obtaining resistant plants, segregating resistance-associated traits has resulted in variable progeny responses in relation to *Phytophthora citrophthora* colonization indices (Bahia et al., 2015). Thus, plant selection should be followed with the evaluation of heritability parameters in relation to qualitative and quantitative descriptors evaluated in mainly segregating populations (Theveninet et al., 2005; Bahia et al., 2015).

In general, polymorphic content-information values are used to assess the discriminatory power of each molecular marker and estimate the diversity at these loci. In the present study, the PIC values were generally of medium magnitude when compared to those of other studies on genetic diversity in cocoa (Zhang et al., 2006; Efombagn et al., 2006). However, at least eight markers associated with a high PIC were observed in this study that were indicated for the study of genetic variation in QTLs for black pod resistance. The low number of alleles associated with Phytoph3 (mTcCIR61), which accounts for 23% of the variation in resistance to *Phytophthora palmivora* in cocoa (Brown et al., 2007) and FOL/100/3 (mTcCIR410) (Akaza et al., 2016), suggests less variability in these genomic regions in relation to the others. These markers may be useful in characterizing segregating strains through their low variation and easy detection in heterozygous lines. On the other hand, the mTcCIR240 marker indicated greater variability associated with QTL PRR/95/2 (Akaza et al., 2016). These variations in the number of effective alleles in SSR loci indicate the variability of QTLs for resistance to black pod disease, which reflects the amplitude of variation that has been observed in studies characterizing cacao resistance to this disease. In addition, the high genotypic variance in relation to resistance to *Phytophthora citrophthora* in relation to the other three pathogen species present in southern Bahia has also likely resulted in the variety of symptoms previously observed in the inoculation assays (Bahia et al., 2015).

The parameters that infer allelic diversity in the whole population sampled suggest a lower allelic diversity when compared to populations in other producing regions, such as Peru (Zhang et al., 2006) and French Guiana (Lachenaud & Zhang 2008). However, the present study was limited to verifying genetic variation in genomic regions related to resistance to black pod disease in cacao. Thus, the low allelic diversity compared to that found in the analysis of the broad genome polymorphism indicates the selection pressure related to black pod resistance QTLs in cacao in southern Bahia, a fact observed in other

phytopathosystems (Klabunde et al., 2016; Yada et al., 2017). This fact can be observed by the lower values for the main parameters of genetic diversity in susceptible subpopulations, as compared to those for the resistant and medium-resistant subpopulations of both the *comum* and *maranhão* varieties. Additionally, both populations of each variety have unique allelic pools.

Despite the existence of susceptible accesses used as controls in investigating resistance to *Phytophthora* from intervarietal hybridization, such as the TSH1188 accession, in the present study, the expected heterozygosity was higher in resistant and medium-resistant populations. Thus, it is possible to conclude that heterozygosity is an important part of resistance to this pathogen, especially for the *comum* variety. Heterosis is an important feature in complex phytopathosystems with continuous variation in symptoms (Yang et al., 2015; Miedaner et al., 2017). Intermediate resistance was observed in one segregant population (F1 (TSH-1188 x CCN-51) in comparison with the parent cultivars along with variance in continuous resistance. However, both parents showed susceptibility to *Phytophthora citrophthora* (Bahia et al., 2015).

The variation in genetic distance between accessions was distributed in groups and subgroups in a dendrogram, as inferred from the genetic similarity of the general population sample, reflecting the polymorphism in QTLs for black pod disease resistance. However, it was not possible to observe specific cluster formations for exclusively resistant or susceptible accessions, but the largest portion of group III accessions was of the *maranhão* variety. This fact can be attributed to the unexpressed nature of SSR sequences. Although these markers are in flanking and internal regions of QTLs for resistance to black pod disease, with gene binding in the expressed regions, their polymorphism is not necessarily related to resistance or susceptibility to *Phytophthora citrophthora* isolate 1893. These markers have been recognized as being associated with black-pod-resistance QTLs caused by *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora capsici* (Brown et al., 2007; Akaza et al., 2016; Barreto et al., 2018), being resistant to *Phytophthora citrophthora* (isolated 62), which is related to only one QTL (q1.BPPct - mTcCIR006 and mTcCIR136) and explaining only 3.299% of the variation (Barreto et al., 2018).

