UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

DIVERSIDADE GENÉTICA E RESISTÊNCIA À VASSOURA DE BRUXA EM POPULAÇÕES DE CACAUEIRO

JOCILENE DOS SANTOS PEREIRA

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL

MARÇO 2021

JOCILENE DOS SANTOS PEREIRA

DIVERSIDADE GENÉTICA E RESISTÊNCIA À VASSOURA DE BRUXA EM POPULAÇÕES DE CACAUEIRO

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

Área de concentração: Genética e Biologia molecular

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL

MARÇO 2021

JOCILENE DOS SANTOS PEREIRA

DIVERSIDADE GENÉTICA E RESISTÊNCIA À VASSOURA DE BRUXA EM POPULAÇÕES DE CACAUEIRO

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

Área de concentração: Genética e Biologia molecular

Aprovado em:

Dra. Claudia Fortes Ferreira (EMBRAPA)	Dra. Francisca Feitosa Jucá Santos (UESC)
Dr. Valter Cruz Magalhães (UFLA)	Dr. Ronan Xavier Corrêa (UESC - Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conduzir pelos melhores caminhos, e à minha família, por todo apoio.

A Universidade Estadual de Santa Cruz, pela estrutura e possibilidade de cursar a Pós-Graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade e excelência no processo formativo, todos os professores e as secretárias Fabrícia e Mara por toda solicitude e disponibilidade.

A meu orientador, Dr. Ronan Xavier Corrêa, pelo exemplo e ensinamentos durante este período de orientação.

À minha co-orientadora, Dra. Edna Dora Martins Newman Luz, pelas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa de estudos, e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pelo financiamento do projeto.

Ao CEPEC localizado na CEPLAC, pelo fornecimento dos isolados de *Moniliophthora perniciosa* para uso em experimento.

Aos colegas de equipe e laboratório (Alice, Taise, Joana, Lívia, Thaynara, Eullaysa, Elinaira e Alberto), pela solicitude e ajuda nos experimentos em casa de vegetação e laboratório.

A todas (os) as (os) colegas e amigas (os) dos laboratórios de genômica, proteômica e Biomol, que me acolheram de forma calorosa, no CBG.

Às colegas de apartamento, Ariana e Leticia, por todo apoio e acolhimento neste período.

A todas as componentes do grupo “Meeting God” e “Trinca nos trinta”, pelos momentos de apoio, trocas de experiências, descontração, conselhos, amizade e companheirismo, bem como os momentos fitness pós expediente (risos). Jamais esquecerei dos novos vínculos e amizades

criados durante este período e do quanto me acolheram, fazendo-me enxergar ainda mais o poder da amizade e do companheirismo. Sinto-me muito abençoada por encontrar pessoas assim.

A todos (as) que contribuíram de alguma forma para este processo de formação.

Minha gratidão!

“Não é a adversidade em si, mas o que fazemos com ela que determina o nosso destino. Encontre as oportunidades na adversidade.”

Shawn Achor

ÍNDICE

RESUMO ---------- ix
ABSTRACT ---------- xi
1. INTRODUÇÃO ---------- 1
2. REVISÃO DE LITERATURA ---------- 3
2.1. *Theobroma cacao* L. ---------- 3
2.2. Vassoura de bruxa do cacaueiro ---------- 4
2.3. Fontes de resistência à vassoura de bruxa ---------- 5
2.4. QTLs e genes candidatos associados a resistência à vassoura de bruxa ---------- 7
2.5. Marcadores moleculares e diversidade genética do cacaueiro ---------- 9
2.6. A sistematização como ferramenta para subsidiar pesquisas científicas ---------- 12
CAPITULO I ---------- 14
1. INTRODUCTION ---------- 15
2. MATERIAL AND METHODS ---------- 16
2.1 Study selection ---------- 16
2.2 Data extraction and summarization ---------- 18
3. RESULTS ---------- 18
3.1 Study selection ---------- 18
3.2 Sources of resistance to witches' broom disease in cacao trees ---------- 21
3.3 Study of diversity in sources of resistance to witches' broom disease ---------- 25
3.4 Identification of QTLs and candidate genes ---------- 25
4. DISCUSSION ---------- 30
4.1 Concentration of studies for resistance to witches' broom disease ---------- 30
4.2 Sources of resistance to witches' broom disease ---------- 31
4.3 Genetic diversity of sources of resistance to witches' broom disease ---------- 32
4.4 QTLs and genes associated with resistance to witches' broom disease ---------- 33
5. CONCLUSION ---------- 34
REFERÊNCIAS ---------- 38

CAPITULO II ---------- 44
1. INTRODUÇÃO ---------- 45
2. MATERIAIS E MÉTODOS ---------- 46
2.1 Material vegetal ---------- 46
2.2 Inoculação e avaliação fenotípica ---------- 48
2.3 Análise estatística ---------- 49
3. RESULTADOS ---------- 49
4. DISCUSSÃO ---------- 53
5. CONCLUSÃO ---------- 53
REFERÊNCIAS ---------- 54
CONCLUSÃO GERAL ---------- 56
REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES ---------- 57

RESUMO

PEREIRA, Jocilene dos Santos, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Março de 2021. **Diversidade genética e resistência à vassoura de bruxa em populações de cacaueiro.** Orientador: Ronan Xavier Corrêa. Co-orientadora: Edna Dora Martins Newman Luz.

A vassoura de bruxa é considerada uma das principais doenças que acometem o cacau (*Theobroma cacao* L.). Ela é causada por *Moniliophthora perniciosa*, e os sintomas são evidentes em ramos, almofadas florais e frutos. O uso de cultivares resistentes tem se mostrado uma medida de controle eficaz para manutenção da cultura a longo prazo, e a diversidade genética é um fator essencial para oferecer meios que possibilitam a diversificação destas fontes. Além disso, o conhecimento dos avanços nas pesquisas em relação à busca por resistência à vassoura de bruxa é fundamental para a elaboração de novos projetos coerentes com as necessidades atuais nos programas de melhoramento. Assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar avanços e perspectivas em relação ao desenvolvimento de cultivares resistentes à vassoura de bruxa, bem como analisar níveis de resistência e diversidade genética em variedades de cacau comum da Bahia. No capitulo I, uma revisão sistemática foi desenvolvida com base nas diretrizes PRISMA, utilizando o software StArt. As buscas foram realizadas em cinco bases de dados (Scopus, Springer Link, PubMed, SciELO e Web Of Science), sendo os artigos inseridos no StArt e selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. A sumarização, consistiu na elaboração de tabelas, gráficos e figuras. Foram identificados genótipos que apresentaram melhor desempenho para resistência à vassoura de bruxa, com base em avaliações fenotípicas, além de combinações de cruzamentos promissores para geração de progênies resistentes. Os estudos de diversidade genética indicam ampla possibilidade de exploração da heterozigose. Os estudos sobre locos para características quantitativas descrevem oito QTLs (*Quantitative Trait Loci*) associados à resistência à vassoura de bruxa e vários genes candidatos com funções biológicas conhecidas e desconhecidas. O capítulo II consistiu em análises de resistência em população de cacau comum da Bahia, amostrados em um plantio em Arataca, BA. As sementes obtidas de frutos das plantas selecionadas foram utilizadas para produzir 54 plântulas (repetições) por genótipo. Aos 40 dias

de idade, as folhas das plântulas foram reduzidas em 2/3 de seu comprimento e o ápice de cada muda foi inoculado com 30 μL de suspensão de basidiósporos na concentração de 2×10^5/mL em meio de ágar-água a 0,2%. Após a inoculação, as plantas permaneceram em ambiente úmido por 48 horas e em seguida foram mantidas nas condições de cultivo em casa de vegetação. A avaliação dos sintomas ocorreu 60 dias após a inoculação e a análise de variância foi feita utilizando o programa Sisvar. Os resultados das análises estatísticas geraram uma classificação em quatro grupos tendo o índice de doença variado de 0,97 a 11,49. De modo geral, comprovou-se que a maioria das plantas apresentou de baixo a moderado índice de doença (54,2%). Como conclusão geral, observa-se que a revisão sistemática se mostrou uma ferramenta eficaz na compilação de dados, revelando os principais avanços na busca por resistência à vassoura de bruxa no cacau, bem como fatores importantes associados ao desenvolvimento de novos cultivares como diversidade genética e QTLs. Portanto, é fundamental explorar estas variadas fontes de resistência que podem trazer ganhos para os programas de melhoramento no desenvolvimento de cultivares resistentes e produtivas. As variedades de cacau comum do Sul da Bahia analisadas, possuem uma variação em relação a resistência à vassoura de bruxa que indica a viabilidade ideal para realizar seleção de genótipos nesse plantio comercial, visando melhoramento genético para resistência à vassoura de bruxa.

Palavras-chave: *Moniliophthora perniciosa*, *Theobroma cacao*, resistência a doença, revisão sistemática.

ABSTRACT

PEREIRA, Jocilene dos Santos, M.S., State University of Santa Cruz, Ilhéus, March 2021. **Genetic diversity and witches' broom resistance in cacao populations.** Advisor: Ronan Xavier Corrêa. Co-supervisor: Edna Dora Martins Newman Luz.

Witche's broom is considered one of the main diseases that affect cacao tree (*Theobroma cacao* L.). The causative agent is the fungus *Moniliophthora perniciosa*, and the symptoms are evident in vegetative branches, floral cushions, and fruits. The use of resistant cultivars has proven to be a long term effective control measure for maintaining the culture and the genetic diversity is an essential factor to enable the diversification of these sources. Also, the knowledge of advances in research about the search for resistance to witches' broom is essential for the development of new projects consistent with current needs within breeding programs. Thus, the present study aimed to identify advances and perspectives about the development of cultivars resistant to witches' broom, as well as to analyze levels of resistance and genetic diversity in common cocoa varieties from the State of Bahia. Therefore, in chapter I a systematic review was developed through the stages of planning, execution, and summarization, based on the PRISMA guidelines, using the StArt software. The searches were carried out in five databases (Scopus, Springer Link, PubMed, SciELO, and Web Of Science), with articles inserted in StArt and selected according to inclusion and exclusion criteria. The summarization consisted of the preparation of tables, graphs, and figures that make up the review. As a result, it was possible to identify genotypes that showed better performance for witches' broom resistance based on phenotypic evaluations in addition to promising crossbreeding combinations for the generation of resistant progenies. Genetic diversity studies indicate a wide possibility of exploring heterozygosis. Eight QTLs associated with witches' broom resistance and several candidate genes with known and unknown biological functions, were identified. Chapter II consisted of the resistance evaluation in a cacao common population native of the south of Bahia. Thus,

pods were collected on a farm located in the municipality of Arataca, BA. The seeds were pre-germinated in water and planted in tubes with 54 replicates per genotype. The leaves of the 30 t0 40 days-old seedlings were reduced by 2/3 of their length and each seedling was inoculated with 30 μL of inoculum suspension at a concentration of 2 x 10^5 basidiospores/ml in 0.2% agar-water medium. After inoculation, the seedlings remained in a humid environment for 48 hours and kept under greenhouse conditions. Symptoms were evaluated 60 days after inoculation and analysis of variance was performed using the Sisvar program. The results of the statistical analysis generated a classification in four groups with the disease index ranging from 0.97 to 11.49. In general, results show that the majority of the plants have low to moderate disease index (54.2%). As a general conclusion, the systematic review proved to be an effective tool for data compilation, revealing the main advances in the search for resistance to witches' broom in cacao, as well as important factors associated with the development of new cultivars such as the genetic diversity and QTLs association. Thus, it is essential to explore these varied sources of resistance, which can bring important genetic gains to the breeding programs in developing resistant and productive cultivars. The population of cacao common from the south of Bahia here evaluated varied n relation to witches' broom resistance, which indicates the feasibility of carrying out genotype selection in this commercial plantation, aiming the genetic improvement for resistance to witches' broom.

Keywords: *Moniliophthora perniciosa*, *Theobroma cacao*, disease resistance, systematic review.

1. INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma espécie perene, arbustiva pertencente à família Malvaceae com origem em regiões tropicais da América do Sul (ALVERSON et al., 1999). No Brasil as maiores zonas de produção encontram-se no Pará, sul da Bahia e Amazônia, apresentando grande importância econômica, principalmente pelo uso de suas amêndoas na indústria, sobretudo na produção de chocolates. Assim, tem representado uma significativa fonte de renda para pequenos e grandes produtores (AFOAKWA et al., 2008). No entanto, alguns fatores limitam a produção da cultura, como a ocorrência de doenças causadas por fungos, um exemplo, a doença conhecida como vassoura de bruxa.

A vassoura de bruxa é causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* e disseminou-se no Brasil em finais dos anos 1980, provocando acentuada redução da produtividade nas plantações de cacau, e consequentemente elevados prejuízos aos produtores impactando na economia destas regiões (AIME & PHILLIPS-MORA, 2005; CALDAS & PERZ, 2013). Os sintomas podem ser evidentes nos ramos, almofadas florais e frutos sendo associados às fases de desenvolvimento do fungo em seu ciclo de vida: biotrófica e necrotrófica. Primeiramente, os basidiósporos colonizam os tecidos meristemáticos iniciando a infecção, causando sintomas como hipertrofia e surgimento intenso de brotos, em seguida ocorre a necrose das regiões infectadas, produzindo novos basidiósporos que são liberados, disseminando-se para outras plantas (MEINHARDT et al., 2008).

Dentre as medidas de controle para *M. perniciosa* o uso de variedades resistentes tem se mostrado a alternativa mais viável para manutenção da cultura a longo prazo, principalmente em locais de constante pressão do patógeno. Com base nisso, os programas de melhoramento do cacau iniciaram a busca por fontes de resistência, visando a validação e disponibilização destes genótipos para cultivo (PURDY & SCHMIDT, 1996). Assim, as primeiras fontes de resistência identificadas foram os clones Scavina 6 (Sca 6) e Scavina 12 (Sca 12), a partir de expedições realizadas no Peru (POUND, 1943). Estes clones foram utilizados em diversos cruzamentos para o desenvolvimento de cultivares resistentes. No entanto, foi relatada a infecção de Sca 6 e Sca 12 no Equador, Peru e Brasil (TEIXEIRA et al., 2015). Assim, os programas de melhoramento têm direcionado esforços para identificação de outras fontes potenciais para resistência à vassoura de bruxa (ALBUQUERQUE et al., 2010; ALMEIDA et al., 2009).

Estudos desenvolvidos com populações de cacau da Amazônia brasileira revelaram acessos da série CAB altamente promissores para resistência a esta doença, indicando grande potencial de uso para desenvolvimento de novos cultivares (ALBUQUERQUE et al., 2010). Adicionalmente, seleções procedidas em fazendas locais na Bahia possibilitaram a identificação de genótipos com resistência alta e moderada, diferentes dos tradicionalmente utilizados em programas de melhoramento, o que representa um importante avanço para a diversificação das fontes de resistência à vassoura de bruxa (FALEIRO et al., 2004; LEAL JÚNIOR et al., 2007; YAMADA et al., 2009; MARSSARO et al., 2020).

Aliada à busca por genótipos resistentes, a diversidade genética representa um dos principais meios para dispor de recursos que possibilitam a diversificação das fontes de resistência, além de contribuir para o aumento da heterose, evitando a depressão por endogamia, que pode comprometer a produtividade em espécies alógamas (MACKAY, et al., 2021; YAMADA et al., 2009). Assim, os estudos de diversidade genética tem sido o foco nos programas de melhoramento do cacaueiro, sobretudo porque alguns resultados indicam baixa diversidade genética em algumas populações descendentes de Scavina (FALEIRO et al. 2004). Dessa forma, considerando a variabilidade do patógeno e o grande número de doenças que ameaçam o cacaueiro, o uso de variedades com elevada similaridade pode estreitar a base genética da resistência (YAMADA et al., 2001). Por outro lado, estudos com outras fontes que não possuem Scavina em sua genealogia, tem revelado altos índices de heterozigose, além da presença de alelos raros, que podem ser importantes para os programas de melhoramento (SERENO et al., 2006). Uma compilação desses dados pode fornecer uma melhor visualização dos avanços na busca por fontes de resistência, bem como informações importantes sobre os principais fatores que subsidiam as etapas do melhoramento, como a diversidade genética, o estudo de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) e genes associados à resistência para vassoura de bruxa (DAVIES & ALLENDER, 2017; TIRADO-GALLEGO et al., 2016).

Dessa forma, é fundamental proceder seleções, considerando diferentes inóculos do patógeno, bem como conhecer os avanços nas pesquisas em relação à busca por resistência a esta doença o que possibilita a elaboração de novos projetos coerentes com as necessidades dentro dos programas de melhoramento. Assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar avanços e perspectivas em relação ao desenvolvimento de cultivares resistentes à vassoura de bruxa, bem como avaliar níveis de resistência em progênies de cacau comum da Bahia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Theobroma cacao* L.

O cacau (*Theobroma cacao* L.) pertencente à família Malvaceae, é uma espécie perene, arbustiva, predominantemente alógama, com genoma diploide (2n = 10). O provável centro de origem são as regiões tropicais da América do Sul (ALVERSON et al., 1999). Atualmente, encontra-se amplamente distribuído em diversas regiões tropicais, destacando-se como maiores produtores os países africanos, responsáveis pela produção de 71% de cacau no mundo. Assim, são considerados maiores produtores mundiais os países Costa do Marfim e Gana (ICCO 2020).

No Brasil, as maiores zonas de produção encontram-se no Pará, sul da Bahia e na Amazônia e a principal forma de cultivo é o sistema conhecido como cabruca, caracterizado por associar o cacau com espécies florestais, que oferecem sombreamento, evitando gastos com irrigação e mantendo as espécies florestais nativas nas regiões de cultivo, o que evidencia a importância ecológica do cultivo de cacau (FRANZEN & MULDER, 2007).

Análises de características morfológicas e distribuição geográfica do cacau permitiram sua classificação em três grandes grupos, sendo estes Criollo, Forastero e Trinitário. O grupo Criollo tem origem na América Central e México, caracteriza-se por apresentar frutos grandes e alongados, casca enrugada e amêndoas com cotilédones na coloração branca ou violeta claro, este grupo é responsável pela produção do chocolate fino, considerado de maior qualidade (ASCRIZZI et al., 2017). No entanto, apresenta grande suscetibilidade a patógenos, devido à baixa diversidade genética presente neste grupo (MOTAMAYOR et al., 2002; BEKELE et al. 2006). O Forastero, tem origem na Amazônia, é considerado o maior grupo, apresentando grande diversidade genética, encontra-se dividido em dois subgrupos: o Alto amazônico e Baixo amazônico. Caracteriza-se pela presença de frutos ovais, casca lisa e amêndoas com cotilédones na coloração violeta escuro (BEKELE et al. 2006). Grande parte das variedades resistentes à doenças encontram-se no grupo Forastero, devido a elevada diversidade genética. O grupo dos Trinitários é composto por híbridos resultantes de cruzamentos entre Criollos e

Forasteros, começou a ser cultivado em Trinidad e apresenta características dos dois grupos anteriores (MOTAMAYOR et al., 2003; YANG et al., 2013).

Com base em dados moleculares, foi sugerido por Motamayor et al. (2008) um novo agrupamento, englobando melhor a diversidade genética do cacaueiro. Dessa forma, com base em genotipagem com marcadores SSR, foi proposta a classificação do cacau em dez grupos: Marañon, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional e Guiana.

O cacau apresenta grande importância econômica e social. Seus frutos são utilizados na indústria para a produção de alimentos, fármacos e cosméticos, sendo o uso de suas amêndoas na produção de chocolates, o principal destaque. Com isso, representa uma significativa fonte de renda para pequenos e grandes produtores, promovendo também a geração de empregos e preservação de espécies nativas através do sistema cabruca (AFOAKWA et al., 2008; BOZA et al., 2012; BELSKY & SEIBERT, 2003).

