



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE  
PERNAMBUCO**

*PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO*



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM FITOPATOLOGIA**

**Dissertação de Mestrado**

**Estudo de componentes para o manejo da monilíase do  
cacaueiro (*Moniliophthora roreri*)**

**Ailton da Silva Estrela Júnior**

**Recife – PE  
2020**

**AILTON DA SILVA ESTRELA JÚNIOR**

**ESTUDO DE COMPONENTES PARA O MANEJO DA MONILÍASE DO  
CACAUEIRO (*Moniliophthora roreri*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Orientador: Delson Laranjeira

Coorientadores: Karina Peres Gramacho, Antonio A. Pimenta Neto

e Zoila Karina Solís (Equador)

**RECIFE – PE  
FEVEREIRO - 2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

E82e Estrela Júnior, Ailton da Silva  
Estudo de componentes para o manejo da monilíase do  
cacaueiro (*Monilophthora roreri*) / Ailton da Silva Estrela Júnior. -  
2020.  
85 f. : il.

Orientador: Delson Laranjeira.  
Coorientadora: Karina Peres Gramacho.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife,  
BR-PE, 2020.  
Inclui referências e anexo(s).

1. Cacaueiro – Doenças e pragas 2. Fungos fitopatogênicos  
3. *Monilophthora roreri* 4. Fungo para controle biológico 5. Defesa  
vegetal 6. Epidemiologia I. Laranjeira, Delson, orient. II. Gramacho,  
Karina Peres, coorient. III. Título

CDD 632

**ESTUDO DE COMPONENTES PARA O MANEJO DA  
MONILÍASE DO CACAUEIRO (*Moniliophthora roreri*)**

**AILTON DA SILVA ESTRELA JÚNIOR**

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 28/02/2020

**ORIENTADOR:** \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

**EXAMINADORES:**

\_\_\_\_\_  
Dr. Delson Laranjeira

\_\_\_\_\_  
Dr<sup>a</sup> Karina Peres Gramacho

\_\_\_\_\_  
Dr<sup>a</sup> Iwanne Lima Coelho

**RECFE-PE  
FEVEREIRO – 2020**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente ao universo, pelo seu poder em fazer com que as coisas aconteçam e que, do começo ao fim, com o bom e o ruim, nos ensina tanto como sermos humanos e termos humanidade.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE pelo apoio em diferentes âmbitos dado aos alunos da instituição e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Aos professores do Programa de Fitopatologia – UFRPE pelos ensinamentos essenciais para a minha formação como profissional e aos funcionários Romildo e Darcy.

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup> Dr. Delson Laranjeira e aos coorientadores Dr<sup>o</sup> Antônio Neto e Dr<sup>a</sup> Zoila Karina Solís e Dr<sup>a</sup> Karina Peres Gramacho, pelo apoio oferecido.

Aos colaboradores do INIAP, aos amigos do Equador que me abraçaram, os quais foram essenciais para o desenvolvimento do projeto fora do Brasil, em especial a Edwin, Paola, Mario, Nancy, Tamara, Dr<sup>a</sup> Beth, Dr<sup>o</sup> Danilo Vera, Dr<sup>o</sup> Ivan e Sofia.

A Catarina Cotrim (ADAB) pela colaboração e ao Ministério público da Bahia pelo financiamento o qual possibilitou o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço aos meus pais Ailton (*In memoria*) e Silvia que me ensinaram e ensinam tanto sendo um espelho construtor.

A toda minha família por ser meu suporte a cada momento da minha vida, em especial a minha primadrinha Roberta Barbosa, minhas tias, tios, minha irmã Jessica e meu sobrinho Gabriel, e aos meus primos, em especial a Laisa, Letícia, Gustavo, Vitor e Nat.

Aos colegas do programa pela companhia na caminhada, em especial a Pedro, Athaise, Suzi, Isabella, Jessica, Angélica, Junior e Alba, obrigado.

À Iwanne Coelho pelo apoio durante minha passagem no LAFSOL e pela ajuda a distância.

Aos colegas e companheiros que fazem e fizeram parte do FITOMOL, com os quais compartilhei muitas risadas durante anos, em especial a Vanessa, Sátiro, Milena, Ces, Nath, Beth

Agradeço imensamente aos meus amigos, Bianca, Erika, Vanessa, Cath, Ivanna, Aline, Samara, Grazi, Fran, Lari, Maylan e Gabe que nos momentos que eu mais precisei estiveram ao meu lado ou ainda me ouvindo por horas a fio do outro lado do telefone.