Plant selection based on genetic distances may contribute to genetic breeding strategies and research prospects involving obtaining and characterizing segregating or homozygous lines (Nadeem et al., 2017). In this case, accessions from subgroups IIIa, IIIb, and IIIc can be used as potential genitors with group Ia accessions to form heterozygous lines.

In general, including the resistant and medium-resistant accessions will make it possible to contemplate representatives of the different molecular genetics groups.

The distribution of genetic distance between accessions and the genetic structure analysis did not allowed the establishment of subpopulations with exclusively resistant or susceptible accessions. However, a subpopulation containing the susceptibility controls suggests that the Catongo, TSH1188, and SIC23 accessions have the same genetic structure at the black pod resistance loci in the SSR regions analyzed in the present work. The similarities in genetic structure based on SSR markers in *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora capsici* related to QTLs for black pod resistance cannot be considered crucial for estimating parameters of *Phytophthora citrophthora* resistance, in view of the observed distinctions in genetic structure between resistant plants 2031 and 2028. The greater aggressiveness of the *Phytophthora citrophthora* species in cacao may also be related to other pathogenicity mechanisms in relation to the other *Phytophthora* species that affect cacao trees, which requires resistance mechanisms that differ in terms of plant protection against other phytopathogens (Bahia et al., 2015; Barreto et al., 2018).

### 3.5 Conclusions

The mean infection level obtained from the summation of eight qualitative phytopathological descriptors of symptoms observed in young seedlings discriminate among the infection levels of different cocoa accessions by black pod disease caused by *Phytophthora citrophthora*. Despite the lack of association between the infection levels caused by the phytopathogen and the SSR loci polymorphism in QTLs for resistance against *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora capsici*, the genetic diversity associated with distance information and genetic structure in cacao populations and subpopulations in southern Bahia allows the selection of plants to form lineages and improve cocoa's resistance to black pod.

### 3.6 Acknowledgements

The authors would like to thank the farmers for keeping their plants in the field. We thank Elisangela dos Santos, Cenilda Serra, Angra Bomfim, Elza Thaynara Assis, Nadia Carolina Véron, Elináira Cardoso, and Joana Fritsch for their collaboration in molecular analysis, data collection at greenhouse, and preparation of the inoculum.

### **Authors' Contributions**

Author LFS managed the experiments, wrote the methodology, and wrote the first draft of the manuscript. Authors CAFM and JJMM performed the statistical analyses. Authors RXC and EDMNL designed the main research project and supervised the first author in her master's course. All of the authors managed the literature searches, discussed the results, and read and approved the final manuscript.

### **Funding Information**

The first and second authors received scholarships from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). This study was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) under the coordination of RXC (grant number 309841/2015-1).

### **Compliance with Ethical Standards**

**Conflicts of Interest** Author have declared that no competing interest exist. The study sponsor had no involvement in the study design, collection, analysis and interpretation of data as well as in the writing of the manuscript.

**Ethics statement** This article does not contain studies with human participants or animals performed by any of the authors.