Considerando todos os benefícios socioeconômicos e ecológicos fornecidos pelo cultivo do cacaueiro é fundamental a manutenção da cultura com elevada produtividade. Entretanto, alguns fatores podem limitar a produção, gerando prejuízos. Dentre estes fatores, podemos destacar a ocorrência de doenças, principalmente aquelas causadas pelos fungos *Moniliophthora perniciosa* e *Moniliophthora roreri*, bem como os oomicetos *Phytophthora* spp. Esses patógenos são responsáveis pelas doenças vassoura de bruxa, monilíase e podridão parda, respectivamente (GRIFFITH & HEDGER, 1994; EVANS et al., 1978; FULTON, 1989). No Brasil, a vassoura de bruxa e podridão parda são consideradas as doenças que geram maiores perdas e prejuízos na cultura de cacau, restringindo a produção e comprometendo severamente a economia das regiões de ocorrência (CALDAS & PERZ, 2013; TAHI et al., 2006; PLOETZ, 2007).

2.2. Vassoura de bruxa do cacaueiro

A vassoura de bruxa do cacaueiro é causada pelo fungo *M. perniciosa* pertencente à família Marasmiaceae, um basidiomiceto caracterizado como hemibiotrófico, por apresentar duas fases em seu ciclo de vida, biotrófica e necrotrófica (AIME & PHILLIPS-MORA, 2005). Essa doença foi relatada cientificamente, pela primeira vez em 1895, no Suriname (WENT, 1904), disseminando-se para países como Venezuela, Guiana, Equador, Peru, entre outros. No Brasil, o primeiro relato da doença foi na região Norte, no Amazonas, e atualmente ocorre em oito estados localizados em distintas regiões. A chegada desta doença no Estado da Bahia, constatada em 1989, gerou grandes impactos, fazendo com que o Brasil perdesse a posição de

terceiro maior produtor mundial, devido à acentuada redução da produtividade do cacaueiro nessa região (PEREIRA et al., 1989; MEINHARDT et al., 2008).

Os sintomas da vassoura de bruxa podem ser observados em diferentes estruturas da planta como ramos, almofadas florais e frutos, estando relacionados com as fases de desenvolvimento do fungo (biotrófica e necrotrófica) (EVANS, 1980). Assim, nos ramos jovens observa-se hipertrofia e surgimento intenso de brotos, caracterizando a vassoura verde que ocorre na fase biotrófica do fungo, seguido de morte e necrose dos tecidos, o que caracteriza a vassoura seca e fase necrotrófica do patógeno, fase em que são produzidos os basidiomas, formados, liberados e disseminados os basidiósporos que irão infectar a mesma e outras plantas.

Nas almofadas florais, a presença do fungo ocasiona a geração de frutos deformados, conhecidos como frutos do tipo “morango” e “cenoura”. Nos frutos adultos do cacaueiro, é possível observar a presença de manchas escuras nas cascas, seguido de enrijecimento e mumificação. Esses sintomas tornam os frutos impróprios para consumo e comercialização, acarretando grandes perdas para os produtores e consequentemente problemas socioeconômicos, comprometendo a economia de muitas regiões produtoras de cacau (MEINHARDT et al., 2008; PERFECT & GREEN, 2001; TEIXEIRA et al., 2014).

As principais ferramentas utilizadas como medidas de controle desta doença são as podas fitossanitárias, uso de químicos (fungicidas), biocontrole e emprego de variedades resistentes (PURDY & SCHMIDT, 1996). As podas fitossanitárias consistem na retirada das vassouras verdes, evitando que o fungo alcance a fase de disseminação, entretanto, esse tipo de manutenção exige assiduidade e rigor, tornando o controle da doença difícil a longo prazo (SOBERANIS et al., 1999; MEINHARDT et al., 2008). O uso de químicos pode gerar custos elevados, além de apresentar substâncias como o cobre, que pode ser acumulado nas amêndoas, depreciando a qualidade deste produto e seus derivados e gerando riscos para o meio ambiente (AIKPOKPODION et al., 2010). Por outro lado, o uso de variedades selecionadas como resistentes, tem se mostrado um método eficaz, de baixo custo para os produtores, e sem danos evidentes para o meio ambiente, favorecendo a manutenção da cultura a longo prazo em locais de ocorrência da doença (MEINHARDT et al., 2008).

2.3. Fontes de resistência à vassoura de bruxa

A busca por fontes de resistência à vassoura de bruxa do cacaueiro, foi iniciada na década de 1930, com a realização de expedições à Bacia Amazônica e coleta de frutos com ausência de sintomas, sendo testados em diferentes países, principalmente Trinidad e Tobago

(FONSECA, 1988). A partir de coletas realizadas no Peru, foram encontrados os clones Scavina 6 e Scavina 12, considerados resistentes a esta doença (POUND, 1943). Esses clones foram testados em diferentes regiões de ocorrência do patógeno e estão presentes na genealogia de muitos cultivares resistentes, selecionados e disponibilizados pelos programas de melhoramento (LOPES et al., 2004).

No Brasil, a chegada da doença na Bahia, gerou uma intensificação da busca por variedades resistentes, e os programas de melhoramento genético do cacaueiro tem contribuído para a identificação e validação desses genótipos, disponibilizando-os para cultivo, pelos agricultores (LOPES et al., 2011; SILVA et al., 2010). Assim, tem sido empregadas diferentes estratégias para selecionar estes genótipos resistentes como avaliações fenotípicas, em campo e/ou casa de vegetação e o uso de marcadores moleculares identificados a partir de mapeamento genético (SILVA et al., 2014; DANTAS NETO et al., 2010; COSTA et al., 2010; QUEIROZ et al., 2003).

Apesar do clone Sca 6 ainda ser considerado uma das principais fontes de resistência à vassoura de bruxa, as buscas por novas fontes tem identificado outros clones relatados como altamente promissores para resistência a esta doença, como os acessos da série CAB, a exemplo CAB 208, CAB 214, e CAB 270, que se mostraram fontes de resistência potenciais com elevados índices de heterozigose e presença de alelos raros, o que evidencia a importância da exploração destes genótipos nos programas de melhoramento (ALBUQUERQUE et al., 2010; ALMEIDA et al., 2009; SERENO et al., 2006). Além disso, estudos recentes tem identificado genótipos diferentes dos tradicionalmente utilizados em programas de melhoramento, a partir de seleções em fazendas locais do Sul da Bahia (MARSSARO et al., 2020), o que representa um importante passo na busca por novas fontes de resistência, favorecendo a diversificação destas fontes e consequentemente a manutenção da cultura a longo prazo, sobretudo em regiões de constante pressão do patógeno.

Atualmente um dos grandes desafios para os programas de melhoramento do cacaueiro tem sido associar a resistência a outras características pertinentes para a produção de cacau, como adaptação a condições de cultivo, elevada produtividade de frutos e amêndoas e qualidades organolépticas (CILAS & BASTIDE, 2020). Além disso, as mudanças sofridas pelo patógeno tornam necessária a constante busca por novas fontes de resistência, para que seja possível a diversificação destas fontes e manutenção da cultura (GRAMACHO et al., 2016). Assim, o emprego de ferramentas moleculares tem se mostrado uma grande aliada às técnicas

de melhoramento clássico, sobretudo por gerar uma seleção rápida e eficaz, visando não somente a resistência à vassoura de bruxa, como também a piramidação de genes (QUEIROZ et al., 2003).

2.4. QTLs e genes candidatos associados a resistência à vassoura de bruxa

A resistência às doenças em plantas pode ser determinada por um ou mais genes, denominando-se resistência qualitativa ou monogênica e quantitativa ou poligênica, respectivamente. Geralmente a maioria das características de interesse agronômico como produtividade de grãos, altura da planta, entre outras, são determinadas por múltiplos genes, podem sofrer influências do ambiente e não são tão facilmente distinguíveis. (TANKLEY, 1993). No caso da resistência à vassoura de bruxa do cacaueiro, temos um exemplo de resistência do tipo quantitativa, e de modo geral os locos que controlam essas características são denominados QTLs (FALEIRO et al., 2006; SANTOS et al., 2014).

O estudo e a identificação destes QTLs tornaram-se possíveis a partir do desenvolvimento de técnicas de mapeamento genético, geralmente baseadas em análises de ligação e associação, permitindo a cobertura completa de genomas, favorecendo o entendimento de características mais complexas, importantes para o melhoramento genético (COLLARD et al., 2005). Assim, o mapeamento de QTLs é fundamental para a compreensão do número de locos envolvidos em uma determinada característica, permitindo estimar seus efeitos genéticos sobre o caráter fenotípico, e a sua localização no genoma. No caso da resistência à vassoura de bruxa do cacaueiro esses estudos têm contribuído para a identificação dos genes associados a esta característica, permitindo a compreensão da base genética da resistência e identificação de marcadores moleculares promissores para uso na seleção de variedades e análises da diversidade genética em populações de cacau (QUEIROZ et al., 2003).

Os primeiros estudos de mapeamento genético no cacaueiro foram realizados por Lanaud et al., (1995), utilizando marcadores do tipo isoenzimas, RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e RAPDs (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), analisando progênies proveniente de cruzamentos contratantes para resistência a doenças e qualidade das amêndoas. Posteriormente, novos marcadores moleculares foram sendo adicionados a este mapa (RISTERUCCI et al., 2000).

As análises para identificação de QTLs associados a resistência à vassoura de bruxa no cacaueiro foram impulsionadas após a identificação de um QTL de grande efeito presente no cromossomo nove. Estas análises foram realizadas por meio de mapeamento por intervalo

composto, utilizando marcadores do tipo RAPDs e AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), em uma população F_2, proveniente do cruzamento contrastante entre as variedades Sca 6 (resistente) e ISC 1 (suscetível). O QTL identificado explica mais de 35% da resistência a esta doença e está associado ao genitor Sca 6 (QUEIROZ et al., 2003).

Estudos desenvolvidos por Brown et al. (2005), utilizando uma população proveniente dos mesmos genitores presentes nos estudos de Queiroz et al (2003), identificaram o mesmo QTL de maior efeito, no cromossomo IX, e outro QTL de menor efeito presente no cromossomo I, que foi atribuído ao genitor suscetível ICS 1. Adicionalmente, Faleiro et al. (2006), visando acrescentar marcadores moleculares aos mapas anteriores, realizou um mapeamento por intervalo composto, identificando os mesmos QTLs e vários marcadores moleculares do tipo SSRs (*Simple Sequence Repeats*), RAPDs e AFLPs associados a esta região. Um novo QTL localizado no cromossomo III foi identificado por Figueira et al. (2006) *apud* LANAUD et al., 2009, analisando populações provenientes dos cruzamentos de ICS 39 com CAB 208 e CAB 214. Todos esses QTLs e marcadores associados à resistência, foram agrupados em um mapa consenso, elaborado por Lanaud et al., (2009), onde foram projetados mais de setenta QTLs associados a resistência para diferentes doenças do cacaueiro.

Mais recentemente, Royaert et al. (2016), analisando populações descendentes de CCN 51 e TSH 1188, encontraram o mesmo QTL de maior efeito proveniente de Sca 6 que está presente na genealogia do TSH 1188 e outros seis QTLs, distribuídos nos cromossomos III, IV, VI, VII e IX, provavelmente associados ao genitor CCN 51, considerado moderadamente resistente. Estes dados mostraram a existência de outros QTLs envolvidos na resistência, bem como vários genes candidatos com funções biológicas conhecidas e desconhecidas. Estes dados oferecem subsídios para novas pesquisas visando a criação e seleção de materiais resistentes e diversificação das fontes de resistência para esta doença no cacaueiro.

A ferramentas de mapeamento tem favorecido a identificação de genes candidatos associados a resistência à vassoura de bruxa e às análises de expressão gênica tem possibilitado a caracterização destes genes para melhor compreensão dos mecanismos da interação cacau x *M. perniciosa*, o que representa um importante passo para subsidiar a seleção de genótipos resistentes nos programas de melhoramento (DA HORA JUNIOR et al., 2012; LEAL JÚNIOR et al., 2007).

2.5. Marcadores moleculares e diversidade genética do cacaueiro

A diversidade genética em populações vegetais é fundamental para a manutenção das espécies ao longo dos anos, favorecendo a adaptação à diversos fatores bióticos e abióticos, que podem comprometer a sobrevivência e dinâmica dessas populações (RAMANATHA RAO & HODGKIN, 2002). Além disso, em espécies de interesse agronômico, a diversidade genética contribui para o aumento do vigor híbrido, devido às maiores possibilidades de recombinação. Dessa forma, a variabilidade genética disponível é uma importante ferramenta para os melhoristas e os estudos de diversidade fornecem subsídios que auxiliam nas principais estratégias de melhoramento, favorecendo a seleção e elaboração de cruzamentos, visando a obtenção de características desejáveis (GOVINDARAJ et al., 2015; BRESEGHELLO, 2013).

O estudo da diversidade genética no cacaueiro tem possibilitado a compreensão da origem, classificação e relações genéticas entre populações dos diferentes grupos de cacau existentes, além de contribuir para a seleção e desenvolvimento de genótipos altamente produtivos e resistentes às doenças (MONTAMAYOR et al., 2008; PEREIRA et al., 2017; OFORI et al., 2019). Adicionalmente, os marcadores moleculares tem sido uma ferramenta importante para a obtenção desses dados de maneira mais rápida e eficaz, sem influência de fatores ambientais. Os principais marcadores moleculares aplicados em estudos de diversidade no cacau são RFLPs, RAPDs, AFLPs, SSRs, também conhecidos como microssatélites e SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*). Nos últimos anos, os mais utilizados tem sido os SSRs e SNPs por serem codominantes, altamente polimórficos e apresentarem ampla distribuição no genoma (MOTILAL & BUTLER, 2003; LAURENT et al., 1994; MOTILAL et al., 2012; KUHN et al., 2012; WICKRAMASURIYA et al., 2018).

Os primeiros estudos de diversidade genética com base em marcadores moleculares no cacaueiro visaram compreender o principal centro de origem e diversidade, bem como seus aspectos evolutivos e relações genéticas dentro da espécie (WARREN 1994; LAURENT et al.,1993; LAURENT et al.,1994; FIGUEIRA et al. 1994). Estudos realizados por Montamayor et al. (2002), com base em marcadores RFLPs e microssatélites, ampliaram as informações sobre a origem e base genética do cacau Criollo, revelando uma elevada homozigose e baixa diversidade genética, o que explica a grande suscetibilidade a doenças e reduzida produtividade encontrada neste grupo. Além disso, as informações com base em marcadores moleculares permitiram identificar os principais genótipos envolvidos na genealogia do cacau Trinitário, proveniente da hibridização entre cacau Criollo e Forastero (MONTAMAYOR et al., 2003).

Utilizando marcadores moleculares microssatélites Montamayor et al. (2008) avaliaram genótipos de diferentes regiões geográficas e obtiveram dados que permitiram uma melhor compreensão em relação à origem, classificação e diferenciação populacional de *T. cacao*, identificando dados errôneos em relação aos agrupamentos em cacaueiro e sugerindo uma nova classificação que explica melhor a diversidade genética da espécie. Essa classificação inclui dez grupos denominados Marañon, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional e Guiana.

Atualmente, o melhoramento genético do cacaueiro tem visado principalmente o aumento da produtividade, adaptação a condições de cultivo e resistência a doenças (CILAS & BASTIDE, 2020). Ao realizar seleções de genótipos resistentes é fundamental a obtenção de informações sobre a variabilidade genética dessas populações, permitindo conhecer as relações de homozigose e heterozigose que são importantes para direcionar os melhoristas na elaboração de cruzamentos, tendo em vista ampliar as possibilidades de associação da resistência com outras características de interesse agronômico e aumentar o vigor híbrido evitando problemas como a depressão por endogamia (LOPES et al., 2011; YAMADA et al., 2013). Além disso, uma base genética limitada, em local de constante pressão de patógenos, pode comprometer a manutenção da cultura a longo prazo, considerando que os patógenos podem sofrer modificações tornando-se capaz de infectar genótipos validados como resistentes. Assim, a busca por diversificação das fontes de resistência tem sido constante nos programas de melhoramento do cacaueiro, sendo fundamental conhecer a variabilidade disponível, bem como verificar se o processo de seleção de genótipos e geração de populações melhoradas tem comprometido a diversidade genética da espécie (BENNETT, 2003).

Estudos de diversidade genética vem sendo realizados em populações de cacau de diferentes locais no mundo. Com base em um conjunto de dados de marcadores microssatélites, Thomas et al. (2012) reanalisaram a diversidade intraespecífica do cacaueiro na América Latina, obtendo dados que indicam elevados níveis de diversidade genética nas regiões do Alto Amazonas, incluindo o sul do Peru até a Amazônia equatoriana e áreas de fronteira entre Colômbia, Peru e Brasil. Estes resultados são semelhantes aos obtidos anteriormente por Sereno et al. (2006) ao realizar estudos de diversidade em populações de cacau da Amazônia brasileira, revelando altos níveis de polimorfismo sobretudo nos acessos provenientes do alto Amazonas. Além disso, foram identificados alelos raros, que podem ser promissores para o desenvolvimento de novos cultivares nos programas de melhoramento do cacaueiro. Por outro lado, pesquisas desenvolvidas com populações de cacau da África Ocidental e Sudeste Asiático

indicaram uma baixa diversidade genética, alertando sobre a importância da introgressão de germoplasma exótico para melhorar a diversidade dessas populações (ZHANG & MOTILAL, 2016).

O uso de marcadores RAPDs em estudos de diversidade em clones de cacau resistentes à vassoura de bruxa provenientes de plantações comerciais da Bahia, indicaram elevada similaridade com os genótipos Sca 6 e Sca 12, que são considerados importantes fontes de resistência a esta doença, e foram utilizados em muitos cruzamentos para obtenção de híbridos resistentes (FALEIRO et al., 2004). Posteriormente, utilizando marcadores microssatélites para avaliar a variabilidade genética em clones de cacau provenientes do melhoramento no Brasil, com potencial para resistência às doenças incluindo a vassoura de bruxa, os resultados indicaram uma elevada diversidade entre esses clones, sugerindo um potencial para utilização na obtenção de progênies hibridas (LINS et al., 2016).

Santos et al. (2015) desenvolveram estudos de caracterização de plantas de variedades locais de cacau na Bahia, derivadas do banco de germoplasma e de fazendas locais, usando marcadores microssatélites. Estes marcadores permitiram avaliar a diversidade e estrutura de clones da série SIC (Instituto Baiano de Cacau) e SIAL (Instituto Agronômico do Leste) e genótipos de fazendas locais, fornecendo subsídios para a reconstrução da história das variedades locais de cacau da Bahia. Os dados de microssatélites indicaram uma baixa diversidade genética para os clones da série SIC e SIAL, sugerindo que estes clones não são representativos na diversidade do cacau baiano, considerando que a maior diversidade foi encontrada nos cacaueiros das fazendas. Esses dados evidenciam a eficiência dos marcadores microssatélites em estudos desenvolvidos no cacaueiro com diversas aplicações. Adicionalmente, métodos de genotipagem utilizando marcadores SNPs também tem contribuído para o conhecimento do contexto genético do cacau, favorecendo a otimização de germoplasmas e conservação de material genético com base em estudos de diversidade (WEVER et al., 2019).

De modo geral, os marcadores SSRs e SNPs têm sido os mais utilizados nos últimos anos, principalmente para genotipagem e classificação de variedades de cacau (LINDO et al., 2018; SAUNDERS et al., 2004). Ambos foram empregados em estudos de diversidade genética no cacaueiro, favorecendo o entendimento de relações genéticas em populações de cacau e contribuindo para a conservação de genótipos promissores para os programas de melhoramento (LINDO et al., 2018; SAUNDERS et al., 2004; PADI et al., 2015).