A Jonathan, quem me incentivou a entrar nessa jornada e que também me ensinou muito na vida, não poderia deixar de agradecer.

*Aos meus pais Silvia e Ailton (In memoria), aos meus avós Helena e Humberto (In memoria), Hamilton (In memoria) e Antônia (In memoria); à minha madrinha Roberta Barbosa; as meus tios pelo apoio, em especial Marise, Márcia e Hilza;, Bia, Van, Ivanna e demais amigos pelo companheirismo e a todos aqueles que me desejaram e desejam o bem.*

**DEDICO**

*As bandas Francisco, el hombre, 5 a seco, Duda Beat, Letrux, Liniker, Pitty, Fresno, Sandy, Paola Navarrete e tantas outras que me acompanharam durante as solitárias horas de trabalho me dando força, espantando meus demônios e me fazendo reconhecer através de suas letras.*

**OFEREÇO**

*“Solidão apavora  
Tudo demorando em ser tão ruim  
Mas alguma coisa acontece  
No quando agora em mim  
Cantando eu mando a tristeza embora  
Cantando eu mando a tristeza embora...”*

## RESUMO GERAL

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) apresenta como grande entrave para a sua produção diversas doenças fúngicas, sendo a monilíase (*Moniliophthora roreri*) de grande relevância a nível mundial, identificada em 13 países, mas ainda não relatada no Brasil. Medidas legislativas atuam para conter a introdução através de materiais vegetais que possam conter propágulos infectivos do patógeno. Leveduras compõem um grupo de organismo utilizado no biocontrole que pode apresentar potencial para o controle da monilíase. O presente trabalho teve como objetivos avaliar a sobrevivência de propágulos de *M. roreri* em sementes de frutos doentes durante o processo de fermentação a cada 24 horas, a partir do plaqueamento de fragmentos de sementes doentes em meio batata dextrose ágar, observando o desenvolvimento de colônias fúngicas, avaliar a viabilidade de esporos secos aderidos a materiais inertes, inoculando esporos do patógeno em amostras de 1 cm<sup>2</sup> de papel, tecido, plástico, vidro, borracha, rafia e alumínio, mensurada através da germinação dos esporos em meio Sabouraud ágar, suplementado com extrato de levedura, incubados por 72 horas, nos períodos de 7, 15, 30, 45 e 100 dias após a inoculação, e isolar leveduras provenientes de tecidos vegetais saudáveis de cacauieiro e avaliar seu potencial biocontrolador em relação ao crescimento *in vitro* do patógeno, selecionando a partir do cultivo pareado entre *M. roreri* os isolados de levedura que apresentaram melhores índices de controle, procedendo a identificação molecular desses isolados, os mecanismos de ação dos isolados selecionados foram estudados quanto a produção de compostos orgânicos antifúngicos, compostos orgânicos antifúngicos termoestáveis, cultivo conjunto e formação de biofilme. Esporulação em testas de sementes e crescimento do fitopatógeno em meio de cultura a partir de sementes infectadas foram observados nos tempos iniciais do processo de fermentação (0 a 24 horas), não sendo observados propágulos de *M. roreri* quando submetidas ao processo de fermentação por 48 horas. Os esporos aderidos a materiais inertes apresentaram-se viáveis durante todos os intervalos de avaliação, apresentando percentual de até 26,6% de esporos viáveis após 100 dias. Os isolados de leveduras controlaram o fitopatógeno *in vitro*, os isolados selecionados não apresentaram crescimento em temperatura corpórea, os quais apresentaram diferentes índices de formação de biofilme. O conhecimento da epidemiologia da doença e a busca por componentes de manejo do patógeno podem auxiliar no controle da monilíase, bem como na adoção de medidas que mitiguem a entrada do patógeno em áreas índenes.