### 3.7 References

- Akaza MJ, Kouassi AB, Akaffou DS et al (2016) Mapping QTLs for Black pod (*Phytophthora palmivora*) resistance in three hybrid progenies of cocoa (*Theobroma cocoa* L.) using SSR markers. Int J. Recent Sci. Res6: 298-311
- Anderson MJ, Ter Braak CTF (2003) Permutation tests for multifactorial analysis of variance. J. Stat. Comput. Sim 73: 85–113. <https://doi.org/10.1080/00949650215733>
- APG IV (2016) An update of Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APGIV. Bot. J. Linn. Soc 181: 1-20 <http://dx.doi.org/10.1111/boj.12385>
- Bahia RC, Vildoso CIA, Luz EDMN et al (2015) Resistance to black pod disease in a segregating cocoa tree population. Trop. Plant Pathol 40:13-18. <http://dx.doi.org/10.1007/s40858-014-0003-7>
- Barreto MA, Rosa J, Holanda I et al (2018) QTL mapping and identification of corresponding genomic regions for black pod disease resistance to three *Phytophthora* species in *Theobroma cacao* L. Euphytica. 214:188. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2273-5>
- Beakes GW, Honda D, Thines M (2014) Systematics of the Staminiplila: Labirynthulomycota, Hyphochytriomycota and Oomycota. The Mycota Part A Systematics and Evolution. 7: 39-97 <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-55318-9-3>
- Brown JS, Phillips-Mora W, Power EJ et al (2007) Mapping QTLs for resistance to frosty pod and black pod diseases and horticultural traits in *Theobroma cacao*. Crop Sci. 47: 1851–1858. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.11.0753>
- Clement D, Risterucci AM, Motamayor JC, N'goran JA, Lanaud C (2003) Mapping QTL for yield components, vigor, and resistance to *Phytophthora palmivora* in *Theobroma cacao* L. Genome 46: 204–212 <https://doi.org/10.1139/g02-125>
- Crouzillat D, Menard B, Mora A et al (2000) Quantitative trait analysis in *Theobroma cacao* using molecular markers. Euphytica 114:13–23. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1003892217582>
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15
- Efombagn MIB, Sounigo O, Nyasse S, Manzanares-Dauleux M et al (2006) Genetic diversity in cocoa germplasm of southern Cameroon revealed by simple sequence repeat (SSRs) markers. Afr. J. Biotechnol 5: 1441-1449

Flament MH, Kebe I, Clement D et al (2001) Genetic mapping of resistance factors to *Phytophthora palmivora* in cocoa. *Genome* 44: 79–85 <http://dx.doi.org/10.1139/gen-44-1-79>

Fouet O, Allegre M, Argout X et al (2011) Structural characterization and mapping of functional EST-SRR markers in *Theobroma cacao*. *Tree Genet. Genomes* 7: 799–817 <http://dx.doi.org/10.1007/s11295-011-0375-5>

Green America (2014) Big Chocolate” brings in \$83 billion per year. Where does all this money end up? Green America. <http://blog.greenamerica.org/2014/10/15/big-chocolate-brings-in-83-million-per-year-where-does-all-this-money-end-up/>  
Accessed 20 June 2019

IBGE Instituto brasileiro de geografia e estatística (2018) Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA, Brasil. <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#notas-tabela> Accessed em 27 de June de 2019

Klabunde GHF, Junkes CFO, Tenfen SZA et al. (2016) Genetic diversity and apple leaf spot disease resistance characterization assessed by SSR markers. *Crop Breed. Appl. Biotechnol* 16: 189–196.  
<http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332016v16n3a29>

Lachenaud P and Zhang D (2008) Genetic diversity and population structure in wild stands of cacao trees (*Theobroma cacao* L.) in French Guiana. *Ann. For. Sci.* 65: 310.  
<http://dx.doi.org/10.1051/forest:2008011>

Lanaud C, Risterucci AM, Pieretti I et al (2004) Characterisation and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Mol. Breed.* 13: 211–227  
<http://dx.doi.org/10.1023/B:MOLB.0000022515.23880.1b>

Lanaud C, Fouet, O, Clement D et al. (2009) A meta-QTL analysis of disease resistance traits of *Theobroma cacao* L. *Mol. Breed.* 24: 361–374. <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-009-9297-4>

Lessa IZV. 2017. Morfologia e agressividade de isolados de *Phytophthora palmivora* de Cacaueiro no Estado da Bahia. Dissertação. Universidade Estadual de Santa Cruz.