2.6. A sistematização como ferramenta para subsidiar pesquisas científicas

A revisão sistemática é uma estratégia de pesquisa que utiliza dados presentes na literatura, possibilitando uma compilação de estudos sobre determinado tema (KORETZ & LIPMAN, 2016). Isso permite uma ampla incorporação de informações de qualidade para responder perguntas específicas, bem como identificar pontos que precisam ser explorados, subsidiando investigações futuras. Todas as etapas são conduzidas com base em diretrizes preestabelecidas para que não ocorra o viés de pesquisa (LINDE & WILLICH, 2003).

Na área de ciências da saúde, a sistematização é uma estratégia bastante comum, fornecendo contribuições fundamentais para a atuação dos profissionais de saúde e desenvolvimento de pesquisas (KORETZ & LIPMAN, 2016). Adicionalmente, nos últimos anos, a necessidade de evidências robustas para subsidiar estratégias de conservação, cultivo e melhoramento de plantas tem impulsionado o emprego de revisões sistemáticas para a síntese de estudos em áreas como ciências agrárias, ambientais e biológicas (WESTGATE & LINDENMAYER, 2017; HADDAWAY et al., 2015; DAVIES & ALLENDER, 2017).

Muitas espécies cultivadas tem sido o foco dos estudos de revisão sistemática, como o milho, banana, arroz, cacau, entre outras. Dessa forma, é possível observar abordagens importantes sobre produtividade de grãos, qualidade nutricional, tolerância a estresses abióticos, e controle de doenças. Estes estudos reúnem informações de qualidade que podem ser fundamentais para subsidiar pesquisas em diferentes etapas do melhoramento genético de plantas (HAARHOFF & SWANEPOEL, 2018; SANTOS et al., 2018; ABTAHI et al., 2017; TIRADO-GALLEGO et al., 2016).

Algumas espécies como o cacau, apresentam frequente abordagens sistemáticas sobre seus benefícios e propriedades para a saúde humana (BARRERA-REYES et al., 2020; DESCH et al., 2010). Entretanto, também é possível constatar estudos sobre manejo e cultivo, como relatado por Tirado-Gallego et al. (2016) que desenvolveram uma revisão sistemática reunindo dados sobre as estratégias de controle para os fungos *M. roreri* e *M. perniciosa*, identificando os métodos mais utilizados e eficazes. De modo geral, as revisões sistemáticas tem trazido grandes contribuições em diferentes áreas do conhecimento, representando uma importante proposta teórica de pesquisa, que possibilita combinar e analisar dados, incorporando conhecimentos científicos, bem como oferecendo novas percepções. Assim, contribuem para o subsídio de futuros projetos, baseados em evidências, favorecendo o preenchimento de lacunas

e a visualização de necessidades atuais relacionadas as temáticas abordadas (ARROYAVE et al., 2021; ALEXANDER, 2020).

CAPITULO I

Sources of resistance to witches' broom disease in cacao: systematization of advances and perspectives

[Article to be submitted for publication in the journal *Plant Breeding*]

Jocilene dos Santos Pereira[1], Ariana Silva Santos[1], Edna Dora Martins Newman Luz[2], Ronan Xavier Corrêa[1]*

[1] Department of Biology, Center for Genetics and Molecular Biology, Santa Cruz State University, Soane Nazaré de Andrade Campus, Jorge Amado Highway, km 16, Bairro Salobrinho, 45662-900, Ilhéus - Bahia, Brazil.

[2] Executive Committee of the Cacao Plantation Plan, Ilhéus-Itabuna Highway, Km 22, 45600-970, Ilhéus, Bahia Bahia, Brazil

* Corresponding author:
Dr. Ronan Xavier Corrêa
Santa Cruz State University, Soane Nazaré de Andrade Campus, Jorge Amado Highway, km 16, Bairro Salobrinho, 45662-900, Ilhéus - Bahia, Brazil.E-mail: ronanxc@uesc.br
Tel: + 55 73 – 3680 5443

ABSTRACT

The use of sources of resistance is an important control measure for witches' broom disease in cacao. Thus, in order to identify the main sources of resistance, and understand their use in studies of genetic diversity and QTLs (Quantitative Trait Loci), as well as possible gaps in breeding programs, we developed a systematic review that compiles the main advances in the search for resistance to witches' broom disease. The systematization focused on studies from

Scopus, Springer Link, PubMed, SciELO and Web of Science databases, and followed the PRISMA guidelines. The protocol, as well as the inclusion and exclusion criteria, were established beforehand using the StArt software. We identified the genotypes that exhibited the greatest resistance in phenotypic analyses, along with combinations of crosses that are promising for future studies and cultivar development. Studies on genetic diversity indicate a wide possibility of benefits from heterozygosis to be exploited. Genetic mapping and association studies revealed eight QTLs associated with resistance and several candidate genes with known and unknown biological functions. Wider research of the various sources of resistance to witches' broom disease can advance cacao tree improvement programs. Carrying out gene expression studies is essential to deepen the understanding of the mechanisms of resistance to this disease.

Keywords: *Moniliophthora perniciosa*, *Theobroma cacao*, systematic review, disease resistance, genetic improvement.

1. INTRODUCTION

Witches' broom is one of the diseases that most affect cacao tree (*Theobroma cacao*), greatly impacting its production. The causal agent is the basidiospore *Moniliophthora perniciosa*, which is currently found in countries in the Americas. In Brazil, it spread in the late 1980s, causing a sharp reduction in productivity in cacao plantations and, consequently, high losses for producers, especially after the arrival of the pathogen in the state of Bahia (Aime & Phillips-Mora, 2005; Caldas & Perz, 2013; Pereira et al., 1989).

Among the control measures for witches' broom disease, the use of resistant varieties has been shown to be the most effective for the long-term maintenance of the crop, without damaging the environment (Meinhardt et al., 2008). The main challenges for breeding programs have been related to maintaining resistance in the face of changes undergone by the pathogen, with different inoculations and infections being reported in genotypes that have already been validated as resistant (Artero et al., 2017; Gramacho et al., 2016). In addition, it is essential to combine resistance with other important characteristics for the cultivation of cacao. Thus, obtaining lasting resistance associated with high productivity, quality and adaptation of cultivation has been the focus of cacao breeding programs (Cilas & Bastide, 2020). In this regard, it is essential to research genetic diversity and understand the molecular mechanisms involved in resistance to this disease.

High genetic diversity favors extensive dissemination of heterozygosis, contributing to the development of diversified cultivars and resistance maintenance. Studies of Quantitative Trait Loci (QTLs) and genes involved in resistance to witches' broom disease can provide substantial evidence for understanding the mechanisms of resistance and targeting within breeding programs (Da Hora Junior et al., 2012; Lanaud et al., 2009; Santos et al., 2005).

A systematization of studies involving the main factors associated with the development of cultivars resistant to witches' broom disease can bring evidence-based recommendations to guide the application of research in cacao breeding programs (Davies & Allender, 2017; Tirado-Gallego et al., 2016). Thus, the knowledge of advances achieved by studies related to the search for resistance to this disease is essential for the elaboration of projects consistent with current needs.

This article presents a systematic review that compiled the main advances reached in the search for resistance to witches' broom disease. The review aimed to identify sources of resistance used in breeding programs, verifying the use of these sources in the creation of new cultivars, diversity studies and QTLs. It also sought to identify the gaps that still exist with regard to strategies for identification and diversification of resistance to witches' broom disease in cacao cultivation, and to propose new directions for future research.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Study selection

The systematic review was carried out according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) guidelines (Moher et al., 2009), consisting of the planning, execution and summary stages (Figure 1). Studies were selected using State of the Art through Systematic Review software (StArt) v.3.3 Beta 03.

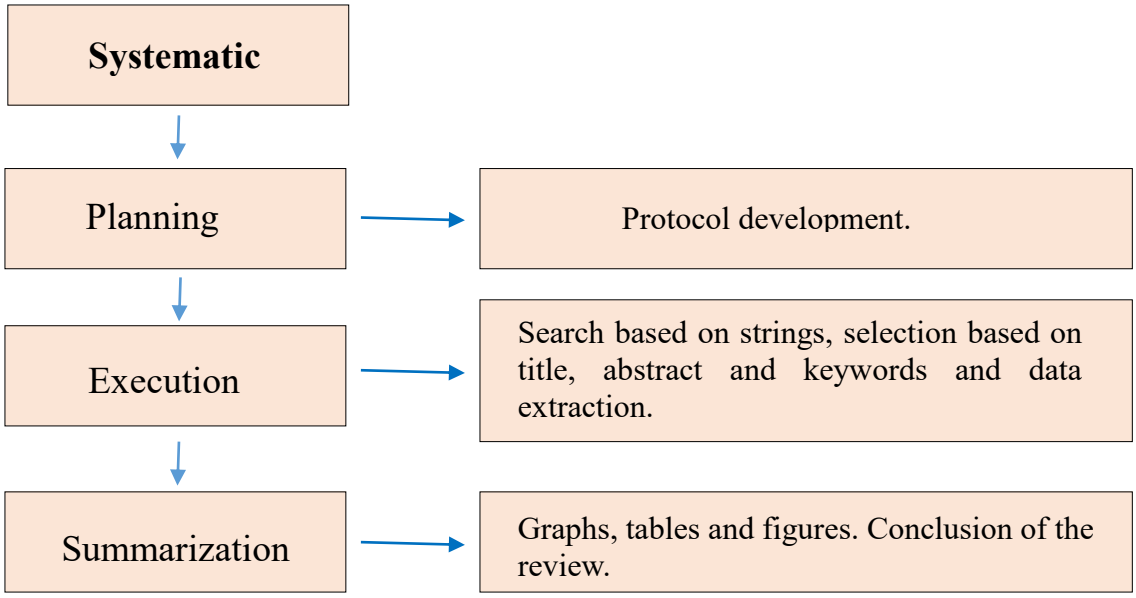

Figure 1. Diagram with the steps and procedures that make up this systematic review, based on the PRISMA guidelines.

In the planning stage, a protocol was elaborated (Additional file 1) in which the title, objectives, and guiding questions of the study were defined, along with its keywords, database, inclusion and exclusion criteria, search strings, and data extraction strategy. The selected databases were Scorpus, Springer Link, PubMed, SciELO, and Web of Science.

In the execution stage, the search for articles was conducted using the following strings in each database: “Theobroma cacao” AND “witches’ broom” AND “sources of resistance”; “Theobroma cacao” AND “witches’ broom” AND “resistance” AND “germplasm” AND “diversity”; "Theobroma cacao" AND "witches’ broom" AND "QTL". The Boolean operator AND was used to group the main words. Three criteria determined the inclusion of the articles: (i) articles in English, Portuguese or Spanish; (ii) primary research; (iii) articles related to the objective of the systematic review. Articles in English, Portuguese and Spanish were included, as the SciELO database contains articles in all of these languages. The exclusion of articles was determined by the following criteria: (i) articles not related to the objective of the systematic review; (ii) dissertations, thesis, books, simple and expanded abstracts, technical reports and review articles; (iii) inconsistencies between methodologies and results. There was no time limit, considering the specificity and the need to gather all the advances related to the theme. The articles found were exported from the databases in formats suitable for recognition in the StArt software, that is, the BibTeX, MEDLINE and RIS formats.

2.2 Data extraction and summarization

After being imported into StArt, the articles were selected by reading the titles, abstracts and keywords, and applying the inclusion and exclusion criteria previously established in the protocol. Thus, the articles were classified as accepted, rejected or duplicate. In the extraction phase, the accepted articles were read in full, synthesizing references when collecting data on the questions set out in the supplementary table 1. After this phase, the articles were classified again, as either accepted or rejected, based on the inclusion and exclusion criteria.

In the summarization stage, the tables, graphs and figures that make up this systematic review were prepared.

3. RESULTS

3.1 Study selection

The search retrieved a total of 710 articles that corresponded to the search strings. The articles found were about witches' broom disease in cacao trees, diversity studies, identification of QTLs and candidate genes, and analysis of gene expression. The Springer Link database contributed the largest number of articles, 38% of the total. However, a large number of these were duplicates; two articles were accepted in the selection phase and then rejected in the extraction phase. The Scopus database had the second largest contribution, 36% of the total and, despite having had the largest number of rejected articles, it contributed 67.4%, of accepted articles, which was also significant. The PubMed, Web of Science and SciELO databases contributed with 18%, 6% and 1% of the articles, respectively. Despite the low contribution of SciELO, it was the only database that had no rejected articles, the majority of them being accepted and some duplicates. Thus, the contribution of SciELO in accepted articles was equal to PubMed (14%) and superior to Web of Science (4.6%) and Springer Link (Figure 2).

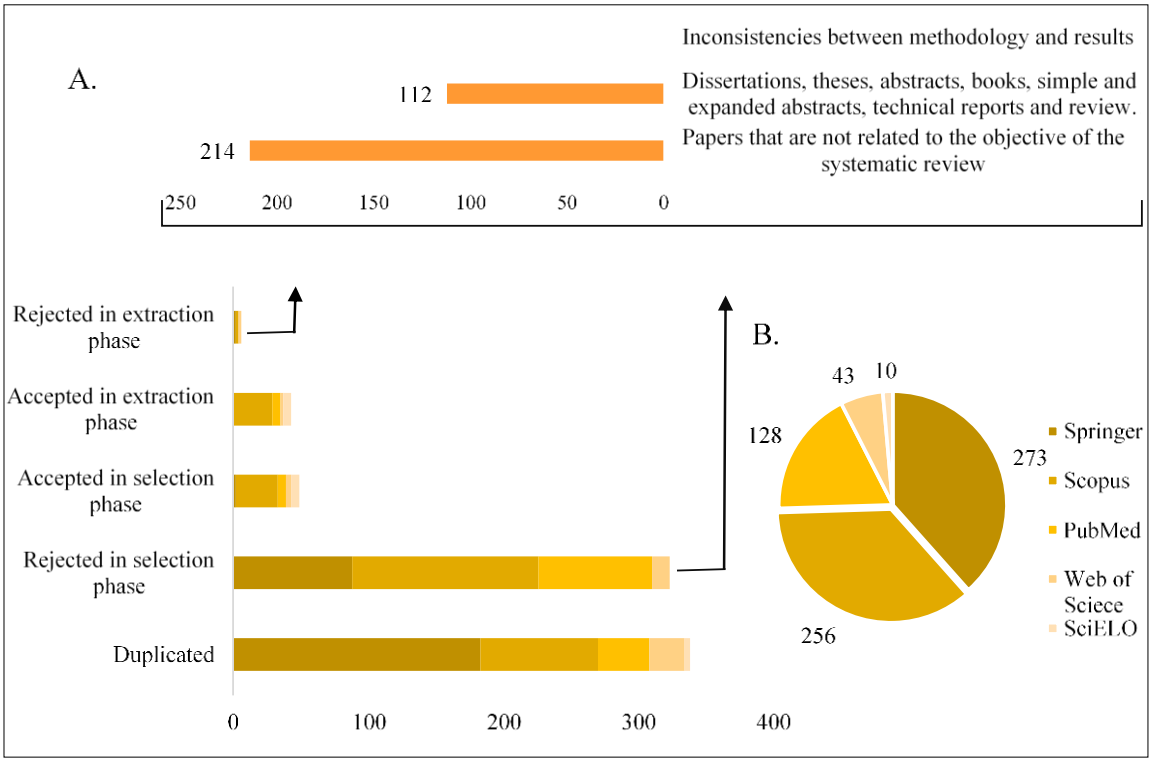

Figure 2. Summary of articles imported into the StArt software. A. number of accepted, rejected and duplicate articles in the selection and extraction phases for each database, and number of articles rejected by exclusion criteria. B. Total number of articles per database.

The number of rejected, duplicate and accepted articles varied between the different databases (Figure 2A). Of the 710 articles, 49 were accepted in the selection phase. After thorough reading in the extraction phase, another 6 articles were rejected according to the established criteria. Thus, a total of 43 articles were accepted at this stage and comprise this review (http://doi.org/10.5281/zenodo.4275709). Most of the rejected articles are not related to the objectives of the Systematic Review (Figure 2A).

Among the 43 accepted articles, 58.1% consisted of studies of evaluation and identification of cacao genotypes resistant to witches' broom disease, the others refer to genetic diversity in resistant varieties, identification of QTLs and candidate genes, as well as expression of genes associated with resistance to the disease, representing 23.3%, 11.6% and 7% of accepted articles, respectively. It was also observed that 74.4% of these studies performed analyses only for witches' broom disease, while 25.6% also included other diseases that affect cacao, such as black pod rot, caused by *Phytophthora* spp., and frosty pod rot disease, which is caused by the fungus *Moniliophthora roreri*.

A word cloud was constructed based on the frequency of each word in the titles of the articles accepted in the extraction phase (Figure 3). It can be seen that the most frequent words are associated with the objectives of the review. These words are also present in the search strings, which shows its efficiency in the search for studies that contributed to address the biological questions of this systematic review.

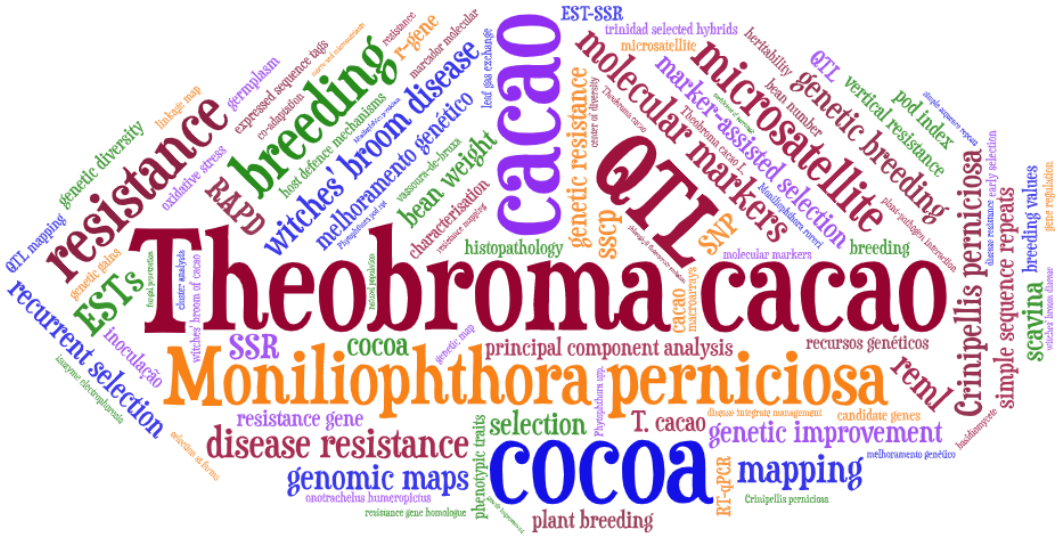

Figure 3. Word cloud based on the titles of articles imported into the StArt software according to the search strings. Words with greater frequency have larger sizes and these mostly make up the search strings of the Systematic Review.

Most of the studies were conducted in countries of South America and Central America, the majority in Brazil, where 76.6% of the studies were carried out (Figure 4 A). Regarding the experiments, approximately 47.7% were conducted in laboratories, 35% in the field, and 18.3% in greenhouses (Figure 4B).