**Palavras-chaves:** biocontrole, viabilidade, cacau, biossegurança.



## GENERAL ABSTRACT

Cacao tree (*Theobroma cacao* L.) shows a diverse fungal disease limiting the production, being the frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) the most important worldwide, related in 13 countries, the disease is not present in Brazil. Legislative measures act to control introduction of plant materials that can act transport *M. roreri* infectious propagules. Yeasts are part of an organism group employed in the biocontrol that can show positive characteristics to control frosty pod rot disease. The present work aims to evaluate the survival of *M. roreri* in unhealthy cocoa beans at intervals of 24 hours during the fermentation process, through plating fragments of the beans in potato dextrose agar medium, watching the rise of fungal colonies, evaluate the spores viability of *M. roreri* adhered to inert materials, inoculating dry spores of the pathogen in 1 cm<sup>2</sup> samples of fabric, plastic, glass, tire, raffia and aluminum, assessing by germination in Sabouraud agar medium, supplemented with yeast extract, after 72 hours at 7, 15, 30, 45 and 100 days after inoculation, and evaluate the biocontrol potential of yeasts isolated from healthy cacao tissues over *M. roreri* isolates, selecting the yeasts isolates through dual culture, proceeding the molecular identification, their mode was studied by antifungal secondary metabolites production, antifungal volatile compounds production, biofilm formation, thermostable and filtered antifungal organic compounds. Sporulation in unhealthy beans forehead and growing in culture medium was presented in the initial evaluated periods of beans fermentation (0 and 24 hours), *M. roreri* propagules was not observed in unhealthy beans fermented up to 48 hours. The spores remained viable during all the evaluation period, showing at 100 days after inoculation maximum rate of 26,6% of viable spores. The yeasts isolates controlled *in vitro* the phytopathogen, the selected isolates did not grow in body temperature, showing different indexes of biofilm formation. The knowledge about the disease epidemiology and the search for new control components to manage the disease can help in the frosty pod rot control, as well as the adoption of mitigation measures to the entrance of the pathogen in indemnities areas.

**Keywords:** Biocontrol, viability, cacao, biosecurity

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	10
INTRODUÇÃO GERAL .....	11
1. IMPORTÂNCIA DO CACAUEIRO .....	11
2. BIOLOGIA DE <i>Moniliophthora roreri</i> .....	15
3. MEDIDAS DE CONTROLE À MONILÍASE DO CACAUEIRO .....	17
4. MEDIDAS DE BIOSSEGURANÇA.....	19
5. LEVEDURAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE .....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	22
CAPÍTULO II .....	29
RESUMO .....	31
INTRODUÇÃO.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
RESULTADOS .....	37
DISCUSSÕES .....	43
CONCLUSÕES .....	45
AGRADECIMENTOS .....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45
ANEXO I – FIGURAS.....	48
CAPÍTULO III .....	51
RESUMO .....	53
INTRODUÇÃO.....	55
MATERIAL E MÉTODOS.....	56
RESULTADOS .....	65
DISCUSSÕES .....	74
CONCLUSÕES .....	76
AGRADECIMENTOS .....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	77
ANEXO II – FIGURAS .....	81
CONCLUSÕES GERAIS .....	83
PERSPECTIVAS FUTURAS .....	85

**CAPÍTULO I**

**Introdução Geral**

## ESTUDO DE COMPONENTES PARA O MANEJO DA MONILÍASE DO CACAUEIRO (*Moniliophthora roreri*)

### INTRODUÇÃO GERAL

#### 1. IMPORTÂNCIA DO CACAUEIRO

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.), matéria-prima para a produção do chocolate, é uma espécie tropical, diploide ( $2n = 2x = 20$ ), classificada na sub-família Sterculiaceae e anexada a família Malvaceae após estudos filogenéticos entre as sub-famílias (BHATTACHARJEE; KUMAR, 2007; KUBITZKI; CHASE, 2003). O centro de origem do cacauieiro mais aceito na comunidade científica tem sido considerada a região do Alto Amazonas na América do Sul, sendo introduzido pelos homens posteriormente nas Américas Central e do Norte (END *et al.*, 2017; MOTAMAYOR *et al.*, 2002). A dispersão do cacauieiro para outros continentes aconteceu apenas após a era Colombiana (BHATTACHARJEE; KUMAR, 2007).

O cacauieiro é uma árvore perene, apresenta crescimento de 4 a 8 metros de altura e, embora raramente, pode crescer acima de 20 metros. As flores crescem diretamente dos galhos (cauliflora), as quais se tornam frutos indeiscentes, os quais podem conter de 20 a 60 sementes (BHATTACHARJEE; KUMAR, 2007). Árvores do cacauieiro em cultivo comercial no Equador são apresentadas na figura 1.

