



Elaboração e validação de diagramas de área padrão (DAP) para avaliação da severidade da monilíase (*Moniliophthora roreri* H.C. Evans) em cacauero (*Theobroma cacao* L.). Elaboration and validation of standard area diagram (SAD) to assess the frosty pod severity (*Moniliophthora roreri* H.C. Evans) of the cacao (*Theobroma cacao* L.).

[Pablo Israel Álvarez-Romero](#)^{1*}, [Hilter Farley Figueroa Saavedra](#)¹, [Fabian Miguel Carrillo Riofrío](#)¹, [Juan Gabriel Chipantiza Masabanda](#)¹, [Ana Francisca Tiburcia Amorim Ferreira e Ferreira](#)²

¹- Escuela Superior Politécnica de Chimborazo - ESPOCH, Riobamba - CH, Ecuador. Panamericana Sur km 1 1/2, Riobamba - Ecuador. CEP: EC060155

²- Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical, Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus - AM, Brasil.

*Autor para correspondência: E-mail: pabloi.alvarez@epoch.edu.ec

Resumo

A monilíase do cacauero é uma das principais doenças que afetam o cacauero no Equador. Considerando a falta de métodos padronizados para quantificar esta doença nos frutos, o objetivo deste estudo foi desenvolver um diagrama para quantificar a severidade da monilíase do cacauero. Para padronizar a avaliação, desenvolvemos um conjunto de diagramas de área padrão com dez imagens. Para validar o diagrama, trinta avaliadores estimaram a severidade de 42 imagens de frutos digitalizados em diferentes níveis de severidade. O diagrama proposto proporcionou bons níveis de acurácia e precisão, constituindo-se em uma ferramenta útil em estudos epidemiológicos e para o desenvolvimento de estratégias de controle da monilíase do cacauero como o melhoramento genético vegetal.

Palavras-chave: Fitopatometria. Melhoramento vegetal. Fenotipagem. Quantificação. Doença de plantas.

Abstract

The frosty pod of cacao is one of the major diseases affecting cacao in Ecuador. Considering the lack of standardized methods to quantify this disease on fruits, the aim of this study was to develop a standard area diagram to quantify the severity of the cacao frosty pod. To standardize the assessment, we developed one set of standard area diagrams with ten images. To validate the diagram, thirty raters estimated the severity of 42 scanned fruit images at different severity levels. The proposed diagram provided good levels of accuracy and precision, constituting thus a useful tool in epidemiological studies and for the development of strategies to control the cacao frosty pod as the plant breeding.

Keywords: Phytopathometry. Plant breeding. Phenotyping. Quantification. Plant diseases.

Introdução

O gênero *Theobroma* é um dos mais importantes da família Malvaceae, devido à relevância econômica do cacauero, *Theobroma cacao* L. As sementes do cacauero consistem na única fonte de manteiga de cacau e sólidos (líquor), matérias-primas fundamentais da indústria de chocolates (MENEZES; CARMO- NETO, 1993).

Um importante problema fitossanitário para a produção de cacau a nível mundial é a monilíase do cacauero, causada pelo fungo *Moniliophthora roreri* (Cif.) H. C. Evans, Stalpers, Smason & Benny (1978), que pode ocasionar redução da produtividade em torno de 20 a 90% (EVANS, 2007). *M. roreri* é um fungo fitopatogênico que infecta somente os frutos de espécies dos gêneros *Theobroma* e *Herrania* (PHILLIPS-MORA et al., 2006).

A quantificação das doenças das plantas é muito importante para estudos de implementação de alternativas de controle de doenças em culturas como o uso de cultivares resistentes (ALVAREZ-ROMERO et al., 2021; AMORIM et al., 2018). A severidade é a variável que avalia os níveis de danos das doenças. A severidade da doença é a proporção ou porcentagem da área do tecido do hospedeiro total afetado pela doença.