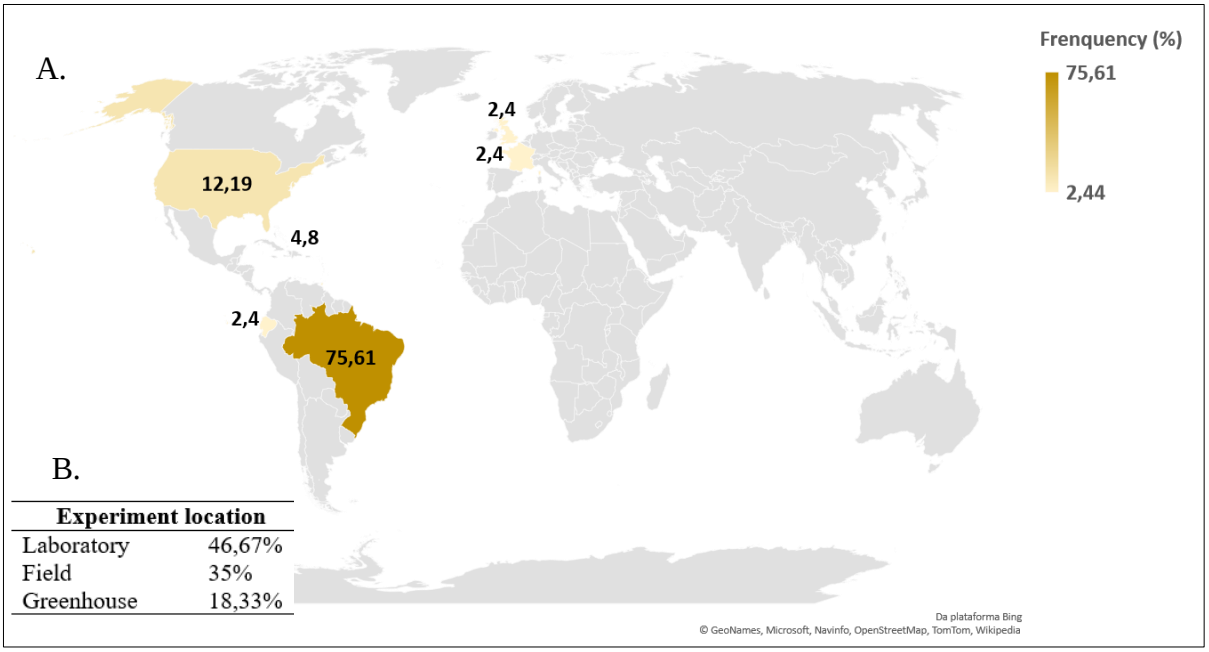

Figure 4. Summary of studies by country and location of experiments. A. Percentage of studies by country. B. Location of experiment.

3.2 Sources of resistance to witches' broom disease in cacao trees

In general, studies that evaluated, characterized, and sought to identify sources of resistance to witches' broom disease, evaluated plants that were artificially inoculated in a greenhouse, naturally or artificially infected in the field, and genotyped by molecular markers previously identified as associated with resistance genes, that is, by molecular marker assisted selection (MAS). Thus, 51% of the studies carried out phenotypic evaluation of symptoms, including seedlings and adult cacao plants. Thus, in adult plants, characteristics such as presence of vegetative broom, cushion broom, number of brooms per crown, and number of infected fruits were evaluated. The main characteristics evaluated in seedlings were the type of broom (terminal and axillary), the number of axillary brooms and the diameter and height of terminal brooms. Through statistical analysis, these evaluations, which aim to rate the disease, allow genotypes to be classifying as resistant, moderately resistant and susceptible.

Resistance evaluations were conducted for different purposes. Some studies have focused on progenies from controlled crosses and open pollination, targeting the identification of promising parent combinations for the generation of new resistant cultivars, as well as the evaluation of different genotypes in order to find promising new sources of resistance to witches' broom disease. In addition, some populations were characterized by studies of genetic mapping, analysis of genetic diversity and studies of gene expression.

Based on the studies that evaluated, characterized and identified sources of resistance, the genotypes with the best performance were identified (Table 1). The list includes Scavina 6 (Sca 6) and Scavina 12 (Sca 12), clones that many authors consider references regarding resistance to witches' broom disease and that are used in many experiments as resistant controls, as well as their progeny TSH 1188. It also includes clones that were characterized and reported as potential new sources of resistance, the accessions of the Cacau da Amazônia Brasileira series (CAB).

Table 1: Best-performing *T. cacao* genotypes, according to articles that carried out evaluation studies for resistance to witches' broom disease.

Clone	Origin	Authors
TSH 1188	Trinidad	Royaert et al., 2016
CCN 10	Ecuador	Silva et al., 2010
CCN 51	Ecuador	Royaert et al., 2016 e Duval et al., 2017
CAB 9	Rondônia/Brazil	Almeida et al., 2009
CAB 35	Para/Brazil	
CAB 40	Para/Brazil	
CAB 64	Acre/Brazil	Paim et al., 2006
CAB 66	Acre/Brazil	
CAB 156	Acre/Brazil	
CAB 169	Acre/Brazil	
CAB 194	Amazonas/Brazil	Albuquerque et al., 2010
CAB 195	Amazonas/Brazil	Paim et al., 2006
CAB 208	Amazonas/Brazil	Albuquerque et al., 2010
CAB 214	Amazonas/Brazil	
CAB 241	Rondônia/Brazil	Almeida et al., 2009
CAB 252	Rondônia/Brazil	
CAB 269	Amazonas/Brazil	Paim et al., 2006
CAB 270	Amazonas/Brazil	Pimenta Neto et al., 2018 e Albuquerque et al., 2010
CAB 274	Amazonas/Brazil	Paim et al., 2006
CAB 352	Amazonas/Brazil	Albuquerque et al., 2010
CAB 371	Rondônia/Brazil	
CAB 373	Rondônia/Brazil	Almeida et al., 2009
CAB 374	Rondônia/Brazil	
CAB 376	Rondônia/Brazil	
CAB 377	Rondônia/Brazil	
CAB 378	Rondônia/Brazil	
CAB 379	Rondônia/Brazil	
CAB 380	Rondônia/Brazil	
CAB 383	Rondônia/Brazil	
CAB 386	Rondônia/Brazil	
CAB 388	Rondônia/Brazil	Albuquerque et al., 2010
CAB 390	Rondônia/Brazil	Almeida et al., 2009

CAB 392	Rondônia/Brazil	Almeida et al., 2009 e Albuquerque et al., 2010
CAB 394	Rondônia/Brazil	Almeida et al., 2009
CAB 397	Rondônia/Brazil	
CAB 398	Rondônia/Brazil	
CAB 403	Rondônia/Brazil	
CAB 405	Rondônia/Brazil	
CAB 410	Rondônia/Brazil	Albuquerque et al., 2010
CAB 413	Rondônia/Brazil	Almeida et al., 2009
CAB 414	Rondônia/Brazil	
Pound 12	Peru	
MA 12	Amazonas/Brazil	
MA15	Amazonas/Brazil	
SA3	Rondônia/Brazil	
SA5	Rondônia/Brazil	
SA9	Rondônia/Brazil	
SA13	Rondônia/Brazil	
PA 150	Peru	
EET 233	ND*	Pimenta Neto et al., 2018
Chuao 120	Valle de Chuao/ Venezuela	
CEPEC 90	Bahia/Brazil	
CEPEC 86	Bahia/Brazil	Silva et al., 2010
CSUL 7	Acre, Brazil	
NA 33	Nanay River/ Peru	
P 4B	Iquitos/ Peru	
RB 39	Acre/Brasil	Benjamin et al., 2016
SGU-26	Guatemala	Marita et al., 2001
Sca 6	Ucayali River/ Peru	
Sca 12	Loreto/Peru	

*ND= Not determined

Some studies have evaluated progenies in order to identify combinations of potential parents for the development of new resistant cultivars and populations for future studies of mapping and identification of candidate genes. They allowed describing crosses considered highly promising (Figure 5), as they stand out from other combinations evaluated. Some progenies showed results higher than Sca 6, used as resistant control in some experiments. The most frequent clone among these promising crosses was the CAB 214 which, even when crossed with a susceptible genotype (ICS 39), showed excellent results. In addition, the clones CCN 51, NA 33 and RB 39 were also present in different combinations generating potential progenies for resistance to witches' broom.

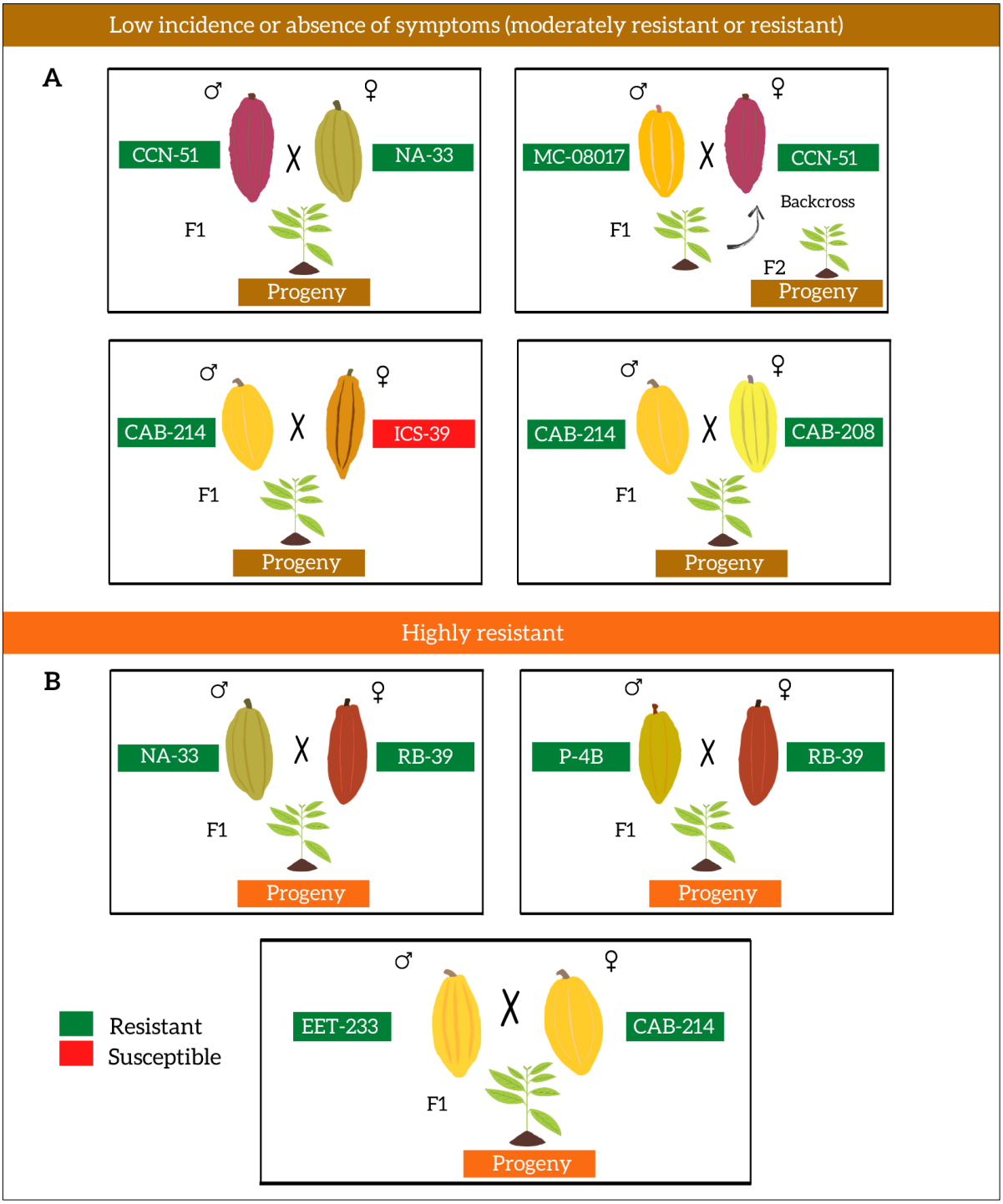

Figure 5. Combinations of parents that stood out by the positive result shown in the articles that analyzed potential parents for generating resistant progenies. A. Combinations that generated progenies considered resistant and moderately resistant. B. Combinations that generated progenies considered highly resistant, as they exceeded the levels of resistance of control samples.

3.3 Study of diversity in sources of resistance to witches' broom disease

Genetic diversity was the subject of 23% of the studies that make up this review. The analyses were performed using isoenzymes and microsatellite molecular markers and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Most studies used microsatellites, actually, with only one having been carried out with isoenzymes, and two with RAPD.

The number of genotypes evaluated ranged from 20 to 270 in most articles. Only one study, carried out with populations from the International Cocoa Genebank in Trinidad, analyzed a large number (812) of genotypes, including resistant and susceptible genotypes.

In general, the 10 genetic diversity studies included genotypes resistant and susceptible to witches' broom. The resistant genotypes evaluated included the clones Sca 6, Sca 12, CCN 51 and genotypes of the CEPEC, TSH, CAB, EET series, among others. Based on data on levels of heterozygosity, genetic distances and grouping, it was possible to observe some genotypes that stood out, such as TSH 1188, which showed high levels of heterozygosity, higher than Sca 6, Sca 12 and CCN 51. The CAB series accessions from the upper Amazon region, also showed high levels of observed and expected heterozygosity, in addition to revealing the presence of rare alleles, thus indicating that the CAB series genotypes can be promising for cacao improvement programs. On the other hand, it has been observed that some Scavina clones descendants have a relatively low level of genetic diversity.

3.4 Identification of QTLs and candidate genes

Studies to identify QTLs associated with resistance to witches' broom disease accounted for 12% of the total of 43 articles. The methods used were simple interval mapping and composite interval mapping. The populations used in the studies came from crosses of the clones Sca 6 x ICS 1 (three studies), TSH 1188 x CCN 51 (one study), TSE 95 x Silecia 1 and Sca 12 x unknown (one study). Table 2 systematizes the identified QTLs, with the respective chromosomes where they are located and probable donor genotypes of these QTLs. Most QTLs were identified by a single study and only one did not find significant QTLs.

Table 2: List of QTLs identified with the respective chromosomes, location, donor genotypes and phenotypic variation.

QTL	Location	Genotype	Phenotypic variation	References
QTL 1.1	Chromosome I	ICS 1	6,7%	Brown et al., 2005
QTL 3.1	Chromosome III	TSH 1188	3,9 %	Royart et al., 2016
QTL 4.1	Chromosome IX	CCN51	7,6%	
QTL 6.1	Chromosome VI	CCN51	8,5%	
QTL 6.2	Chromosome VI	CCN51	7,7%	
QTL 7.1	Chromosome VII	CCN51	9,7%	
QTL 9.1	Chromosome IX	SCA 6/TSH 1188	34,8%	Queiroz et al., 2003
QTL 9.2	Chromosome IX	TSH 1188/CCN51	7,7%	Royart et al., 2016

The clone CCN 51 had the highest number (four) of QTLs of the total identified coming from this clone, one of which the author claims may be from CCN 51 or TSH 1188. According to the studies, the most significant QTLs are found on chromosome IX (QTL 9.1) and the clones Sca 6 and TSH 1188 have this QTL in common.

In addition to QTLs, two studies have identified resistance associated candidate genes. Thus, the identified genes are represented in total number by QTL (Figure 6 A), also indicating the number of genes by biological function (Figure 6 B). The number of genes ranged from 1 in QTL 1.1 to 90 in QTL 6.1, most of which were identified in a single study and many still have unknown biological functions. Among the genes characterized in terms of biological function, we can observe genes involved in cellular organization and biogenesis, metabolism of DNA or RNA and proteins, among others. The genes with unknown function represented the majority of the total identified, representing 54.29%, distributed in different QTLs. Only QTL 9.2 presented a greater number of genes with known function, considering the total by QTL.

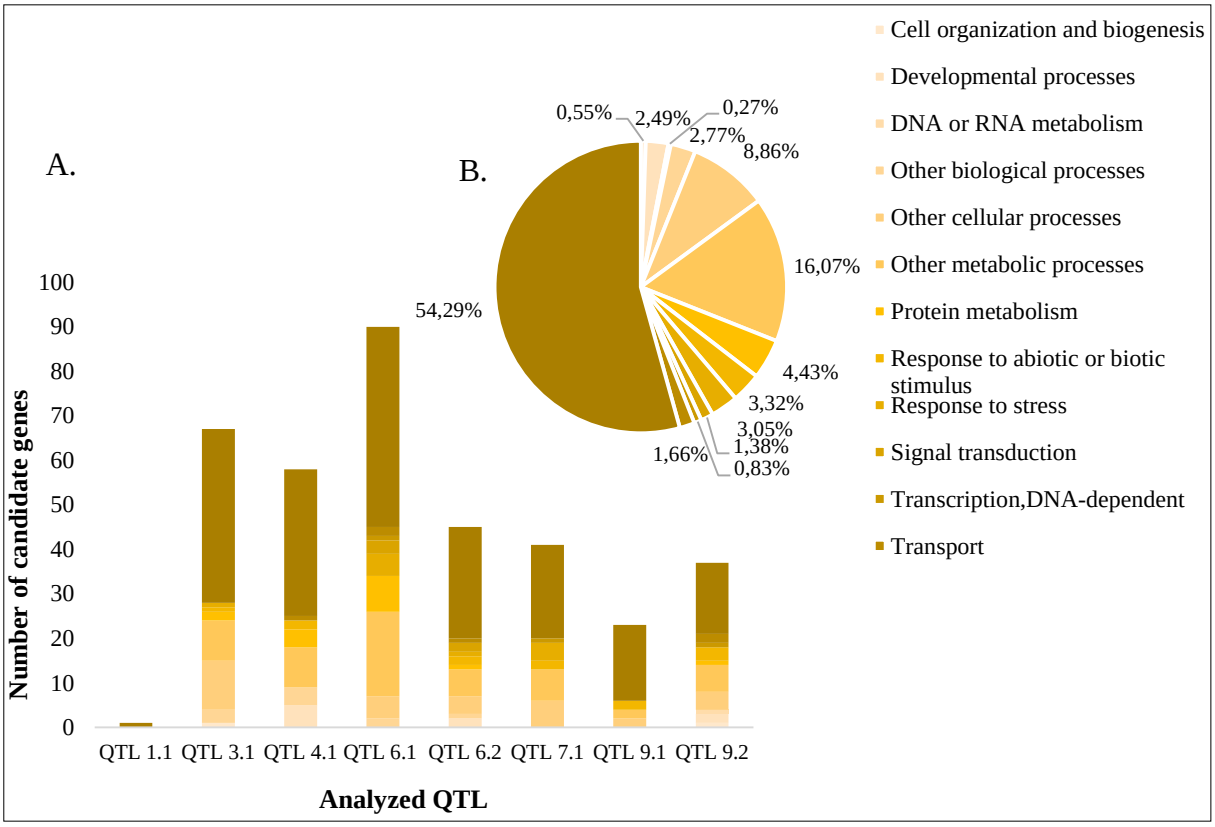

Figure 6. Total candidate genes identified, based on the articles that performed identification of QTL and candidate genes. A. Number of candidate genes per QTL. B. Biological function of the identified genes.

Including the studies that analyzed gene expression and considering only the candidate genes most discussed within them, these genes were organized in a list containing the genes and their respective proteins or function, when the encoded protein was not informed (Table 3). Many of these genes were found through the genetic mapping aimed at identifying candidate genes, in which the resistant clones CCN 51, TSH 1188 and Sca 6 were used. The other genes were characterized by means of gene expression studies, and inoculations and amplifications were conducted using PCR (Polymerase Chain Reaction) techniques, to check the levels of gene expression through infection with *M. perniciosa*. The resistant clones used in these gene expression studies were TSH 1188 and CAB 214.

Table 3: List of cacao tree genes associated with resistance to witches' broom disease and their proteins or function.