Luz EDMN, Silva SDVM (2001) Podridão-Parda dos frutos, cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacaueiro. In: Luz EDMN, Santos dos AF, Matsuoka K, Bezerra JL (Eds.) Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas SP. Livraria e Editora Rural. 175–265

Miedaner T, Schulthess AW, Gowda M et al (2017) High accuracy of predicting hybrid performance of Fusarium head blight resistance by mid-parent values in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 130: 461–470.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00122-016-2826-8>

Nadeem MA, Nawaz MA, Shahid MQ et al. (2017) DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Agric. Environ. Biotechnol* 32: 261–285. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>

Oliveira ML, Luz EDMN (2005) Identificação e manejo das principais doenças do cacaueteiro no Brasil: CEPLAC/ CEPEC/SEFIT. Bahia, Ilhéus.

Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.  
<https://dx.doi.org/10.1093%2Fbioinformatics%2Fbts460>

Perrier X, Jacquemoud-Collet JP (2006) DARwin software. <http://darwin.cirad.fr/darwin>

Pires JL (2003) Avaliação Quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento do cacaueteiro com ênfase na produtividade, qualidade de frutos e resistência a doenças. Tese. Universidade Federal de Viçosa.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959 [HTTPS://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x)

Pugh T, Fouet O, Risterucci AM et al. (2004). A new cocoa linkage map based on codominant markers: Development and integration of 201 new microsatellite markers. *Theor Appl Genet.* 108: 1151-1161.  
<https://dx.doi.org/10.1007/s00122-003-1533-4>

Risterucci A.M, Paulin D, Ducamp M et al (2003) Identification of QTLs related to cocoa resistance to three species of *Phytophthora*. *Theor Appl Genet* 108: 168–174  
<https://doi.org/10.1007/s00122-003-1408-8>

Santos A.A. 2019. Avaliação de resistência a doenças e diversidade genética de cultivares locais de cacaueteiro da Bahia. Tese. Universidade Estadual de Santa Cruz.

Santos ESL, Cerqueira-Silva CBM, Clement DPL, Luz EDMN (2009) Identificação de resistência genética do cacaueteiro à podridão-parda. *Pesqui Agropecu Bras* 44:413–416.  
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2009000400012>

Santos ESL, Cerqueira-Silva CBM, Clement DPL, Luz EDMN (2011) Resistance gradient to black pod disease and selection of cacao by leaf disc test. *Crop Breed Appl Biotechnol* 11: 297-303

<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-70332011000400002>

Santos ESL, Cerqueira-Silva CBM, Mori GM et al (2015) Genetic structure and molecular diversity of cocoa plants established as local varieties for more than two centuries: the genetics history of cocoa plantations in Bahia, Brazil. *Plos One* 10: 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145276>

Thevenin J-M, Umaharan R, Surujdeo-Maharaj S et al (2005) Relationships between black pod and witches' broom diseases in *Theobroma cacao*. *Phytopathology* 95:1301–1307. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1301>

Valbuena M.R. 2017. Diversidade genética e variabilidade morfológica de frutos em cultivares locais de cacao resistentes à podridão parda. Dissertação. Universidade Estadual de Santa Cruz.

Wessel M, Quist-Wessel PMF (2015). Cocoa production in West Africa, a review and analysis of recente developments. *NJAS-WAGEN J LiFE SC* 74:1-7 <https://doi.org/10.1016/j.njas.2015.09.001>

Yada B, Alajo A, Ssemakula GN et al (2017) Selection of Simple Sequence Repeat Markers Associated with Inheritance of Sweetpotato Virus Disease Resistance in Sweetpotato. *Crop Sci* 57: 1421-1430 <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.08.0695>

Yang M, Wang X, Ren D et al (2017) Genomic architecture of biomass heterosis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: 8101-8106 <https://doi.org/10.1073/pnas.1705423114>

Zhang D, Arevalo-Gardini E, Mischke S et al (2006) Genetic diversity and structure of managed and semi-natural populations of cocoa (*Theobroma cacao*) in the Huallaga and Ucayali Valleys of Peru. *Ann Bot* 98: 647-655. <https://dx.doi.org/10.1093%2Faob%2Fmcl146>