A quantificação do tecido doente pode ser realizada com o auxílio de diagramas de área padrão (DAP) ou diagramas de severidade (DS) também chamadas escalas diagramáticas ou ainda através da estimativa visual feita pelos avaliadores (ALVAREZ-ROMERO et al., 2021; AMORIM et al., 2018). Os DAP são representações ilustradas de partes de plantas com sintomas de doenças com diferentes níveis de severidade, e constituem a principal ferramenta de quantificação das doenças das plantas (AMORIM et al., 2018). O objetivo principal da utilidade da DAP é mostrar de forma real vários níveis de severidade levando em consideração o tamanho, a forma e a distribuição das lesões ou sintomas reais.

As variáveis usadas para a validação dos DAP são: LCC (Coeficiente de Correlação de Concordância de Lin ou ρ_c), coeficiente de correlação de Pearson (r) e coeficiente de bias (Cb). O LCC mede a concordância da correlação entre exatidão e precisão (LCC ou ρ_c), e é obtido pelo produto do coeficiente de correlação de Pearson (r) e um coeficiente de viés (ou viés) (Cb). O intervalo do coeficiente abrange valores de -1 a 1 quando aplicado a variáveis contínuas (LCC=1 quando há concordância perfeita, ou quando a concordância é aleatória; LCC= -1 quando os valores estimados aumentam enquanto os reais diminuem). Portanto, quanto mais próximo o coeficiente LCC estiver de 1, maior será a concordância da avaliação (DEL PONTE et al., 2017; MADDEN; HUGHES; VAN DEN BOSCH, 2017).

Levando em consideração a importância da monilíase no cacauero e a ausência de DAP validados para avaliar a severidade desta doença no cacauero, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar diagramas de área padrão (DAP) para medir com precisão e confiabilidade a severidade da monilíase em cacauero que servirá de base na validação de variedades com resistência genética horizontal ou outras ferramentas do manejo integrado de doenças. Os resultados gerados poderão fornecer mais informações sobre fitopatometria. Portanto, a hipótese deste trabalho foi que os DAPs influenciam na avaliação da severidade da monilíase no cacauero acrescentando a confiabilidade e exatidão das estimações.

Material e métodos

Para o desenvolvimento do diagrama de área padrão (DAP), frutos de cacaueteiro do genótipo CCN51 infectados com *M. royeri* com diferentes severidades foram coletados no município Francisco de Orellana, no Equador localizado nas coordenadas 0°39'56,20" S e 76°22'26,08" W, totalizando ao final da coleta 42 frutos, os quais foram digitalizados por meio de uma câmera digital Canon Powershot SX70 HS, com resolução de 300 dpi (pontos por polegada) e fundo azul. As fotos digitalizadas foram salvas no formato png (gráfico de rede portátil), e cada fruto foi analisado quanto à proporção da área lesionada (severidade) usando o software Assess 2.0.

A severidade de cada fruto estimada com o uso do programa foi considerada como a severidade real da doença e utilizada como referência nas avaliações para validação da escala. Frutos reais com severidades seguindo um padrão linear foram escolhidos para elaborar os diagramas, para a elaboração dos diagramas, foram considerados os critérios propostos por (DEL PONTE et al., 2017), com algumas modificações. Utilizando o software Adobe Illustrator CS5, foi desenhada um fruto padrão de área conhecida, que foi utilizada para representar os dez níveis de severidade do DAP, a fim de reproduzir os sintomas observados nos frutos, e verificar o percentual de danos no software Assess 2.0. Por fim, com as informações acima, foram elaborados os DAP para a quantificação da intensidade do dano ou severidade.

A validação dos diagramas foi realizada em duas etapas distintas, onde primeiramente, 30 avaliadores sem experiência em quantificar doenças de plantas avaliaram 40 imagens de frutos de cacaueteiro com diferentes níveis de severidade sem utilizar a escala como ferramenta. As imagens foram projetadas em slides do MS PowerPoint, com tempo programado de 60s por imagem. Após 30 minutos, os avaliadores tiveram que avaliar o mesmo conjunto de frutos, mas em ordem diferente. Nesta etapa, 30 avaliadores receberam o diagrama de área padrão proposto (Figura 2).