Gene	QTL	Protein / function	Authors
Thecc1EG028968	QTL 6.1	CC-NBS-LRR resistance protein, putative	Royart et al 2016

Thecc1EG028973	QTL 6.1	CC-NBS-LRR resistance protein, putative	
Thecc1EG028972	QTL 6.1	NB-ARC domain-containing disease resistance protein, putative	
Thecc1EG028979	QTL 6.1	Disease resistance-responsive family protein, putative	
Thecc1EG028959	QTL 6.1	Leaf senescence-associated receptor-like protein kinase, putative isoform 2	
Thecc1EG032367	QTL 7.1	2-oxoglutarate and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	
Thecc1EG032371	QTL 7.1	2-oxoglutarate and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	
Thecc1EG032376	QTL 7.1	2-oxoglutarate and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	
Thecc1EG032382	QTL 7.1	2-oxoglutarate and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	
Thecc1EG016564	QTL 3.1	Mitogen-activated protein kinase kinase 5, putative	
Thecc1EG016546	QTL 3.1	Glycosyl hydrolase superfamily protein, putative	
Thecc1EG016568	QTL 3.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein isoform 2	
Thecc1EG038262	QTL 9.1	RING/U-box superfamily protein	
Thecc1EG038249	QTL 9.1	DNA-binding protein phosphatase 1	
Thecc1EG038267	QTL 9.1	Kinase superfamily protein with octicosapeptide/Phox/Bem1p domain, putative	
Thecc1EG016777	QTL 4.1	pirofosforilase UDP-glicose 2	
RGC2	ND*	witches' broom resistance	Da Hora Junior et al., 2012
HRGP	ND	HRGPs proteins, structural components of the cell wall	
PPI	ND	witches' broom resistance	
CBL10	ND	CBL protein involved in binding to Ca^{2+} and regulation of protein kinase activity.	
RGH11	QTL 1.1	witches' broom resistance	Brown et al 2005

RGH2	QTL 9.1	witches' broom resistance	
RGH7		witches' broom resistance	
RGH8		witches' broom resistance	
AV14.940	QTL 9.1	witches' broom resistance	Queiroz et al 2003
LRP-CAB	ND	Leucine-rich protein/ Membrane receptor	Leal Junior et al., 2007
LRP.2-CAB	ND	Leucine-rich protein/ Membrane receptor	
WD.40-ICS	ND	WD-repeat protein/ Signal transduction	
ERF-ICS	ND	Ethylene-Response Factor 1 protein/ Transcription regulator	
NAM-ICS	ND	No-Apical Meristem protein/ Transcription regulator	
SVP-ICS	ND	Short Vegetative Phase protein/ Transcription regulator	
Hev-ICS	ND	Hevein/ A pathogenesis related protein	
Thau-ICS	ND	Thaumatin/ A pathogenesis related protein	
Chit-ICS	ND	Chitinase/ Hydrolysis of chitin	
Gluc-CAB	ND	Beta 1,3 glucanase/ Hydrolysis of glucan	
Cyst-ICS	ND	Cysteine Proteinase/ Peptidase	
Perox-CAB	ND	Peroxidase/ Catalyse oxidative reaction	
Caff-CAB	ND	Caffeine synthase/ Biosynthesis of caffeine	
AR-CAB	ND	Anthocyanidin reductase/ Biosynthesis of tannin and pro-anthocianydins	
LD-ICS	ND	Leucoanthocyanidin dioxygenase/ Biosynthesis of anthocyanidin	
EH-CAB	ND	Epoxide hydrolase/ Biosynthesis of cutin	
C.P450-ICS	ND	Cytochrome P450/ Oxidative degradation	
Cell-CAB	ND	Endo-1 4-beta-glucanase/ Hydrolysis of cellulose	
USP-CAB	ND	Universal Stress Proteint/ Response to stress	
EIG.7-CAB	ND	Lipid-associated family protein	
ATS.3-ICS	ND	Embryo-specific protein	

*ND= Não determinado

4. DISCUSSION

This systematic review brings together high-quality articles that demonstrate the main advances in research on sources of resistance to witches' broom disease in cacao tree, which have resulted in significant contributions to cacao genetic improvement programs. Furthermore, this review lends support to new studies aimed at identifying and diversifying sources of resistance to this disease as well as better understanding the molecular mechanisms involved.

4.1 Concentration of studies for resistance to witches' broom disease

Brazil has conducted the most studies on witches' broom disease in cacao (Figure 4). This is most likely due to the impact of this disease on the country following the arrival of the pathogen in Bahia, the state responsible for the majority of national production of cacao. The expansion of this pathogen has devastated many cacao farms, and consequently generated a series of social, economic and environmental problems (Caldas & Perz, 2013). In fact, the sharp reduction in production made Brazil lose its position as the third largest producer of cacao worldwide, compromising its economy (Meinhardt et al., 2008).

The devastating impact of witches' broom disease in Bahia accelerated the search for resistant cultivars that will allow Brazil to reestablish cacao production by implementing resistant cultivars (Lopes et al., 2011; Silva, Luz, Pires, Yamada, & Santos Filho, 2010). Therefore, a series of studies were developed with this aim, which justifies why a greater number of studies have been conducted in Brazil. On the other hand, the scarcity of studies on resistance to this disease in African and Asian countries may be associated with being these countries free from the pathogen, which only occurs in the Americas (Hebbar, 2007).

Variations in the pathogen *M. perniciosa* make the search for resistant sources constant, as well as fundamental for areas where the disease occurs in cacao-producing countries. This makes resistance sustainable and allows maintaining cacao production in these areas (Gramacho et al., 2016). However, it should be noted that it is critical to direct these studies to areas free of the pathogen. Africa, for example, is home to the world's largest cacao producing countries. Ploetz, 2007, and Teixeira, et al., 2015, warned of the dangers of a possible arrival of this disease to African countries. They state it would represent a major threat to the global chocolate industry, especially because most of the cacao grown in Africa belongs to groups considered susceptible to witches' broom disease. Thus, studies to identify resistance in these locations would represent an important preventive measure.

4.2 Sources of resistance to witches' broom disease

The present systematization made it possible to list the genotypes that showed the best performance in phenotypic evaluations for resistance to witches' broom disease (Table 1). The list includes different genotypes with distinct origins, developed by important research institutions, such as the Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC). The widespread use of these sources of resistance can render great advances to cacao breeding programs.

The clones Sca 6 and Sca 12, included among the genotypes identified as best performing, were used in most studies as resistant controls and were reported as parents of many hybrids and cultivars studied. The frequency of these clones in the studies is probably associated with the fact that they were the first identified sources of resistance to witches' broom disease. Although Sca 6 and Sca 12 infections have already been reported in some regions of Ecuador, Peru and Brazil (Teixeira et al., 2015), they are still considered references for resistance to this disease. However, studies carried out by the Santa Cruz State University (UESC), in collaboration with the Mars Center for Cocoa Science (MCCS), showed that TSH 1188 and CCN 51 generate outstanding combinations for witches' broom disease resistance (Royaert et al., 2016). In addition, other studies have indicated accessions of the CAB series, for example CAB 214, CAB 208 and CAB 270, as new sources of potential resistance (Albuquerque et al., 2010; Almeida et al., 2009).

The variability of the population of the pathogen emphasizes the importance of, and the need for, further research on these potential new sources of resistance to witches' broom disease. It is essential to focus the search for resistance on different cacao populations, in order to produce results that are as promising as those achieved by Marssaro et al., 2020. While analyzing local cacao varieties from Bahia, the authors identified about 28 genotypes with high and moderate resistance, apart from those traditionally used in breeding programs. This finding represented an important step toward the validation of new sources of resistance to witches' broom and pointed out the importance of making selections on local farms.

The choice of parents is a crucial step in breeding programs, requiring a lot of rigor and previous knowledge about the characteristics present in these genotypes (Fasahat et al., 2016). In fact, in addition to being resistant, the cultivars obtained must have other characteristics relevant to the production of cacao, such as high fruit and bean productivity, organoleptic qualities and resistance to other diseases (Adewale et al., 2014; Motilal et al., 2016). Thus, in

this systematic review we present the most promising combinations based on phenotypic analyses (Figure 5). Most of the progenies obtained from these crosses have been evaluated for many years, showing resistance levels superior to the resistant controls, and in some cases to the parents themselves (Albuquerque et al., 2010; Benjamin et al., 2016; DuVal et al., 2017; Pimenta Neto et al., 2018).

Tests of new combinations of parents can contribute to the diversification of sources of resistance, as they have been sought through evaluations conducted with different inocula in different populations of cacao from different locations (Gramacho et al., 2016), associating traditional improvement tools with molecular markers in order to accelerate and enhance the process of identification and validation of new sources of resistance. The crosses proposed here mainly include genotypes reported as potential new sources of resistance, offering support for the development of new research aimed at the widespread exploration of these sources, which can bring promising results in the development of new cultivars. In addition, they have potential for use in the generation of populations for genetic mapping studies, aiming at the identification of QTLs and candidate genes, which are important for a better understanding of the molecular basis of resistance to witches' broom disease.

4.3 Genetic diversity of sources of resistance to witches' broom disease

The use of genotypes with a greater number of diverse alleles, associated with resistance to witches' broom disease, has become the primary strategy for ensuring the durability of resistance in cacao, particularly in regions where the pathogen is a constant threat (Yamada et al., 2009). In addition, the exploration of genetic diversity in breeding programs aims to avoid inbreeding depression that can compromise the productivity of allogamous species (Mackay, et al., 2021).

Genetic diversity in the sources of resistance to witches' broom disease has been the target of attention in breeding programs, mainly because many cultivars resistant to this disease are descendants of the Scavina clones, which can narrow the genetic basis of resistance (Faleiro et al., 2004). In fact, the clone Sca 6 was represented in the majority of the diversity studies included in this review, and it is possible to observe that some of its descendants have relatively low levels of diversity. However, despite having Sca 6 in its ancestry, TSH 1188 displayed high heterozygosity, which can be attributed to the origin of this hybrid, which involves contrasting crosses (Lima et al., 2013).

The efforts made in the search for new sources of resistance have led to the identification of several genotypes that do not have Scavina in their genealogy and have high rates of heterozygosity, such as the accessions of the CAB, EET and CEPEC series. Thus, data on genetic diversity of sources of resistance to witches' broom disease in cacao indicates the possibility of broad heterozygosis exploration, especially the rare alleles found in Amazonian high CAB accessions, which can be highly promising for obtaining diversified cultivars and gene pyramiding (Sereno et al., 2006).

Despite the positive results in relation to the genetic diversity of many sources of resistance to witches' broom disease, these studies are still necessary, if not critical, for maintaining diversity. They could validate whether breeding program selection has compromised the genetic diversity of these improved populations and provide relevant information to guide breeders in the selection of contrasting parents and development of cultivars with high variability, thereby favoring the maintenance of resistance.

4.4 QTLs and genes associated with resistance to witches' broom disease

The Sca 6 x ICS1 cross was the most frequently used in the generation of mapping populations for the identification of QTLs, most likely because it is a high contrast combination using one of the main sources of resistance. However, research on other genotypes, such as CCN 51 and TSH 1188, allowed for the identification of new QTLs (Royaert et al., 2016).

A QTL of greater effect was identified on chromosome IX (Table 2), being associated with the clone Sca 6 (Brown et al., 2005; Faleiro et al., 2006; Queiroz et al., 2003). Additionally, according to the data obtained by Brown et al., 2005, it was possible to observe that genotypes considered susceptible can also present genomic regions associated with resistance. They identified, in this regard, a QTL located on chromosome I, which was associated with the susceptible genotype ICS1.

The significant effect of the gene AV14.940 present in QTL 9.1 (Table 3) suggested the presence of monogenic resistance to witches' broom disease (Queiroz et al., 2003). However, Royaert et al., 2016, found the same QTL and identified several candidate genes present in this region using populations descended from TSH 1188 x CCN 51, , indicating the occurrence of polygenic resistance. The presence of the same QTL as Scavina in populations derived from crosses between TSH 1188 and CCN 51 is explained by the genealogy of TSH 1188, which includes Sca 6.

Several QTLs were identified from the cross TSH 1188 x CCN 51, and most were associated with the clone CCN 51 (Table 2) (Royaert et al., 2016). This demonstrated the importance of a wide exploration of the sources of resistance in mapping studies, using populations from different crosses, as shown in Figure 5. The widespread of these genotypes facilitates the identification of new QTLs and candidate genes associated with resistance, allowing for a more thorough investigation of the genetic potential of these sources.

Albuquerque et al., 2010 emphasize the importance of using the CAB series genotypes to identify QTLs, as they have proved to be highly promising in field evaluations and diversity studies. The identification of QTLs using populations from two crosses involving CAB clones (ICS 39 x CAB 208 and ICS 39 x CAB 214) was performed by Figueira et al., 2006, who identified two QTLs located on chromosomes IV and VIII. It should be noted that these results, although also referenced by Lanaud et al., 2009, in a meta-analysis containing all QTLs for disease resistance in cacao, were not published in journals.

This systematic review brings together all the QTLs previously identified for resistance to witches' broom disease, as well as several candidate genes with known and unknown functions (Table 3; Figure 6). It offers, therefore, the basis for developing further research aimed at exploring these genomic regions to better elucidate the molecular mechanisms of resistance to witches' broom disease. Some genes listed herein are involved in the initial processes of recognition of the pathogen by the plant, which represents a crucial stage of the defense mechanisms (Da Hora Junior et al., 2012; Royaert et al., 2016).

Gene expression studies are required to understand the expression levels and functions of genes whose expression and functions are unknown, which account for the vast majority of the genes identified in our systematization. In general, different defense mechanisms and many genes are known to be involved in the process of responding to biotic stress (Da Hora Junior et al., 2012; Leal Júnior et al., 2007), and understanding these mechanisms is critical for guiding the choice of parents and the development of new cultivars within breeding programs.

5. CONCLUSION

Proving to be an important theoretical research proposal, this systematic review compiled and incorporated the scientific knowledge from primary studies carried out by different research institutions around the world. Thus, it represents an important step toward the performance of new projects, to be based on the evidence offered herein.

Given the substantial impact of witches' broom disease on cacao trees, many efforts have been directed toward identifying sources of resistance, particularly in areas where the pathogen is found. The current systematic review summarized the main advances made by this disease resistance research, as well as the factors that contribute to the stages of improvement, such as genetic diversity and QTL analysis.

Despite the fact that this systematization identified significant advances, it also revealed the need for new studies that expand research on the various sources of resistance. Because breeding programs can benefit greatly from a broad application of resistance sources, it is critical to continue selections in different cacao populations as well as conduct molecular studies to better understand the mechanisms of resistance to witches' broom disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

The Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), for granting the first author's scholarship. The Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for granting the second author's postdoctoral scholarship. To the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), for granting the scientific productivity scholarship to the last author.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Pereira J.S: elaborated, planned, conducted the analyses and wrote the article; Silva A.S: elaborated, planned, advised the analyses and corrected the article; Corrêa R. X: idealized, advised and corrected the article; Luz E.D.M.N: corrected the article. All authors provided critical suggestions and helped shape the research and the article.

ADDITIONAL FILES

Additional file 1: Previously prepared protocol to conduct the systematic review

Title	Sources of resistance to witches' broom disease in cacao: systematization of advances and perspectives
Researchers	Jocilene dos Santos Pereira; Ariana Silva Santos; Edna Dora Martins Newman Luz; Ronan Xavier Corrêa.
Description	Witches' broom is one of the diseases that most affect cacao trees in Brazil. Among the control measures, the use of resistant varieties has shown to be the most effective for long-term crop maintenance in regions affected by the pathogen. Therefore, genetic improvement programs have been working on identifying and selecting sources of resistance. Their purpose is making available resistant and highly productive cultivars for small and large producers, mitigating the damages caused by the disease and reestablishing cacao production in many regions where the disease has devasted the crops.
Objectives	- To identify the main sources of resistance to witches' broom disease used in cacao breeding programs; - To check which sources of resistance to witches' broom disease were used to create new cultivars, for studies of diversity and identification of QTLs; - To study the data present in the literature and identify possible gaps that still exist in breeding programs with regard to strategies for identification and diversification of resistance to witches' broom disease.
Main questions	**Q1**- What are the main sources of resistance to witches' broom disease used in cacao breeding programs? **Q2**- Do the sources of resistance to witches' broom disease have samples representing germplasm from around the world? **Q3**- What are the main strategies used to identify the sources of resistance to witches' broom disease?

	Q4- What are the strategies for diversifying sources of resistance to witches' broom disease in breeding programs? **Q5** - What sources of resistance were used to create new cultivars resistant to witches' broom disease? **Q6**- Which of the sources of resistance to witches' broom disease are represented in genetic diversity studies? **Q7**- Which genotypes or varieties resistant to witches' broom disease have already been mapped to identify QTLs? **Q8**- What are the main QTLs associated with resistance to witches' broom in cacao trees? **Q9**- Are there QTLs in common in the main sources of resistance to witches' broom disease in cacao?
Keywords	*Moniliophthora perniciosa*, *Theobroma cacao*, systematic review, disease resistance, genetic improvement.
Search strings	"*Theobroma cacao*" AND "witches broom" AND "sources of resistance" "*Theobroma cacao*" AND "witches broom" AND "resistance" AND "germplasm" AND "diversity" "*Theobroma cacao*" AND "witches broom" AND "QTL"
Search source selection criteria	Scientific articles indexed in peer reviewed journals.
Search method	Use of "search strings" and programs to help organize the data.
Database for research	- Scopus; - PubMed; - Springer Link - Web Of Science - SciELO
Inclusion criteria	- Articles in English, Portuguese or Spanish; - Primary research; - Articles that are related to the objective of the systematic review.
Exclusion Criteria	-Articles that are not related to the objective of the systematic review - Dissertations, theses, books, simple and expanded abstracts, technical reports and review articles; - Inconsistencies between methodologies and results.

Definition of the types of studies	Based on the inclusion and exclusion criteria.
Initial selection of studies	Title; Summary; Key words.
Final selection of studies	- Meet inclusion criteria - Must not meet any of the exclusion criteria
Data Extraction Strategy	- Abstract (objective, conclusions, keywords); - Country of the study; - Sources of resistance to witches' broom disease; - Witches' broom resistant cacao genotypes; - Cacao germplasm bank; Identification of sources of resistance; - Diversification of sources of resistance; - Development of resistant cultivars; - Identification of QTLs; - QTLs associated with resistance to witches' broom disease.
Summarizing the data	Graphs, tables and figures.
Publishing strategy	Plant Breeding.