**Figura 1** - Cacauieiros do genótipo CCN 51 em áreas de cultivo. A) Conformação das árvores. B) Frutos de cacauieiro do genótipo CCN 51



Fonte: Elaborada pelo autor

A obtenção das amêndoas (commodity mundial) se dá pelo processo de fermentação das sementes provenientes do cultivo do cacauieiro. O processo de fermentação confere sabor e aroma as amêndoas que são utilizadas por indústrias para produção de chocolate, através dos seus produtos intermediários: massa de cacau, manteiga de cacau, cacau em pó e liquor de cacau

(APROTOSOAIE *et al.*, 2015; BHATTACHARJEE; KUMAR, 2007). O chocolate é o produto comercial mais conhecido, no entanto diversos produtos alimentícios e cosméticos podem ser produzidos através das amêndoas e sementes de cacau (BAILEY *et al.*, 2018; BECKETT, 1994).

O Brasil tem importância histórica na produção mundial de cacau, no princípio do século XX a Bahia tornou o produto a principal pauta de exportação do estado, que chegou a contribuir por cerca de 19% da renda tributária estadual (CHIAPETTI, 2009; RANGEL, 1982). Isso proporcionou a chegada do país à liderança da produção mundial de cacau no ano de 1910 (ROCHA, 2008), atualmente o Brasil ocupa a sétima posição no ranking de produção mundial de cacau, precedido pelos países Costa do Marfim, Gana, Equador, Camarões, Nigéria e Indonésia, os dados das estimativas de produção em toneladas/ano são apresentados no quadro 1.1 (ICCO, 2019). O volume de amêndoas de cacau produzidas pelos 7 países que apresentam maiores índices de produção na safra 2018/2019 corresponde a aproximadamente 88% da produção mundial (ICCO, 2019).

**Quadro 1.1** - Produção de amêndoas de cacau (toneladas/ano) a nível mundial entre os anos de 2016 a 2019.

Continentes/Países	Estimativas				Previsões	
	2016/17		2017/18		2018/19	
África	3617	76,4%	3496	75,2%	3701	76,3%
Camarões	246		250		270	
Costa do Marfim	2020		1964		2220	
Gana	969		905		830	
Nigéria	245		250		250	
Outros	137		127		131	
América	758	16%	836	18%	842	17%
Brasil	174		204		200	
Equador	290		287		310	
Outros	294		345		332	
Ásia e Oceania	357	7,50%	319	6,90%	306	6,3%
Indonésia	270		240		220	
Papua Nova Guiné	38		36		40	
Outros	49		43		46	
<b>Produção mundial</b>	<b>4731</b>	<b>100%</b>	<b>4651</b>	<b>100%</b>	<b>4849</b>	<b>100%</b>

Fonte: ICCO: Organização Internacional de Cacau e Chocolate, 2019.

A introdução da cacauicultura na Bahia ocorreu no ano de 1746, por conta da sua boa adaptabilidade ao solo clima da região, a produção do estado chegou a representar 95% da produção de cacau nacional (ROCHA, 2008). Historicamente, no Brasil, grande parte da produção nacional concentra-se no estado da Bahia, a outra parcela da produção está dividida entre os estados do Pará, Espírito Santo e Rondônia (BRASIL, 2011). Estimativas da safra de 2019 apontam o Pará como líder na produção nacional de amêndoas, com participação de 51,2%,

por sua vez, a Bahia representa 41,6% da produção nacional na mesma safra, apresentando uma redução em vista do percentual de 48% na safra de 2018, superior a participação de 45,5% pelo estado do Pará no mesmo ano (IBGE, 2020).

Perdas econômicas relacionadas a redução da produtividade de cacauzeiros em decorrência de doenças podem chegar ao valor médio de 20%, valor que varia de consideravelmente entre e dentro das regiões produtoras, esse valor correspondeu a cerca de 1,3 milhões de toneladas de amêndoas a menos produzidas mundialmente durante o ano de 2012 (PLOETZ, 2016). Dentre as diversas doenças que acometem a cultura, as de origem fúngica apresentam efeitos negativos proeminentes na produção dos países produtores, a exemplo da murcha de *ceratocystis*, podridão parda, vassoura de bruxa do cacauzeiro e monilíase do cacauzeiro (OLIVEIRA; LUZ, 2005; PLOETZ, 2016)

