

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Moniliophthora perniciosa* EM
CACAUEIRO POR *Trichoderma* spp.: UMA ABORDAGEM COM
FOCO NA COLONIZAÇÃO DE CASCAS DE FRUTOS

QUENIA BARRETO DA SILVA

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

AGOSTO – 2024

**Controle Biológico de *Moniliophythora perniciosa* em Cacaueiro por
Trichoderma spp.: Uma abordagem com foco na Colonização de cascas de
frutos**

QUENIA BARRETO DA SILVA

Engenheira agrônoma, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2019

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Agricultura Tropical).

Orientadora: Ana Cristina Fermino Soares

Co-orientadora: Karina Gramacho

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

AGOSTO DE 2024

FICHA CATALOGRÁFICA

S586c

Silva, Quenia Barreto da.

Controle biológico de *Moniliophthora perniciosa* em cacaueiro por *Trichoderma* spp.: uma abordagem focada na colonização de cascas de frutos / Quenia Barreto da Silva._ Cruz das Almas, BA, 2024.

62f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Mestrado em Ciências Agrárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Fermino Soares.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a Karina Gramacho.

1.Cacau – Cultura agrícola. 2.Cacau – Doenças e pragas – Vassoura-de-bruxa. 3.Controle biológico – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 633.74

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB. Responsável pela Elaboração Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Moniliophthora perniciosa* EM CACAUEIRO POR
Trichoderma spp.: UMA ABORDAGEM FOCADA NA COLONIZAÇÃO DE
CASCAS DE FRUTOS**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de

Quênia Barreto da Silva

Aprovada em 29.8.2024

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Fermino Soares

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Leilane Silveira D'Ávila

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB

Examinadora Externa


Prof. Dr. Juan Manuel Anda Rocabado

Universidade Estadual de Feira de Santana

Examinador Externo

DEDICATÓRIA

Aos ventos que me trouxeram ao Recôncavo Baiano, desse território de um povo diverso e com singularidades culturais e sociopolíticas. Que também é meu povo, aquele que resistiu as mazelas do contexto da escravidão [holocausto] de povos africanos e indígenas. E que lutaram para que uma sonhadora, poeta, cantora, agrônoma, cientista e mãe - que sou - pudesse trilhar uma pesquisa de resoluções de problemas socioeconômicos causados pela ausência de políticas públicas no âmbito da territorialização desses povos.

Ao meu pai Valter Oliveira da Silva Filho, por me ensinar a criar leveza nos dias mais duros. À mãe, Rita Cavalcante Barreto por me fazer entender que a educação constrói pontes, redes e continuidade. Aos meus avós maternos e paternos, nordestinos e pretos, respectivamente.

Dedico a meu companheiro e amigo Bruno O Suspeito pelas horas de dedicação. Mesmo que incompreensível parecesse este trabalho, entendi que ser mãe e cientista era meu KAminho e você escutou! Dua

Dedico também a minha rede de apoio por tornar possível o caminho de uma mãe e cientista/pesquisadora, em especial Kheila de Paula, Dani Jêje e José Wilson meu paizão.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo concedimento da bolsa de mestrado para realização desta pesquisa de importância social e econômica para agricultoras e agricultores de reforma agrária do Baixo Sul e Sul da Bahia.

Ao Centro de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, bem como à Finep, pelo fornecimento dos equipamentos e suporte técnico para os experimentos de microscopia eletrônica.

Ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, por nos permitir acesso aos meios de produção, tornando possível todas as etapas desta pesquisa.

Ao corpo técnico de servidores que esteve em prontidão auxiliando.

À Zozilene Nascimento Santos Teles, nossa querida Lene, que além de sua função de técnica, assumiu por diversas vezes a função de educadora/pesquisadora.

À minha orientadora Ana Cristina Fermino Soares por conduzir a orientação desta pesquisa de forma honrosa, atuante e atenta aos detalhes que validam a pesquisa científica. Da mesma forma, agradeço às minhas co-orientadoras Karina Gramacho e Cintia Armond pela grandiosa participação e ensinamentos.

Aos guerreiros e guerreiras do Movimento dos Trabalhadores Rurais Sem Terra por abrir as portas de suas casas [Assentamento] para tornar possível este projeto, e acompanhar todas as etapas realizadas em campo.

Agradeço honrosamente a meus Nkises por me dar força e sabedoria ancestral para concluir este trabalho. Sakidila Tatetu, Sakidila Mametu.

EPÍGRAFE

“Babu wani an Adam da zai iya sanin ko kuma tsara yadda duniya za ta kasance nan gaba”

“O destino da Terra não cabe ao homem decidir ou controlar”

[provérbio hauçá/Yorubá]

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Moniliophthora perniciosa* EM CACAUEIRO POR *Trichoderma* spp.: UMA ABORDAGEM COM FOCO NA COLONIZAÇÃO DE CASCAS DE FRUTOS

Autor: Quênia Barreto da Silva

Orientadora: Ana Cristina Fermino soares

Co-orientadora: Karina Gramacho

RESUMO

Os resíduos de cultura deixados nos plantios de cacau vem sendo um problema fitossanitário para pequenos produtores nos assentamentos rurais no Baixo Sul da Bahia. Esse material orgânico é fonte de inóculo de *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura de bruxa nessa cultura. Apesar das diversas estratégias de controle, como o uso de fungicidas e plantas com resistência genética, esta doença ainda vem causando perdas alarmantes na produtividade do cacau nessas áreas. Fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os agentes de biocontrole com resultados promissores para diversas culturas e, no caso da cultura do cacau, a espécie *T. stromaticum* tem sido usada na Bahia. Entretanto, outras espécies de *Trichoderma* precisam ser isoladas e avaliadas para o controle desta doença no cacau, para ampliar o leque de espécies e bioinoculantes, com potencial para colonizar os casqueiros (cascas de frutos deixadas sobre o solo nos plantios de cacau), reduzir a fonte de inóculo e controlar a vassoura de bruxa no cacaueiro. Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de isolar e identificar espécies de *Trichoderma* de áreas de produção de cacau em assentamentos rurais na Bahia e avaliar o seu potencial em inibir o crescimento micelial de *M. perniciosa* e colonizar casqueiros de cacau. Foram obtidos 20 isolados de *Trichoderma*, codificados de Tric 1 a Tric 20. Estes isolados foram avaliados quanto à inibição do patógeno por compostos voláteis em placas de Petri bi-partidas e por compostos não voláteis por meio do pareamento das culturas, em meio BDA e incubação a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$. Para observação do micoparasitismo, lâminulas esterilizadas foram colocadas sobre as culturas pareadas, na região de contato entre o patógeno e o *Trichoderma*. As lâminulas foram retiradas das placas, após 5 a 7 dias de incubação a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, e colocadas sobre uma lâmina microscópica com uma gota de azul de algodão em lactofenol. O micoparasitismo foi observado em microscópio óptico com aumento de 40 e 100X. Foi demonstrado o micoparasitismo de diversos isolados de *Trichoderma* sobre *M. perniciosa*, com o enovelamento e destruição das hifas do patógeno. Foi comprovado o potencial de vários isolados de *Trichoderma* em inibir o crescimento micelial do patógeno em até 90% por compostos não voláteis, em até 83% por compostos voláteis e em colonizar os casqueiros de cacau, com boa esporulação. Nos testes *in vitro*, vários isolados de *Trichoderma* cresceram sobre a colônia do patógeno, com esporulação intensa e a formação de pústulas. Foi demonstrado o potencial de *Trichoderma*, de áreas de plantio de cacaueiro, para o controle de *M. perniciosa*, por diferentes mecanismos de ação e com capacidade de colonizar e esporular nos casqueiros. Estudos futuros deverão avaliar esses isolados no controle da vassoura de bruxa em plantas de cacau.

Palavras-chave: Casqueiro, vassoura de bruxa, biocontrole, micoparasitismo.

BIOLOGICAL CONTROL OF *Moniliophthora perniciosa* IN COCOA PLANTS WITH *Trichoderma* spp.: AN APPROACH BASED ON THE COLONIZATION OF COCOA FRUIT SHELLS

Author: Quênia Barreto

Advisor: Ana Cristina Fermino soares

Co-advisor: Karina Gramacho

ABSTRACT

The crop residues left in cocoa fields have become a phytosanitary issue for small farmers in rural settlements in the Baixo Sul region of Bahia. This organic material is a source of inoculum of *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease in this crop. Despite various control strategies, such as the use of fungicides and genetically resistant plants, this disease continues to cause alarming productivity losses in these areas. Fungi of the genus *Trichoderma* are among the biocontrol agents showing promising results for various crops, and in the case of cocoa cultivation, the species *T. stromaticum* has been used in Bahia. However, other *Trichoderma* species need to be isolated and evaluated for the control of this disease in cocoa, to broaden the range of species and bioinoculants with the potential to colonize the "casqueiros" (fruit shells left on the soil in cocoa fields), reduce the source of inoculum, and control witches' broom disease in cacao plants. The aims of this study were to isolate and identify *Trichoderma* species from cocoa fields in rural settlements in Bahia and evaluate their potential to inhibit mycelial growth of *M. perniciosa* and to colonize cocoa fruit shells. A total of 20 *Trichoderma* isolates were obtained, coded from Tric 1 to Tric 20. These isolates were evaluated for pathogen's mycelium growth inhibition through volatile compounds in split Petri dishes, and through non-volatile compounds in paired cultures, on PDA medium with incubation at $26\pm 2^{\circ}\text{C}$. To observe mycoparasitism, sterilized cover slips were placed over the paired cultures at the contact region between the pathogen and *Trichoderma*. The cover slips were removed from the plates after 5 to 7 days of incubation at $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ and placed on a microscope slide with a drop of lactophenol cotton blue. Mycoparasitism was then observed under a light microscope at 40x and 100x magnification. Mycoparasitism by various *Trichoderma* isolates on *M. perniciosa* was demonstrated, with coiling and destruction of the pathogen's hyphae. Several *Trichoderma* isolates were shown to inhibit the pathogen's mycelial growth by up to 90% through non-volatile compounds, by up to 83% through volatile compounds, and to colonize cocoa fruit shells with good sporulation. In vitro tests showed that several *Trichoderma* isolates grew over the pathogen colony with intense sporulation and pustule formation. The potential of *Trichoderma* from cocoa planting areas to control *M. perniciosa* through various mechanisms of action and its ability to colonize and sporulate on cocoa fruit shells was demonstrated. Future studies should evaluate these isolates for witches' broom disease control in cocoa plants.

Keywords: Fruit shell, witches' broom, biocontrol, mycoparasitism.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Testes de pareamento.....	18
Tabela 2. Índice de Mulamba e Mock para inibição do crescimento micelial de <i>M. pernicioso</i> , após 13 dias de incubação com <i>Trichoderma</i> spp., em pareamento para avaliação do efeito de compostos não voláteis.....	29
Tabela 3. Índice de Mulamba e Mock para inibição do crescimento micelial de <i>M. pernicioso</i> , após 13 dias de incubação com <i>Trichoderma</i> spp., em placas bipartidas para avaliação do efeito de compostos voláteis.....	34

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localização do município de Wenceslau Guimarães/Bahia, foco do estudo em questão.....4
- Figura 2.** (A) Roça coletiva de cacau de um assentamento rural de Wenceslau Guimarães/Bahia, (B) fruto infectado por *Moniliphythora pernicioso* e (C) Casqueiros (cascas de frutos de cacau) deixados no campo.....5
- Figura 3.** Ciclo de vida do Fungo *Moniliophythora pernicioso*.....9
- Figura 4.** Colheita do cacau realizada de forma coletiva pelos produtores rurais (A) e casqueiros, restos de frutos e cascas descartados em campo (B).....11
- Figura 5.** Boxplot representando o diâmetro da colônia de *M. pernicioso* em mm com quatro leituras, sendo estas com 5, 9, 11 e 13 dias de incubação, com 20 isolados de *Trichoderma* spp. – Teste de Pareamento.....24
- Figura 6.** Boxplot representando percentagem de inibição da colônia de *M. pernicioso* em mm com quatro leituras, sendo estas com 5, 9, 11 e 13 dias de incubação com 20 isolados de *Trichoderma* spp. – Teste de Pareamento.....26
- Figura 7.** Boxplot representando o diâmetro da colônia de *M. pernicioso* em mm com quatro leituras, sendo estas com 5, 7, 9 e 11 dias de incubação com 20 isolados de *Trichoderma* spp. Para avaliar inibição por compostos voláteis.....30
- Figura 8.** Boxplot representando percentagem de inibição da colônia de *M. pernicioso* em mm, com quatro leituras, sendo estas com 5, 7, 9 e 11 dias de incubação com 20 isolados de *Trichoderma* spp. – Teste de Compostos Voláteis.....31
- Figura 9.** Teste de compostos voláteis entre espécies de *Trichoderma* e o patógeno *M. pernicioso* (colônia que se apresenta sempre abaixo de todas as placas) através de pareamento em placa bipartida, em meio BDA, à 25±2°C após 11 dias. Controle (A), Tric1 (B), Tric 2 (C), Tric3 (D), Tric4 (E), Tric5 (F), Tric6 (G), Tric7 (H), Tric8 (I), Tric9 (J), Tric10 (K), Tric 11 (M), Tric 12 (N), Tric13 (O), Tric14 (P), Tric15 (Q), Tric16 (R), TRic17 (S), Tric18 (T), Tric19 (U) e Tric 20 (V).....33
- Figura 10.** Antagonismo entre espécies de *Trichoderma* e o patógeno *M. pernicioso* (colônia que se apresenta sempre à direita em todas as placas) através de duplo pareamento, em meio BDA, à 25±2°C após 10 dias de incubação.....36
- Figura 11.** Isolados de *Trichoderma* em diferentes tempos de incubação. À esquerda com 4 dias de incubação e à direita com 10 dias de incubação.....37
- Figura 12.** Fotografias de microscopia de Luz mostrando a presença de parasitismo dos isolados de *Trichoderma* spp. contra o patógeno *Moniliophythora pernicioso*.....38
- Figura 13.** Figuras obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) ilustrando o micoparasitismo de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. sobre *Moniliophythora pernicioso*.....39

Figura 14. Colonização por isolados de *Trichoderma* em casqueiros esterilizados, partes interna e externa casqueiro, após nove dias de incubação. Controle (A), Tric1 (B), Tric 2 (C), Tric3 (D), Tric4 (E), Tric5 (F), Tric6 (G), Tric7 (H), Tric8 (I), Tric9 (J), Tric10 (K), Tric 11 (L), Tric 12 (M), Tric13 (N), Tric14 (O), Tric15 (P), Tric16 (Q), TRic17 (R), Tric18 (S), Tric19 (T) e Tric 20 (U).....41

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	1
2.0 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 A cultura do Cacau: Assentamentos rurais da Região Cacaueira.....	3
2.2 Vassoura de Bruxa: uma doença devastadora no cultivo de cacau.....	6
2.3 O Ciclo de Vida de <i>Moniliophythora perniciosa</i>	7
2.4 O descarte incorreto de restos de cultura no campo: uma fonte de disseminação da doença.....	10
2.5 Métodos de controle.....	11
2.6 O Potencial do Controle Biológico com <i>Trichoderma</i> spp.	12
3.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Obtenção de isolados nativos de <i>Trichoderma</i> spp.....	17
3.2 Obtenção de <i>Moniliophthora perniciosa</i>	17
3.3 Teste de pareamento para compostos não voláteis	18
3.4 Teste de inibição por compostos voláteis	19
3.5 Teste de micoparasitismo	20
3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV	20
3.7 Teste de colonização dos casqueiros com <i>Trichoderma</i> spp.....	Erro! Indicador não definido.
3.8 Análises Estatísticas	21
4.0 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Características macro e microscópicas observadas a partir das interações antagonista-patógeno.....	35
5.0 CONCLUSÕES	43
6.0 REFERÊNCIAS.....	44

1.0 INTRODUÇÃO

O cultivo do cacau (*Theobroma cacao* L.) tem uma importância econômica e social significativa, especialmente nas regiões tropicais. No entanto, a produtividade das plantações no Brasil ainda é ameaçada pela vassoura-de-bruxa, uma doença causada pelo fungo *Moniliophythora perniciosa*. A disseminação e agressividade desse patógeno no ambiente agrícola resultam em grandes perdas econômicas e desafios contínuos para os pequenos produtores rurais nas regiões do Sul e Baixo Sul da Bahia.

Diante desse cenário, o controle biológico surge como uma alternativa sustentável e eficaz ao uso intensivo de produtos químicos. O gênero *Trichoderma* spp. destaca-se como um dos agentes de controle biológico mais promissores devido à sua capacidade de antagonizar diversos fitopatógenos (ROSMANA et al., 2016; CROZIER et al., 2015; SOUZA et al., 2021).

A interação entre espécies de *Trichoderma* e *M. perniciosa* pode envolver diversos mecanismos, incluindo competição direta por recursos, produção de compostos antifúngicos e micoparasitismo. Esses processos podem interferir na dinâmica de colonização de patógenos, com efeitos positivos na saúde das plantas hospedeiras, influenciando assim a produtividade e a qualidade dos frutos de cacau. (LEIVA et al., 2020; LEIVA et al., 2022). Através de mecanismos como competição por nutrientes, produção de metabólitos antifúngicos e indução de resistência sistêmica nas plantas hospedeiras, *Trichoderma* spp. pode reduzir a incidência e a severidade da doença (vassoura de bruxa), contribuindo para a saúde e a produtividade dos plantios de cacau (BAILEY et al., 2008).