A partir dos dados de cada avaliador, a exatidão e precisão foram determinadas usando o coeficiente de correlação de concordância de Lin (LCC), coeficiente de bias (Cb), mudança de escala (s.shift), mudança de localização (l.shift), regressão linear simples entre a severidade real (variável quantificada no programa Assess 2.0) e a severidade estimada (variável estimada com e sem o uso de DAP), realizando as análises separadamente com os dados sem e com o uso dos DAP. Além disso, a precisão foi avaliada por meio do coeficiente de correlação (r) e pela variância dos erros (severidade estimada menos severidade real). Todo o processamento e análise de dados, além dos gráficos, foram realizados com R v. 4.1.2 (TEAM, 2017).

Os dados obtidos posteriormente foram analisados com a precisão ou exatidão geral (igual à concordância) das estimativas, que se refere a como as estimativas de severidade estão próximas da severidade real (BOCK et al., 2016; MADDEN; HUGHES; VAN DEN BOSCH, 2007) foi determinada para cada avaliador e condição (sem DAP e com DAP) com base no coeficiente de correlação de concordância de Lin (LCC, ρ_c), conforme sugerido para dados de doenças de plantas (BOCK et al., 2010; MADDEN; HUGHES; VAN DEN BOSCH, 2007). Além disso, os dois componentes da precisão geral (precisão e enviesamento) foram explorados para investigar as ramificações dos erros.

Para comparar a precisão e confiabilidade entre os métodos de estimativa de severidade (sem DAP e com DAP), um modelo linear generalizado misto foi ajustado aos dados dos parâmetros de concordância-LCC para cada avaliador. As avaliações (sem DAP e com DAP), e os avaliadores foram considerados fatores de efeito fixo e aleatórios no modelo, respectivamente. As médias dos mínimos quadrados de cada parâmetro de concordância LCC entre os métodos de avaliação da condição foram

comparadas com base no Teste de Tukey no nível de significância de 5%. A confiabilidade ou reprodutibilidade entre avaliadores foi avaliada usando dois métodos diferentes: correlação intraclasse (ICC), conforme descrito em SCHWANCK; DEL PONTE (2014), e correlação de concordância geral (OCC), que é um método LCC multi-avaliador aprimorado. Os ICC foram comparados com base nos intervalos de confiança.

Resultados e discussão

Nos campos de culturas selecionadas de cacaueteiro no Equador, frutos com sintomas característicos de monilíase foram observados com lesões de coloração chocolate-preto em diferentes níveis de severidade e até podridão total nos frutos (Figura 1).