A murcha de *ceratocystis*, também conhecida popularmente como mal do facão, tem como agente etiológico o fungo *Ceratocystis cacaofunesta* (Engelbrecht & Harrington, 2005), sendo identificada inicialmente no Equador em 1918 (OLIVEIRA; LUZ, 2005; RORER, 1918). Na Bahia, o primeiro registro da doença ocorreu no ano de 1997, em mudas propagadas para enxertia (BEZERRA, 1997). Sua importância é subestimada e causa epidemias esporádicas nas Américas (CABRERA *et al.*, 2016). No Brasil, a doença obteve destaque após a introdução na Bahia de novos materiais genéticos que possuíam resistência para a vassoura-de-bruxa, mas mostraram-se suscetíveis a murcha de *ceratocystis*, ocasionando a morte estimada de milhões de cacauzeiros e destruição de grandes áreas na região (DAND, 2011; SOUSA; DIAS, 2001). As espécies de *Ceratocystis* são majoritariamente restritas ao xilema do hospedeiro (HARRINGTON, 2000), *C. cacaofunesta* chega as células do parênquima do xilema do cacauzeiro passivamente, através de aberturas causadas por insetos (MAZÓN *et al.*, 2013) ou através de ferimentos (OLIVEIRA; LUZ, 2005), chegando aos vasos do xilema (CABI, 2015). As plantas de cacauzeiro doentes apresentam escurecimento do caule, externa e internamente; já na parte aérea, as folhas apresentam-se amareladas e murchas, que posteriormente secam e morrem, mas permanecem aderidas às plantas (OLIVEIRA; LUZ, 2005; SILVA *et al.*, 2004).

A podridão parda é ocasionada pela infecção de tecidos vegetais do cacauzeiro por *Phytophthora* spp. (END *et al.* 2017). A doença é distribuída em todos os países produtores de cacau, sendo *P. palmivora* a espécie com maior distribuição global (ICCO, 2015; SUSILENE *et al.*, 2011). A podridão parda gera impactos diretos reduzindo a produção de amêndoas comercializáveis, podendo também debilitar as plantas pela formação de cancrios em ramos e troncos, que podem evoluir ocasionando a morte das plantas (PLOETZ, 2016). A espécie mais agressiva, *P. megakarya*, é endêmica nos países Camarões, Nigéria, Gabão e Gana, e pode

ocasionar perdas entre 60 a 100% da produção (HERVÉ *et al.*, 2019; OPOKU *et al.*, 2007). No Brasil, a espécie *P. tropicalis (capsici)* pode ocasionar perdas em torno de 30% a 41% da produção anual (HERVÉ *et al.*, 2019; OLIVEIRA; LUZ, 2005; SURUJDEO-MAHARAJ *et al.*, 2016).

A vassoura de bruxa do cacau, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005), ocasiona grande redução da produção de cacau nas Américas do Sul e Central (HERVÉ *et al.*, 2019). Endêmica da Bacia Amazônica, o primeiro relato da doença foi realizado no ano de 1895 no Suriname, no entanto, os sintomas da doença foram descritos inicialmente na Amazônia no ano de 1785 (BARROS, 1978; MEINHARDT *et al.*, 2008; PURDY; SCHMIDT, 1996). *M. perniciosa* se desenvolve a partir da infecção por basidiósporos, propágulos infectivos do fitopatógeno, de tecidos vegetais como meristemas apicais e axilares, folhas jovens, flores em desenvolvimento, e frutos (MEINHARDT *et al.*, 2008; GRIFFITH *et al.*, 2003). A redução da produtividade ocasionada a nível mundial pela doença variou entre estimativas de 250 a 380 mil toneladas de amêndoas nos anos de 2001 e 2012, respectivamente, valor caracterizado como de alto impacto relativo (BOWERS *et al.*, 2001; PLOETZ, 2016). No Brasil, desde o relato oficial na Bahia no ano de 1989, a vassoura de bruxa do cacau tem sido considerada a doença de maior importância para o país pelos danos causados a cultura (OLIVEIRA; LUZ, 2005). A introdução da doença na região ocasionou redução brusca na produção nacional de cacau, 384.327 toneladas de amêndoas foram produzidas no ciclo 1990/1991, por sua vez, a produção na temporada 1999/2000 foi de apenas 123.006 toneladas (ZUGAIB, 2008). Esse panorama resultou na perda de cerca de 200 mil empregos, aumento nos índices de criminalidades, e um extenso êxodo rural (GRIFFITH *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 1996).