Alguns estudos têm demonstrado que fungos do gênero *Trichoderma* atuam tanto no controle de fitopatógenos, como na decomposição da matéria orgânica (SACHDEV & SINGH, 2020; BAILEY et al., 2008; WOO et al., 2022). Portanto, estes fungos além de se destacarem como agentes de biocontrole de patógenos como *M. perniciosa* (BAILEY et al., 2008), podem também beneficiar a cultura do cacau pelo seu potencial de colonização das cascas dos frutos de cacau.

Quando associado a matéria orgânica, *Trichoderma* spp. pode competir por nutrientes e espaço e inibir a colonização e crescimento de patógenos. Este comportamento foi observado entre *Trichoderma afroharzianum* e *Botrytis cinerea*, através dos efeitos antagônicos e de degradação de oxalato (QING WU et al., 2022).

Além disso, *Trichoderma* spp. pode produzir enzimas que degradam compostos indesejados, como toxinas produzidas por patógenos (XIANFENGREN et al., 2022), podendo inibir toxinas presentes na casca de frutos de cacau, contribuindo para a qualidade e a segurança do produto. Estes fungos antagonistas podem colonizar resíduos orgânicos, transformando-os em substratos agrícolas úteis, o que agrega valor ao manejo de resíduos culturais.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo explorar o potencial de *Trichoderma* spp. no controle da vassoura-de-bruxa e na valorização dos resíduos culturais do cacau, especificamente os casqueiros. Para isso, se presume a seguinte hipótese: espécies de *Trichoderma* spp. eficientes no controle de *M. pernicioso* e na colonização de frutos de cacau são potenciais para formulação de bioinsumos agrícolas.

Este estudo é de grande relevância para a melhoria das práticas de manejo no cultivo de cacau e a sustentabilidade da cultura. Ao utilizar *Trichoderma* spp. como agente de controle biológico e como meio de valorização de resíduos orgânicos, pretende-se promover um manejo de doenças mais sustentável e eficiente. A aplicação de métodos biológicos não apenas contribui para a saúde das plantações de cacau, mas também abre possibilidades para o uso de resíduos culturais como recursos valiosos na agricultura, promovendo a sustentabilidade e a produtividade agrícola.

2.0 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do Cacau: Assentamentos rurais da Região Cacaueira

O cacau é uma das *commodities* agrícolas de suma importância no mundo, desempenhando um papel fundamental na indústria alimentícia e na economia de diversos países tropicais. A produção de cacau está concentrada em regiões equatoriais, onde as condições climáticas favoráveis, como temperatura, umidade e solo adequado, proporcionam um ambiente propício para o cultivo dessa cultura (LAHIVE et al, 2018).

Nos últimos anos, o mercado global de cacau tem sido dominado por alguns países produtores que se destacam tanto em termos de quantidade produzida, quanto de qualidade do produto. Entre esses países, destacam-se Costa do Marfim, com 39,0% da produção, Gana (14,5%) Indonésia (14,0%), Nigéria (6,3%), Equador (5,1%), Camarões (5,0%) e o Brasil (4,6%), sendo o sétimo maior produtor mundial, e juntos esses países respondem por uma parcela 88,4% da produção mundial (FAOSTAT, 2020). A produção de cacau contribui significativamente para a economia desses países, com um papel importante na geração de empregos e no Brasil, contribui para o desenvolvimento socioeconômico das comunidades rurais e assentamentos de reforma agrária.

Assentamentos rurais de reforma agrária organizados no Movimento dos Trabalhadores Rurais Sem Terra – MST, presentes no território de identidade Baixo Sul e Sul da Bahia, correspondem a uma parcela de pequenos produtores rurais que lutaram por longos anos por direito à terra, assim como o direito a existência desses povos após um longo processo de escravização e colonialismo no Brasil. Nesta região, as ocupações se deram em fazendas com plantio de cacau abandonadas que ao longo do período foram (re)apropriadas pela União, a partir do processo de compra legitimado pela política de reforma agrária brasileira. Durante o processo de ocupação até o momento que recebem o título de Assentamento de reforma agrária pelo INCRA – Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária, o MST organiza reuniões e mutirões a fim de estabelecer princípios norteadores para a produção agrícola, sendo um deles o não uso de agrotóxicos nas plantações. Para tanto, como afirma Luiz Zarref (2018), pode-se seguramente afirmar que hoje o MST está em uma outra

marcha histórica, e sem volta, rumo à transição agroecológica em todos seus territórios. Ainda segundo Zarref (2018), esse não é um processo simples, rápido e sem contradições. Mas sem dúvidas é a tarefa que a história nos colocou nesse momento: reconstruir o projeto para a sociedade brasileira, em que as famílias camponesas e trabalhadoras retomam a soberania sobre seus territórios, sua alimentação e sua capacidade produtiva, e estabelecem uma nova relação com a natureza, baseada no trabalho e na compreensão das dinâmicas ecológicas.

Os Assentamentos de Reforma Agrária organizados no MST, presentes na região, são muitos. Entretanto, o presente estudo foi realizado no Assentamento Ernesto Che Guevara, localizado no município de Wenceslau Guimarães, Bahia (Figura 1). Segundo o setor de comunicação do assentamento (2020), este assentamento foi desmembrado da antiga Fazenda Rodagem e fica localizado próximo a BR101. No assentamento, as atividades agrícolas principais são os cultivos de cacau, banana, cupuaçu, guaraná, mandioca e hortaliças. Os cultivos são organizados em roças consolidadas pelos assentados individualmente, e em roças coletivas com cacau plantado há 25 anos atrás. Todas as áreas com cacau possuem o sistema “cabruca”, que é o cacau plantando sob árvores nativas da Mata Atlântica ou florestas secundárias.

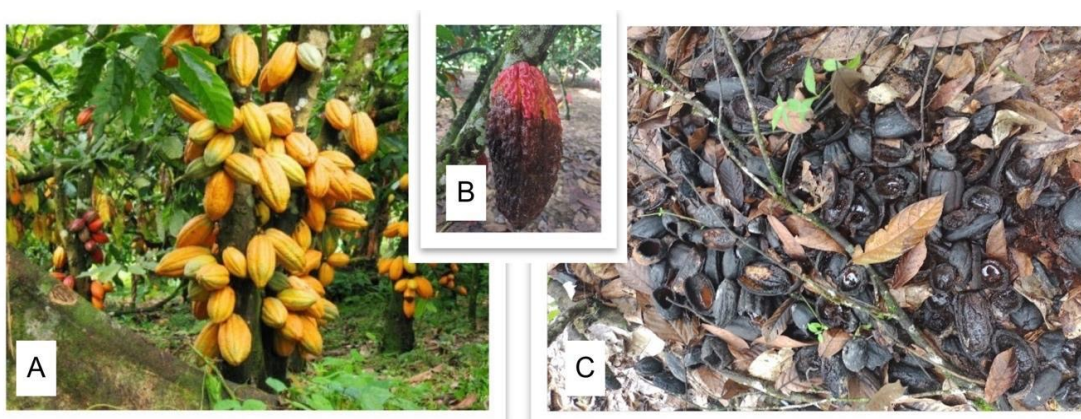
Figura 1. Localização do município de Wenceslau Guimarães/Bahia, foco deste estudo.



Fonte: Raphael Lorenzeto de Abreu, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1134074>

O cacau é o cultivo de maior relevância na geração de renda das famílias do assentamento, devido às condições climáticas e ambientais favoráveis a esse cultivo e por ter sido o principal cultivo da antiga fazenda (Figura 2). A produção em consórcio é bastante explorada no assentamento, dando destaque para cacau/banana e banana/mandioca. Essa prática tem incrementado o uso e manejo do solo no aumento da diversificação da produção e consequentemente maior geração de renda.

Figura 2. (A) Roça coletiva de cacau de um assentamento rural de Wenceslau Guimarães/Bahia, (B) fruto infectado por *Moniliphythora perniciosa* e (C) casqueiros (cascas de frutos de cacau) deixados no campo.



Fonte: (A) fotografia retirada do Facebook do Setor de Produção do Assentamento; (B, C) fotografias registradas pela autora.

O cacau desempenha um papel crucial na subsistência e no sustento de milhões de pequenos produtores rurais em diversas regiões tropicais ao redor do globo (SOUSA FILHO et al., 2021). Esses agricultores familiares muitas vezes dependem da produção de cacau como principal fonte de renda, proporcionando-lhes meios de subsistência e oportunidades econômicas em áreas rurais onde outras formas de emprego são escassas. Para os autores Gomes e Pires, (2015) para além de gerar empregos diretos para os produtores e suas famílias, a produção de cacau também contribui para a dinamização da economia local, promovendo o comércio e estimulando o desenvolvimento de serviços e infraestrutura nas áreas rurais.

Além disso, a produção de cacau por esses produtores rurais assentados está frequentemente associada a práticas de manejo agrícola sustentável, como agrofloresta, manejo integrado de pragas e doenças e conservação dos recursos naturais. Essas práticas não apenas preservam a biodiversidade e os serviços

ecossistêmicos, mas também promovem a resiliência dos sistemas agrícolas, frente a desafios ambientais e econômicos (SANTOS & HOYOS, 2023).

No entanto, apesar da importância do cacau para os produtores rurais assentados, estes enfrentam uma série de desafios, incluindo baixa produtividade, roças de cacau muito antigas, acesso limitado a mercados e cadeias de suprimentos desiguais, problemas fitossanitários. A volatilidade dos preços do cacau no mercado global e a incidência de doenças, como a vassoura de bruxa, representam ameaças significativas à sustentabilidade da produção de cacau em pequena escala (FAO, 2014).

2.2 Vassoura de Bruxa: uma doença devastadora no cultivo de cacau

A vassoura de bruxa, uma das doenças do cacaueiro mais devastadora e amplamente estudada (SENAA et al., 2014; MARELLI et al., 2009; MONDEGO et al., 2008; VIEIRA & VALLE, 2012; MENEZES et al., 2014; PIRES et al., 2009; JAIMES et al., 2022; ALI et al., 2021), é causada pelo fungo *M. perniciosus* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, anteriormente conhecido como *Crinipellis perniciosus* (Stahel) Singer. Essa doença é caracterizada pelo aparecimento de lesões nos brotos e frutos do cacau, levando à formação de estruturas semelhantes a vassouras (MARELLI et al., 2009). Os sintomas causados por esta doença são caracterizados pelo crescimento anormal de almofadas florais, com gemas vegetativas que se transformam em pequenas vassouras, causando a redução na produção de frutos, os quais apresentam uma consistência dura, com engrossamento do pedúnculo (MARELLI et al., 2009). A infecção causada nos tecidos da planta, sobretudo os tecidos meristemáticos, causam a hipertrofia e hiperplasia, causando a morte do tecido vegetal em poucos dias (PIRES et al., 2009).

Os impactos da vassoura de bruxa vão além das perdas quantitativas na produção de cacau (FILHO et al., 2021). As comunidades e assentamentos de reforma agrária que dependem do cacau como fonte de renda e subsistência sofrem consequências socioeconômicas adversas, devido à diminuição da produtividade e ao aumento dos custos de controle fitossanitário. Se tratando de assentamentos de reforma agrária, onde não é permitido o uso de insumos químicos, o desafio ainda se torna maior, frente a escassez de produtos agroecológicos disponíveis no mercado.

A vassoura-de-bruxa, identificada no estado da Bahia em 1989, tornou-se um marco histórico significativo para a cacauicultura regional. Nesse ano, um agrônomo da CEPLAC detectou o fungo *M. pernicioso* em uma fazenda no município de Uruçuca, confirmando a chegada da praga à principal área produtora de cacau do Brasil. Esse evento desencadeou uma série de esforços emergenciais para conter a disseminação da doença, com foco em estratégias de manejo e controle da vassoura-de-bruxa, visando mitigar seus impactos devastadores na produção cacaueira.

A vassoura-de-bruxa afetou cerca de 50-90% da produtividade cacaueira, levando o Brasil a sair da posição de terceiro maior produtor de cacau para a de importador (PIRES et al., 2009). Segundo os dados do IBGE, no ano de 1982 a produção estimada da região que hoje compreende o sul da Bahia foi de 457.873 toneladas de amêndoas de cacau, em uma área total de 670.417 ha. No ano de 1992, essa produção caiu para 237.086 toneladas, em uma área de 534.647 há e em 2002, a produção estimada foi de 110.205 toneladas, em 576.875 ha de área cultivada. Os dados mais recentes apontam para 440 ha de área plantada com a cultura do cacau em 2023, com um rendimento total no valor de R\$2.356.369 mil reais (IBGE, 2024).

A relevância da vassoura-de-bruxa no cacaueiro persiste até os dias de hoje devido à sua capacidade de causar danos significativos em regiões produtoras de cacau ao redor do mundo. Dentre estes, podemos citar os impactos econômicos causados para milhares de famílias que tinham a venda das amêndoas como renda principal, devido à queda drástica na produção de cacau, diminuição da área cultivada, a degradação da qualidade dos frutos, forçando ao êxodo rural e ao enfrentamento dos desafios para a recuperação da cacauicultura.

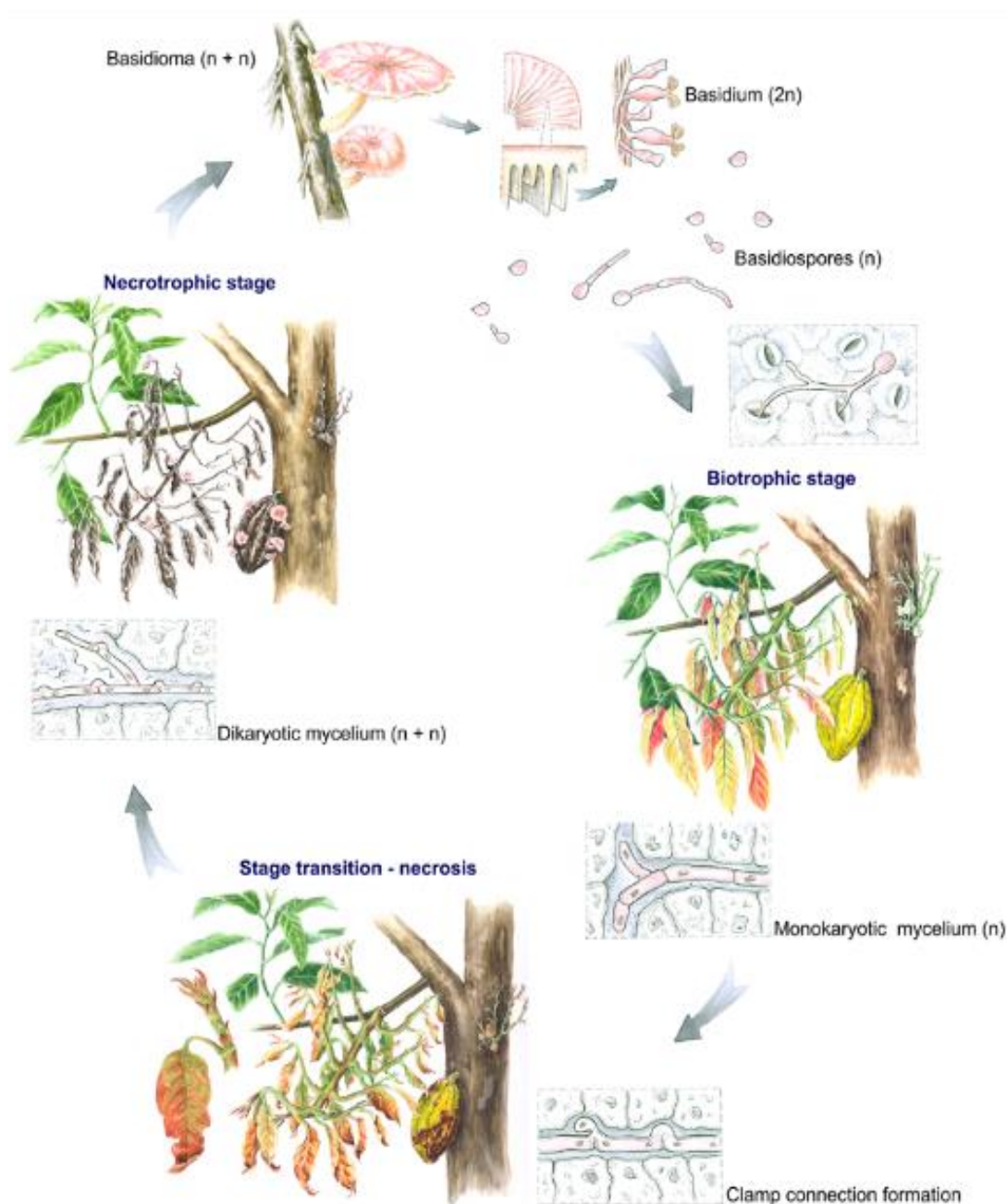
Sendo assim, a compreensão dos mecanismos de infecção e disseminação do *M. pernicioso*, bem como o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle, tornaram-se áreas de pesquisa prioritárias para garantir a sustentabilidade e a resiliência desses pequenos agricultores rurais.