#### 4. CONCLUSÃO GERAL

- A realização da inoculação artificial pelo método de borrifagem em plantas com 60 dias de idade pode ser considerado um método eficaz para a avaliação do sintoma associado à infecção a podridão parda em cacaueteiro, não sendo técnica limitada a análises em discos foliares ou frutos.
- O cacaueteiro existente em regiões de cultivo no sul da Bahia apresenta variação fenotípica em termos de resistência ao fitopatógeno *Phytophthora citrophthora*, sendo útil na seleção de plantas com diferentes níveis de infecção/resistência.
- Os QTLs propostos para a conferência da resistência à podridão parda causada pelos patógenos *P. palmivora* e *P. capsici* não estão relacionados à mesma doença causada pelo oomiceto *P.citrophthora*, indicando existência de mecanismos de resistência diferentes em cacaueteiro contra os diferentes patógenos que causam a podridão parda.
- Elevada diversidade genômica em regiões SSR flaquadoras e internas dos QTLs de resistência à podridão parda é observada no cacaueteiro do sul da Bahia, mas varia em relação cultivar "comum" e "maranhão" e ao perfil fenotípico da resistência a essa doença.
- Grande porção da estruturação genética nos QTLs de resistência à podridão parda segue o modelo de admixture, apesar da existência de genótipos em subpopulações bem estruturadas.

## 5. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

- ALVERSON, W. S.; WHITLOCK, B. A.; NYFFELER, R.; BAYER, C.; BAUM, D. A. **Phylogeny of the core Malvales: Evidence from *ndhF* sequence data**. American Journal of Botany, v. 86, p. 1474-1486, 1999.
- AKROFI, A.Y.; APPIAH, A.A.; OPOKU, I.Y. **Management of *Phytophthora* pod rot disease on cocoa farms in Ghana**. Crop Protection, v. 22, p. 469-477. 2003.
- AKAZA, M.J.; KOUASSI, A.B.; AKAFFOU, D.S. et al. **Mapping QTLs for Black pod (*Phytophthora palmivora*) resistance in three hybrid progenies of cocoa (*Theobroma cocoa* L.) using SSR markers**. Int J. Recent Sci. Res6: 298-311, 2016.
- ANDRADE, M. P. **Ilhéus: Passado e Presente**. 2. ed. Ilhéus: Editus, 2003.
- APG IV. **An update of Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APGIV**. Bot. J. Linn. Soc 181: 1-20. 2016.
- APPIAH, A.A.; FLOOD, J.; ARCHER, A.S.; BRIDGE, P.D. **Molecular analysis of the major *Phytophthora* species on cocoa**, Plant Pathology, 53: 209–219. 2004.
- ARGOUT, X.; SALSE, J.; AURY, J.; GUILTINAN, M.J.; DROC, G et al. **The genome of *Theobroma cacao***. Nature Genetics, 43: 101–108. 2010.
- BAHIA, R.C.; VILDOSO, C.I.A.; LUZ, E.D.M.N. et al. **Resistance to black pod disease in a segregating cocoa tree population**.Trop. Plant Pathol 40:13-18. 2015.
- BARRETO, M.A. **Caracterização da resistência a *Phytophthora* e mapeamento de QTL para resistência à Podridão Parda e à Vassoura de Bruxa do cacauero**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Biologia. Campinas-SP. 2014.
- BARRETO, M.A.; ROSA, J.; HOLANDA, I. et al. **QTL mapping and identification of corresponding genomic regions for black pod disease resistance to three *Phytophthora* species in *Theobroma cacao* L.** Euphytica. 214:188. 2018.
- BASTOS, C. N. et al. **Doenças do cacauero**. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds). Manual de Fitopatologia: 40 doenças das plantas cultivadas. Editora Agronômica Ceres Ltda. v. 2.5º Ed., Ouro Fino – MG, p. 175-181. 2016.
- BEAKES, G.W.; HONDA, D.; THINES, M. **Sistematics of the Staminiopila: Labirynthulomycota, Hyphochytriomycota and Oomycota**. The Mycota Part A Systematics and Evolution. 7: 39-97. 2014.
- BLAHA, G.; LOTODÉ, R. **Un critère primordial de sélection du cacaoyer au Cameroun: la resistance à la pourriture brune des cabosses. Variations des réactions à la maladie en liaison avec les dones écologiques et l'état physiologique des fruits**. Café Cacao Thé 20 (2): 97-116. 1976.