A monilíase do cacau, causada pelo fungo *Moniliophthora roreri* (Cif.) H. C. Evans, Stalpers, Smason & Benny (1978), tem causado severos danos econômicos em diversos países da América do Sul e Central (OLIVEIRA; LUZ, 2005). A doença também é conhecida em países latinos como “moniliasis”, “vaina helada”, “enfermedad de Quevedo” e “podredumbre-acuosa”, a primeira detecção oficial da monilíase do cacau ocorreu em Quevedo, Los Ríos, Equador, no ano de 1918 (EVANS, 2002; RORER, 1918). Além do Equador, Venezuela e Colômbia, considerados centro de origem, a doença se alastrou para outros países onde há cultivo de cacau nas Américas, sendo relatada em Belize, Bolívia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Jamaica, México, Nicarágua, Panamá e Peru (END *et al.*, 2017). Apesar de não relatada no Brasil (BRASIL, 2018), a doença apresenta-se como um risco a cacauicultura brasileira uma vez que o país apresenta condições climáticas ideais para o estabelecimento da

doença, inclusive em regiões com alto risco de introdução, como áreas próximas a fronteira com o Peru (MORAES *et al.*, 2012).

A nível mundial apresenta-se como a doença mais severa por conta do alto potencial em ocasionar perdas na produtividade e pela dificuldade do seu manejo (EVANS, 2002; 2007). Ocasionalmente pela infecção do basidiomiceto hemibiotrófico, a doença afeta apenas os frutos dos gêneros *Theobroma* e *Herrania* em plantações já estabelecidas, destruindo parcial ou totalmente as suas sementes (PHILLIPS-MORA *et al.*, 2006; PORRAS; GONZÁLEZ, 1984).

## **2. BIOLOGIA DE *Moniliophthora roreri***

Regiões nordeste e central da Colômbia, bem como pequenas áreas de cultivo de cacaueteiro e hospedeiros silvestres presentes no Equador e Venezuela têm sido apontadas como o centro de origem da monilíase (PHILLIPS-MORA, AIME; WILKINSON, 2007; PLOETZ, 2016). Evidências moleculares comprovam que os patógenos responsáveis pela vassoura de bruxa e a monilíase do cacaueteiro apresentam alta correlação, sendo espécies irmãs, reclassificadas para o gênero *Moniliophthora*, pertencendo à família Marasmiaceae (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005).

O fungo apresenta micélio hialino, ramificado, septado com doliporos típicos (TORRES, 2010). Não apresenta grampos de conexão, e o número de núcleos em suas hifas e conídios é variado. A faixa de temperatura ótima para o crescimento micelial e germinação dos esporos encontra-se entre 24-26°C, não apresentando esporulação acima de 32°C (HERRERA, 1988).

Acredita-se que *M. roreri* seja um fungo anamórfico, apesar de apresentar um mecanismo citológico que permite a sua reprodução sexual, este mecanismo aparentemente não é muito ativo na natureza (EVANS *et al.*, 2002; END *et al.*, 2017). A formação dos conídios é estritamente rexolítica tálica, produzida diretamente da fragmentação das células conidiogênicas das hifas (DÍAZ-VALDERRAMA; AIME, 2016). Apresentam coloração amarelo claro ou café e podem apresentar conformação globosa a subglobosa ou ocasionalmente elipsoidal (EVANS, 2002). As dimensões dos esporos maduros podem estar relacionadas com o conteúdo de DNA e o número de núcleos contidos na célula conidiogênica (LEAICH; PAPA, 1975; PHILLIPS *et al.* 1987). Desse modo, esporos binucleados de *M. roreri* são significativamente maiores que os conídios uninucleados, em relação ao seu diâmetro e área (DÍAZ-VALDERRAMA; AIME, 2016).

O ciclo de vida de *M. roreri* é composto por uma fase biotrófica, seguida por uma fase necrotófica, levando aproximadamente 183 dias para completar o seu ciclo após a infecção dos frutos (THÉVENIN; TROCMÉ, 1996; OREA *et al.*, 2017). Inicia-se com a liberação dos



esporos, que se desprendem facilmente dos frutos doentes, sendo disseminados até a superfície de outros frutos dispostos nas copas das árvores de forma descendente (EVANS, 1986). Os esporos de *M. roleri* correspondem a única estrutura infectiva conhecida do fungo capaz de ocasionar a doença nos frutos dos hospedeiros (FHIA, 2012).

A dispersão de propágulos do fitopatógeno acontece, majoritariamente, pela ação do vento (RAM, 1989), e em menor escala pode ser exercida por outros agentes dispersores, pela ação o homem (EVANS, 1986; PHILLIPS-MORA; WILKINSON, 2007), por insetos (PHILLIPS-MORA, 2003) e a água (PORRAS; ENRIQUEZ, 1998). O transporte atmosférico de fitopatógenos pode ser descrito como um processo aerobiológico de pré-condicionamento, liberação, transporte horizontal, deposição, impacto e infecção (ISARD *et al.*, 2005). A infecção dos frutos pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento (OREA *et al.*, 2017).