2.3 O Ciclo de Vida de *Moniliophythora pernicioso*

A compreensão do ciclo de vida de um patógeno é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle de doenças em plantas. Compreender o ciclo de vida desse fungo é crucial para elucidar os mecanismos de infecção, disseminação e persistência do fungo nos cultivos de cacau. *M. pernicioso*

é um fungo hemibiotrófico, o que significa que tem a capacidade de viver tanto como um parasita biotrófico, obtendo nutrientes das células vivas do hospedeiro, quanto como um saprófito, alimentando-se de matéria orgânica morta (THOMAZELLA et al., 2012). Esse padrão de vida complexo contribui para a sua adaptação e sobrevivência em diferentes ambientes, assim como uma distinta morfologia de micélio e comportamento (MEINHARDT et al., 2006).

Figura 3. Ciclo de vida do Fungo *Moniliophythora perniciosa*.



Fonte: Teixeira et al., 2015.

O ciclo de vida de *M. perniciosa* começa com a produção de basidiocarpos, sempre em vassouras mortas, 8-12 semanas após o início da estação chuvosa (KIMATI et al., 1997). A liberação e disseminação dos basidiósporos ocorre frequentemente durante a noite, quando a umidade relativa do ar é elevada, entre 80 e 90% e a temperatura média varia de 24 a 26°C. Os basidiósporos são disseminados principalmente pelo vento, tendo a água das chuvas importância secundária. As

dispersões desses basidiósporos podem chegar a distâncias superiores a 300m da fonte de inóculo (KIMATI et al., 2005).

Os esporos germinam e penetram tecidos meristemáticos da folha e tecidos do caule, seja através da penetração direta ou a partir dos estômatos e ferimentos na planta. Uma vez ocorrido o processo de penetração dos basidiósporos, o fungo cresce intracelularmente por intermédio de hifas de 5-20 μm , frequentemente intumescidas, irregulares, monocarióticas e desprovidas de grampo de conexão. O fungo possui duas fases distintas em seu ciclo de vida. A fase parasítica caracterizada acima e a fase saprofítica que é caracterizada por um micélio formado por hifas mais finas (1,4 - 3,0 μm), intracelulares, dicarióticas, com grampos de conexão e de fácil cultivo *in vitro*, sendo encontrada no tecido necrótico ou morto do hospedeiro. Durante a fase saprofítica, o fungo produz corpos frutíferos, os basidiomas, de coloração rosada (KIMATI et al., 2005; MARELLI et al, 2009; MEINHARDT et al., 2006).

A complexidade do ciclo de vida de *M. pernicioso* e sua capacidade de se adaptar a diferentes condições ambientais representam desafios significativos para o manejo eficaz da vassoura de bruxa. Portanto, uma compreensão abrangente desse ciclo, juntamente com pesquisas direcionadas para identificar pontos vulneráveis e desenvolver estratégias de controle direcionadas, é essencial para mitigar os danos causados por essa doença e garantir a sustentabilidade da produção de cacau em assentamentos de reforma agrária.

2.4 O descarte incorreto de restos de cultura no campo: uma fonte de disseminação da doença

Um dos fatores críticos que contribuem para a disseminação da vassoura-de-bruxa é o manejo inadequado dos restos culturais. O descarte incorreto de material vegetativo infectado, como galhos, folhas e frutos, pode servir como fonte contínua de inóculo, facilitando a disseminação do patógeno para plantas saudáveis.

Esse problema está presente na região em estudo, contribuindo significativamente para a manutenção e disseminação do *M. pernicioso*. Os frutos deixados no solo após a colheita, formando o que popularmente chamamos de casqueiros (Figura 4), ou descartados inadequadamente em áreas próximas à plantação, são responsáveis pela disseminação da doença na região.

Figura 4. Colheita do cacau realizada de forma coletiva pelos produtores rurais (A) e casqueiros, restos de frutos e cascas descartados em campo (B).



Fonte: (A) Brasil de Fato, 2018. (B) Agrolink, 2024

A CEPLAC vem demonstrando que a prática inadequada de descarte dos restos culturais é um dos principais fatores que perpetuam a presença do patógeno nas plantações. Entretanto, a ausência de práticas agrícolas apropriadas para o manejo desses resíduos não apenas agrava a disseminação da doença, mas também pode comprometer a sustentabilidade a longo prazo das plantações de cacau, comprometendo também o pequeno agricultor.

Portanto, a adoção de práticas de descarte corretas, embasadas em conhecimento científico e em um processo gradual de conscientização de pequenos agricultores rurais se torna essencial para garantir a sustentabilidade e a produtividade das plantações de cacau.

2.5 Métodos de controle

Os métodos de controle das doenças causadas por *Moniliophythora spp* incluem: 1) Químico: uso de fungicidas registrados pertencem aos grupos químicos benzotiadiazol, inorgânicos e triazol. No total são vinte e dois produtos químicos registrados no mercado, sob diferentes formas de aplicação e uso. As aplicações variam entre produtos, sendo alguns para aplicação em mudas e outros para plantas em fase de desenvolvimento e frutificação; 2) Genético: uso de clones resistentes à vassoura-de-bruxa, que tem sido um avanço muito importante e a CEPLAC foi uma importante aliada nesta tarefa. Podemos citar os clones auto-compatíveis: PH 16, PH 15, IPIRANGA, SJ 02, CCN 51, CCN 10, CA 14, PS 1319, CEPEC 2002, CEPEC

2005, RVID 08 e CP 49, e os clones inter-compatíveis: TSH 1188, TSH 565, TSA 792, CCN 16, CEPEC 2008, ESFIP 02, ESFIP 03 e ESPIF 04; 3) Tratos culturais, como a poda fitossanitária que deve ocorrer em função das condições climáticas, sendo recomendado pelo menos quatro remoções por ano a partir da remoção sistemática (frequente) de qualquer parte afetada da planta, incluindo vassouras, frutos e almofadas florais que deverá ser queimada, enterrada ou bem coberta, para rápida decomposição (INCAPER, 2007); 4) Biológico, podemos citar o uso de insumos biológicos, que são produtos ou processos agroindustriais desenvolvidos a partir de enzimas, extratos (de plantas ou de microrganismos), microrganismos, metabólitos secundários e feromônios, destinados ao controle biológico (EMBRAPA, 2021). Os estudos desenvolvidos na CEPLAC tiveram como foco o uso do fungo antagônico *Trichoderma stromaticum* no controle da vassoura-de-bruxa, o qual apresentou resultados satisfatórios quando aplicado em casqueiros.

Estratégias de controle químico, como o uso de fungicidas, têm sido empregadas, mas frequentemente apresentam limitações, como a resistência dos patógenos e impactos ambientais negativos (SOUZA FILHO et al., 2021). Essas limitações estão atreladas, por exemplo, ao fato que os fungicidas à base de cobre e azóis possuem ação na membrana celular ou na respiração do *M. perniciosa*. Entretanto, recentes estudos apontam para o fato que o fungo possui a capacidade de utilizar uma enzima oxidase mitocondrial alternativa com função essencial, sobretudo na sobrevivência contra fungicidas (FERRAZ et al., 2019; THOMAZELLA et al., 2012; MEINHARDT et al., 2008).

Nesse sentido, o uso de práticas culturais atrelado ao uso do controle biológico pode ser uma alternativa sustentável de baixo custo para os pequenos agricultores/as rurais. A busca por métodos eficazes, mas que também sejam sustentáveis de controle de doenças de plantas é uma preocupação crescente. O controle biológico tem se destacado como uma alternativa promissora para combater diversas doenças, e dentro deste contexto, o gênero *Trichoderma* spp. emerge como um potencial agente de controle.

2.6 O Potencial do Controle Biológico com *Trichoderma* spp.

Fungos do gênero *Trichoderma* (Teleomorfo: Hypocrea) estão entre os agentes de controle biológico de fitopatógenos mais estudados, em especial para patógenos

veiculados pelo solo (MOUSUMI DAS et al., 2019; PORTEOUS-ÁLVAREZ et al., 2023). *Trichoderma* spp. é geralmente habitante do solo e saprófito, e podem ser simbioses avirulentos de plantas (HARMAN et al., 2004; STRACQUADANIO et al., 2020). Estes fungos são conhecidos por sua capacidade de suprimir patógenos de plantas através de diversos mecanismos, incluindo competição por nutrientes e espaço, produção de antibióticos e enzimas de degradação celular (LEIVA et al., 2022; LEIVA et al., 2020; SIMÕES et al., 2012). Essas características fazem com que espécies de *Trichoderma* sejam amplamente estudadas e aplicadas em programas de controle biológico em várias culturas, podendo citar o uso de *T. asperellum* no pré-tratamento de plantas de coco em Camarões, com efeito significativo na redução da infecção por *Pythium myriotylum* em 50% (MBARGA et al., 2012); no enriquecimento de *T. atroviride* em composto orgânico contribuindo no controle biológico de doenças de gramado causadas pelas espécies: *Sclerotium rolfii*, *Claviceps* spp. e *Rhizoctonia solani* (COELHO et al., 2021); bem como o uso de *T. reesei* CN4-VR11 na produção de biofertilizante com efeito na decomposição dos fertilizantes orgânicos, após apenas 30 dias de incubação (THUY et al., 2022). Estudos têm demonstrado que várias espécies de *Trichoderma* têm a capacidade de inibir o crescimento *in vitro* de *M. royeri* (LEIVA et al., 2022; BAILEY et al., 2008), fungo causador da Monilíase no cacauzeiro. Essa supressão pode ocorrer através de diferentes mecanismos, incluindo a produção de enzimas que degradam a parede celular do patógeno, a competição por nutrientes e a ativação do sistema de defesa das plantas hospedeiras (SARAVANAKUMAR et al., 2015).

Além disso, o *Trichoderma* tem sido explorado como um promissor biofungicida no manejo integrado de doenças em sistemas agrícolas (MORENO-VELANDIA et al., 2024). Segundo Melo e Azevedo (2000), a premissa básica do controle biológico é manter a densidade populacional das espécies de pragas associadas à agricultura, em níveis econômicos e ecologicamente aceitáveis. As interações mais estudadas entre fungos fitopatogênicos e seus antagonistas são com fungos do gênero *Trichoderma*, com os mecanismos de antibiose, representada pela hostilidade química, competição, que reflete a disputa por nutriente, espaço, água e luz (LEIVA et al., 2022), e micoparasitismo do *Trichoderma* sobre o patógeno, por meio da ação de enzimas resultando na destruição de estruturas do patógeno (MBARGA et al., 2012; SANOGO et al., 2002). No estudo elaborado por Rush et al., (2021) com a descrição

minuciosa das ações do *Trichoderma* como agente de controle biológico é relatado que 27 espécies de *Trichoderma* produzem múltiplos compostos que foram identificados e caracterizados como: metabólitos com propriedades antibacterianas, antifúngicas, antimicroalgas, antivirais, nematicidas e citotóxicas podem ser usados como biopesticidas. Os metabólitos que promovem o crescimento ou desenvolvimento das plantas podem ser usados como biofertilizantes ou bioestimulantes.

Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse no desenvolvimento e na aplicação de produtos biológicos na agricultura, visando promover práticas sustentáveis de manejo de culturas e reduzir a dependência de agroquímicos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana (PIERSON et al., 2022; CONSTANTINE et al., 2023). Nesse contexto, os fungos do gênero *Trichoderma* têm se destacado como agentes promissores. A aplicação de produtos à base de *Trichoderma* spp. tem demonstrado resultados promissores na proteção de culturas contra uma ampla gama de doenças causadas por fungos, bactérias e nematoides, bem como na promoção do crescimento e desenvolvimento das plantas hospedeiras. Esses produtos incluem formulações comerciais contendo esporos viáveis, células vegetativas, metabólitos ou combinações desses elementos, que podem ser aplicados diretamente no solo, nas sementes ou nas plantas (MATAS-BACAS et al., 2022). Além de seu potencial como agentes de controle biológico, os produtos à base de *Trichoderma* spp. têm sido cada vez mais reconhecidos por sua contribuição para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas. A utilização desses produtos pode reduzir a dependência de pesticidas sintéticos, minimizando assim os riscos de contaminação ambiental e a seleção de patógenos resistentes.

O uso de bioinsumos formulados com *Trichoderma* spp. apresenta um grande potencial como parte integrante de estratégias de manejo da vassoura-de-bruxa em mudas de cacau, como é o caso do produto Tricovab® formulado por pesquisadores/as da Comissão Executiva do Pano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC. O Tricovab® atualmente é comercializado pela BIOFUNGI - Indústria e Comércio de Defensivos Biológicos e Inoculantes Ltda, localizada em Eunápolis, no sul da Bahia. Este bioinsumo é o único voltado para controle biológico da vassoura-de-bruxa na Bahia, com eficiência próxima a 87% no controle desta doença (MAPA, 2023). Os produtos registrados até hoje para o controle da vassoura-de-bruxa do cacaueiro se limitam a um total de 23 produtos químicos e apenas um bioproduto, que é o caso do Tricovab®,

tendo em sua formulação esporos de *T. stromaticum*. Neste sentido, é importante a realização de novas pesquisas com outros isolados de *Trichoderma* e que preconizem a formulação de produtos que estejam em conformidade com a Lei 10.831/2003 que dispõe sobre a agricultura orgânica para ofertar aos assentamentos de Reforma Agrária e comunidades rurais na Bahia. Da mesma forma, faz-se necessário contribuir com formulações de bioprodutos, determinar as doses ou número de aplicações adequadas, avaliar os efeitos a longo prazo e desenvolver protocolos de aplicação eficazes.

Produzir bioprodutos se tornou cada vez mais necessário, levando em conta custo-benefício e viabilidade técnica para a implementação prática dessa tecnologia pelos produtores rurais de assentamento de reforma agrária que trabalham com a cultura do cacau. Da mesma forma que questões relacionadas à formulação, estabilidade, viabilidade e aplicação dos produtos, bem como sua integração com outras práticas de manejo. O que também nos exige uma abordagem multidisciplinar e colaborativa envolvendo pesquisa, políticas públicas e produtores/assentados. Além disso, é fundamental continuar investindo em pesquisa para o isolamento de novas cepas de *Trichoderma* e aprimorar nossa compreensão dos mecanismos de ação desses isolados e otimizar sua eficácia como agente de controle biológico. A integração de diferentes estratégias de manejo, incluindo o uso de variedades resistentes e o monitoramento eficaz, contribuem para práticas agronômicas sustentáveis que também são essenciais para um controle efetivo da vassoura de bruxa.

Portanto, o controle biológico utilizando *Trichoderma* representa uma abordagem promissora e sustentável para o manejo da vassoura-de-bruxa no cultivo de cacau. Com esforços contínuos de pesquisa, fomento de políticas públicas voltadas para o meio rural e adoção de prática, podemos avançar na direção de sistemas agrícolas mais resilientes, saudáveis e ambientalmente sustentáveis. Dessa forma, este estudo foi desenvolvido com os objetivos de: 1) isolar e testar isolados de *Trichoderma spp.* para o controle biológico do patógeno; 2) avaliar o potencial de colonização do *Trichoderma spp.* em casqueiros para controle do patógeno, como uma abordagem sustentável para reduzir os impactos causados pelo descarte incorreto de restos de podas e frutos (popularmente conhecido como casqueiro) no campo.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de isolados nativos de *Trichoderma* spp.

Amostras de solo foram coletadas próximo as raízes de plantas de cacau, na profundidade de 0 a 15 cm e foram coletadas amostras de casqueiro, em duas áreas de produção de cacau no assentamento de Reforma Agrária Ernesto Che Guevara, localizado no município de Wenceslau Guimarães, Sul da Bahia, sob as coordenadas geográfica 13°40'44.7''S 30°28'38.2''W. Para o isolamento de *Trichoderma*, 10 g de cada amostra de solo ou de casqueiro foram adicionadas a 90 ml de solução salina (0,85% NaCl) com duas gotas de Tween 20, em frascos de Erlenmeyer e a suspensão de solo foi agitada em agitador orbital por 20 minutos. Em seguida, fez-se a diluição seriada para cada suspensão em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina. As diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram transferidas para placas de Petri (100µL por placa) contendo meio TSM (*Trichoderma Selective Medium*) (Shah e Afiya, 2019) com 1 mL por litro de Tormicina (antibiótico Terramicina) para controle do crescimento bacteriano. O ensaio foi incubado a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ e as placas foram observadas diariamente para o crescimento de colônias com características típicas de *Trichoderma*. A partir das colônias que cresceram, foram preparadas lâmina microscópicas com uma gota de azul de algodão em lactofenol, para observação das características microscópicas do fungo e, para as que apresentavam a morfologia semelhante à de espécies de *Trichoderma*, a colônia foi repicada, usando uma agulha de repicagem esterilizada por flambagem, para placas contendo meio batata dextrose ágar (BDA), seguido de incubação a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$. Após o crescimento e esporulação das colônias purificadas de *Trichoderma* spp., discos de micélio contendo esporos foram transferidos para microtubos de centrífuga contendo 30% glicerol, para preservação no freezer a -80°C e para frascos de vidro contendo água esterilizada para preservação a temperatura ambiente.

3.2 Obtenção de *Moniliophthora perniciosa*

O isolado de *M. perniciosa* 4145 utilizado neste estudo foi proveniente da Micoteca da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC,

coordenadas 14°78'10.8"W 39°22'39.9"S. Este isolado foi conservado na coleção de fungos do Laboratório de Microbiologia da UFRB.