REFERÊNCIAS

Adewale, D. B., Adeigbe, O. O., Sobowale, O. I., & Dada, O. S. (2014). Breeding Value of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) for Pod and Bean Traits: A Consequential Advance in Nigerian Cocoa Breeding Program. *Notulae Scientia Biologicae*, *6*(2), 214–219. https://doi.org/10.15835/nsb629291

Aime, M. C., & Phillips-Mora, W. (2005). The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, *97*(5), 1012–1022. https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832751

Albuquerque, P. S. B., Silva, S. D. V. M., Luz, E. D. M. N., Pires, J. L., Vieira, A. M. C., Demétrio, C. G. B., … Figueira, A. (2010). Novel sources of witches' broom resistance (causal agent *Moniliophthora perniciosa*) from natural populations of *Theobroma cacao* from the Brazilian Amazon. *Euphytica*, *172*(1), 125–138. https://doi.org/10.1007/s10681-009-0068-4

Almeida, C. M. V. C., dos Santos Dias, L. A., & Silva, A. de P. (2009). Caracterização agronômica de acessos de cacau. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, *44*(4), 368–373. https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009000400006

Artero, A. S., Silva, J. Q., Albuquerque, P. S. B., Bressan, E. A., Leal, G. A., Sebbenn, A. M., Figueira, A. (2017). Spatial genetic structure and dispersal of the cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* in the Brazilian Amazon. *Plant Pathology*, *66*(6), 912–923. https://doi.org/10.1111/ppa.12644

Benjamin, C. S., Luz, E. D. M. N., Santos, W. O., & Pires, J. L. (2016). Cacao families and parents selected as resistant to natural infection of *Moniliophthora perniciosa*. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, *16*(2), 141–146. https://doi.org/10.1590/1984-70332016v16n2a21

Brown, J. S., Schnell, R. J., Motamayor, J. C., Lopes, U., Kuhn, D. N., & Borrone, J. W. (2005). Resistance gene mapping for witches' broom disease in *Theobroma cacao* L. in an F2 population using SSR markers and candidate genes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *130*(3), 366–373. https://doi.org/10.21273/jashs.130.3.366

Caldas, M. M., & Perz, S. (2013). "Agro-terrorism? The causes and consequences of the appearance of witch's broom disease in cocoa plantations of southern Bahia, Brazil." *Geoforum*, *47*, 147–157. https://doi.org/10.1016/j.geoforum.2013.01.006

Cilas, C., & Bastide, P. (2020). Challenges to Cocoa Production in the Face of Climate Change and the Spread of Pests and Diseases. *Agronomy*, *10*(9), 1–8. https://doi.org/10.3390/agronomy10091232

Da Hora Junior, B. T., Poloni, J. D. F., Lopes, M. A., Dias, C. V., Gramacho, K. P., Schuster, I. Micheli, F. (2012). Transcriptomics and systems biology analysis in identification of specific pathways involved in cacao resistance and susceptibility to witches' broom disease. *Molecular BioSystems*, *8*(5), 1507–1519. https://doi.org/10.1039/c2mb05421c

Davies, L. R., & Allender, C. J. (2017). Who is sowing our seeds? A systematic review of the use of plant genetic resources in research. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *64*(8), 1999–2008. https://doi.org/10.1007/s10722-017-0491-7

DuVal, A., Gezan, S. A., Mustiga, G., Stack, C., Marelli, J. P., Chaparro, J., … Motamayor, J. C. (2017). Genetic parameters and the impact of off-types for *Theobroma cacao* L. In a breeding program in Brazil. *Frontiers in Plant Science*, *8*(December), 1–12. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02059

Faleiro, F.G., Lopes, U. V., Yamada, M. M., Melo, G. R. P., Monteiro, W. R., Pires, J. L., Faleiro, A. S. G. (2004). Genetic diversity of cacao accessions selected for resistance to

witches' broom based on RAPD markers. *Cropp Breeding and Applied Biotechnology*, *4*(1), 12–17. https://doi.org/10.12702/1984-7033.v04n01a03

Faleiro, F. G., Queiroz, V. T., Lopes, U. V., Guimarães, C. T., Pires, J. L., Yamada, M. M. O., Moreira, M. A. (2006). Mapping QTLs for witches' broom (*Crinipellis perniciosa*) resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). *Euphytica*, *149*(1–2), 227–235. https://doi.org/10.1007/s10681-005-9070-7

Fasahat, P., Rajabi, A., Jad, J. M., & Derera, J. (2016). Principles and Utilization of Combining Ability in Plant Breeding. *Biometrics & Biostatistics International Journal*, *4*(1). https://doi.org/10.15406/bbij.2016.04.00085

Figueira, A., Paulo, S., Albuquerque, B., Gildemberg, A., Leal-Jr, G. Genetic mapping and differential gene expression of Brazilian alternative resistance sources to witches' broom (causal agent *Crinipellis perniciosa*). 15th International Cocoa Research Conference, 2006.

Gramacho, K. P., Luz, E. D. M.N, Da Silva, F. S., Lopes, U. V., Pires, J. L., & Pereira, L. (2016). Pathogenic variability of *Moniliophthora perniciosa* in three agroecological zones of the cacao region of Bahia, Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, *16*(1), 7–13. https://doi.org/10.1590/1984-70332016v16n1a2

Hebbar, P. K. (2007). Cacao Diseases : A Global Perspective from an Industry Point of View e - X tra * Cacao Diseases : Important Threats to Chocolate Production Worldwide Cacao Diseases : A Global Perspective from an Industry Point of View. *Phytopathology*, *97*(12), 1658–1663.

Lanaud, C., Fouet, O., Clément, D., Boccara, M., Risterucci, A. M., Surujdeo-Maharaj, S., Argout, X. (2009). A meta-QTL analysis of disease resistance traits of *Theobroma cacao* L. *Molecular Breeding*, *24*(4), 361–374. https://doi.org/10.1007/s11032-009-9297-4

Leal Júnior, G. A., Albuquerque, P. S. B., & Figueira, A. (2007). Genes differentially expressed in *Theobroma cacao* associated with resistance to witches' broom disease caused by *Crinipellis perniciosa*. *Molecular Plant Pathology*, *8*(3), 279–292. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00393.x

Lima, E. M., Pereira, N. E., Pires, J. L., Barbosa, A. M. M., & Corrêa, R. X. (2013). Genetic molecular diversity, production and resistance to witches' broom in cacao clones. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, *13*(2), 127–135. https://doi.org/10.1590/s1984-

70332013000200005

Lopes, U. V., Monteiro, W. R., Pires, J. L., Clement, D., Yamada, M. M., & Gramacho, K. P. (2011). Cacao breeding in Bahia, Brazil - strategies and results. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, *11*(SUPPL.), 73–81. https://doi.org/10.1590/s1984-70332011000500011

Mackay, I. J., Cockram, J., Howell, P., & Powell, W. (2021). Understanding the classics: the unifying concepts of transgressive segregation, inbreeding depression and heterosis and their central relevance for crop breeding. *Plant Biotechnology Journal*, *19*(1), 26–34. https://doi.org/10.1111/pbi.13481

Marssaro, A. L., Montejo-Díaz, A., Montaño-Orellana, V. M., Luz, E. D. M. N., & Corrêa, R. X. (2020). Resistance to witches' broom in adult plants and progeny of local varieties of cacao in Southern Bahia. *Bragantia*, *79*(4), 421–432. https://doi.org/10.1590/1678-4499.20200341

Meinhardt, L. W., Rincones, J., Bailey, B. A., Aime, M. C., Griffith, G. W., Zhang, D., & Pereira, G. A. G. (2008). *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: What's new from this old foe? *Molecular Plant Pathology*, *9*(5), 577–588. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00496.x

Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D. G., Altman, D., Antes, G., Tugwell, P. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Medicine*, *6*(7). https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097

Motilal, L. A., Zhang, D., Mischke, S., Meinhardt, L. W., Boccara, M., Fouet, O., Umaharan, P. (2016). Association mapping of seed and disease resistance traits in *Theobroma cacao* L. *Planta*, *244*(6), 1265–1276. https://doi.org/10.1007/s00425-016-2582-7

Pereira, J.L., Ram, A., Figueiredo, J.M., Almeida, L.C.C. (1989) Primeira ocorrência da vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. *Agrotrópica*, *1*, 79-81.

Pimenta Neto, A. A., Laranjeira, D., Pires, J. L., & Luz, E. D. M. N. (2018). Selection of cocoa progenies for resistance to witches' broom. *Tropical Plant Pathology*, *43*(5), 381–388. https://doi.org/10.1007/s40858-017-0208-7

Ploetz, R. C. (2007). e - X tra * Cacao Diseases : Important Threats to Chocolate Production Worldwide Development of a Marker Assisted Selection Program for Cacao. *Phytopathology*, 1664–1669.

Queiroz, V. T., Guimarães, C. T., Anhert, D., Schuster, I., Daher, R. T., Pereira, M. G., Moreira, M. A. (2003). Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. *Plant Breeding*, *122*(3), 268–272. https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00809.x

Royaert, S., Jansen, J., da Silva, D. V., de Jesus Branco, S. M., Livingstone, D. S., Mustiga, G., Motamayor, J. C. (2016). Identification of candidate genes involved in Witches' broom disease resistance in a segregating mapping population of *Theobroma cacao* L. in Brazil. *BMC Genomics*, *17*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/s12864-016-2415-x

Santos, R. de C., Pires, J. L., Lopes, U.V, Gramacho, K. P. G., Batista Flores, A., Bahia, R. D. C. S., Ahnert, D. (2005). Assessment of genetic diversity on a sample of cocoa accessions resistant to witches' broom disease based on RAPD and pedigree data. *Bragantia*, *64*(3), 361–368. https://doi.org/10.1590/s0006-87052005000300005

Sereno, M. L., Albuquerque, P. S. B., Vencovsky, R., & Figueira, A. (2006). Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. *Conservation Genetics*, *7*(1), 13–24. https://doi.org/10.1007/s10592-005-7568-0

Silva, S. D. V. M., Luz, E. D. M. N., Pires, J. L., Yamada, M. M., & Santos Filho, L. P. dos. (2010). Parent selection for cocoa resistance to witches'-broom. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *45*(7), 680–685. https://doi.org/10.1590/s0100-204x2010000700007

Teixeira, P. J. P. L., Thomazella, D. P. de T., & Pereira, G. A. G. (2015). Time for Chocolate: Current Understanding and New Perspectives on Cacao Witches' Broom Disease Research. *PLoS Pathogens*, *11*(10), 1–8. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005130

Tirado-Gallego, P. A., Lopera-Álvarez, A., & Ríos-Osorio, L. A. (2016). Estrategias de control de Moniliophthora roreri y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao* L.: Revisión sistemática. *Corpoica Ciencia y Tecnologia Agropecuaria*, *17*(3), 417–430. https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num3_art:517

Yamada, M. M., Faleiro, F. G., Flores, A. B., Lopes, U. V., Pires, J. L., Xavier, R. C., & Santos, R. F. Dos. (2009). Microsatellite diversity and heterozygosity of parents of a cocoa breeding population. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, *9*(1), 17–22. https://doi.org/10.12702/1984-7033.v09n01a03

CAPITULO II

Avaliação de resistência à vassoura de bruxa em progênies de cacau comum da Bahia

Jocilene dos Santos Pereira, Edna Dora Martins Newman Luz, Ronan Xavier Corrêa

Resumo

A ocorrência da vassoura de bruxa causada por *Moniliophthora perniciosa* no cacaueiro tem ocasionado grandes perdas e prejuízos. A principal medida de controle é o uso de variedades resistentes. Assim, o foco dos programas de melhoramento tem sido a diversificação dessas fontes para manutenção da cultura a longo prazo, sobretudo em locais de constante pressão do patógeno. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar níveis de resistência em progênies de cacau comum do sul da Bahia. Para tanto, foram coletados frutos de 52 plantas matrizes de cacau comum em uma fazenda localizada em Arataca-BA. As sementes foram pré-germinadas e plantadas em tubetes. Após 40 dias, as plantas foram inoculadas com uma suspensão na concentração de 2×10^5 basidiósporos/ml colocada na gema apical. A avaliação dos sintomas foi realizada 60 dias após a inoculação, gerando-se o índice de doença (ID) para cada matriz amostrada. A análise de variância dos ID foi conduzida no programa Sisvar. Como resultados, o ID variou de 0,97 a 11,48, sendo formados quatro diferentes grupos, indicando que as variedades de cacau comum do Sul da Bahia analisadas possuem variação em relação a resistência à vassoura de bruxa. A seleção de genótipos resistentes à vassoura de bruxa no plantio comercial de cacau analisado é viável e promissora.

Palavras-chave: *Moniliophthora perniciosa*; melhoramento genético, variedades resistentes.

1. INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma importante cultura, que apresenta possibilidades de usos na indústria, sobretudo na produção de chocolates. Assim, tem contribuído para a economia e renda das regiões produtoras (AFOAKWA et al., 2008; WESSEL & QUIST-WESSEL, 2015). No entanto, a ocorrência de doenças, como a vassoura de bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* tem ocasionado grandes perdas para esta cultura, necessitando de medidas de controle eficazes (MARELLI et al., 2019). O uso de variedades resistentes tem sido a principal medida de controle para esta doença, possibilitando a manutenção e produtividade da cultura em regiões de ocorrência do patógeno (MEINHARDT et al., 2008).

Os programas de melhoramento genético do cacaueiro têm trabalhado na identificação de fontes de resistência a esta doença, disponibilizando-as para cultivo pelos agricultores (LOPES et al., 2011; PIMENTA NETO et al., 2018). Entretanto, variações do patógeno tem sido relatadas em várias regiões, o que tem gerado preocupações, principalmente porque alguns cultivares já validados como resistentes têm sido infectados, como os clones Sca 6 e Sca 12 que foram as primeiras fontes de resistência identificadas e estão presentes na genealogia de muitos cultivares desenvolvidos e utilizados atualmente (GRAMACHO et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2015). Dessa forma, é importante verificar fenotipicamente a incidência dos sintomas da doença nas plantas, analisando as variações dos níveis de resistência com diferentes inóculos. Este processo pode ser realizado no campo ou em condições de casa de vegetação, com temperatura e umidade controladas (SILVA et al., 2010; GRAMACHO et al., 2016).

Considerando as modificações do patógeno e os riscos que estas novas variações podem oferecer ao cultivo e produção do cacaueiro, que também é acometido por outras doenças, é fundamental proceder novas seleções em variadas populações de cacau visando identificar genótipos diferentes dos tradicionalmente utilizados em programas de melhoramento para validação de novas fontes de resistência (LISBOA et al., 2020; (LOPES et al., 2011; SILVA et al., 2010). Resultados obtidos por Santos (2019) e Marssaro et al. (2020), a partir de seleções em fazendas locais do Sul da Bahia identificaram genótipos promissores que podem contribuir para a geração de novos cultivares. Estes resultados evidenciam a importância de uma maior exploração das populações existente em fazendas locais de cacau. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar níveis de resistência em progênies de cultivares locais de cacau comum no sul da Bahia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram coletados frutos de 52 plantas matrizes de cacau comum, provenientes de polinização aberta, em uma fazenda localizada em Anuri, município de Arataca-BA. Essas plantas foram utilizadas por apresentarem estado fitossanitário destacado em campo e contrastes de resistência em estudos prévios desenvolvidos por Santos (2019), sendo selecionadas 31 plantas resistentes e 17 suscetíveis (Tabela 1). De cada planta matriz foram coletados três frutos e as sementes colocadas em água por um período de 48 horas para pré-germinação. Em seguida foram plantadas em tubetes com um número de 54 repetições por genótipo, sendo mantidas em casa de vegetação sob condições de cultivo, por um período de 30 a 40 dias após a germinação para serem inoculadas.

Tabela 1: Relação de genótipos utilizados para avaliação fenotípica e classificação de resistência e suscetibilidade com base em teste piloto realizado por Santos, (2019).

Identificação do genótipo	Variedade	Classificação em teste piloto
2002	Comum	Resistente
2003	Comum	Resistente
2006	Comum	Suscetível
2008	Comum	Suscetível
2011	Comum	Resistente
2013	Comum	Resistente
2016	Comum	Suscetível
2017	Comum	Suscetível
2020	Comum	Resistente
2021	Comum	Resistente
2023	Comum	Resistente
2024	Comum	Suscetível
2025	Comum	Resistente
2027	Comum	Suscetível
2028	Comum	Resistente
2030	Comum	Resistente
20301	Comum	Resistente
2031	Pará	Suscetível

2037	Pará	Resistente
2041	Pará	Resistente
2046	Pará	Suscetível
2047	Pará	Resistente
2048	Pará	Resistente
2050	Pará	Resistente
2051	Maranhão	Suscetível
2052	Maranhão	Resistente
2053	Maranhão	Suscetível
2054	Maranhão	Resistente
2055	Maranhão	Resistente
2056	Maranhão	Resistente
2058	Maranhão	Suscetível
2059	Maranhão	Suscetível
2065	Maranhão	Resistente
2071	Maranhão	Resistente
2072	Maranhão	Resistente
2074	Maranhão	Resistente
2075	Maranhão	Resistente
2076	Maranhão	Resistente
2078	Maranhão	Resistente
2079	Maranhão	Resistente
2081	Maranhão	Suscetível
2083	Maranhão	Suscetível
2084	Maranhão	Resistente
2087	Maranhão	Resistente
2089	Maranhão	Resistente
2090	Maranhão	Suscetível
2091	Maranhão	Suscetível
2096	Maranhão	Suscetível
7004*	Híbrido	Resistente

*genótipo controle resistente

2.2 Inoculação e avaliação fenotípica

As suspensões de basidiósporos foram disponibilizadas pelo laboratório do CEPEC (Centro de Pesquisa do Cacau) localizado na sede da CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira). Os inóculos foram obtidos de acordo com a metodologia descrita por Dickstein et al. (1987) e encontravam-se armazenados em nitrogênio líquido. A germinação dos esporos foi observada 24 horas antesda inoculação para verificar a viabilidade do inóculo, sendo selecionados apenas aqueles que apresentaram mais de 80% de esporos germinados como proposto por Frias et al. (1995). Posteriormente, foi realizada a diluição em meio de ágar-água a 0,2% para uma concentração de 2×10^5 basidiósporos/ml (DICKSTEIN et al., 1987).

As etapas para inoculação e avaliação de progênies de cacau foram conduzidas de acordo com a metodologia descrita por Surujdeo-Maharaj et al. (2004) com modificações realizadas por Pimenta Neto et al. (2018) (Figura 1). Assim, plantas com idade de 30 a 40 dias, foram preparadas para inoculação. As folhas foram cortadas, reduzindo em 2/3 o limbo foliar, para melhor expor a gema apical e favorecer o desenvolvimento das plantas após a inoculação (Figura 1A). Cada planta foi inoculada com 30 μL de suspensão do inóculo colocado na gema apical (Figura 1B). Após a inoculação, as mudas foram colocadas em câmara úmida por 48 horas. Em seguida, mantidas em casa de vegetação em idênticas condições de cultivo e após 60 dias foi feita a avaliação dos sintomas (Figura 1C). A avaliação considerou a presença e ausência de vassoura (terminal e axilares), a quantidade de vassouras axilares com tamanho superior a um centímetro, o diâmetro e a altura da vassoura terminal,a presença de vassoura cotiledonar e a ocorrência de vassoura seca, estágio final da doença.

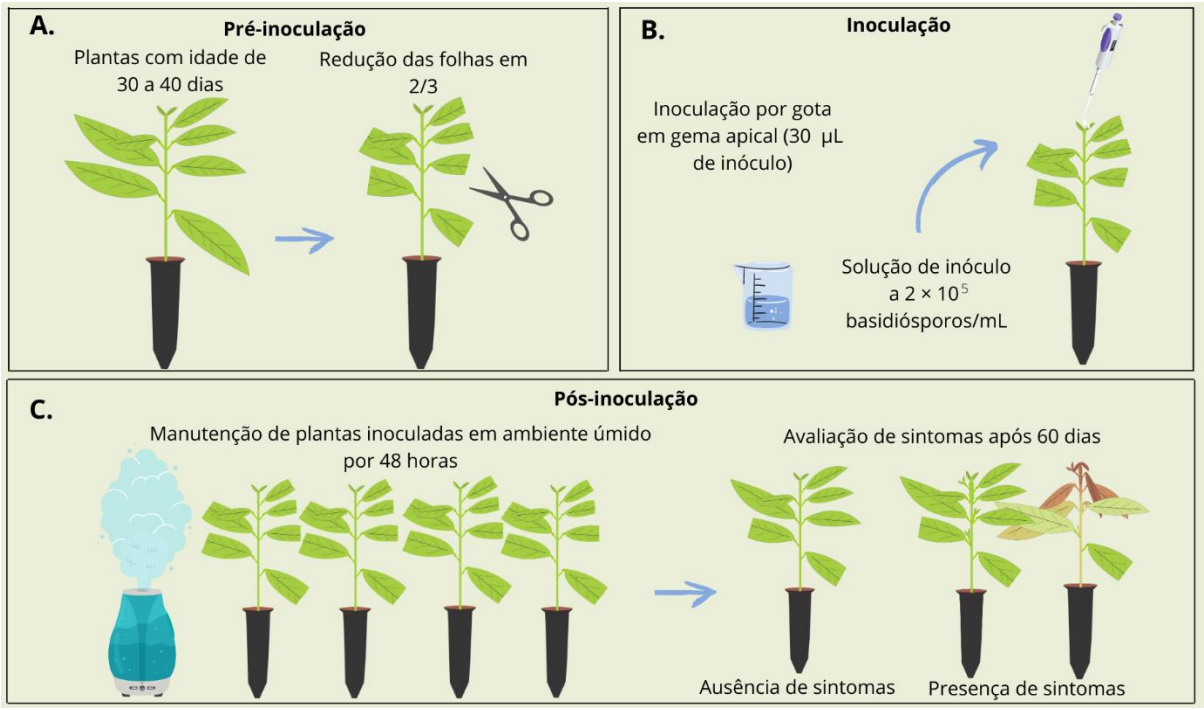

Figura 1: Etapas da inoculação e avaliação de progênies de cacau com *Moniliophthora perniciosa*, com base na metodologia descrita por Surujdeo-Maharaj et al. (2004) com modificações realizadas por Pimenta Neto et al. (2018). (A) Preparo das plantas para inoculação, (B) Processo de inoculação por gota de suspensão de basisdiósporos em plântulas, (C) Etapas pós-inoculação, mantendo-se plantas em câmara úmida e casa de vegetação para desenvolvimento do fungo e avaliação de sintomas.