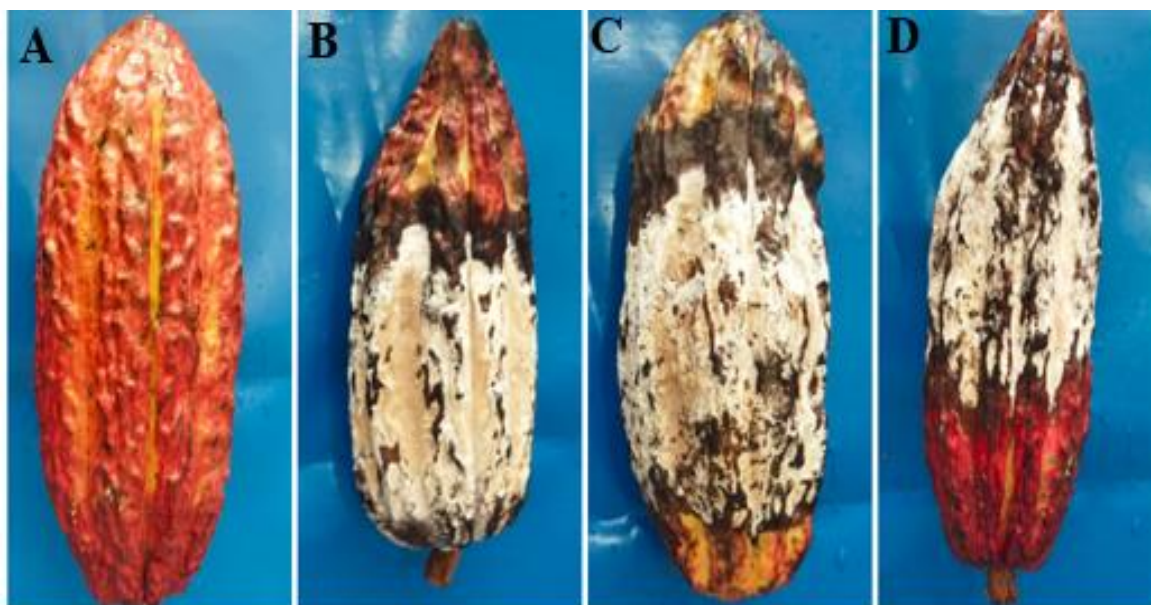


Figura 1 - Frutos com sintomas de monilíase (*Moniliophthora roreri*) em diferentes níveis de severidade. A) severidade = 0%; B) severidade=79,48%; C) severidade=83,25; D) severidade= 64,52%. Fonte: Os autores.

O DAP proposto neste estudo é composta de 10 níveis de severidade, seguindo um padrão de intervalos linear que vai de 1 a 70% (Figura 2).

Os diagramas de área padrão (DAP) foram desenhados com 10 imagens de frutos, cada uma com diferentes severidades de monilíase do cacaueteiro conforme recomendado nas boas práticas de uso dos DAPs (DEL PONTE et al., 2017). Para o diagrama de severidade, os valores de severidade utilizados foram 1; 5; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 70% (Figura 2).

Para 100% dos avaliadores, a concordância evidenciada pelo coeficiente de concordância Lin-LCCC (ρ_c) foi melhorada quando foram utilizados diagramas com incrementos. No caso dos avaliadores quando não utilizaram o DAP, as faixas de concordância (ρ_c) foram de 0,332 a 0,529, porém, quando utilizaram o DAP proposto com a concordância (ρ_c) variou de 0,769 a 0,986. Os coeficientes de localização (u) e deslocamento de escala (v) melhoraram quando o DAP foi utilizado pelos avaliadores, as faixas de deslocamento de localização sem o uso de DAP foi de 0,414 a 0,719, quando eles usaram o DAP, a mudança de localização (u) variou de -0,015 a 0,2127. Enquanto a escala muda (v) sem diagrama, os intervalos foram de -0,820 a 1,050.