3.3 Teste de pareamento para compostos não voláteis

A avaliação do potencial antagônico dos diferentes isolados de *Trichoderma* spp. contra o *M. pernicioso* foi realizada através da técnica de pareamento das culturas de *Trichoderma* spp. com o patógeno, conforme metodologia proposta por Dennis e Webster (1971). Para tanto, foram utilizados discos com 5 mm de diâmetro, obtidos das colônias do fitopatógeno e isolados de *Trichoderma* spp. crescidos por 10 a 12 dias e 5 dias, respectivamente, em meio BDA, na temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Foram utilizadas placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo 20 mL de meio BDA. Os discos da colônia de *M. pernicioso* foram repicados para a superfície do BDA em placas de Petri, a uma distância de 20 mm da borda da placa e as placas foram incubadas a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Após o crescimento das colônias do patógeno por 5 dias, foram repicados discos da colônia dos isolados de *Trichoderma* spp. em lados opostos das placas de Petri a 20 mm da borda das placas. As placas de Petri contendo colônia do fitopatógeno e do antagonista pareadas foram incubadas a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 dias.

Cada isolado de *Trichoderma* spp. foi pareado com o fitopatógeno e considerou-se como controle somente o patógeno na placa de Petri sem o antagonista, totalizando dois ensaios, com 11 tratamentos cada (Tabela 1), e quatro repetições. Devido ao número elevado de isolados de *Trichoderma*, os testes foram divididos em dois ensaios.

Tabela 1. Testes de pareamento.

Tratamentos	Descrição
Ensaio 1	
T1	<i>M. pernicioso</i>
T2	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric1
T3	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric2
T4	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric3
T5	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric4
T6	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric5

T7	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric6
T8	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric7
T9	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric8
T10	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric9
T11	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric10
Ensaio 2	
T2	<i>M. pernicioso</i>
T13	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric11
T14	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric12
T15	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric13
T16	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric14
T17	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric15
T18	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric16
T19	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric17
T20	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric18
T21	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric19
T22	<i>M. pernicioso</i> x isolado Tric20

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições, considerando cada placa uma unidade experimental. As avaliações foram iniciadas 72 horas após a repicagem do *M. pernicioso* e o *Trichoderma*, sendo realizadas a cada 48 horas durante um período de sete dias. As medições do crescimento micelial das colônias do patógeno foram feitas com um paquímetro e as medições do diâmetro da colônia (média das medições em três pontos da colônia) foram utilizadas para calcular a porcentagem de inibição do crescimento do patógeno, com a seguinte equação: $PI (\%) = (Dc - Dt / Dc) \times 100$, sendo PI = Porcentagem de Inibição, Dc=diâmetro da colônia do patógeno não pareado com *Trichoderma* e Dt=Diâmetro do da colônia do patógeno pareado com *Trichoderma*.

3.4 Teste de inibição por compostos voláteis

O potencial de controle de *M. pernicioso* por compostos voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. foi avaliado pelo método de pareamento sem contato direto entre

as colônias, usando placas de Petri bipartidas descartáveis. Os isolados de *Trichoderma* foram multiplicadas em meio BDA durante 4 dias, enquanto para o patógeno foram necessários 10 dias de incubação à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, para posterior retirada de discos de 5mm de cada colônia em crescimento. O pareamento foi realizado pela transferência de um disco de micélio do patógeno em um lado da placa bipartida com BDA e, após 4 dias, o disco da colônia do *Trichoderma* foi transferido para o outro lado da placa bipartida. Como controle, a placa com meio BDA recebeu disco de micélio apenas do patógeno. Todas as placas foram incubadas em BOD à $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 7 dias. Medições foram realizadas do crescimento micelial por meio das medições do diâmetro da patógeno, usando um paquímetro, com medições a cada 48h. A porcentagem de inibição do crescimento micelial de *M. perniciosus* foi calculada usando a equação indicada no item 3.3. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, com uma placa sendo uma unidade experimental, seguindo o mesmo arranjo experimental feito para o teste de antagonismo por compostos não voláteis.

3.5 Teste de micoparasitismo

Lamínulas microscópicas esterilizadas foram colocadas sobre as colônias na região de interação entre *M. perniciosus* e *Trichoderma*, nas placas do teste de pareamento para compostos não voláteis. As lamínulas foram removidas das culturas após observação macroscópica do contato entre os dois fungos e foram colocadas sobre uma lâmina com uma gota de azul algodão em lactofenol, e observadas no microscópio Leica DM 750, com câmera modelo ICC 50 HD.

3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Parte da região de interação entre os fungos foi cuidadosamente removida das culturas pareadas, com um bisturi esterilizado e transferida para os stubs recobertos com folha de alumínio e fita de carbono. As amostras foram recobertas com ouro utilizando o evaporador Modelo 150TS Quorum. As imagens foram geradas no microscópio eletrônico EVO LS15 ZEISS, com parâmetros de 20 kV de tensão de aceleração, 10 mm de distância de trabalho (WD) e variadas magnificações (MAG). Além de imagens obtidas pelo detector de Elétron Secundário (SE), para algumas

amostras, foram obtidas imagens do detector de Elétron Retroespalhado (BE), com varreduras realizadas em áreas distintas de cada espécime.

3.7 Colonização dos casqueiros com *Trichoderma* spp.

Para avaliação da colonização dos casqueiros foram coletados frutos de cacau e casqueiros em plantio de cacau de um produtor rural no município de Cruz das Almas, Bahia. Os casqueiros foram lavados com sabão e água corrente e foram cortados em pedaços com 3 a 3,5 cm de largura e comprimento. Esses pedaços foram colocados em placas de Petri, com quatro pedaços em cada Placa, e foram esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos. Três a quatro dias após a esterilização, cada pedaço de casqueiro foi inoculado com um disco de micélio da cultura de *Trichoderma* spp. As placas de Petri continham quatro pedaços de casqueiro sendo dois com o lado interno da casca de cacau virado para cima e dois com o lado externo da casca virado para cima. Sobre cada pedaço de casqueiro, na região central, foi colocado um disco de micélio da cultura de *Trichoderma* spp. O ensaio foi incubado na temperatura ambiente do laboratório por até 12 dias, sendo estes observados diariamente para a colonização e esporulação por *Trichoderma* spp. Fez-se uma estimativa visual da porcentagem de colonização e esporulação dos pedaços de casqueiro. O controle foi constituído por placas com os pedaços de casqueiro sem inoculação. Para cada isolado de *Trichoderma* spp. foram preparadas duas placas de Petri com os pedaços de casqueiro esterilizados.

3.8 Análises Estatísticas

Para os dados obtidos foram construídos gráficos de box-plot. Os dados também foram submetidos ao teste F da análise de variância. As médias dos tratamentos foram agrupados pelo teste de Scott-Knott e foi realizada comparação das médias dos isolados versus o controle com uso do teste t de Dunnet, ambos a 5% de significância. Os dados de inibição foram transformados para arcoseno, visando o atendimento das pressuposições da análise de variância.

Foi também realizada análise multivariada de agrupamento utilizando-se a distância euclidiana como medida de dissimilaridade. Os agrupamentos hierárquicos foram obtidos pelo método UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic

Mean (Sneath; Sokal, 1973). A validação dos agrupamentos foi determinada pelo coeficiente de correlação cofilético de acordo com Sokal e Rohlf (1962). A significância dos coeficientes de correlação cofilético foi calculada pelo teste de Mantel com 10.000 permutações (Mantel, 1967). O critério para definição do número de grupos foi feito pelo método do pseudo-t2 (Mingotti, 2005) utilizando o pacote NbClust pertencente ao programa computacional R (CHARRAD et al., 2014).

Visando selecionar os isolados mais eficientes foi calculado o índice de soma de classificação a partir das médias dos tratamentos (Mulamba e Mock, 1978). As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico R (R CORE TEAM, 2024).

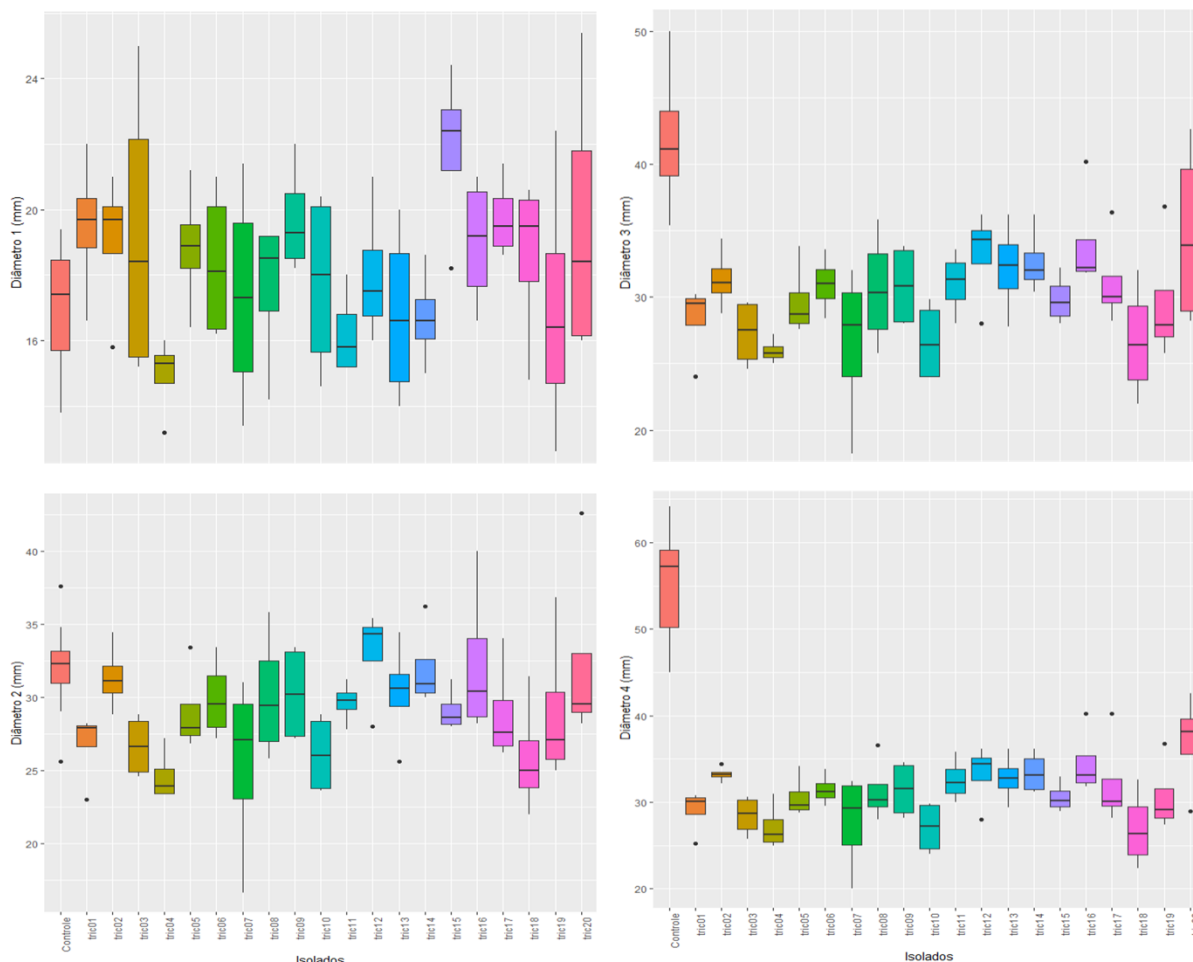
4.0 RESULTADO E DISCUSSÃO

Com nove dias de incubação, o isolado Tric 4 (24,6%) apresentou inibição do crescimento micelial de *M. perniciosus* ($p \geq 0.05$) e o isolado Tric 7 (25,45%) também apresentou inibição do crescimento micelial ($p \geq 0.1$). Após 11 dias de incubação, observamos resultados expressivos na inibição do crescimento micelial do patógeno devido à ação de metabólitos secundários produzidos pelos isolados de *Trichoderma*. Os isolados Tric1 (28,3%), Tric2 (31,3%), Tric3 (27,3%), Tric4 (25,9%), Tric5 (29,7%), Tric6 (31,0%), Tric7 (26,5%), Tric8 (30,5%), Tric9 (30,8%), Tric10 (26,6%), Tric11 (31,0%), Tric13 (32,2%) e Tric14 (32,6%), Tric15 (29,8%), Tric17 (31,1%), Tric18 (26,7%) e Tric19 (29,6%) demonstraram inibição significativa, com nível de confiança de $p \geq 0,001$. Enquanto Tric 16 (34,1%) e Tric 12 (33,2%) apresentaram efeito significativo com $p \geq 0,05$. Cabe ressaltar que os valores de p menores que 0,001 indicam alta significância estatística, o que significa que as diferenças observadas nos experimentos são extremamente improváveis de terem ocorrido por acaso. Portanto, esses valores reforçam a confiabilidade dos resultados, garantindo que o efeito dos microrganismos selecionados, como a inibição do crescimento do patógeno, é real e consistente.

Nesse sentido, os resultados acima indicam um efeito muito significativo dos metabólitos secundários não-voláteis na inibição do crescimento micelial do patógeno. Observou-se que após 11 dias de incubação, todos os isolados de *Trichoderma* apresentaram inibição do crescimento micelial de *M. perniciosus* com significância ($p \geq 0.000$) (Figura 5).

A análise do pareamento revelou que o isolado Tric4 (55,7%) obteve o melhor desempenho geral, com as maiores porcentagens de inibição do patógeno. Esse isolado apresentou os maiores valores de inibição do crescimento do patógeno com 5, 9 dias de incubação patógeno x antagonista, indicando uma superioridade estatisticamente significativa, quando comparado ao controle (Figura 5). SENAA et al. (2014) também destacaram a habilidade superior de certos isolados de *Trichoderma* em competir com patógenos de plantas, devido à sua capacidade de colonização agressiva e produção de metabólitos secundários. De acordo com Bailey et al. (2008), os isolados eficazes de *Trichoderma* combinam múltiplos mecanismos de ação, como o micoparasitismo, que envolve a penetração direta e destruição das hifas do patógeno, com a produção de enzimas líticas.

Figura 5. Boxplot representando o diâmetro da colônia de *M. perniciosa* em mm com quatro leituras, sendo estas com 5, 9, 11 e 13 dias de incubação, com 20 isolados de *Trichoderma* spp. – Teste de Pareamento.



Leiva et al. (2022) também reportaram que a capacidade de *Trichoderma* em colonizar rapidamente os espaços ocupados pelo patógeno é crucial para seu sucesso como agente de biocontrole. No presente estudo, observou-se que os isolados Tric10 (50,27%) e Tric18 (53,17%) também apresentaram alto desempenho, com porcentagens de inibição próximos aos do Tric4 (55,7%), sugerindo que esses isolados são competitivos e capazes de suprimir o patógeno eficientemente através de mecanismos semelhantes.

Além disso, o isolamento dos compostos voláteis e a análise de seus efeitos específicos indicam que os isolados que produzem maior quantidade desses compostos tendem a ser mais eficazes no campo (LEIVA et al., 2020). Nesse contexto, isolados como o Tric19 (45,8%) e Tric12 (37,3%) não só mostraram uma relativa eficiência nos testes de compostos voláteis (Figura 6) mas também apresentaram

bons resultados nos testes de pareamento, reforçando a hipótese de que esses compostos desempenham um papel central no biocontrole, ainda que este estudo não tenha envolvido o isolamento e testes desses compostos.

Os metabólitos secundários produzidos por *Trichoderma spp.*, como apontado por Dourou e La Porta (2023), incluem compostos voláteis e não voláteis com atividade antimicrobiana. Entre os principais, destacam-se o ácido heptelídico e os terpenóides, que inibem fitopatógenos, como *Alternaria sp.* e *Fusarium ramigenum*, através da degradação da parede celular. As enzimas hidrolíticas, como quitinases e glicanases, também desempenham um papel crucial na inibição desses patógenos, impedindo sua colonização em plantas.