BROWN, J.S.; PHILLIPS-MORA, W.; POWER, E.J. et al. **Mapping QTLs for resistance to frosty pod and black pod diseases and horticultural traits in *Theobroma cacao***. Crop Sci. 47: 1851–1858. 2007.

BOWERS, J.H. et al. **The impact of plant diseases on world chocolate production**. Online. Plant Health Prog. 2001.

CAMPELO, A.M.F.L.; LUZ, E.D.M.N. **Virulência de *Phytophthora* spp. em frutos destacados de cacau da cultivar comum**. Fitopatol Bras 6: 587. 1981.

CHEESMAN, E. E. **Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations**. Tropical Agriculture, London, v.21, n.8, p.144-159, 1944.

CLAIR, D. A. **Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding**. Annual Review of Phytopathology 48, 247–68. 2010.

CLEMENT, D.; RISTERUCCI, A.M.; MOTAMAYOR, J.C.; N'GORAN, J.A.; LANAUD, C. **Mapping QTL for yield components, vigor, and resistance to *Phytophthora palmivora* in *Theobroma cacao* L.** Genome 46: 204–212. 2003.

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento. Cacau amêndoa** – análise mensal. Novembro, 2018. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/infoagro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historicomensal-de-cacau> >. Acesso em: 20 de Julho de 2019.

CROUZILLAT, D.; MENARD, B.; MORA, A. et al. **Quantitative trait analysis in *Theobroma cacao* using molecular markers**. Euphytica 114:13–23. 2000.

CZERMAINSKI, A.B.C. **Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de avaliação de doenças em plantas**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.34, p.1545-1555, 1999.

ENGELS J. M. M. **Technical bulletin 7, tropical agriculture and research training center, Turrialba, Costa Rica**. 191 p., 1981.

EVANS, H. C. **Cacao Diseases - The Trilogy Revisited**. Phytopathology, 97, 1640– 1643. 2007.

ÉRSEK, T.; RIBEIRO, O. **Mini Review Article: An annotated list of new *Phytophthora* species described post 1996**. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 45(2), 251–266. 2010.

FIGUEIRA, A. V. O.; JANICK, J.; GOLDSBROUGH, P. **Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao***. Journal of the American Society for Horticultural Science, v. 117, n. 4, p. 673-677, 1992.

FLAMENT, M.H; KEBE, I, CLEMENT, D. et al. **Genetic mapping of resistance factors to *Phytophthora palmivora* in cocoa**. Genome 44: 79–85. 2001.

HENDERSON, J. S. et al. **Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverages**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 104, n. 48, p. 18937– 18940, 2007.

IBGE **Instituto brasileiro de geografia e estatística** (2018)  
<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#notas-tabela> Acesso em Julho de 2019

ICCO – International Cocoa Organization. Production QBCS XLIV No. 3. Disponível em

IWARO, A.D.; SREENIVASSAN, T.N.; UMAHARAN, P. ***Phytophthora* resistance in cacao (*Theobroma cacao*): influence of pod morphological characteristics**. Plant Pathol 46: 557–565. 1997.

LAWRENCE, J. S.; LUZ, E. D. M. N.; RESNIK, F. C. Z. **The relative virulence of *Phytophthora palmivora* and *P. capsici* on cacao in Bahia, Brasil**. In: Conferencia Internacional de Investigacions en Cacao, 8ª, 57 Catagena, Colombia. Actas. Lagos, Nigeria, Cocoa Producers' Alliance, p. 395-400, 1982.

LANAUD, C.1.; RISTERUCCI, A. M.; PIERETTI, I.; FALQUE, M.; BOUET A.; LAGODA P. J. **Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L.** Mol Ecol. V. 8, n. 12, 2141-3. 1999.