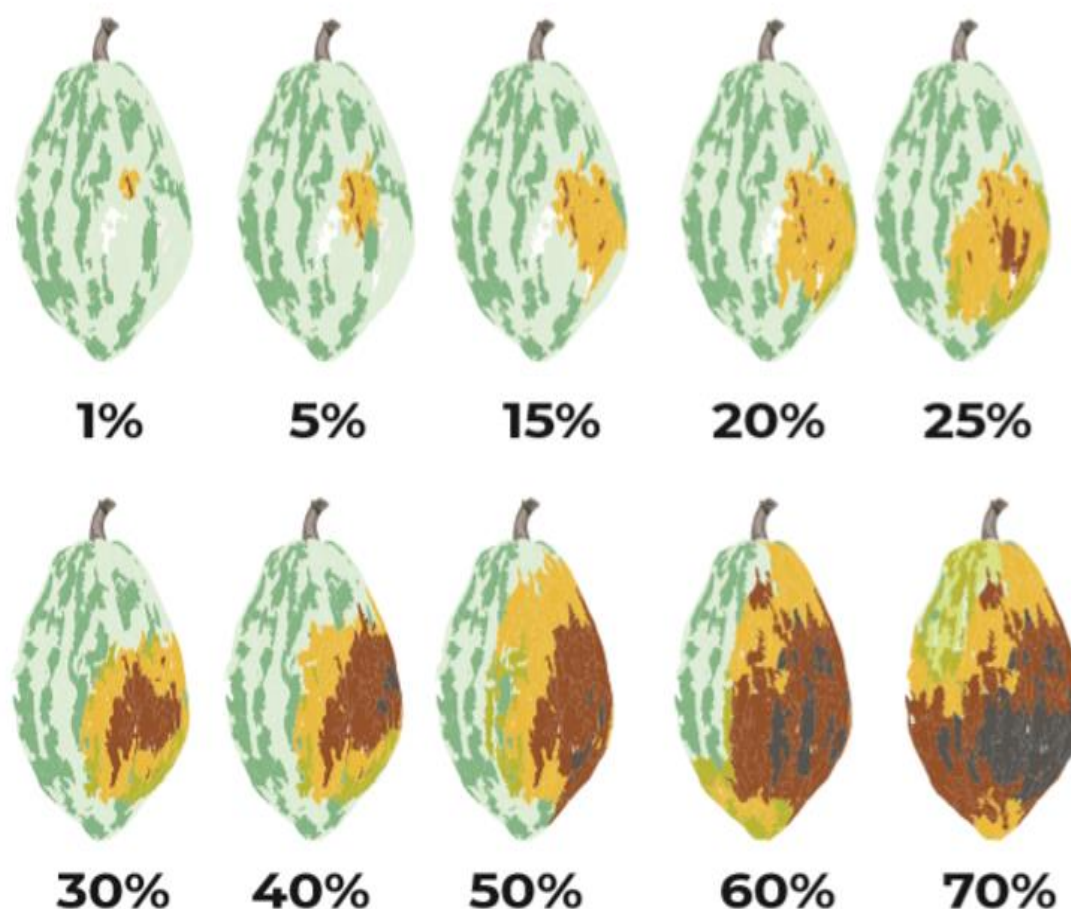


Figura 2 - Diagrama de área padrão para avaliar a severidade da monilíase no cacauero. Fonte: Os autores.

A análise do modelo linear generalizado misto mostrou que os valores de todos os parâmetros estatísticos (r , C_b , v , u , ρ_c) melhoraram significativamente quando o DAP proposto foi usado pelo grupo de avaliadores para estimar a severidade da monilíase do cacauero, comparado a não utilização de DAP (Tabela 1). Os resultados das estatísticas de ICC e OCC mostraram uma melhora geral e significativa na confiabilidade entre avaliadores para o grupo de avaliadores que usaram o DAP (Tabela 2).

Tabela 1 - Análise dos parâmetros do coeficiente de correlação de concordância Lin-LCC (ρ_c) para as avaliações feitas pelos avaliadores representando a exatidão (tipos de enviesamento), precisão (coeficiente de correlação).

Método	N	μ^b	v^c	C_b^d	r^e	ρ_c^f
Sem DAP	30	0,541 a	0,914 b	0,868 b	0,392 b	0,451 b
Com DAP	30	-0,030 b	0,965 a	0,996 a	0,950 a	0,953 a

^a Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes (Teste de Tukey, com um nível do 5%).

^b Mudança de localização (μ).

^c Mudança de escala (v).

^d Fator de correção Bias (C_b) mede o quanto a linha de melhor ajuste se desvia de 45° e é uma medida de precisão.

^e Coeficiente de correlação como medida de precisão (r).

^f Coeficiente de correlação de concordância de Lin (LCC), que combina as medidas de precisão (r) e exatidão (C_b) para medir a exatidão geral (concordância) com os valores reais de severidade.

Tabela 2 - Medidas de confiabilidade das avaliações da severidade da monilíase do cacauero de 30 avaliadores.

Método	Coefficiente de correlação Intra-Classe (ICC) <i>p</i> (95% IC) ^a	Correlação de Concordância Geral (OCC) ^b
Com DAP	0,975 (0,963-0,985)	0,975
Sem DAP	0,939 (0,909-0,963)	0,935

^a Calculado com decisões do modelo ICC de acordo com Schwanck e del Ponte, 2014.