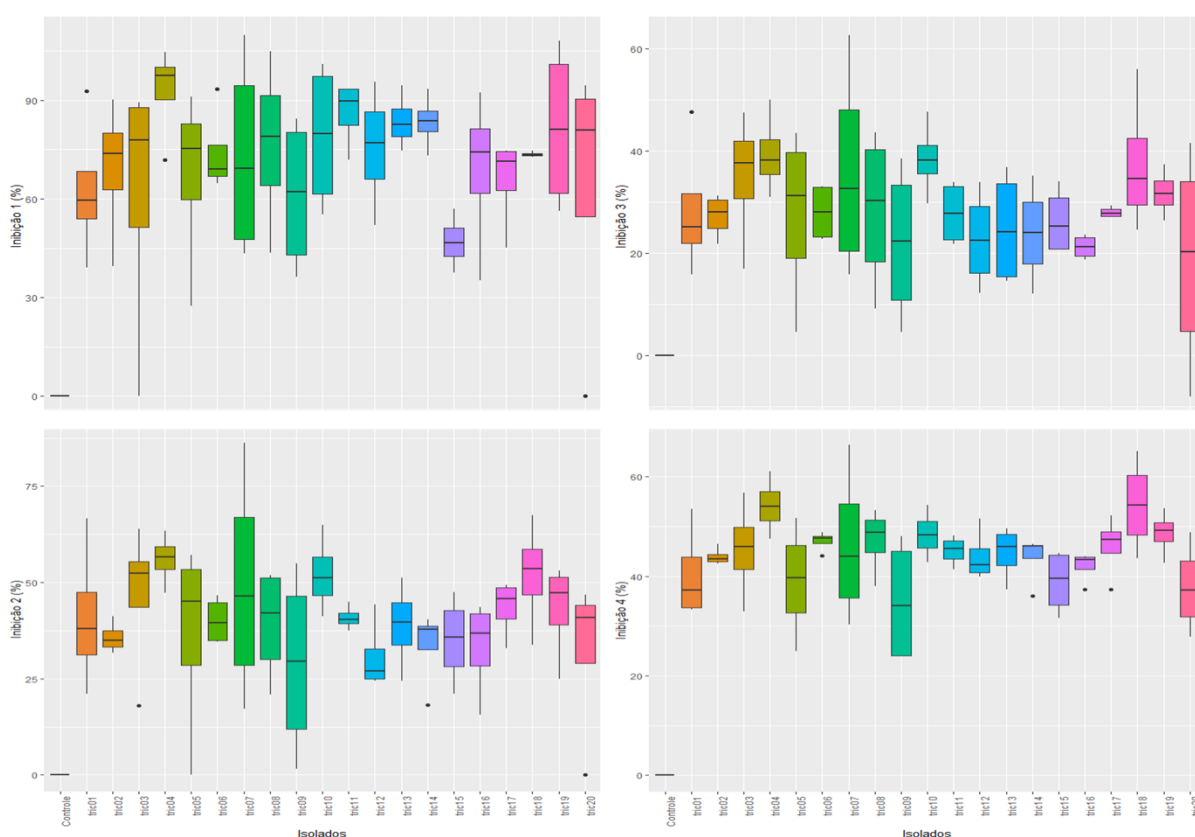
Os tratamentos com as menores médias do diâmetro da colônia do patógeno indicam os isolados de *Trichoderma* que promoveram as melhores respostas, no que tange a inibição do crescimento micelial do patógeno, sendo considerados os mais eficientes no controle (Figura 6). Segundo Fernandes et al. (2021), apesar de os resultados terem sido significativos quanto à inibição *in vitro* do *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, pelos isolados testados de *Trichoderma*, não é possível afirmar que esses seriam eficientes *in vivo*. Neste sentido, torna-se ainda mais efetivo avaliar os efeitos conjuntos para se tirar qualquer conclusão.

É relevante a observação de que o isolado Tric15 (36,9%) pode ter favorecido o aumento do crescimento da colônia de *M. perniciosa* ($p \geq 0,1$), em relação aos demais isolados estudados, demonstrando ser inadequado para o biocontrole. Após apenas cinco dias de incubação, observou-se um aumento no crescimento micelial do patógeno *M. perniciosa*, indicando que Tric15 não inibiu o crescimento do patógeno. De acordo com Dourou e La Porta (2023), algumas cepas de *Trichoderma* podem favorecer o crescimento do patógeno devido à secreção de metabólitos que não inibem, mas, em alguns casos, facilitam a colonização do patógeno. Além disso, as características fenotípicas e a produção de compostos bioativos variam entre as cepas, resultando em interações diferentes com os patógenos. Essa variabilidade indica que a eficácia do biocontrole não é garantida para todos os isolados, ressaltando a importância de analisar as interações fúngicas para selecionar adequadamente os agentes de controle biológico.

A produção de compostos voláteis por isolados de *Trichoderma spp.* tem sido amplamente documentada como um mecanismo crucial no biocontrole de

fitopatógenos. Dennis e Webster (1971) foram pioneiros em identificar que espécies de *Trichoderma* produzem antibióticos voláteis que podem inibir o crescimento de fungos patogênicos à distância.

Figura 6. Boxplot representando percentagem de inibição da colônia de *M. pernicioso* em mm com quatro leituras, sendo estas com 5, 9, 11 e 13 dias de incubação com 20 isolados de *Trichoderma* spp. – Teste de Pareamento.



A percentagem de inibição confirma os resultados observados quanto ao crescimento micelial de *M. pernicioso* após 11 dias de incubação com os isolados de *Trichoderma*, pois todos inibiram significativamente o crescimento de *M. pernicioso* nos testes de pareamento das culturas. A análise do índice de Mulamba e Mock (Tabela 2) permite avaliar todas as variáveis analisadas e nos fornece melhor visão do efeito de todos os isolados, para a seleção dos melhores, ou seja, aqueles que promoveram o melhor controle do crescimento do patógeno, por compostos não voláteis.

Tabela 2. Índice de Mulamba e Mock para inibição do crescimento micelial de *M. pernicioso*, após 13 dias de incubação com *Trichoderma* spp., em pareamento para avaliação do efeito de compostos não voláteis.

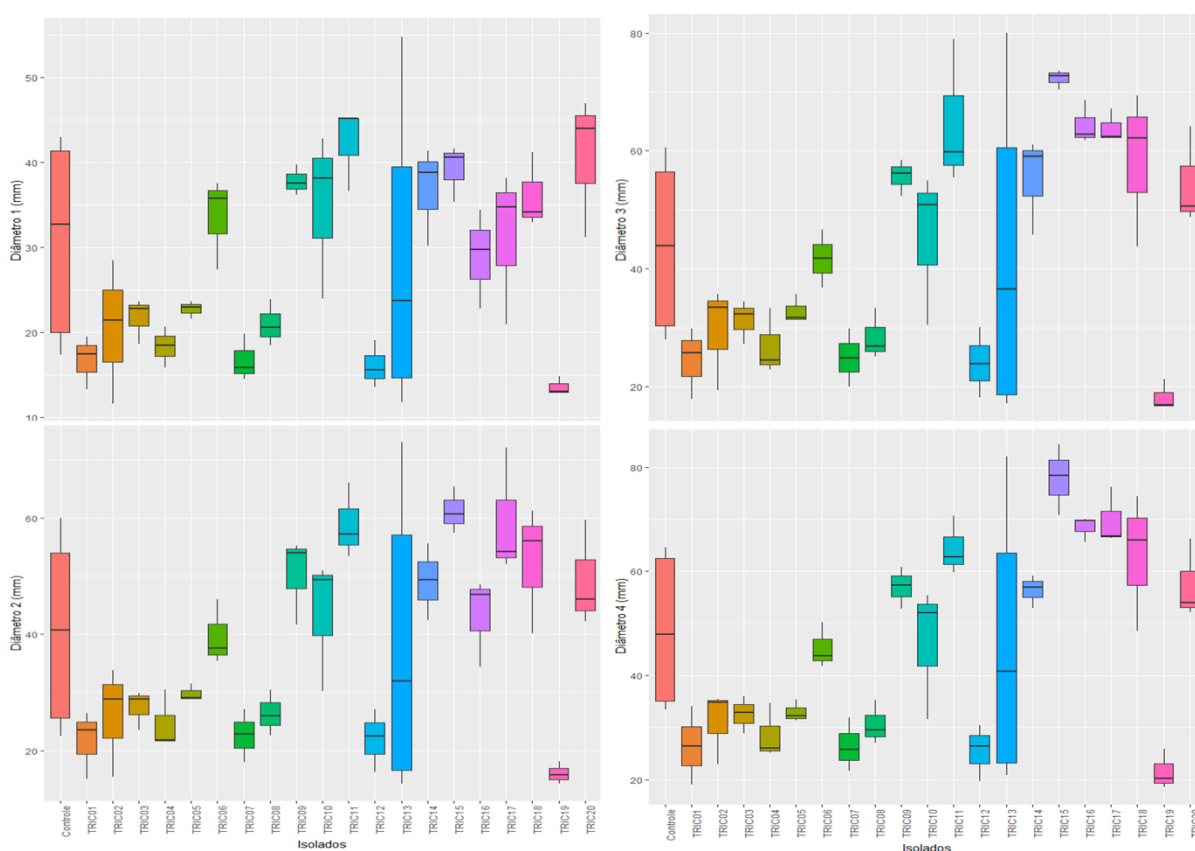
Trat	diam1	Rank	diam2	Rank	diam3	Rank	diam4	Rank	inib1	Rank	inib2	Rank	inib3	Rank	inib4	Rank	TC1	Rank	TC2	Rank	Índice
Tric04	14.95	1	24.60	1	25.95	1	27.15	3	92.90	1	56.01	1	39.37	1	54.13	2	0.68	12	0.60	11	34
Tric10	17.75	9	26.10	4	26.65	3	27.05	2	78.93	6	52.10	2	38.45	2	48.44	4	0.28	4	0.20	3	39
Tric18	18.60	12	25.85	3	26.70	4	26.95	1	73.57	10	52.06	3	37.42	3	54.29	1	0.43	9	0.13	2	48
Tric07	17.35	7	25.45	2	26.50	2	27.75	4	72.95	11	49.09	4	35.93	4	46.18	7	0.53	10	0.63	12	63
Tric19	16.95	5	29.00	8	29.60	7	30.60	8	81.63	5	43.13	7	31.82	6	48.63	3	0.30	5	0.50	9	63
Tric08	17.60	8	30.10	12	30.55	10	31.30	9	76.68	7	39.25	11	28.31	8	47.21	5	0.23	3	0.38	7	80
Tric03	19.25	16	26.65	5	27.30	5	28.45	5	61.28	18	46.68	5	34.97	5	45.34	9	0.33	6	0.58	10	84
Tric06	18.35	11	29.90	11	31.00	12	31.45	10	74.13	9	40.15	10	27.99	10	47.03	6	0.55	11	0.23	4	94
Tric11	16.20	2	29.65	10	31.05	13	32.60	13	86.22	2	40.82	9	27.86	11	45.12	10	0.70	13	0.78	13	96
Tric01	19.50	17	26.75	6	28.30	6	29.05	6	62.80	17	40.88	8	28.43	7	40.29	16	0.78	14	0.38	7	104
Tric05	18.85	13	29.00	8	29.70	8	30.60	7	67.32	14	36.82	13	27.59	12	39.02	17	0.35	7	0.45	8	107
Tric13	16.80	4	30.30	14	32.20	16	32.80	14	83.66	3	38.81	12	24.92	15	44.67	11	0.95	16	0.30	5	110
Tric14	16.70	3	32.00	17	32.65	17	33.40	17	83.55	4	33.55	16	23.86	16	43.65	14	0.33	6	0.38	7	117
Tric17	19.75	20	28.85	7	31.15	14	32.15	12	65.68	15	43.44	6	28.02	9	46.08	8	1.15	18	0.50	9	118
Tric12	18.00	10	33.00	20	33.20	18	33.25	16	75.41	8	30.71	19	22.81	17	44.03	12	0.10	2	0.03	1	123
Tric02	19.05	15	31.35	15	31.35	15	33.25	15	69.24	12	35.75	14	27.27	13	43.96	13	0.00	1	0.95	14	127
Tric15	21.85	21	29.10	9	29.85	9	30.60	7	47.00	20	35.07	15	26.38	14	38.83	18	0.38	8	0.38	7	128
Tric09	19.70	19	30.25	13	30.85	11	31.50	11	61.23	19	28.88	20	21.92	18	35.03	20	0.30	5	0.33	6	142
Tric16	19.00	14	32.25	18	34.10	19	34.55	18	69.00	13	33.28	17	21.20	19	41.96	15	0.93	15	0.23	4	152
Tric20	19.55	18	32.45	19	34.65	20	37.00	19	64.05	16	32.14	18	18.50	20	37.73	19	1.10	17	1.18	15	181
Control	16.98	6	31.98	16	42.08	21	54.95	20	0.00	21	0.00	21	0.00	21	0.00	21	5.05	19	6.44	16	182

Classificação dos isolados de *Trichoderma* spp. baseada no Índice de Seleção de Mulamba e Mock, utilizando parâmetros como a porcentagem de inibição do crescimento de *Moniliophthora pernicioso*, produção de compostos não voláteis, e taxa de crescimento do isolado. Rank 1 representa o melhor desempenho para cada característica, e a soma dos ranks ponderados determina a ordem final dos isolados.

Os isolados Tric 4 (55,0%), Tric 10 (50,2%), Tric18 (53,1%), Tric 7 (47,6%) e Tric 19 (45,8%) se destacaram como os cinco melhores. Bailey et al. (2008) observaram que os compostos voláteis são um dos principais mecanismos de ação do *Trichoderma* contra patógenos, causando a inibição do crescimento do patógeno, mesmo sem o contato direto entre o patógeno e o antagonista. O isolado Tric19 demonstrou uma inibição de 94% no crescimento do patógeno em apenas cinco dias de incubação. Esse efeito de inibição foi mantido ao longo dos 11 dias de observação, destacando-se notavelmente em comparação com os demais isolados (Figura 7).

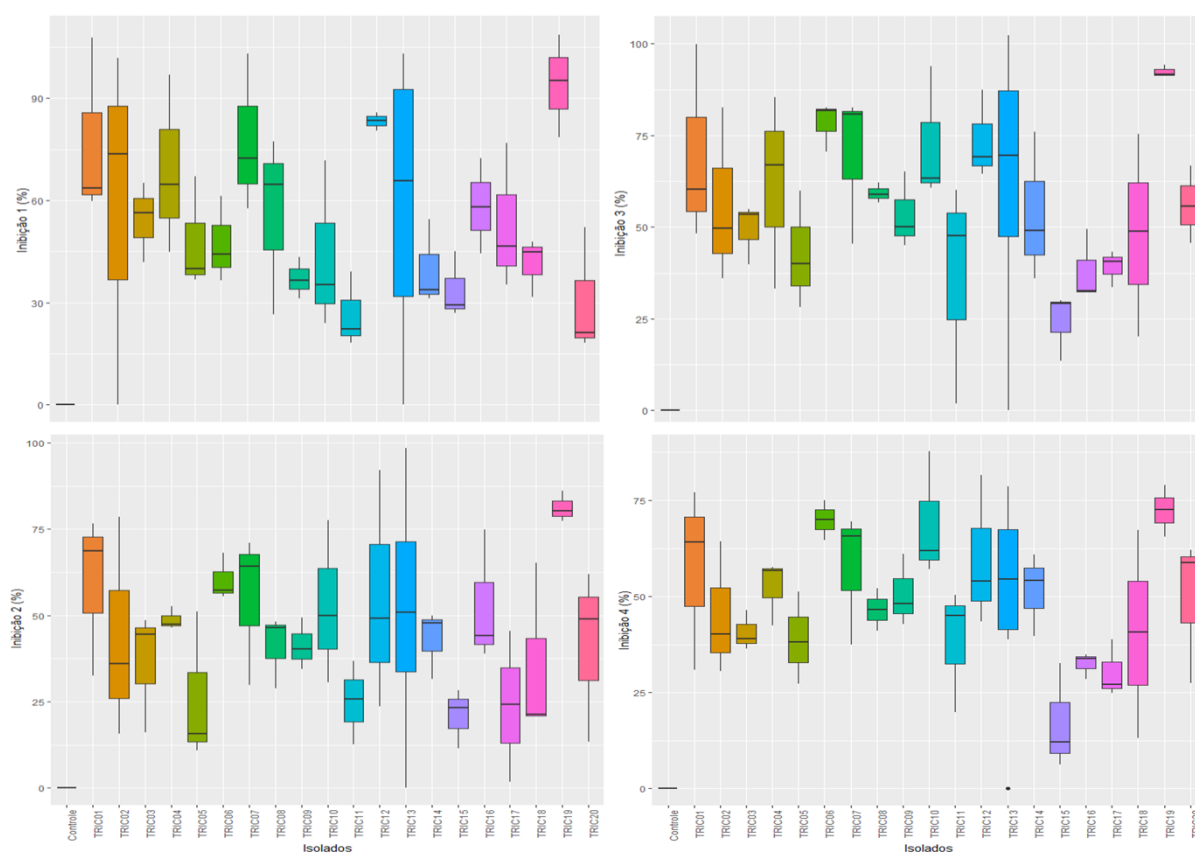
Esse efeito está em acordo com as observações de Leiva et al. (2020), que relataram que isolados de *Trichoderma* nativos da Amazônia peruana apresentaram alta eficácia na inibição de *Moniliophthora roreri*, sendo essa eficácia parcialmente atribuída à produção de compostos voláteis bioativos.

Figura 7. Boxplot representando o diâmetro da colônia de *M. perniciosa* em mm com quatro leituras, sendo estas com 5, 7, 9 e 11 dias de incubação com 20 isolados de *Trichoderma* spp. para avaliar inibição por compostos voláteis.



Os isolados Tric12 (75,4%%) e Tric19 (81,6%) apresentaram resultados significativos em termos de inibição do crescimento micelial de *M. perniciosa*, reduzindo significativamente o crescimento da colônia do patógeno nos primeiros 5 dias de incubação. O isolado Tric15 (30,6%) pode ter contribuído com o aumento do crescimento micelial de *M. perniciosa*, enquanto o isolado Tric19 iniciou precocemente a inibição do crescimento micelial e manteve essa inibição até a última leitura, com resultados significativos ($p \geq 0,001$).

Figura 8. Boxplot representando percentagem de inibição da colônia de *M. perniciosa* em mm, com quatro leituras, sendo estas com 5, 7, 9 e 11 dias de incubação com 20 isolados de *Trichoderma* spp. – Teste de Compostos Voláteis.



Os isolados de *Trichoderma* inibiram significativamente o crescimento micelial de *M. perniciosa* por meio da produção de metabólitos secundários voláteis (Figuras 11 e 12). Dourou e La Porta (2023) destacam que os metabólitos secundários voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. desempenham um papel essencial no controle biológico de patógenos vegetais. Esses compostos voláteis, como terpenos e ácidos

orgânicos, têm a capacidade de inibir o crescimento de patógenos a uma certa distância, interferindo diretamente na viabilidade dos microrganismos. Além disso, esses voláteis não apenas inibem o desenvolvimento dos patógenos, mas também influenciam a dinâmica ecológica ao redor das plantas, criando um ambiente menos propício à proliferação de organismos fitopatogênicos.