Os frutos jovens infectados pelo patógeno podem apresentar protuberâncias e distorções amarelo claro na casca e prematura maturidade. Com o avanço do estágio de infecção do patógeno, são observadas lesões de coloração chocolate, desenvolvendo estruturas do patógeno na superfície dos frutos. Internamente as sementes apresentam-se marrom avermelhadas e necróticas (HERVÉ *et al.*, 2019). A figura 2 apresenta sintomas e sinais característicos da doença em frutos de cacaueteiro em diferentes estágios de desenvolvimento.

**Figura 2** - Frutos de cacaueteiro com sintomas característicos de monilíase em diferentes estágios do ciclo de desenvolvimento da doença. Apresentadas pontuações, protuberâncias, prematura maturidade, manchas necróticas e esporulação na superfície dos frutos



Fonte: Elaborada pelo autor

As perdas ocasionadas pela monilíase se relacionam com a alta capacidade de sobrevivência de estruturas do patógeno em diferentes condições ambientais, rápida dispersão

natural e alta probabilidade de dispersão antrópica (PHILLIPS-MORA; WILKINSON, 2007). A viabilidade de longa duração, apresentada por esporos de alguns fungos, constitui-se como um dos mais importantes aspectos no surgimento, disseminação e desenvolvimento de fungos patogênicos (BARUA *et al.*, 2016).

Esporos fúngicos podem apresentar espessamento da parede e melanização com o tempo, esse aspecto garante que esporos possam ser transportados a longas distâncias aderidos a diversos materiais, como plástico, metal, madeira e tecido, mantendo a sua viabilidade mesmo em diferentes regimes de temperatura e tempo (BARUA *et al.*, 2017). Esporos de *M. royeri* apresentam um risco especial, pois podem sobreviver por muitas semanas em frutos infectados resistindo a exposição solar, bem como podem aderir-se a tecidos vegetais ou a uma planta inteira e serem transportados para novas áreas (END *et al.*, 2017).

Os esporos de *M. royeri* mais jovens, liberados durante os primeiros dias de esporulação, são menos resistentes a fatores abióticos como irradiação e dissecação (EVANS, 1981). Por sua vez, esporos mais velhos adquirem coloração escura e uma parede mais espessa, apresentando viabilidade por aproximadamente 9 meses em frutos mumificados nas árvores, reduzindo para 1 a 3 meses quando no solo ou em frutos no solo (EVANS; EDWARDS; RODRIGUEZ, 1977; EVANS, 1981).

### **3. MEDIDAS DE CONTROLE À MONILÍASE DO CACAUEIRO**

As práticas de controle da monilíase são baseadas em estratégias de manejo cultural, químico e biológico, associadas ao emprego de variedades resistentes, sendo o manejo cultural o mais empregado por pequenos produtores (PHILLIPS-MORA; WILKINSON, 2007). O manejo cultural da doença requer trabalho laboral excessivo e de alto custo, fato que pode desencorajar a participação do produtor na adoção de tal prática a depender do seu nível de produção e o preço do mercado (HEBBAR, 2007; KRAUS *et al.* 2010). Em uma área que não apresenta manejo adequado até 95% dos frutos de cacaueteiro podem ser afetados (FHIA, 2012).

O controle cultural da monilíase baseia-se, principalmente, na redução das fontes de inóculo, por meio da remoção de frutos doentes das áreas de cultivo (EVANS, 2016). A frequência de remoção de frutos doentes em campo é um fator crítico para o manejo da doença (BAILEY *et al.*, 2018). Por exemplo, a remoção semanal acarreta diferença significativa na incidência da doença em uma área quando comparada a remoções realizadas a cada 2 semanas (SOBERANIS *et al.*, 1999).

Sombreamento e espaçamento entre plantas também são fatores importantes que podem afetar a incidência e desenvolvimento da doença em campo (WOOD; LASS, 1985). Associada

a outras práticas de manejo, a redução de sombreamento limita a umidade, em áreas com manejo de sombreamento, quando reduzida de 70% para 50%, pode diminuir até 90% da incidência da doença na área (SCHROTH *et al.*, 2000). O espaçamento entre árvores de cacaueteiro em sistema agroflorestal ocasiona alteração do microclima e cria um efeito de barreira na dispersão de esporos, que pode reduzir a incidência da doença, indicando sua importância como parte do manejo integrado da doença (BIENG *et al.*, 2017).