^b Estatística de concordância geral para avaliar a concordância entre múltiplos observadores.

O DAP desenvolvido neste estudo é o primeiro diagrama de área padrão para avaliar a severidade da monilíase no cacauero e que analisaram a melhoria na exatidão, precisão e confiabilidade das avaliações realizadas com e sem o uso do DAP. Os avaliadores que não utilizaram o DAP tenderam a superestimar a severidade da doença (Figura 3 e Figura 4), um fenômeno semelhante foi observado em outras culturas (ALVAREZ-ROMERO et al., 2021; DUARTE et al., 2013). De maneira geral, podemos dizer que o DAP desenhado e nesta pesquisa ajudou aos trinta avaliadores melhorarem consideravelmente suas avaliações, reduzindo o viés que tendia a superestimar os danos (Figura 3 e Figura 4).

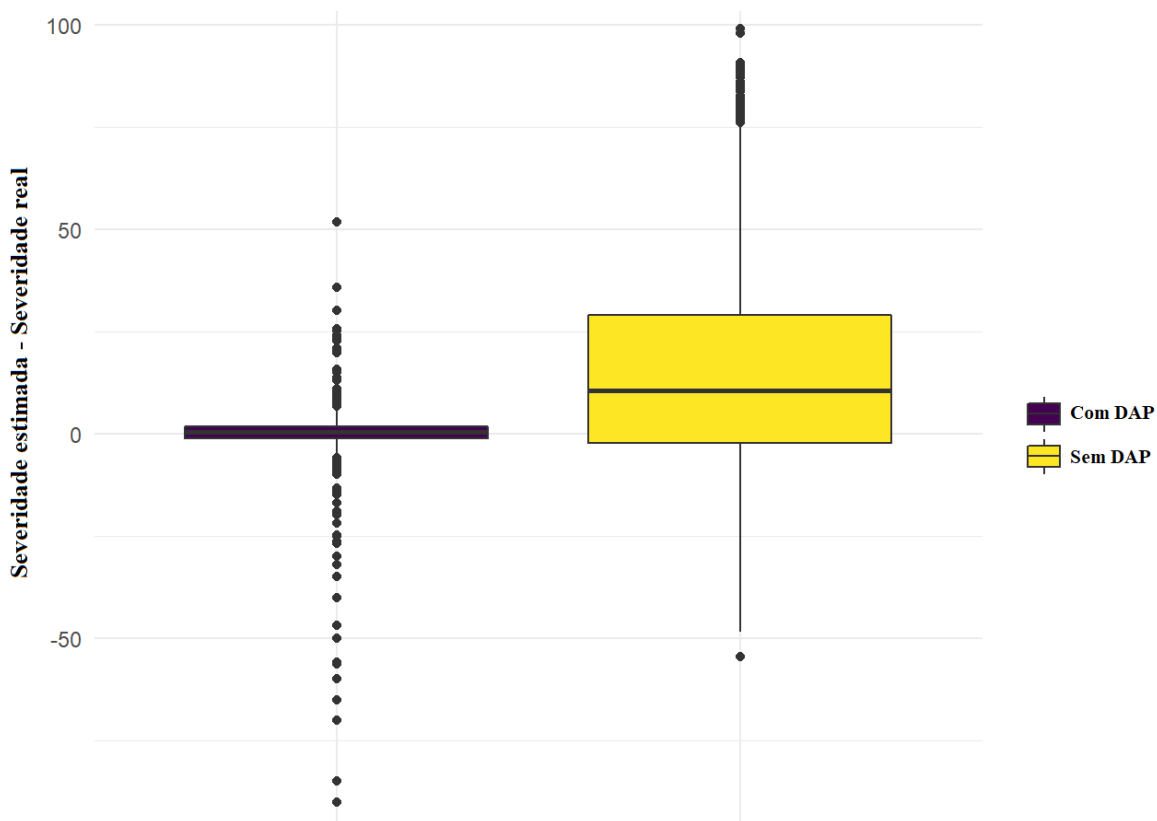


Figura 3 - Gráficos de boxplot dos erros absolutos das estimativas da severidade da monilíase do cacauero feitas com o DAP, e sem DAP, com trinta avaliadores. Fonte: Os autores.