Os isolados Tric1 (40,5%), Tric7 (47,6%), Tric12 (37,3%), Tric13 (41,7%) e Tric19 (45,8%) promoveram resultados significativos a ($p \geq 0,001$), seguido dos isolados Tric 4 (55,0%) ($p \geq 0,01$) e Tric 2 (39,8%), Tric 3 (46,0%), Tric5 (37,9%), Tric 6 (43,5%), Tric8 (43,2%), Tric16 (37,6%) e Tric17 (44,7%) ($p \geq 0,05$). Além disso, os isolados Tric12 (37,3%) e Tric13 (41,7%) também mostraram boa atividade, indicando um potencial significativo para uso em biocontrole (Figuras 9 e 10). Sachdev e Singh (2020), destacaram a importância dos compostos voláteis de *Trichoderma*, não apenas na inibição de patógenos, mas também na promoção do crescimento das plantas, criando um ambiente desfavorável ao desenvolvimento de organismos fitopatogênicos.

Pelo índice de Mulamba e Mock, os isolados Tric 19, Tric 12, Tric 7, Tric 1 e Tric 4 se destacam com os melhores, considerando o conjunto de todas as variáveis analisadas para a inibição do crescimento do patógeno por compostos voláteis (Tabela 3).

Figura 9. Teste de compostos voláteis entre espécies de *Trichoderma* e o patógeno *M. perniciosa* (colônia que se apresenta sempre abaixo de todas as placas) através de pareamento em placa bipartida, em meio BDA, à $25\pm 2^\circ\text{C}$ após 11 dias. Controle (A), Tric1 (B), Tric 2 (C), Tric3 (D), Tric4 (E), Tric5 (F), Tric6 (G), Tric7 (H), Tric8 (I), Tric9 (J), Tric10 (K), Tric 11 (M), Tric 12 (N), Tric13 (O), Tric14 (P), Tric15 (Q), Tric16 (R), TRic17 (S), Tric18 (T), Tric19 (U) e Tric 20 (V).

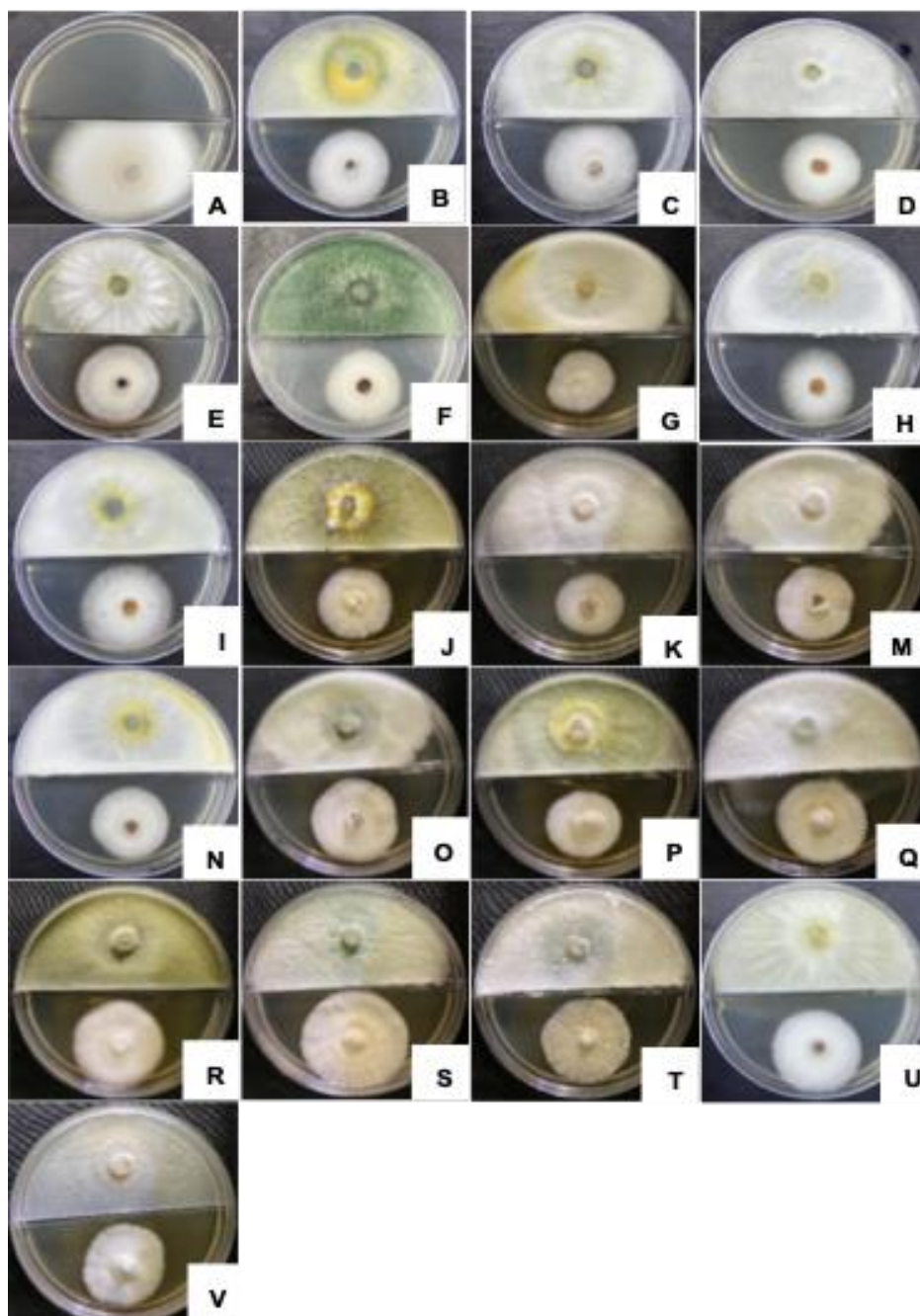


Tabela 3. Índice de Mulamba e Mock para inibição do crescimento micelial de *M. pernicioso*, após 13 dias de incubação com *Trichoderma* spp., em placas compartilhadas para avaliação do efeito de compostos voláteis.

Trat	diam1	Rank	diam2	Rank	diam3	Rank	diam4	Rank	inib1	Rank	inib2	Rank	inib3	Rank	inib4	Rank	TC1	Rank	TC2	Rank	TC3	Rank	Indice
Tric19	13.63	1	16.10	1	18.23	1	21.53	1	94.08	1	81.30	1	92.45	1	72.34	1	4.65	3	1.05	5	1.64	13	29
Tric 12	16.10	2	21.97	3	24.03	2	25.53	2	83.20	2	55.06	4	73.70	3	59.68	4	6.95	8	1.02	3	0.78	6	39
Tric 07	16.77	3	22.67	4	24.90	4	26.47	3	77.67	3	55.06	4	69.61	5	57.55	5	7.13	9	1.12	7	0.79	7	54
Tric 01	16.77	3	21.73	2	24.50	3	26.53	4	77.03	4	59.36	3	69.46	6	57.38	6	6.68	7	1.38	8	1.02	10	56
Tric 04	18.37	4	24.67	5	26.90	5	28.63	5	68.79	5	48.87	8	61.89	8	52.31	7	7.73	11	1.10	6	0.88	9	73
Tric 06	33.60	13	39.67	11	41.73	10	45.27	10	47.36	13	60.35	2	78.32	2	69.92	2	3.03	1	1.03	4	1.77	14	82
Tric 10	35.00	14	43.53	14	45.40	13	46.33	12	43.62	14	52.70	6	72.67	4	68.92	3	4.27	2	0.93	1	0.47	3	86
Tric 08	21.00	6	26.40	7	28.40	6	30.60	6	56.11	9	41.15	13	59.28	9	46.59	12	7.95	13	0.99	2	1.09	11	94
Tric 02	20.53	5	26.07	6	29.50	7	31.13	7	58.46	7	43.47	9	56.12	10	45.01	13	7.91	12	1.71	11	0.82	8	95
Tric 13	28.43	9	38.02	10	41.92	11	45.48	11	59.45	6	51.12	7	62.43	7	49.37	11	6.53	6	1.95	13	1.78	15	106
Tric 03	21.73	7	27.47	8	31.30	8	32.60	8	54.42	10	36.40	14	49.41	14	40.64	14	8.28	16	1.92	12	0.67	5	116
Tric 05	22.77	8	29.83	9	32.90	9	32.97	9	47.92	12	25.98	16	42.70	16	38.90	16	9.23	17	1.52	9	0.05	2	123
Tric 14	36.80	16	49.13	15	55.27	15	56.40	14	39.79	16	43.07	10	53.67	12	51.53	8	6.17	4	3.07	19	0.57	4	133
Tric 09	37.87	17	50.27	17	55.67	16	57.00	15	37.06	17	41.35	12	53.42	13	50.71	9	6.20	5	2.70	16	0.67	5	142
Tric 20	40.73	19	49.27	16	54.53	14	57.47	16	30.46	19	41.45	11	56.01	11	49.44	10	4.27	2	2.63	15	1.47	12	145
Tric 16	29.00	10	43.27	13	64.40	19	68.47	19	58.29	8	52.71	5	38.18	18	32.40	18	7.13	9	10.57	21	2.03	16	156
Control	30.98	11	40.48	12	43.78	12	48.67	13	0.00	21	0.00	20	0.00	21	0.00	21	7.25	10	1.66	10	2.43	18	169
Tric 18	36.13	15	52.47	18	58.47	17	63.00	17	41.40	15	35.77	15	48.14	15	40.36	15	8.17	14	3.00	18	2.27	17	176
Tric 11	42.33	20	58.87	19	64.73	20	64.40	18	26.54	20	25.15	17	36.56	19	38.40	17	8.27	15	2.93	17	-0.17	1	183
Tric 17	31.33	12	59.40	20	63.93	18	69.80	20	52.80	11	23.89	18	39.17	17	30.30	19	14.03	19	2.27	14	2.93	20	188
Tric 15	39.20	18	61.13	21	72.27	21	77.87	21	33.82	18	21.01	19	24.33	20	17.02	20	10.97	18	5.57	20	2.80	19	215

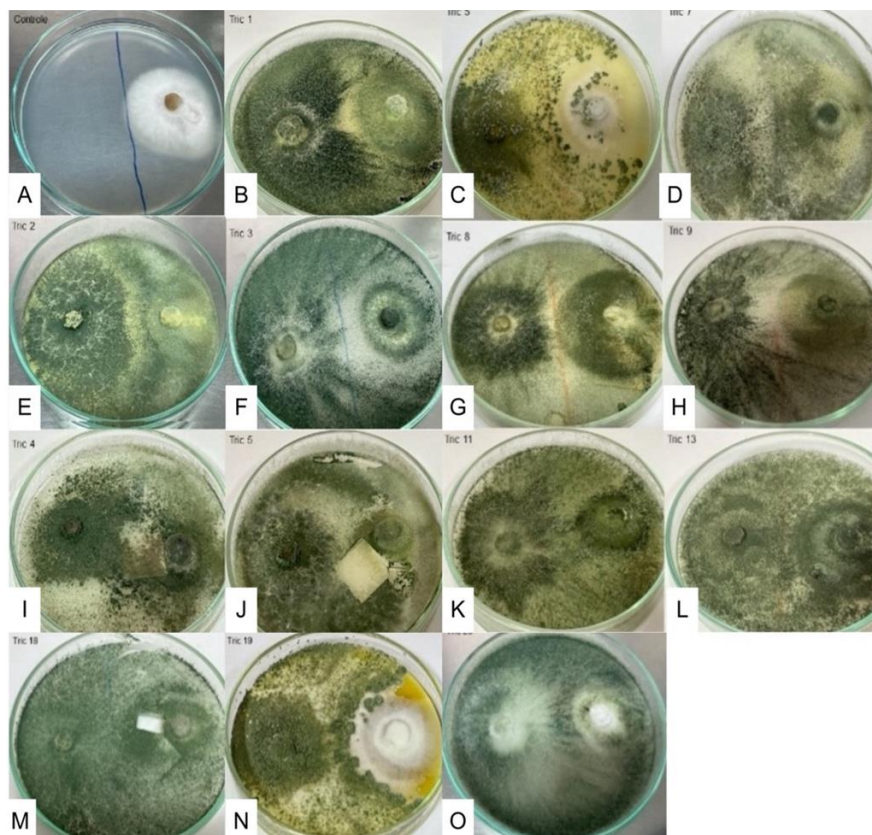
Classificação dos isolados de *Trichoderma* spp. baseada no Índice de Seleção de Mulamba e Mock, utilizando parâmetros como a porcentagem de inibição do crescimento de *Moniliophthora pernicioso*, produção de compostos não voláteis, e taxa de crescimento do isolado. Rank 1 representa o melhor desempenho para cada característica, e a soma dos ranks ponderados determina a ordem final dos isolados.

4.1 Características macro e microscópicas observadas a partir das interações antagonista-patógeno

A análise macroscópica do pareamento (Figura 10) mostrou que o antagonismo ao *M. pernicioso* pelos isolados de *Trichoderma* ocorreu com a formação de halo e pigmento amarelo, a formação de cristas com pústulas, que são formadas com esporulação intensa do *Trichoderma* e, na maioria dos casos, por um intenso crescimento e esporulação do *Trichoderma* sobre a colônia do patógeno. Essas formas de interação variaram com o isolado de *Trichoderma*. Devido ao crescimento lento do *M. pernicioso*, este fungo foi incubado por 14 dias, antes da inserção do disco de micélio do *Trichoderma*. As leituras do efeito antagônico foram realizadas após 4 e 10 dias.

As múltiplas interações em tempos diferentes de incubação demonstram o comportamento dos isolados no pareamento, sendo que, exceto para os isolados Tric 5 e Tric 19, todos apresentaram crescimento micelial sobre o patógeno. O isolado Tric 5, na segunda leitura já apresentou crescimento com formação de pústulas ao redor da colônia do patógeno. O isolado Tric 19 formou um halo com intensa pigmentação amarela e poucas pústulas ao redor da colônia do patógeno (Figuras 10 e 11). As pústulas são formações que aparecem sobre colônias de fungos hospedeiros como resultado da ação parasitária de fungos antagonistas, sendo áreas de degradação e destruição dos tecidos do fungo hospedeiro. Estas sinalizam a ação direta do micoparasita sobre o patógeno alvo, se apresentando como pequenas elevações na superfície cheias de esporos. Podemos observar a evolução da interação *Trichoderma*-patógeno no pareamento, após 4 e 10 dias de introdução do *Trichoderma* (Figuras 10 e 11), em que ocorre no início a produção de muito micélio e pigmentos. Após 10 dias já se observa intensa esporulação e formação de pústula em volta da colônia do patógeno. Os isolados começaram a esporular pelas bordas da colônia, depois cresceram e esporularam intensamente sobre a colônia do patógeno, sendo uma característica da maioria dos isolados em estudo, podendo estes ter ação de micoparasitismo.

Figura 10. Antagonismo entre espécies de *Trichoderma* e o patógeno *M. perniciosa* (colônia que se apresenta sempre à direita em todas as placas) através de duplo pareamento, em meio BDA, à $25\pm 2^\circ\text{C}$ após 10 dias de incubação.

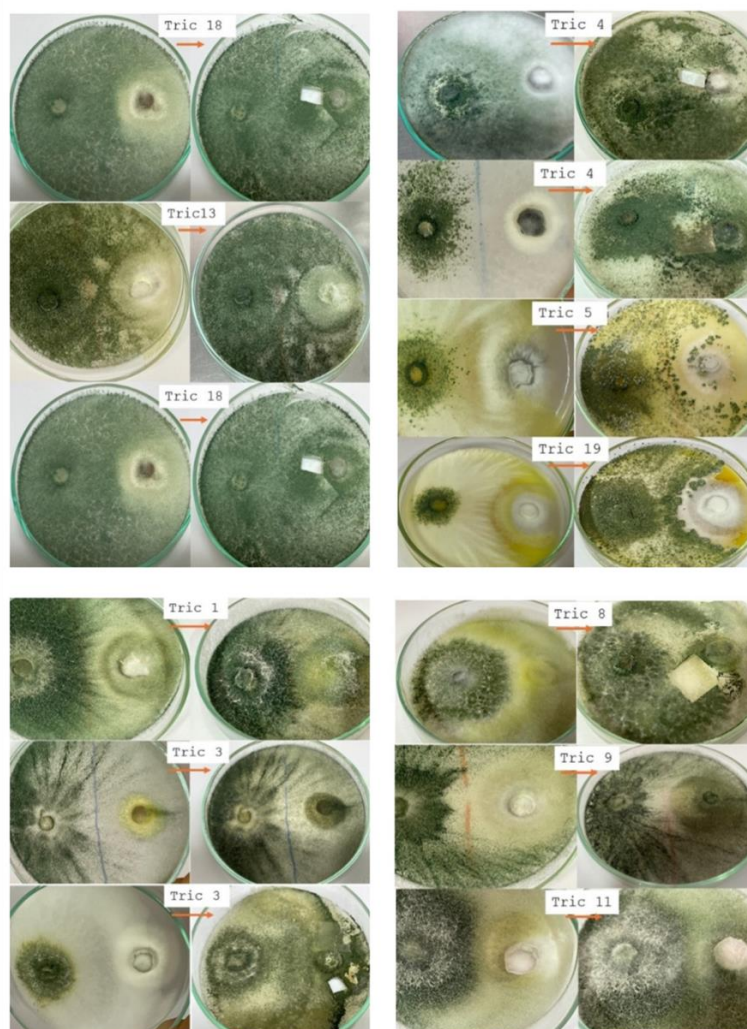


A) Tratamento controle representado por colônia única de *M. perniciosa*; B, C, E, J e N) Isolados que produziram pigmentação; B, D, E, F, G, H, I, J, L, K e M) Supercrescimento do *Trichoderma* sobre o patógeno; C, J, L e N) Isolados de *Trichoderma* com formação de pústulas (esporulação intensa); C, E e N) Formação de crista com pústulas do *Trichoderma* em volta da colônia do patógeno; C e N) Formação de halo de inibição durante a interação com o patógeno.