LANAUD C; RISTERUCCI, A.M; PIERETTI, I. et al. **Characterisation and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.)**. Mol. Breed.13: 211–227. 2004

LANAUD, C.; FOUET, O.; CLEMENT, D. et al. **A meta-QTL analysis of disease resistance traits of *Theobroma cacao* L.** Mol. Breed. 24: 361–374. 2009.

LIMA, E.M.; PEREIRA, N.E.; PIRES, J.L.; BARBOSA, A.M.M.; CORRÊA, R.X. **Genetic molecular diversity, production and resistance to witches' broom in cacao clones**. Crop Breeding and Applied Biotechnology, v. 13, n. 2, 127-135. 2013.

LUZ, E. D. M. N. et al. **Selection of cacao genotypes resistant to *Phytophthora capsici*, *P. palmivora* and *P. citrophthora* in Bahia, Brazil**. Fitopatologia Brasileira 21: 71-79, 1996.

LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S. D.V.M. **Podridão-Parda dos frutos, cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacauero**. In: Luz EDMN, Santos dos AF, Matsuoka K, Bezerra JL (Eds.) Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas SP. Livraria e Editora Rural. 175-265. 2001

LUZ, E.D.M.N.; CERQUEIRA, A.O.; FALEIRO, F.G.; NETO, A.D.; MATSUOKA, K. MARQUES, J.R.B. **Diversidade Genética de Isolados de *Phytophthora capsici* de Diferentes Hospedeiros com Base em Marcadores RAPD Patogenicidade e Morfologia**. Fitopatol. bras. v. 28, n. 5, 2003.

MACAGNAN, D. **Isolamento e seleção de bactérias endosporogênicas e do tipo actinomicetos visando o biocontrole da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) e da podridão-parda (*Phytophthora* spp.) do cacauero (*Theobroma cacao* L) e estudo dos mecanismos de antagonismo ao fungo *Crinipellis pernicioso***. 109 p. Tese (Doutorado em

Fitopatologia) - Departamento de Fitopatologia - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

MASANTO; WIBOWO, A.; SUBANDIYAH, S.; KAGEYAMA, K. **Morphometric Variation of *Phytophthora palmivora* Causing Black Pod Rot Disease on Cocoa (*Theobroma cacao* L.)** in Indonesia. Plant Pathology Journal. V. 18, N. 1, 1-11, 2019.

MCELROY, M.S.; NAVARRO, A.J.R.; MUSTIGA, G.; STACK, C.; GEZAN, S.; PENA, G.; SARABIA, W.; SAQUICELA, D.; SOTOMAYOR, I.; DOUGLAS, G.M.; et al. **Prediction of cacao (*Theobroma cacao*) resistance to *Moniliophthora* spp. diseases via genome-wide association analysis and genomic selection.** Front. PlantSci, 9. 2018.

MEDEIROS, A. G.; MELO, J. W.; SANTANA, J. B. **Incidência e disseminação da Podridão Parda em cacaueiros na Bahia.** In Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. Informe Técnico. pp. 68-69. 1969.

MICHELMORE, R.W. **The impact zone: genomics and breeding for durable disease resistance.** Current Opinion in Plant Biology 6, 397–404. 2003.

MOTAMAYOR, J.C.; LACHENAUD, P.; SILVA, M.J.W.; LOOR, R.; KUHN, D.N.; BROWN, J.S.; SCHNELL, R.J. **Geographic and genetic population differentiation of the amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.).** PLoS ONE 3(10): e3301. 2008.

MOTAMAYOR, J.C.; MOCKAITIS, K.; SCHMUTZ, J.; HAIMINEN, N.; LIVINGSTONE, D.; CORNEJO, O. et al. **The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color,** Genome Biology, 14: r53. 2013.

MUÑOZ, J.J.M. **Genômica estrutural e funcional da resistência do cacaueiro a *Phytophthora palmivora* Butler (Butler).** Dissertação de Mestrado do Programa de pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – UESC, Ilhéus, Bahia, Brasil, 2019.