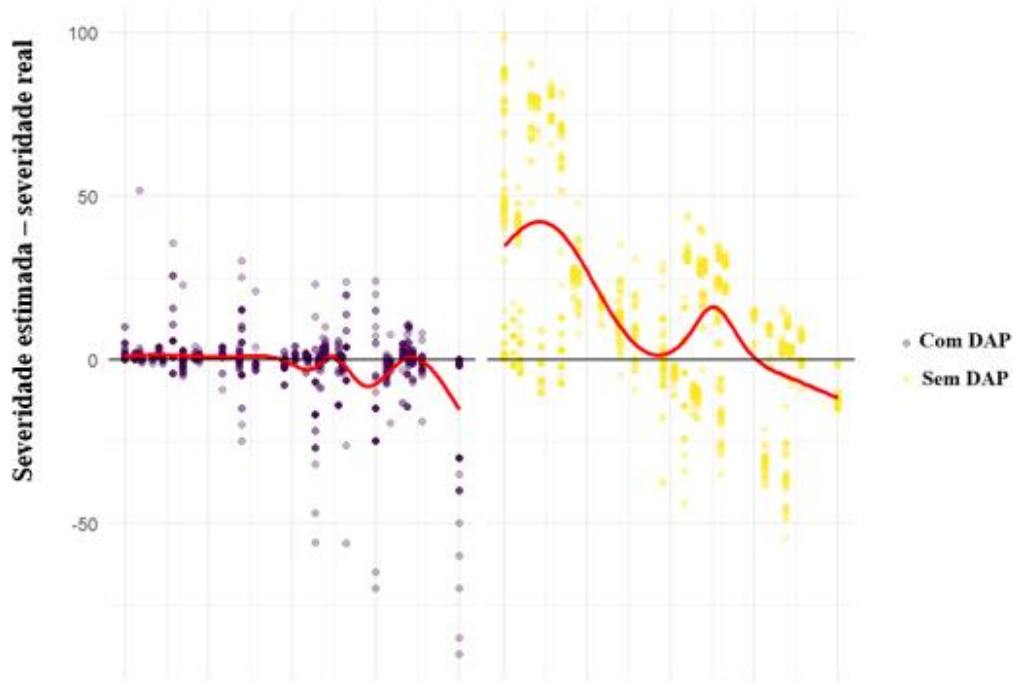


Figura 4 - Gráfico de dispersão da relação entre erro absoluto (estimativas menos real) e severidade real das estimativas da monilíase do cacauzeiro feitas com o DAP, e sem DAP. Fonte: Os autores.

Atualmente não existem ferramentas disponíveis para avaliar a severidade da monilíase no cacauzeiro, sendo uma necessidade urgente para os pesquisadores e melhoristas de cacauzeiro, o diagrama de área padrão (DAP) proposto forneceu melhorias em geral em acurácia, precisão e confiabilidade e deve ser amplamente recomendado e utilizado na quantificação da severidade da monilíase no cacauzeiro, em investigações de campo, principalmente para avaliar novos métodos de controle como novos genótipos de cacauzeiro. A maioria dos genótipos de cacau é suscetível a esta doença e esta doença está distribuída nos principais países produtores de cacauzeiro, dessa maneira, de acordo com os resultados obtidos, observa-se que o DAP é uma ferramenta importante para estudar o desenvolvimento de *M. royeri* a partir de frutos doentes, portanto esta ferramenta de pesquisa deve ser utilizada em estudos epidemiológicos de monilíase.