O micoparasitismo é um mecanismo que contribui para a eficácia de *Trichoderma* como agente de biocontrole, e envolve a degradação direta da parede celular do patógeno por meio de enzimas hidrolíticas. De Marco et al. (2003) destacam que a produção de enzimas como quitinases e glucanases por *Trichoderma* é fundamental para a degradação das hifas de *M. perniciosa*, patógeno causador da vassoura-de-bruxa em cacaueiros. Os isolados Tric19, Tric17, Tric5 e Tric9 produziram pigmentos o que indica que possivelmente produzem antibiótico. A produção de enzimas hidrolíticas causa a degradação da parede celular de patógenos, com o enovelamento e destruição de hifas do patógeno e inibição do crescimento (BENITÉZ, 2004; GAJERA, 2012). Apresentando um efeito importante quando se refere ao ataque direto de um fungo

sobre outro, o micoparasitismo é um processo complexo, que envolve eventos sequenciais, incluindo reconhecimento, ataque e subsequente penetração e morte do hospedeiro. *Trichoderma spp.* pode exercer biocontrole direto parasitando uma variedade de fungos, detectando os fungos e crescendo em sua direção (BENITÉZ, 2004; GAJERA, 2012; TROIAN, 2014).

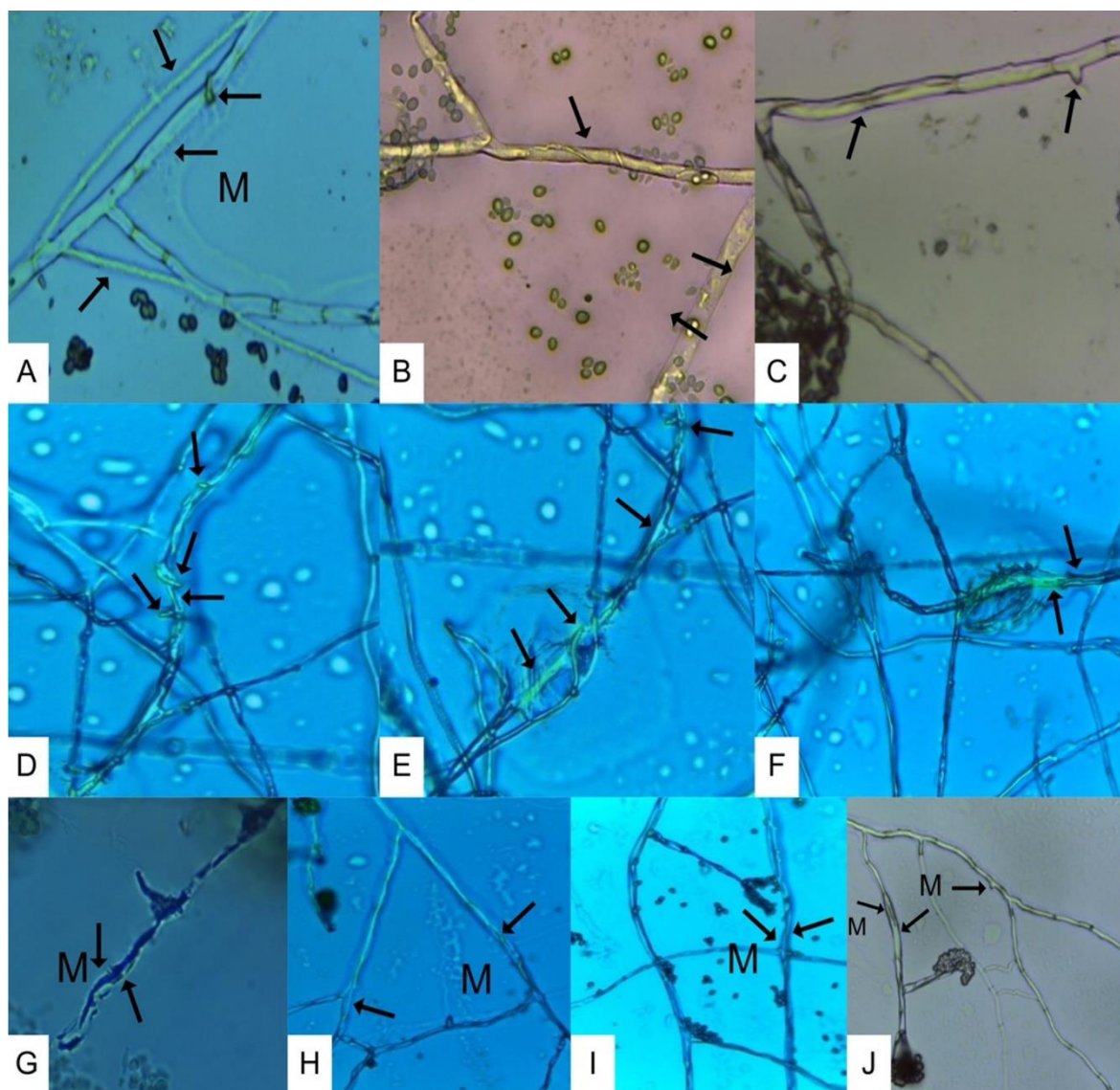
Figura 11. Isolados de *Trichoderma* em diferentes tempos de incubação. À esquerda com 4 dias de incubação e à direita com 10 dias de incubação.



Estudos descrevem que o *Trichoderma* tem sido um fungo antagonista potencial para controle de diferentes patógenos. De acordo com De-Marco (2003), os isolados de *Trichoderma* testados produziram e secretaram por indução, quantidades substanciais de enzimas quitinolíticas e glucanolíticas. Acredita-se que as enzimas quitinolíticas e as β -glucanases desempenhem um papel importante no micoparasitismo entre *Trichoderma spp* e fitopatógenos.

A interação patógeno x antagonista causou modificações nas hifas do *M. pernicioso*, com o enovelamento das hifas de *Trichoderma* em volta das hifas de *M. pernicioso*. Vários isolados de *Trichoderma* apresentaram micoparasitismo (Figuras 12 e 13). Foi possível observar o enovelamento sobre as hifas do patógeno por *Trichoderma* spp (Figura 12) sinalizando a presença de micoparasitismo. Nas imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 13) também observamos o micoparasitismo de *Trichoderma* sobre o *M. pernicioso*, com enovelamento e crescimento da hifa do *Trichoderma* sobre o patógeno.

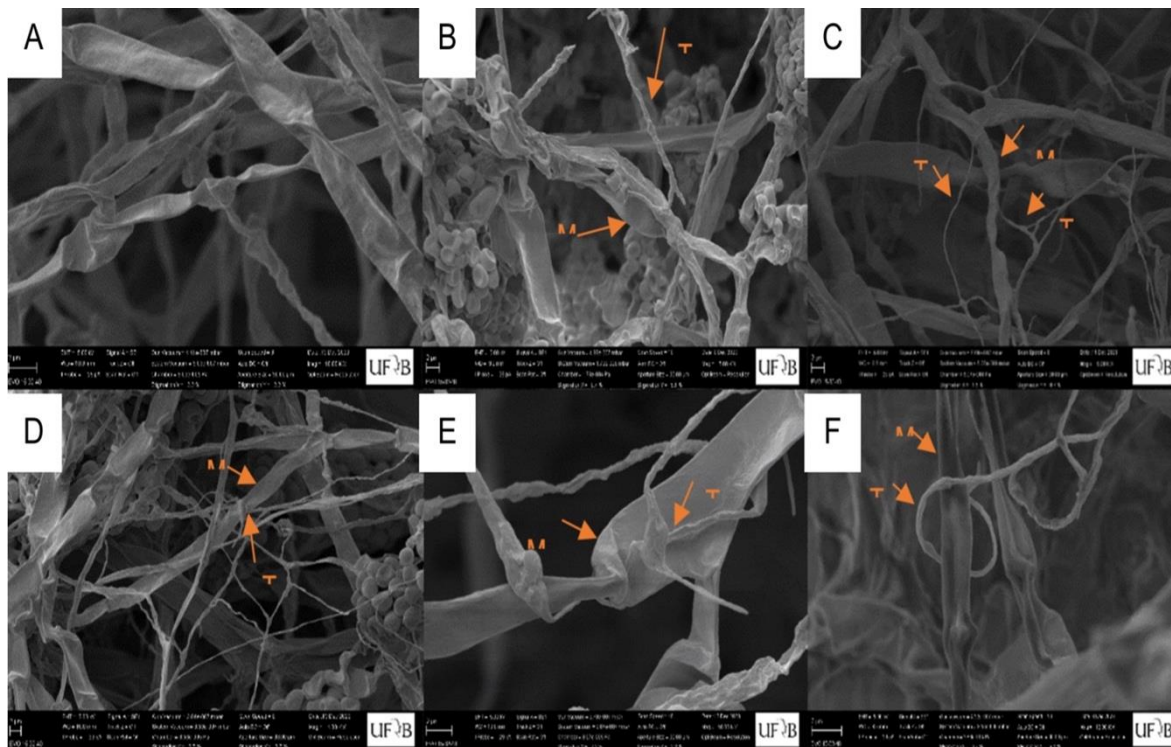
Figura 12. Fotografias de microscopia de Luz mostrando a presença de parasitismo dos isolados de *Trichoderma* spp. contra o patógeno *Moniliophthora pernicioso*.



A, B e C) setas indicam enrolamento das hifas do patógeno pelo isolado de *Trichoderma* Tric 20 G) Isolado de *Trichoderma* Tric 18 destruindo hifa do patógeno; H) Isolado de *Trichoderma* Tric1 enovelando hifas do patógeno; D, E e F) Enovelamento de hifas do patógeno realizada pelo isolado Tric 19, apresentando além de parasitismo, destruição da hifa; I) Isolado de *Trichoderma* Tric 1

indicando presença de esporos; J) Isolado de *Trichoderma* Tric 8 colonizando hifas do patógeno a partir da formação de conídios.

Figura 13. Figuras obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) ilustrando o micoparasitismo de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. sobre *Moniliophthora perniciosa*.



A – Controle com o patógeno; B – setas indicam hifas do isolado TRIC13 enovelado com o patógeno; C – isolado TRIC18 colonizando o patógeno. (D) isolado TRIC11 enrolando hifas do patógeno. (E) isolado TRIC1 e sua interação com o patógeno e (F) hifas do isolado TRIC3 enovelado no patógeno.

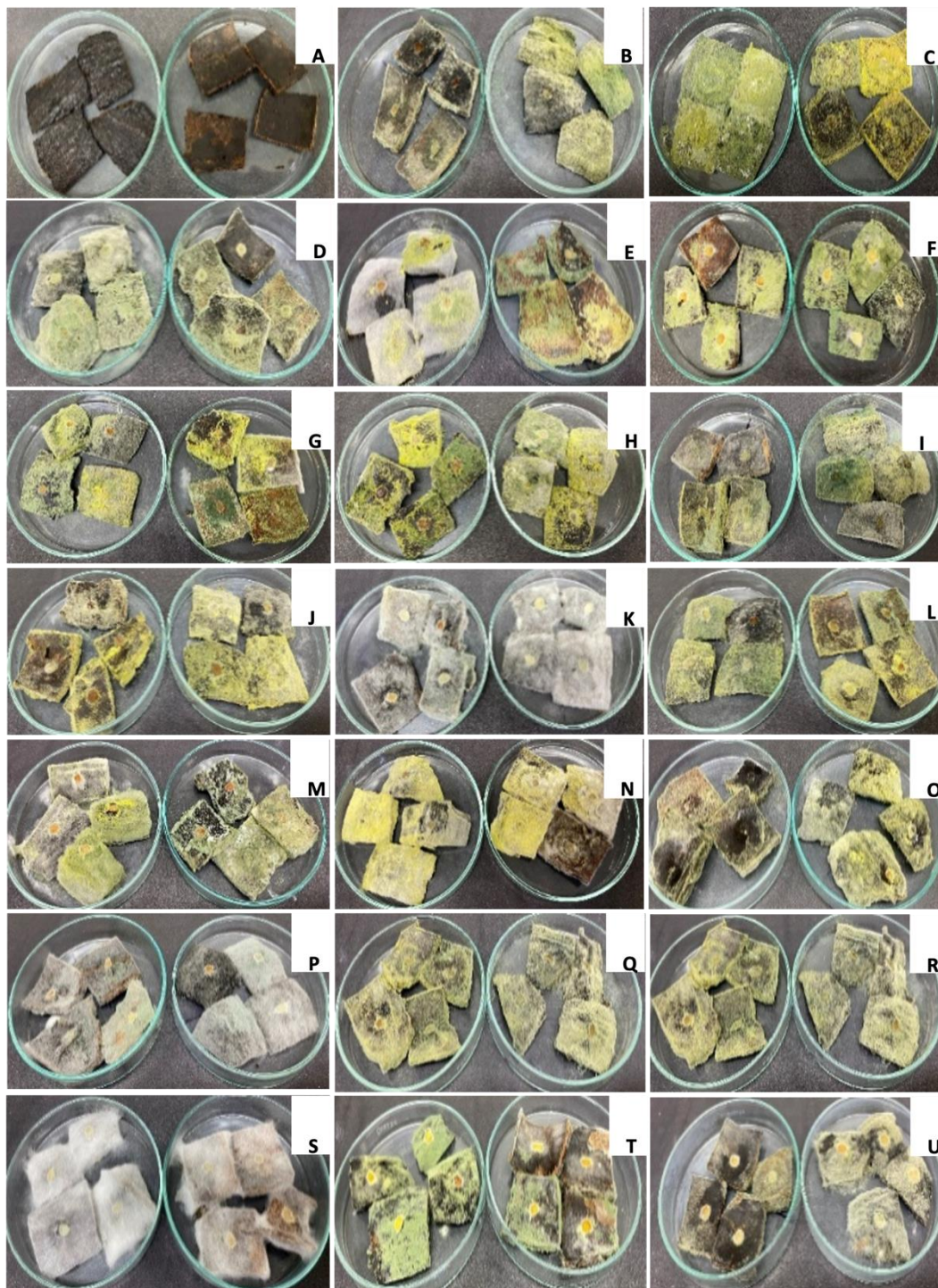
Em estudos *in vitro* demonstrou-se que enzimas líticas como proteases, amilases e celulasas, mas não antibióticos, foram produzidas pelo antagonista (*Trichoderma*). A morte de *M. perniciosa* (ex *C. Perniciosa*) em cultura e em vassouras secas de cacau, aliada à ausência de um antibiótico ativo, sustentam a ideia de que o mecanismo mais importante envolvido nesta interação parasita-hospedeiro parece ser o micoparasitismo (DE-MARCO, 2003).

Entretanto, para a produção de um bioinsumo ainda se faz necessário realizar testes em campo para compreender melhor o efeito desses isolados. Para Almeida (2007) análises adicionais da capacidade de enrolamento e atividades específicas de enzimas hidrolíticas, juntamente com análises de fatores como tolerância à temperatura, viabilidade sob condições de estresse, taxa de

crescimento e seleção de formulação, permitirão a produção de um melhor agente de biocontrole de *Trichoderma*.

Os isolados de *Trichoderma* colonizaram o casqueiro esterilizado, apresentando diferentes comportamentos em relação a área de superfície dos casqueiros colonizada e esporulada ao longo dos dias de incubação (Figura 14). O isolado Tric1 apresentou colonização micelial de 100% em apenas 3 dias, com esporulação observada aos 5 dias, abrangendo 35 a 40% da superfície colonizada. O isolado Tric2 foi mais rápido na colonização micelial do casqueiro, alcançando 87% da superfície aos 3 dias e, aos 5 dias, atingiu 100% de colonização com esporulação em toda a superfícies do casqueiro. O Tric3 apresentou colonização micelial inicial de 60 a 65% aos 3 dias, evoluindo para esporulação de 50 % da superfície colonizada, aos 5 dias após a incubação. De forma semelhante, o isolado Tric4 apresentou 60% de colonização por micélio aos 3 dias, mantendo essa proporção até o quinto dia, porém com presença significativa de esporos. O isolado Tric5, por sua vez, alcançou 87% de colonização micelial aos 3 dias, e ao final de 5 dias, alcançou 75% da superfície com esporulação. O isolado Tric6 apresentou apenas 37% de cobertura por micélio aos 3 dias, mas aos 5 dias, a colonização com esporulação atingiu 60%. O Tric7 destacou-se por colonizar completamente o casqueiro em apenas 3 dias, com micélio e esporos, alcançando 100% de superfície dos casqueiros ao final de 5 dias. O isolado Tric8, por outro lado, colonizou 75% do casqueiro com micélio aos 3 dias, enquanto a esporulação atingiu 50% aos 5 dias. Os resultados do isolado Tric9 indicaram uma colonização inicial de 25% com esporulação aos 3 dias e com uma relevante presença de micélio de cor branca plumosa, que aumentou para 62% ao final de 5 dias. O isolado Tric10, por sua vez, apresentou 87% de colonização micelial aos 3 dias, com esporulação atingindo 37% da superfície aos 5 dias. O isolado Tric11 colonizou 75% da superfície dos casqueiros aos 3 dias e apresentou 75% de superfície do casqueiro esporulada aos 5 dias. De forma semelhante, o isolado Tric12 colonizou 75% da superfície dos casqueiros com o micélio e poucos esporos aos 3 dias, e com 65% da superfície esporulada aos 5 dias. O isolado Tric13 alcançou 85 a 90% de colonização por micélio aos 3 dias, e aos 5 dias, a esporulação atingiu 50%. O isolado Tric14 demonstrou uma colonização micelial de 100% aos 3 dias, com 50% da superfície esporulada ao final do quinto dia. O isolado Tric15 apresentou 50% de colonização por micélio em 3 dias, mantendo essa proporção ao final de 5 dias.