2.3 Análise estatística

O índice de doença (ID) foi calculado com base na formula descrita previamente por Rodrigues et al. (2019): ID = TB + AB + CB + (4.3 * DB) + (0.1*LTB) + (0.2 *NAB), onde: TB = presença de vassoura terminal; AB = número de vassouras axilares; DB = presença de vassoura seca; LTB = comprimento da vassoura terminal; NAB = número de vassouras axilares > 1 cm. A análise de variância foi feita utilizando o programa Sisvar versão 5.6. Progênies de 51 plantas matrizes e um controle (resistente) foram avaliadas, totalizando 52 tratamentos.

3. RESULTADOS

As análises em casa de vegetação possibilitaram constatar a presença e ausência de sintomas da doença em progênies de cacau comum da Bahia (Figura 1). O sintoma mais frequente foi a ocorrência de vassoura terminal (Figura 1B). A vassoura seca em mudas de cacau foi raramente encontrada nesta avaliação (Figura 1C).

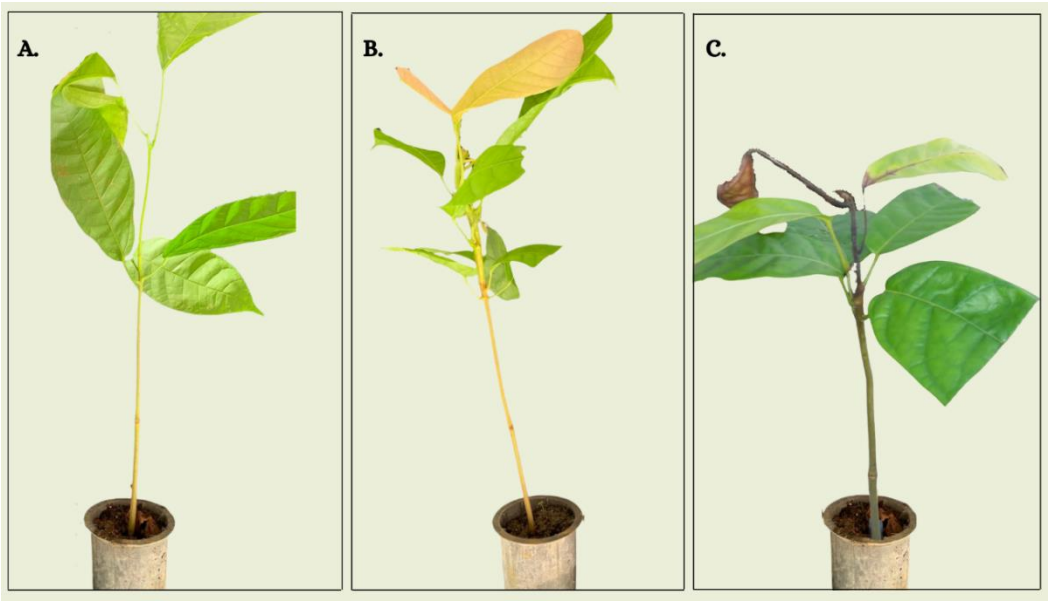

Figura 2: Comparação de progênies de cacau inoculadas com *M. perniciosa*. (A) Planta assintomática, (B) Planta com vassoura terminal, (C) Planta com vassoura seca.

Com base no índice de doença foram constatadas diferenças significativas entre os 52 genótipos de cacau comum avaliados no presente trabalho (Tabela 2).

Tabela 2: Análise de variância do índice de doença (ID) para vassoura de bruxa de variedades locais de cacau e do clone 7004, considerado controle mediamente resistente.

Fonte de variação	g.l.	SQ	F
Genótipo	51	915,61	0,0000*
Erro	2756	4593,68	
Total corrigido	2807	5509,29	
Média Geral do ID	2,03		
CV (%)	63,47		

g.l. – grau de liberdade; SQ – soma de quadrados.

*significativo, indicando que há pelo menos um genótipo cuja média difere das médias dos demais genótipos.

O teste de Scott-Knott, possibilitou a distinção dos genótipos formando dois diferentes grupos de resistência à vassoura de bruxa e dois grupos de suscetibilidade, o que indica a existência de diferentes níveis de resistência. O índice de doença variou de 0,97 a 11,48 e a maioria das plantas apresentou de baixo a moderado índice de doença (54,2%), sendo 25% tipicamente resistentes e 29,2% moderadamente resistentes.

Progênies provenientes de polinização aberta do clone TSH 1188 (7004) apresentaram ID de 3,36 (Tabela 3). Este clone tem sido considerado nova referência de resistência à vassoura de bruxa e suas progênies obtidas em plantios com plantas suscetíveis podem apresentar resistência alta a moderada.

Ao comparar os genótipos classificados como tipicamente resistentes com as médias do genótipo controle (7004), foi possível observar genótipos que apresentam um índice de doença inferior ao do padrão de resistência, indicando potencial de uso para seleção e geração de novos cultivares resistentes à vassoura de bruxa (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação individual entre os valores médios do índice de doença da vassoura de bruxa (ID) de 52 genótipos de variedades locais de cacau e do controle mediamente resistente inoculados com *Moniliophthora perniciosa*, pelo teste Skott-Knott.

Genótipo	ID
2059	11,48 [A]
2030	10,19 [A]
2096	10,19 [A]
2041	10,04 [A]
2020	9,85 [A]
2047	8,73 [B]
2046	8,60 [B]
2027	8,49 [B]
2021	8,31[B]
2076	8,04 [B]
2023	7,98 [B]
2003	7,86 [B]
2002	7,84 [B]
2009	7,72 [B]
20811	7,27 [B]
2079	7,08 [B]
2024	7,04 [B]
2048	6,92 [B]
2013	6,71 [B]
2025	6,47 [B]

2006	6,38 [B]
2055	6,18 [B]
2083	5,92 [B]
2050	5,70 [C]
2017	5,67 [C]
2054	5,55 [C]
2031	5,51 [C]
20911	5,51 [C]
2056	5,47 [C]
20301	5,14 [C]
2091	5,01 [C]
2072	4,89 [C]
2052	4,85 [C]
2078	4,11 [C]
2008	4,10 [C]
2058	4,07 [C]
2087	3,89 [C]
2074	3,75 [C]
2071	3,70 [C]
2089	3,42 [D]
7004	3,36 [D]
2084	2,88 [D]
2016	2,53 [D]
2051	2,50 [D]
2011	2,49 [D]
20161	2,26 [D]
2037	1,91 [D]
2028	1,77 [D]
2080	1,76 [D]
2065	1,66 [D]
2053	1,39 [D]
2090	0,97 [D]

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%

4. DISCUSSÃO

A avaliação de progênies inoculadas com *M. perniciosa* em casa de vegetação possibilitou constatar os sintomas causados pelo fungo em mudas jovens. Estes sintomas estão associados as fases de desenvolvimento do fungo. Assim, o mais frequente foi a presença de vassoura verde terminal, que é o sintoma inicial associado à fase biotrófica do patógeno. A vassoura seca está associada à fase necrotrófica do fungo, que geralmente inicia dois meses após a infecção, sendo mais evidente em períodos superiores a 60 dias (MEINHARDT et al., 2008). Para estudos de níveis de resistência, a avaliação de sintomas no período biotrófico da doença e adoção do ID utilizado no presente trabalho vêm sendo usado em diferentes estudos como adequado para seleção de plantas (MARSSARO et al., 2020; RODRIGUES et al., 2019; PIMENTA NETO at al., 2018).

As análises estatísticas indicaram variabilidade na resistência à vassoura de bruxa na população de cacau avaliada. Treze genótipos mostraram-se altamente promissores, apresentando índice de doença numericamente inferiores ao controle resistente (7004), ficando juntamente com este no grupo D (Tabela 3) que é composto por aqueles que obtiveram os menores índices de doença, podendo ser considerados resistentes. Estes dados indicam o uso potencial destes genótipos em programas de melhoramento, sobretudo visando a diversificação das fontes de resistência. Resultados semelhantes foram obtidos anteriormente por Marssaro et al. (2020) ao realizar avaliações de genótipos de outra fazenda de cacau comum do sul da Bahia, onde foram encontrados 28 genótipos com resistência alta a moderada, dentre os 96 avaliados, evidenciando a importância de proceder seleções em fazendas.

A exploração de genótipos de fazendas locais pode trazer ganhos para os programas de melhoramento. Estudos anteriores indicam também elevada diversidade genética nas seleções de fazendas (LEAL, et al., 2008).

5. CONCLUSÃO

A população de plantio comercial de cacau analisada apresenta genótipos resistentes a vassoura de bruxa promissores para melhoramento genético. Assim, as seleções nestas populações podem favorecer a identificação de cultivares diferentes dos tradicionalmente utilizados em programas de melhoramento.

REFERÊNCIAS

AFOAKWA, E.O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. Flavor Formation and Character in Cocoa and Chocolate. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.48, p.840-857, 2008.

DICKSTEIN, E.R.; PURDY, L.H.; FRIAS, G.A. *Crinipellis perniciosa*, the cacao witches' broom fungus: Inoculum production and storage. **Phytopathology,** v.77, p.1747, 1987.

FRIAS, G.A.; PURDY, L. H. E.; SCHMIDT, R. A. An inoculation method for evaluating resistance of cacao to *Crinipellis perniciosa*. **Plant Disease**, v.79, p.787-791, 1995.

GRAMACHO, K. P.; LUZ, E. D. M. N.; SILVA, F. S.; LOPES, U. V.; PIRES, J. L.; PEREIRA, L. Pathogenic variability of *Moniliophthora perniciosa* in three agroecological zones of the cacao region of Bahia, Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v.16, n.1, p.7-13, 2016.

LEAL, J.B.; SANTOS, L.M.; SANTOS, C.A.P.; PIRES, J.L.; AHNERT, D.; CORRÊA, R.X. Diversidade genética entre acessos de cacau de fazendas e de banco de germoplasma na Bahia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.43, p.851-858, 2008.

LISBOA, D.O.; EVANS, H. C.; ARAÚJO, J. P. M.; ELIAS, S. G.; BARRETO, R. W. *Moniliophthora perniciosa*, the mushroom causing witches' broom disease of cacao: Insights into its taxonomy, ecology and host range in Brazil. **Fungal Biology**. v.124, p.983-1003, 2020.

LOPES, U. V.; MONTEIRO, W. R.; PIRES, J. L.; CLEMENT, D.; YAMADA, M. M.; GRAMACHO, K. P. Cacao breeding in Bahia, Brazil - strategies and results. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v.11, p.73-81, 2011.

MARELLI, J. P.; GUEST, D.I.; BAILEY, B.A.; EVANS, H.C.; BROWN, J.K.; JUNAID, M.; BARRETO, R.W.; LISBOA, D.O.; PUIG, A.S. Chocolate Under Threat from Old and New Cacao Diseases. **Phytopathology.** v.109, p.1331-1343, 2019.

MARSSARO, A. L.; MONTEJO-DÍAZ, A.; MONTAÑO-ORELLANA, V. M.; LUZ, E. D. M. N.; CORRÊA, R. X. Resistance to witches' broom in adult plants and progeny of local varieties of cacao in Southern Bahia. **Bragantia**. v.79, n.4, p.421-432.

MEINHARDT, L.W.; RINCONES, J.; BAILEY, B.A.; AIME, M.C.; GRIFFITH, G.W.; ZHANG, D.; PEREIRA, G.A.G. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches'

broom disease of cacao: What's new from this old foe? **Molecular Plant Pathology**, v.9, p.577-588, 2008.

PIMENTA NETO, A. A.; LARANJEIRA, D.; PIRES, J. L.; LUZ, E. D. M. N. Selection of cocoa progenies for resistance to witches' broom. **Tropical Plant Pathology**, v.43, n.5, p. 381-388, 2018.

RODRIGUES, G. S.; PIRES, J. L.; LUZ, E. D. M. N. Índice de severidade da vassoura-de-bruxa para avaliar genótipos de cacaueiro inoculados artificialmente. **Revista Agrotrópica**. v.31, p.255-258, 2019.

SANTOS, A. A. **Variabilidade morfoagronômica e resistência a doenças em variedades locais de cacau no sul da Bahia.** Tese (Doutorado em Produção Vegetal)- Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus, p.100, 2019.

SILVA, S. D. V. M.; LUZ, E. D. M. N.; PIRES, J. L.; YAMADA, M. M.; SANTOS FILHO, L. P. Parent selection for cocoa resistance to witches'broom. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.680-685, 2010.

SURUJDEO-MAHARAJ, S.; UMAHARAN, P.; BUTLER, D.R. Assessment of resistance to witches'-broom disease in clonal and segregating populations of *Theobroma cacao*. **Plant Disease.** v.88, p.787-803, 2004.

TEIXEIRA, P. J. P. L.; THOMAZELLA, D. P. DE T.; PEREIRA, G. A. G. Time for Chocolate: Current Understanding and New Perspectives on Cacao Witches' Broom Disease Research. **PLoS Pathogens.** v.11, n.10, p.1-8, 2015.

WESSEL, M.; QUIST-WESSEL, P. M. F. Cocoa Production in West Africa, A Review and Analysis of Recent Developments. **NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences.** v.74, p.1-7, 2015.

YAMADA, M.M.; FALEIRO, F.G.; FLORES, A.B.; LOPES, U.V.; PIRES, J.L.; CORRÊA, R.X.; SANTOS, R.F. Microsatellite diversity and heterozygosity of parents of a cocoa breeding population. **Crop Breeding and Applied Biotechnology,** v.9, p.17-22, 2009.

CONCLUSÃO GERAL

A revisão sistemática é uma ferramenta eficaz para analisar os estudos prévios sobre resistência do cacaueiro à vassoura de bruxa, reunindo dados de diferentes estudos acerca dos principais avanços na busca por resistência à vassoura de bruxa no cacaueiro. Além disso, possibilita gerar compilações de dados importantes sobre diversidade genética, QTLs e genes associados a resistência para esta doença, revelando a necessidade de uma maior exploração das variadas fontes de resistência existentes, bem como, proceder estudos para melhor compreensão dos mecanismos de resistência a vassoura de bruxa.

A população de plantio comercial de cacau comum da Bahia analisada, revelou grande variação em relação a resistência à vassoura de bruxa, evidenciando a viabilidade de se proceder seleções de genótipos nesse plantio visando a diversificação das fontes de resistência.

REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

ABTAHI, M.; FAKHRI, Y.; OLIVERI, C. G.; KERAMATI, H.; ZANDSALIMI, Y.; BAHMANI, Z.; HOSSEINI, P. R.; SARKHOSH, M.; MORADI, B.; AMANIDAZ, N.; GHASEMI, S.M. Heavy metals (As, Cr, Pb, Cd and Ni) concentrations in rice (*Oryza sativa*) from Iran and associated risk assessment: a systematic review. **Toxin Reviews.** v. 36, p. 331-34, 2017.

AFOAKWA, E.O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. Flavor Formation and Character in Cocoa and Chocolate. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.48, p.840-857, 2008.

AIKPOKPODION, P.E.; LAJIDE, L.; AIYESANMI, A.F. Heavy metals contamination in fungicide treated cocoa plantations in Cross River State, Nigeria, Am.-Eurasian. **Journal of Agriculture and Environmental Sciences**. v.8, p.268-274, 2010.

AIME, M.C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v.97, p.1012-1022, 2005.

ALBUQUERQUE, P. S. B.; SILVA, S. D. V. M.; LUZ, E. D. M. N.; PIRES, J. L.; VIEIRA, A. M. C.; DEMÉTRIO, C. G. B.; FIGUEIRA, A. Novel sources of witches' broom resistance (causal agent *Moniliophthora perniciosa*) from natural populations of *Theobroma cacao* from the Brazilian Amazon. **Euphytica**, v.172, n.1, p.125-138, 2010.

ALEXANDER, P. A. Methodological Guidance Paper: The Art and Science of Quality Systematic Reviews. **Review of Educational Research.** v. 90, n.1, p. 6-23, 2020.

ALMEIDA, C. M. V. C.; DIAS, L. A. S.; SILVA, A. P. Caracterização agronômica de acessos de cacau. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**.v.44, n.4, p.368-373, 2009.

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.

ARABZAI, M. G.; GUL, H. Application Techniques of Molecular Marker and Achievement of Marker Assisted Selection (MAS) in Three Major Crops Rice, Wheat and Maize. **International Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology**. v.8, p.82-93, 2021.

ARROYAVE, W.D.; MEHTA, S.S.; GUHA, N.; GUHA, N.; SCHWINGL, P.; TAYLOR, K. W.; GLENN, B.; RADKE, E. G.; VILAHUR, N.; CARREÓN, T.; NACHMAN, R. M.; LUNN, R. M. Challenges and recommendations on the conduct of systematic reviews of observational epidemiologic studies in environmental and occupational health. **Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology**. v.31, p.21-30, 2021.

ASCRIZZI, R.; FLAMINI, G.; TESSIERI, C.; PISTELLI, L. From the raw seed to chocolate: volatile profile of blanco de Criollo in different phases of the processing chain **Microchemical Journal**, v.133, p. 474-479, 2017.

BARRERA-REYES, P.K.; DE LARA, J.C.F.; GONZÁLEZ-SOTO, M.; TEJERO, M. E. Effects of Cocoa-Derived Polyphenols on Cognitive Function in Humans. Systematic Review and Analysis of Methodological Aspects. **Plant Foods for Human Nutrition.** v.75, p.1-11, 2020.

BEKELE, F.L.; BEKELE, I.; BUTLER, D.R.; BIDAISEE, G.G. Patterns of morphological variation in a sample of cacao (*Theobroma cacao* L.) germplasm from the International Cocoa Genebank, Trinidad. **Genetic Resources and Crop Evolution.** v.53, p.933-948, 2006.

BELSKY, J.M.; SEIBERT, S. Cultivating cacao: implications of sun-grown cacao on local food security and environmental sustainability. **Agriculture and Human Values,** v.20, p.277-285, 2003.

BENNETT, A.B. Out of the Amazon: *Theobroma cacao* enters the genomic era. **Trends in Plant Science**, v.8, p.561-563, 2003.

BOZA, E.J.; IRLANDÊS, B.M.; MEEROW, A.W.; TONDO, C.L.; RODRÍGUEZ, O.A.; VENTURA-LÓPEZ, M.; GÓMEZ, J.A.; MOORE, J.M.; ZHANG, D.P.; MOTAMAYOR, J.C.; SCHNELL, R.J. Genetic Diversity, Conservation, and Utilization of *Theobroma cacao* L.:

Genetic Resources in the Dominican Republic. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.60, p.609 -615, 2012.

BRESEGHELLO, F. Traditional and modern plant breeding methods with examples in rice (Oryza sativa L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p.8277-8286, 2013.

CALDAS, M.M; PERZ S. “Agro-terrorism? The causes and consequences of the appearance of witch’s broom disease in cocoa plantations of southern Bahia, Brazil". **Geoforum**. v.47, p.147-157, 2013.

CILAS, C.; BASTIDE, P. Challenges to Cocoa Production in the Face of Climate Change and the Spread of Pests and Diseases. **Agronomy**. v.10, n.9, p.1-8, 2020

COLLARD, B.C.Y.; JAHUFER, M.Z.Z.; BROUWER, J.B.; PANG, E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. **Euphytica,** v.142, p.169-196, 2005.