Conclusões

O diagrama de área padrão (DAP) proposto neste estudo aumentou a acurácia e precisão das avaliações. O DAP também incrementou a confiabilidade das avaliações feitas pelos avaliadores sendo uma importante ferramenta para avaliar severidade da monilíase do cacauzeiro, na determinação de medidas de controle e em qualquer outra situação que necessite medidas precisas de quantificação da doença em questão.

Conflitos de interesse

Não houve conflito de interesses dos autores.

Contribuição dos autores

Pablo Israel Álvarez Romero, Hilter Farley Figueroa Saavedra, Fabian Miguel Carrillo Riofrío, Juan Gabriel Chipantiza Masabanda e Ana Francisca Tiburcia Amorin Ferreira e Ferreira – coleta de dados, revisão bibliográfica e redação do manuscrito.

Referências bibliográficas

ALVAREZ-ROMERO, P. I.; MARIÑO-FRIAS, V.; CARPIO-COBA, C. F.; FERREIRA-FERREIRA, Ana F. T. A. Elaboração e validação de diagramas de área padrão (DAP) para avaliação da severidade do míldio (*Peronospora variabilis* Gäum) em quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). **Revista Agrária Acadêmica**, v. 4, n. 4, p. 43-54, 2021. <http://doi.org/10.32406/v4n4/2021/43-54/agrariacad>

AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos**. 5ª ed., v. 1, Sao Paulo: Editora Ceres, 2018, 573p.

BOCK, C. H.; KUOSZU, C.; DEL PONTE, E. M. Accuracy of plant specimen disease severity estimates: concepts, history, methods, ramifications and challenges for the future. **CABI Reviews**, v. 11, n. 32, p. 1-21, 2016. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR201611032>

BOCK, C. H.; POOLE, G. H.; PARKER, P. E.; GOTTWALD, T. R. Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 2, p. 59-107, 2010. <https://doi.org/10.1080/07352681003617285>

DEL PONTE, E. M.; PETHYBRIDGE, S. J.; BOCK, C. H.; MICHEREFF, S. J.; MACHADO, F. J.; SPOLTI, P. Standard area diagrams for aiding severity estimation: scientometrics, pathosystems, and methodological trends in the last 25 years. **Phytopathology**, v. 107, n. 10, p. 1161-1174, 2017. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-17-0069-FI>

DUARTE, H. S. S.; ZAMBOLIM, L.; CAPUCHO, A. S.; NOGUEIRA JÚNIOR, A. F.; ROSADO, A. W. C.; CARDOSO, C. R.; PAUL, P. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Development and validation of a set of standard area diagrams to estimate severity of potato early blight. **European Journal of Plant Pathology**, v. 137, n. 2, p. 249-257, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0234-3>

EVANS, H. C. Cacao diseases – the trilogy revisited. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1640-1643, 2007. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-12-1640>

MADDEN, L. V.; HUGHES, G.; VAN DEN BOSCH, F. **The Study of Plant Disease Epidemics**. APS Publications, 2017. <https://doi.org/10.1094/9780890545058>

MENEZES, J. A. S.; CARMO-NETO, D. **A Modernização do Agribusiness Cacao**. São Paulo: Fundação Cargil, 1993, 233p.

PHILLIPS-MORA, W.; CAWICH, J.; GARNETT, W.; AIME, M. C. First report of frosty pod rot (moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Belize. **Plant Pathology**, v. 55, n. 4, p.584-584, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01378.x>

SCHWANCK, A. A.; DEL PONTE, E. M. Accuracy and reliability of severity estimates using linear or logarithmic disease diagram sets in true colour or black and white: a study case for rice brown spot. **Journal of Phytopathology**, v. 162, n. 10, p. 670-682, 2014. <https://doi.org/10.1111/jph.12246>

TEAM, R. D. C. R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**, 2017.

Recebido em 30 de junho de 2022

Retornado para ajustes em 16 de outubro de 2022

Recebido com ajustes em 24 de outubro de 2022

Aceito em 31 de outubro de 2022