Figura 14. Colonização por isolados de *Trichoderma* em casqueiros esterilizados, partes interna e externa casqueiro, após nove dias de incubação. Controle (A), Tric1 (B), Tric 2 (C), Tric3 (D), Tric4 (E), Tric5 (F), Tric6 (G), Tric7 (H), Tric8 (I), Tric9 (J), Tric10 (K), Tric 11 (L), Tric 12 (M), Tric13 (N), Tric14 (O), Tric15 (P), Tric16 (Q), TRic17 (R), Tric18 (S), Tric19 (T) e Tric 20 (U).



O isolado Tric16 se destacou ao colonizar 100% do casqueiro com pouca presença de micélio e intensa esporulação aos 3 dias, e ao final de 5 dias, a

colonização com esporulação também foi de 100%. O isolado Tric17 apresentou uma colonização inicial de 60 a 65% com esporulação aos 3 dias, que se manteve após 5 dias. Para o isolado Tric18, houve 100% de colonização micelial aos 3 dias, mantendo esta colonização branca plumosa, com a presença de micélio ao final de 5 dias. O isolado Tric19 apresentou 50% de colonização e esporulação aos 3 e 5 dias, apresentando resultados melhores ao longo de 9 dias, quando a esporulação alcançou o máximo. Por fim, o isolado Tric20 apresentou 50% de colonização com esporulação aos 3 e 5 dias, com presença de micélio de cor branca plumosa

O potencial de isolados de *Trichoderma* em colonizar os casqueiros e inibir o crescimento do patógeno *in vitro*, por compostos voláteis e não-voláteis e por micoparasitismo foi demonstrado neste estudo. Os melhores isolados de *Trichoderma* são os codificados como TRIC19, TRIC12, TRIC13 e TRIC4, sendo os mais promissores para o biocontrole de *M. perniciosa*, agente causal da Vassoura de bruxa no cacaueiro.

5.0 CONCLUSÕES

Este estudo demonstra o potencial de uso de diferentes espécies de *Trichoderma*, obtidas de plantios de cacau, para o controle biológico da vassoura-de-bruxa no cacaueiro.

Os melhores isolados indicados nos testes de compostos voláteis e do pareamento foram Tric12, Tric19, Tric13 e Tric4, os quais também apresentaram melhores percentagem de colonização dos casqueiros.

A continuidade das pesquisas com esses isolados, incluindo testes em casa de vegetação e em campo, e a formulação de bioprodutos, pode contribuir significativamente para o controle da vassoura de bruxa em cacaueiros.

6.0 REFERÊNCIAS

- ACÁSSIA, P. B. L.; GRAMACHO, K. P.; SILVA, D. C.; GÓES-NETO, A.; SILVA, M. M.; MUNIZ-SOBRINHO, J. S.; PORTO, R. F.; VILLELA-DIAS, C.; BRENDEN M.; CASCARDO, J. C. M. and PEREIRA, G. A. G. Early Development of *Moniliophthora Perniciosa* Basidiomata and Developmentally Regulated Genes. **Microbiology**, v. 9, n.1, 2009.
- ADJALOO, M. K. ODURO, W. BANFUL, B. K. "Floral Phenology of Upper Amazon Cocoa Trees: Implications for Reproduction and Productivity of Cocoa." **ISRN Agronomy** 2012 (2012): 1-8.
- AGUILAR, M. A. G.; SOUZA, C. A. S.; DIAS, L. A. dos S.; MARINATO, C. S. Botânica e Morfologia. Capítulo 3 –Livro: **Cacau – do plantio à colheita**. Ed.: UFV – 2016 Viçosa, MG. Editores Carlos Alberto Spaggiari Souza.
- ALMEIDA, F. B. dos R.; CERQUEIRA, F. M.; SILVA, R. do N.; ULHOA, C. J.; LIMA, A. L. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**. v.29 p. 1189-1193, 2007.
- AMORIM, A. O.; ORLANDELLI, R. C.; PAMPHILES, J. A. Control of cocoa plant (*Theobroma cacao* L.) pathogens by fungal endophytes from genera *Trichoderma* and *Clonostachys*. **Revista Uningá**, 2019.
- BAILEY, B.A. BAE, H. STREM, M.D. CROZIER, J. THOMAS, S.E. SAMUELS, G.J. VINYARD, B.T. HOLMES, K.A. Antibiosis, Mycoparasitism and Colonization Success for Endophytic *Trichoderma* Isolates with Biological Control Potential in *Theobroma Cacao*. **Biological Control**, v. 46, n.1, 2008.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CONDÓN, L. A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology** v.7 p. 249-260, 2004.
- CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia** v.91 p. 553–556, 1999.
- CHARRAD, M.; GHAZZALI, N.; BOITEAU, V.; NIKNAFS, A. NbClust: An R Package for Determining the Relevant Number of Clusters in a Data Set. **Journal of Statistical Software**, v. 61, n. 6, p. 1-36. 2014.
- CHIAPETTI, J. **Produção de cacau na Bahia**: Análise da trajetória política e econômica. Capítulo 1-Cacau: Cultivo, Pesquisa e inovação, ed.: editus Ilhéus 2018. (p13 a 58).
- CROZIER, J. ARROYOA, C. MORALES, H. MELNICK, R. L. STREMB, M. D. VINYARD, B. T. COLLINS, R. HOLMES, K. A. BAILEY, B. A. The influence of formulation on *Trichoderma* biological activity and frosty pod rot management in *Theobroma cacao*. **Plant Pathology**. v.64, 2015.
- DE MARCO, J. L.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FELIX, C. R. Production of Hydrolytic Enzymes by *Trichoderma* Isolates with Antagonistic Activity against

Crinipellis Perniciosa, the Causal Agent of Witches' Broom of Cocoa. **Brazilian journal of microbiology** v. 34 (2003): p. 33-38.

DENNIS, C. Y. WEBSTER, J. Antagonistics properties of species-groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57 p. 41-48, 1971.

DOUROU, M.; LA PORTA, C. A. M.; A Pipeline to Investigate Fungal–Fungal Interactions: *Trichoderma* Isolates against Plant-Associated Fungi. **Plant-Associated Fungi. J. Fungi**, v.9, n.461, 2023.

EMBRAPA, 2021. FERREIRA, A. L.; BRITO, S. Portfólio Insumos biológicos. **Revista Embrapa**, 2021.

FIORAVANTI, C. H.; VELHO, L. Fungos, Fazendeiros E Cientistas Em Luta Contra a Vassoura-de-bruxa Fungi, Farmers and Scientists Fighting Witch's Broom Disease. **Sociologias**, v.13, n.27, p. 256-83, 2011.

FORMIGHIERI, E. F. **Genoma de *Moniliophthora perniciosa*: Montagem e Anotação da Mitocôndria e desenvolvimento de sistema de anotação semiautomático de genes**. Universidade Estadual de Campinas, Capinas, São Paulo, Brasil, 2006. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular).

FUENTES, M.; BAIGORRI, R.; GARCIA_MINA, J. M. Maturation in composting process, an incipient humification-like step as multivariate statistical analysis of spectroscopic data shows. **Environmental Research**, 2020.

GOMES, A. da S.; PIRES, M. de M. Cacauicultura: estrutura produtiva, mercados e perspectivas. Ilhéus/Bahia: **Editores da UESC**, 272p., 2015.

KRAUSS, Ulrike. SOBERANIS, Whilly. Biocontrol of Cocoa Pod Diseases with Mycoparasite Mixtures. **Biological Control** v.22, n. 2, p. 149-158, 2001.

LAHIVE, F.; HANDLEY, L. R.; HADLEY, P.; DAYMOND, A. J. Climate Change Impacts on Cacao: Genotypic Variation in Responses of Mature Cacao to Elevated CO₂ and Water Deficit. **Agronomy** (Basel), v.11, n.5, 2021.

LEIVA, S.; OLIVA, M.; HERNÁNDEZ, E.; CHUQUIBALA, B.; RUBIO, K.; GARCÍA, F.; DE LA CRUZ, M. Torres. Assessment of the Potential of *Trichoderma* spp. Strains Native to Bagua (Amazonas, Peru) in the Biocontrol of Frosty Pod Rot (*Moniliophthora roreri*). **Agronomy**, v.10, n. 9, 2020.

LEIVA, Santos. RUBIO, Karol. DIAZ-VALDERRAMA, Jorge R. GRANDA-SANTOS, Milagros. MATTOS, Leonor. Phylogenetic Affinity in the Potential Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Moniliophthora roreri*. **Agronomy** v.12, n.9, 2022.

LOPES, A. R. de O. **Preparação, caracterização e viabilidade de *Trichoderma asperellum* T356 em cápsulas de alginato**. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil, 2018. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente).

MANTEL, N. The detection of disease clustering and generalized regression approach. **Cancer Research**, Birmingham, v.27, n.2, p.209-220, 1967.

MAXIMOVA, J. P. M.; GRAMACHO, S. N.; KANG, K. P. S.; GUILTINAN, M. J. Infection biology of *Moniliophthora perniciosa* on *Theobroma cacao* and alternate solanaceous hosts. **Tropical Plant Biol.** V.2 p.149–160, 2009.

MBARGA, J.B.; HOOPEN, G. M. T.; KUATÉ, J.; ADIOBO, A.; NGONKEU, M. E. L.; AMBANG, Z.; AKOA, A.; TONDJE, P. R.; BEGOUDE, B. A. D. *Trichoderma asperellum*: A potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. **Crop Protection**, v.36, 2012 p. 18-22, 2012.

MEJÍA, L. C.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; BAEL, S. V.; ARNOLD, A. E. A.; HEBBAR, P.; SAMUELS, G. J.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Science Direct - Biological Control** v 46 p.4–14, 2008.

MELO, I. S. de.; AZEVEDO, J. L. de. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Editora Embrapa Meio Ambiente, 2000, 388p.

MINGOTI, S.A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada**: uma abordagem aplicada. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2013. 297 p.

MULAMBA, N. N.; MOCK, J. J. Improvement of yield potential of the ETO blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. **Egyptian Journal of Genetics and Cytology**, Cairo, v. 7, n. 1, p. 40-51, 1978.

MULLER, M. W.; VALLE, R. R. **Ecofisiologia do cultivo do cacaueiro**. Capítulo 2 – Livro: Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacaueiro. Ed.: VITAL Ltda, Itabuna, BA – 2007.

NIEMENAK, N.; CILAS, C.; ROHSIUS, C.; BLEIHOLDER, H.; MEIER, U.; LIEBEREI, R. Phenological Growth Stages of Cacao Plants (*Theobroma* Sp.): Codification and Description According to the BBCH Scale. **Annals of Applied Biology** v.156, n.1, p. 13-24, 2010.

PAIVA, A. de Q.; ARÉVALO-HERNÁNDEZ, C. O.; BALIGAR, V. C.; FERNANDES, R. B. **Atributos físicos do solo para a cultura do cacaueiro**. Capítulo 7- Livro: Cacao: Cultivo, Pesquisa e inovação, ed.:editus Ilhéus, p 215-233, 2018.

PAKDAMAN, B. S.; GOLTAPPEH, E. M.; SOLTANI, B. M.; TALEBI, A. A.; NADEPOOR, M.; KRUSZEWSKA, J. S.; PILSY, S.; SARROCCO, S.; VANNACCI, G. Toward the quantification of confrontation (Dual Culture) test: a case study on the biological control of *Pythium aphanidermatum* with *Trichoderma asperelloides*. **Journal of Biofertilizers & Biopesticides**. v. 4, n.2, 2013.

PIRES, A. B. L.; GRAMACHO, K. P.; SILVA, D. C.; GÓES-NETO, A.; SILVA, M. M.; MUNIZ-SOBRINHO, J. S.; PORTO, R. F.; VILLELA-DIAS, C.; BRENDDEL, M.; CASCARDO, J. C. M.; PEREIRA, G. A. G. Early development of *Moniliophthora*

perniciosa basidiomata and developmentally regulated genes. **BMC Microbiology** v. 9 p.158, 2009.

PROGRAMA R CORE TEAM R: A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2024. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

RAHIM, A. The role of local isolates of *Trichoderma* sp. as a decomposer in the substrate of cacao pod rind (*Theobroma cacao* L.), 2020.

REHNER, S. A. 2011. **Primers for elongation factor 1-alpha (EF1-alpha)**. Disponível em: www.aftol.org/pdfs/EF1primer.pdf. Acesso em: junho de 2019.

RIVERA – FENÁNDEZ, R. D.; VALAREZO BELTRON, O.; VERA-MACÍAS, L. CHAVARRÍA-PÁRRAGA, J. E.; GUZMÁN-CEDENO, Á. M. The Phytosanitary pruning effect on the witches' broom disease in the cocoa farming. **Revista Intropica** v. 9 p. 129 – 136, 2014.

ROS, M.; GARCÍA C.; HERNÁNDEZ, T. A Full-scale Study of Treatment of Pig Slurry by Composting: Kinetic Changes in Chemical and Microbial Properties. **Waste Management**, v. 26, n. 10, p. 1108-1118, 2006.

ROSMANA, A.; NASARUDDIN, N.; HENDARTO, H.; HAKKAR, A. A.; AGRIANSYAH, N. Endophytic Association of *Trichoderma asperellum* within *Theobroma cacao*. Suppresses Vascular Streak Dieback Incidence and Promotes Side Graft Growth. **Mycobiology**, v.44, n.3, 2016.

SACHDEV, S.; SINGH, R. P. **Trichoderma**: A Multifaceted Fungus for Sustainable Agriculture - Ecological and Practical Applications for Sustainable Agriculture, p.261-304, 2020.

SANOGO, S.; POMELLA, A.; HEBBAR, P. K.; BAILEY, B.; COSTA, J. C. B.; SAMUELS, G. J.; LUMSDEN, R. D. Production and Germination of Conidia of *Trichoderma stromaticum*, a Mycoparasite of *Crinipellis perniciosa* on Cacao. **The American Phytopathological Society**, v.29, n.10, p.1-6, 2007.

SANTOS, J. H. dos; HOYOS, A. E. O Trabalho no Cacao Cabruca: conhecimento tradicional e agroecológico no assentamento Terra Vista no sul da Bahia. **Fotocronografias**, v.6, n.13, 2020.

SENA, K.; ALEMANN, L.; GRAMACHO, K. P. The infection process of *Moniliophthora perniciosa* in cacao. **Plant Pathology**, 2014.

SHAH, M. M.; AFIYA, H. Identification and Isolation of *Trichoderma* spp. - Their Significance in Agriculture, Human Health, Industrial and Environmental Application. 1 capítulo, **IntechOpen**, 2019.

SNEATH, P.H.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 1973.

SODRÉ, G. A.; VENTURINI, M. T.; RIBEIRO, D.O.; MARROCO, P. C. L. Extrato da casca do fruto do cacaueiro como fertilizante potássico no Crescimento de Mudas de Cacaueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.34, n.3, 2012.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v.11, p. 33-40, 1962.

SOUZA, R. A de. **Combinação de Isolados de *Trichoderma spp.* para o controle de podridão vermelha do sisal** (Dissertação), 2016. Cruz das Almas (63 páginas).

SOUZA, W. W. de; BRITO, N. F.; ELSEMBURGH, C. A.; VIEIRA, T. A.; LUSTOSA, D. C. Evaluation of *Trichoderma* spp. Isolates in Cocoa Seed Treatment and Seedling Production. **Plants**, v.10, n.9, 2021.

TAGHDI, Y.; HERMOSA, R.; DOMÍNGUEZ, S.; RUBIO, M. B.; ESSALMANI, H.; NICOLÁS, C.; MONTE, E. Effectiveness of composts and *Trichoderma* strains for control of Fusarium wilt of tomato. **Phytopathologia Mediterranea**, p. 232-240, 2015.

THOMAZELLA, D. P. T.; TEIXEIRA, P. J. P. L.; OLIVEIRA, H. C.; SAVIANI, E. E.; RINCONES, J.; TONI, I. M.; REIS, O.; GARCIA, O. L. W.; MEINHARDT, I. S.; PEREIRA, G. A. G. The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. **New Phytologist** v.194 p.1025–1034, 2012.

TROIAN, R. F.; STEINDORFF, A. S.; RAMADA, M. H. S.; ARRUDA, W.; ULHOA, C. J. Mycoparasitism Studies of *Trichoderma Harzianum* against *Sclerotinia Sclerotiorum*: Evaluation of Antagonism and Expression of Cell Wall-Degrading Enzymes Genes. **Biotechnology letters**, v.36 n.10, p. 2095-2101, 2014.