NYADANU, D.; AKROMAH, D.; ADOMAKO, B.; DZAHINI-OBIALEY, H.; AKROFI, A.Y.; LOWOR, S.T.; ASSUAH, M.K. **Breeding for Multiple Disease Resistance in Cocoa (*Theobroma cacao* L.).** International Journal of Plant Breeding and Genetics, 6: 182-194. 2012.

NYASSÉ, S.; CILAS, C.; HÉRAIL, C.; BLAHA, G. **Leaf inoculation as an early screening test for cocoa (*Theobroma cacao* L.) resistance to *Phytophthora* black pod disease.** Crop Protection, v.14, p.657-663, 1995.

NYASSÉ, S.; DESPRÉA, U. X.D.; CILAS, C. **Validity of a leaf inoculation test to assess the resistance to *Phytophthora megakarya* in a cocoa (*Theobroma cacao* L.) diallel mating design.** Euphytica, v.123, p.395-399, 2002.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. **Principais doenças do cacaueiro e seu manejo.** In: VALLE, R. R. CIÊNCIA, tecnologia e manejo do cacaueiro. 2ª Ed. Brasília-DF, p. 187-275, 2012.

- PLOETZ, R. C.; SCHNELL, R.J.; YING, Z.; ZHENG, Q.; OLANO, C.T.; JOHNSON, E.; MOTAMAYOR, J.C. **Molecular diversity in *Crinipellis perniciosa* with AFLPs**. European Journal of Plant Pathology, 111: 317–326, 2005.
- PRIA, M.; CAMARGO, L.E.A. **Doença do cacaueiro**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). Manual de Fitopatologia. São Paulo, SP: Editora Agronômica Ceres, 1997.
- POKOU, N.D.; N'GORAN, J.A.K.; KÉBÉ, I.; ESKES, A.; TAHI, M.; SANGARÉ, A. **Levels of resistance to *Phytophthora* pod rot in cocoa accessions selected on-farm in Côte d'Ivoire**. Crop Protection, 27: 302-309, 2008.
- RAMOS, C. S. **Produção e preços do cacau aumentaram no país em 2018**. Valor Econômico. Disponível em: Acesso em 13 de Agosto de 2019.
- RISTERUCCI A.M.; PAULIN, D.; DUCAMP, M. et al. **Identification of QTLs related to cocoa resistance to three species of *Phytophthora***. Theor Appl Genet 108: 168–174 . 2003
- SANTOS, E.S.L.; BERNARD, C.; MORI, G.M.; ANHERT, D.; MELLO, D.L.N.; PIRES, J.L.; CORRÊA, R.X.; SOUZA, A.P. **Genetic structure and molecular diversity of cocoa plants established as local varieties for more than two centuries: the genetics history of cocoa plantations in Bahia, Brazil**. Plos One, v.10, n.12: 1-18. 2015.
- SANTOS, E.S.L.; CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; CLEMENT, D.P.L.; LUZ, E.D.M.N. **Identificação de resistência genética do cacaueiro à podridão-parda**. Pesqui Agropecu Bras 44:413–416. 2009.
- SCHNELL, R.J.; OLANO, C.T.; BROWN, J. S.; MEEROW, A.W.; CERVANTES-MARTÍNEZ, C. **Retrospective determination of the parental population of superior cacao (*Theobroma cacao* L) seedlings and association of microsatellite alleles with productivity**. Journal of American Society for Horticulture Science, v. 130, n. 2. 181–190. 2005.
- SCHNELL, R.J.; KUHN, D.N.; BROWN, J.S.; OLANO, C. T.; PHILLIPS-MORA, W.; AMORES, F. M.; MOTAMAYOR, J.C. **Development of a marker assisted selection program for cacao**. Phytopathology., v. 97, n. 12, 1664-9. 2007.
- ZHANG, D.; MOTILAL, L. **Origin, dispersal, and current global distribution of cacao genetic diversity**. In: Cacao Diseases (B.A. Bailey and L.W. Meinhardt, eds), 3– 31. 2016.
- WESSEL, M.; QUIST-WESSEL, P.M.F. **Cocoa production in West Africa, a review and analysis of recente developments**. NJAS-WAGEN J LiFE SC 74:1-7. 2015