COSTA, J.C.B.; RESENDE, M.L.V.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; CAMILO, F.R.; MONTEIRO, A.C.A.; PEREIRA, R.B. Indução de resistência em mudas de cacaueiro contra *Moniliophthora perniciosa* por produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 285-294, 2010.

DA HORA JUNIOR, B. T.; POLONI, J. D. F.; LOPES, M. A.; DIAS, C. V.; GRAMACHO, K. P.; SCHUSTER, I.; MICHELI, F. Transcriptomics and systems biology analysis in identification of specific pathways involved in cacao resistance and susceptibility to witches’ broom disease. **Molecular BioSystems**. v.8, n.5, 1507-1519, 2012.

DANTAS NETO, A.; CORRÊA, R.X.; MONTEIRO, W.R.; LUZ, E.; GRAMACHO, K.P.; LOPES, U.V. Caracterização de uma população de cacaueiro para mapeamento de genes de resistência à vassoura-de-bruxa e podridão parda. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 380-386, 2005.

DAVIES, L.R.; ALLENDER, C.J. Who is sowing our seeds? A systematic review of the use of plant genetic resources in research. **Genet Resour Crop Evol,** v. 64, p. 1999-2008, 2017.

DESCH, S.; SCHMIDT, J.; KOBLER, D.; SONNABEND, M.; EITEL, I.; SAREBAN, M.; KAZEM, R.; SCHULER, G.; THIELE, H. Effect of Cocoa Products on Blood Pressure: Systematic Review and Meta-Analysis. **American Journal of Hypertension**. v. 23, n.1, p.97-103, 2010.

EVANS, H. C.; STALPERS, J. A.; SAMPSON, R. A.; E BENNY, G. L. On the taxonomy of *Monilia roreri,* an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. **Canadian Journal of Botany**. v.56, p.2528-2532, 1978.

EVANS, H.C. Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society,** v.74, p.515-526, 1980.

FALEIRO, A.S.G.; FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; MELO, G.R.P.; MONTEIRO, W.R.; YAMADA, M.M.; BAHIA, R.C.; CORRÊA, R.X. Genetic diversity of cacao accessions selected for resistance to witches' broom based on RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.4, p.290-297, 2004.

FALEIRO, F.G.; QUEIROZ, V.T.; LOPES, U.V.; GUIMARÃES, C.T.; PIRES, J.L.; YAMADA, M.M.; ARAÚJO, I.S.; PEREIRA, M.G.; SCHNELL, R.; SOUZA FILHO, G.A.; FERREIRA, C.F.; BARROS E.G.; MOREIRA MA. Mapping QTLs for witches' broom (*Crinipellis perniciosa*) resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). **Euphytica**, v.149, p. 227-235, 2006.

FALEIRO, A. S. G.; FALEIRO, F.; LOPES, U. V.; MELO, G. R. P.; MONTEIRO, W. R.; YAMADA, M. M.; BAHIA, R. C. S.; CORRÊA, R. X. Variabilility in cacao selected by producers for resistance to witchwa' broom based on microsatellite markes. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v., p.290-297, 2004.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; MORRIS, L. Goldsbrough P. Re-examining the classification of *Theobroma cacao* L. using molecular markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.119, p.1073-1082, 1994.

FIGUEIRA, A.; PAULO, S.; ALBUQUERQUE, B.; GILDEMBERG, A.; LEAL-Jr, G. Genetic mapping and differential gene expression of Brazilian alternative resistance sources to witches' broom (causal agent *Crinipellis perniciosa*). 15th International Cocoa Research Conference, 2006.

FRANZEN, M.; MULDER, B. M. Ecological, economic and social perspectives on cocoa production worldwide. **Biodiversity and Conservation,** v.16, p.3835–3849, 2007.

FULTON, R. H. The cacao disease trilogy: black pod, monilia pod rot, and witches'-broom. **Plant Disease**. v.73, p.601-603, 1989.

GOVINDARAJ, M.; VETRIVENTHAN, M.; SRINIVASAN, M. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: An overview of its analytical perspectives. **Genetics Research International**, v.2015, p.431-487, 2015.

GRAMACHO, K. P.; LUZ, E. D. M. N.; SILVA, F. S.; LOPES, U. V.; PIRES, J. L.; PEREIRA, L. Pathogenic variability of *Moniliophthora perniciosa* in three agroecological zones of the cacao region of Bahia, Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v.16, n.1, p.7-13, 2016.

GRIFFITH, G.W.; HEDGER, J.N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cacao, *Crinipellis perniciosa*. **Heredity**. v.72, p.278-289, 1994.

HAARHOFF, S. J.; SWANEPOEL, P. A. Plant population and maize grain yield: A global systematic review of rainfed trials. **Crop Science**, v. 58, p. 1819-1829, 2018.

HADDAWAY, N.R.; WOODCOCK, P.; MACURA, B.; COLLINS, A. Making literature reviews more reliable through application of lessons from systematic reviews. **Conservation Biology**. v.29, n.6, p.1596-1605, 2015.

ICCO- International Cocoa Organization. (2020). Production of Cocoa Beans. Disponível em: https://www.icco.org/, Acesso em: 30 nov. 2020.

KORETZ, R.L.; LIPMAN, T.O. Understanding systematic reviews and meta-analyses. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition** v.41, p. 316-323, 2016.

KUHN, D.N., LIVINGSTONE, D., MAIN, D.; ZHENG, P.; SASKI, F.; FELTUS, F.A.; MOCKAITIS, K.; FARMER, A.D.; MAY, G.D.; SCHNELL, R.J.; MOTAMAYOR, J.C. Identification and mapping of conserved ortholog set (COS) II sequences of cacao and their conversion to SNP markers for marker-assisted selection in *Theobroma cacao* and comparative genomics studies. **Tree Genetics & Genomes,** v.8, p.97-111, 2012.

LANAUD, C.; RISTERUCCI, A. M.; N'GORAN, J. A. K.; CLEMENT, D.; FLAMENT, M. H.; LAURENT, V.; FALQUE, M. A genetic linkage map of *Theobroma cacao* L.. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, n 6-7, p.987-993, 1995.

LAURENT, V.; RISTERUCCI, A.M.; LANAUD, C. Chloroplast and mitochondrial DNA diversity in *Theobroma cacao*. **Theor Appl Genet**, v.87, p.81-88, 1993.

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

LEAL JÚNIOR, G. A.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; FIGUEIRA, A. Genes differentially expressed in *Theobroma cacao* associated with resistance to witches' broom disease caused by *Crinipellis perniciosa*. **Molecular Plant Pathology**. v.8,n.3, p.279-292, 2007.

LEAL, J.B.; SANTOS, L.M.; SANTOS, C.A.P.; PIRES, J.L.; AHNERT, D.; CORRÊA, R.X. Diversidade genética entre acessos de cacau de fazendas e de banco de germoplasma na Bahia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.43, p.851-858, 2008.

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, p.127-135, 2013.

LINDE, K.; WILLICH, S.N. How objective are systematic reviews? Differences between reviews on complementary medicine. **Journal of the Royal Society of Medicine**. v.96, p.17-22, 2003.

LINDO, A. A.; ROBINSON, D. E.; TENNANT, P. F.; MEINHARDT, L. W.; ZHANG, D. Molecular Characterization of Cacao (*Theobroma cacao*) Germplasm from Jamaica Using Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Markers. **Tropical Plant Biology**, v.11, p.93-106, 2018.

LINS, A.B.; LAWINSCKY, P.R.; BARBOSA, A.M.M.; GAIOTTO, F.A.; CORREA, R.X. Molecular genetic diversity in a core of cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones with potential for selection of disease resistance, plant height and fruit production. **African Journal of Biotechnology**, v.15, p.2517-2523, 2016.

LOPES, U. V.; MONTEIRO, W. R.; PIRES, J. L.; CLEMENT, D.; YAMADA, M. M.; GRAMACHO, K. P. Cacao breeding in Bahia, Brazil - strategies and results. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v.11, p.73-81, 2011.

LOPES, U.V.; MONTEIRO, W.R.; PIRES, J.L.; ROCHA, J.B.; PINTO, L.R.M. On farm selection for witches' broom resistance in Bahia, Brazil: a historical retrospective. **Agrotrópica**, v.16, p.61-66, 2004.

MACKAY, I. J.; COCKRAM, J.; HOWELL, P.; POWELL, W. Understanding the classics: the

unifying concepts of transgressive segregation, inbreeding depression and heterosis and their central relevance for crop breeding. **Plant Biotechnology Journal**, v.19, n.1, p.26-34, 2021.

MARIUS, W.; QUIST-WESSEL FOLUKE, P.M. Cocoa production in West Africa, a review and analysis of recent developments. **NJAS–Wageningen Journal of Life Sciences**. v.74-75, p.1-7, 2015.

MARSSARO, A. L.; MONTEJO-DÍAZ, A.; MONTAÑO-ORELLANA, V. M.; LUZ, E. D. M. N.; CORRÊA, R. X. Resistance to witches' broom in adult plants and progeny of local varieties of cacao in Southern Bahia. **Bragantia**. v.79, n.4, p.421-432.

MEINHARDT, L.W.; RINCONES, J.; BAILEY, B.A.; AIME, M.C.; GRIFFITH, G.W.; ZHANG, D.; PEREIRA, G.A.G. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: What's new from this old foe? **Molecular Plant Pathology**, v.9, p.577-588, 2008.

MOTAMAYOR, J.C.; LACHENAUD, P.; MOTA, J.W.S.; 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**. p 1-8, 2008.

MOTAMAYOR, J.C.; RISTERUCCI, A.M.; HEATH, M.; LANAUD, C. Cacao domestication II: progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. **Heredity**. V.91, p.322-330, 2003.

MOTAMAYOR, J.C.; RISTERUCCI, A.M.; LOPEZ, P.A.; ORTIZ, C.F.; MORENO, A.; LANAUD, C. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity**. v.89, p.380-386, 2002.

MOTILAL, L.; BUTLER, D. Verification of identities in global cacao germplasm collections. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.50, p.799-807, 2003.

MOTILAL, L.; ZHANG, D.; UMAHARAN, P.; BOCCARA, M.; MISCHKE, S.; SANKAR, A.; MEINHARDT, L. Elucidation of genetic identity and population structure of cacao germplasm within an international cacao genebank. **Plant Genetic Resources**, v.10, p.232-241, 2012.

OFORI, A.; ARTHUR, A.; PADI, F.K. Extending the cacao (*Theobroma cacao* L.) gene pool with underrepresented genotypes: growth and yield traits. **Tree Genetics & Genomes**, v.15, p.75-88, 2019.

PADI, F. K.; OFORI, A.; TAKRAMA, J.; DJAN, E.; OPOKU, S. Y.; DADZIE, A. M.; BHATTACHARJEE, R.; MOTAMAYOR, J. C.; ZHANG, D. The impact of SNP fingerprinting and parentage analysis on the effectiveness of variety recommendations in cacao. **Tree Genetics & Genomes,** v.11, p.1-14, 2015.

PEREIRA, A.S., ALMEIDA, A.-A.F., SILVA BRANCO, M.C., COSTA, M.G.C.; AHNERT, D. Combining ability, heritability and genotypic relations of different physiological traits in cacao hybrids. **PLoS ONE**, v.12, e0178790, 2017.

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

PERFECT, S.E.; GREEN, J.R. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. **Molecular Plant Pathology**, v.2, p.101-108, 2001.

PLOETZ, R.C. Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide. **Phytopathology**, v.97, p.1634-1639, 2007.

POUND, F. J. Cocoa and witches' broom disease: report on a recent visit to the Amazon territory of Peru. The archives of cocoa research, volume 1, H. Toxopeus ed. ACRI-IOCC, London, United Kingdom, 1943.

PURDY, L.H; SCHMIDT, R.A. Witches' broom: biology, epidemiology and management. **Annu. Rev. Phytopathol**. v.34 , p.573-594, 1996.

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

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

RAMANATHA RAO, V.; HODGKIN, T. Diversidade genética e conservação e utilização de recursos genéticos de plantas. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** v.68, p.1-19, 2002.

RISTERUCCI, A. M.; GRIVET, L.; N'GORAN, J. A. K.; PIERETTI, I.; FLAMENT, M. H.; LANAUD, C. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L.. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, n.6, p.948-955, 2000.

ROYAERT, S.; JANSEN, J.; DA SILVA, D.V.; DE JESUS BRANCO, S.M.; LIVINGSTONE, D.S.; MUSTIGA, G. MARELLI, J.P.; ARAÚJO, I.S.; CORRÊA, R.X.; MOTAMAYOR, J.C. Identification of candidate genes involved in Witches' broom disease resistance in a segregating mapping population of *Theobroma cacao* L. in Brazil. **BMC Genomics**, v.17, p.1-16, 2016.

SANTOS, A. S.; AMORIM, E. P.; FERREIRA, C. F.; PIROVANI, C. P. Water stress in *Musa* spp: A systematic review. **PLoS ONE**. v.13, e0208052., 2018.

SANTOS, E.S.; CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; MORI, G.M.; AHNERT, D.; MELLO, D.L.; PIRES, J.L.; CORRÊA, R.X.; SOUZA, A.P. Genetic structure and molecular diversity of cacao plants established as local varieties for more than two centuries: the genetic history of cacao plantations in Bahia, Brazil. **PLoS ONE**, v.10, p.0145276, 2015.

SANTOS, F. F. J.; LOPES, U. V.; PIRES, J. L.; MELO, G. R. P.; GRAMACHO, K. P.; CLEMÉNT, D. QTLs detection under natural infection of *Moniliophtora perniciosa* in a cacao F2 progeny with SCAVINA-6 descendants. **Agrotropica**, v.26, p.65-72, 2014.

SAUNDERS, J. A.; MISCHKE, S.; LEAMY, E. A.; HEMEIDA, A. A. Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p.41-47, 2004.

SERENO, M. L.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; VENCOVSKY, R.; FIGUEIRA, A. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. **Conservation Genetics**, v.7, n.1, p.13-24, 2006.

SERENO, M.L.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; VENCOVSKY, R.; FIGUEIRA, A. Genetic Diversity and Natural Population Structure of Cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon Evaluated by Microsatellite Markers. **Conservation Genetics** v.7, p.13-24, 2006.

SILVA, D.V.; ARAÚJO, I.S.; BRANCO, S.M.J.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; LOPES, U.V.; MARELLI, J.P.; MOTAMAYOR, J.C.; ROYAERT, S.; REBOUÇAS, R.C.; CORRÊA, R.X. Analysis of resistance to witches' broom disease (*Moniliophthora perniciosa*) in flower cushions of *Theobroma cacao* in a segregating population. **Plant Pathology**, v.63, p.1264-1271, 2014.

SILVA, S. D. V. M.; LUZ, E. D. M. N.; PIRES, J. L.; YAMADA, M. M.; SANTOS FILHO, L. P. Parent selection for cocoa resistance to witches'broom. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.680-685, 2010.

SILVA, S. D. V. M.; LUZ, E. D. M. N.; PIRES, J. L.; YAMADA, M. M.; SANTOS FILHO, L. P. Parent selection for cocoa resistance to witches'-broom. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.45, n.7, p.680-685, 2010.

SOBERANIS, W.; RÍOS, R.; ARÉVALO, E.; ZÚNIGA, L.; CABEZAS, O.; KRAUSS, U. Increased frequency of phytosanitary pod removal in cacao (*Theobroma cacao*) increases yield economically in eastern Peru. **Crop Protect**, v.18, p.677– 685, 1999.

TAHI, G.M.; KÉBÉ, B.I.; N'GORAN, J.A.K.; SANGARÉ, A.; MONDEIL, F.; CILAS, C.; ESKES, A.B. Expected selection efficiency for resistance to cacao pod rot (*Phytophthora palmivora*) comparing leaf disc inoculations with field observations. **Euphytica**, v.149, p.35-44, 2006.

TANKLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v.27, p.205-233, 1993.

TEIXEIRA, P.J.P.L; THOMAZELLA, D.P.T; REIS O.; PRADO. P.F.V.; RIO. M.C.S.; FIORIN. G.L.; JOSÉ. J.; COSTA. G.G.L.; NEGRI. V.A.; MONDEGO. J.M.C.; MIECZKOWSKI. P.; PEREIRA. G.A.G. High-Resolution Transcript Profiling of the Atypical Biotrophic Interaction between *Theobroma cacao* and the Fungal Pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **The Plant Cell**, v.26, p.4245-4269, 2014.

TEIXEIRA, P. J. P. L.; THOMAZELLA, D. P. DE T.; PEREIRA, G. A. G. Time for Chocolate: Current Understanding and New Perspectives on Cacao Witches' Broom Disease Research. **PLoS Pathogens.** v.*11*, n.10, p.1-8, 2015.

THOMAS, E.; VAN ZONNEVELD, M.; LOO, J.; HODGKIN, T.; GALLUZZI, G.; VAN ETTEN, J. Present Spatial Diversity Patterns of Theobroma cacao L. in the Neotropics Reflect Genetic Differentiation in Pleistocene Refugia Followed by Human-Influenced Dispersal. **PLoS ONE** v.7, e47676, 2012.

TIRADO-GALLEGO, P. A.; LOPERA-ÁLVAREZ, A.; RÍOS-OSORIO, L. A. Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao* L.: Revisión sistemática. **Corpoica Ciencia y Tecnologia Agropecuaria**, v. 17, p. 417-430, 2016.

WARREN, J.M. Isozyme variation in a number of populations of *Theobroma cacao* L. obtained through various sampling regimes. **Euphytica**, v.72: p.121-126, 1994.

WENT, F.A.F.C. Krullonten em Verstendevruchten van cacao in Suriname Verch. **K Akad**, v.10, p.1-40, 1904.

Westgate, M.J., Lindenmayer, D.B. The difficulties of systematic reviews: Systematic Review. **Conservation Biology,** v.31, p.1002-1007, 2017.

WEVER, J.; EVERAERT, H.; COPPIETERS, F.; ROTTIERS, H.; DEWETTINCK, K.; LEFEVER, S; MESSENS, K. The development of a novel SNP genotyping assay to differentiate cacao clones. **Scientific Reports**, v.9, p.9512, 2019.

WICKRAMASURIYA, A.M.; DUNWELL, J.M. Cacao biotechnology: current status and future prospects. **Plant Biotechnology Journal**, v.16, p.4-17, 2018.

YAMADA, M.M.; FALEIRO, F.G.; FLORES, A.B.; LOPES, U.V.; PIRES, J.L.; CORRÊA, R.X.; SANTOS, R.F. Microsatellite diversity and heterozygosity of parents of a cocoa breeding population. **Crop Breeding and Applied Biotechnology,** v.9, p.17-22, 2009.

YAMADA, M.M.; FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; BAHIA, R.C.; PIRES, J.L.; GOMES, L.M.C.; MELO, G.R.P. Genetic variability in cultivated cacao populations in Bahia, Brazil, detected by isozymes and RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.1, p.377-384, 2001.

YAMADA, M.M.; PIRES, J.L.; FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; MACEDO, M.M. Agronomic performance of 27 cocoa progenies and plant selection based on productivity, self-compatibility and disease resistance. **Revista Ceres**, v.60, p.514-518, 2013.

YANG, J.Y.; MOIRA, S.; MOTILAL, L.A.; SVEINSSON, S.; ENGELS, J.M.M.; KANE, N.C.; DEMPEWOLF, H.; ZHANG, D.; MAHARAJ, K.; CRONK, Q.C.B. Complex origin of Trinitario-type *Theobroma cacao* (Malvaceae) from Trinidad and Tobago revealed using plastid genomics. **Tree Genet Genomes**. v.9, p.829-840, 2013.

ZHANG, D.; MOTILAL, L. ORIGIN, Dispersal, and Current Global Distribution of Cacao Genetic Diversity. *In*: BAILEY, B.; MEINHARDT, L. **Cacao Diseases**. Springer, 2016, p. 3-31. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-24789-2_1, Acesso em: 23 nov. 2020.