O cultivo de cacaueteiros em sistemas agroflorestais não apresenta incremento na incidência de monilíase em campo e, quando as práticas de manejo são bem implementadas, pode aumentar a produtividade da cultura (ARMENGOT *et al.*, 2020). Na Bahia o cacaueteiro é cultivado, em grande parte, em um sistema florestal conhecido como Cabruca, onde parte da vegetação nativa da Mata Atlântica é preservada. A cultura pode também ser cultivada em associação planejada com seringueira, apresentando-se como uma alternativa econômica para o produtor (CARDOSO, 2019).

Várias alternativas de controle da monilíase vêm sendo testadas, sejam elas culturais, químicas ou biológicas (PHILLIPS-MORA; WILKINSON, 2007). Quanto ao controle químico, *M. rozeri* apresenta sensibilidade a fungicidas sistêmicos como azoxistrobina, trifloxistrobina, tebuconazole e propiconazole e ainda a fungicidas protetores como sulfato de cobre, hidróxido de cobre, óxido cuproso, oxiclóruo de cobre e polisulfuro de cálcio (TORRES-DE-LA-CRUZ *et al.*, 2019). Fungicidas alternativos, como polisulfuro de cálcio e silicosulfocálcico, apresentam relativo controle em campo (OCHOA-FONSECA, 2017). No entanto, o controle químico isoladamente não é indicado, uma vez que a utilização se torna onerosa pela necessidade de aplicações frequentes (EVANS, 2016).

O controle genético da monilíase do cacaueteiro baseia-se no uso de variedades resistentes obtidas por meio de programas de melhoramento genético, a fonte de resistência/tolerância (R/T) mais comum para *M. rozeri* na América do Sul são o ICS-95 e seu clone CCN-51. O genótipo ICS-95 apresenta tolerância a sete isolados de *M. rozeri* representantes da diversidade genética do patógeno na América latina, o que demonstra a possibilidade de seleção de genótipos com alta R/T (PHILLIPS-MORA *et al.*, 2005). Indica-se realizar o *screening* por novas fontes de R/T no centro de origem do patógeno, uma vez que a diversidade genética de *M. rozeri* é limitada em diversos países (BAILEY *et al.*, 2018) devido a sua reprodução apresentar-se exclusivamente clonal (ALI *et al.*, 2015; DÍAZ-VALDERRAMA; AIME, 2016; PHILLIPS-MORA, 2003).

Como componente do manejo integrado da doença, o controle biológico da monilíase do cacaueteiro é realizado empregando espécies dos gêneros *Trichoderma* e *Clonostachys*, os quais

atuam na inibição do desenvolvimento do patógeno (OREA *et al.*, 2017). As leveduras apresentam-se como uma alternativa no controle de doenças da parte aérea, apresentando ação, preferencialmente, na competição por nutrientes bem como indução de resistência (BETTIOL; GHINI, 2009).

#### 4. MEDIDAS DE BIOSSEGURANÇA

A importação e movimentação de plantas e produtos vegetais apresentam potencial para introdução de pragas que afetam a produção agrícola e limita o acesso ao mercado de exportação (GANPAT *et al.*, 2019). Sobrepondo barreiras geográficas, a ação antropogênica é responsável pela disseminação de doenças a longa distância, e infecções ocultas podem apresentar grande significância na disseminação para novas áreas (END *et al.*, 2017).

Dentro dos mecanismos para o manejo de doenças, a quarentena é um sistema adotado por diversos países que tem como objetivo principal a proteção e a saúde das plantas, restringindo a movimentação de patógenos entre áreas geográficas (IFTIKHAR; SAJID, 2020). Abrange a prevenção, erradicação e eliminação de organismos prejudiciais, sendo, às vezes, a única medida específica para um programa de manejo integrado de uma praga (GANPAT; ISAAC, 2017).

Por medida de segurança, regulamentos de quarentena de plantas têm sido designados para prevenir a introdução e dispersão de pragas de importância econômica para áreas indenes, ou ainda onde a doença ou agente causal esteja presente, mas em uma escala limitada ou sob controle oficial (FAO, 2004). No Brasil o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento regulamenta medidas legislativas, apresentando de forma constante e atualizada uma lista de Pragas Quarentenárias Ausentes (PQA) no país, na qual o fitopatógeno *M. royeri* está incluído junto a aproximadamente outras 200 pragas de diferentes naturezas (BRASIL, 2018).

Diante da grande quantidade de PQA, a priorização de pragas, com base metodológica reconhecida cientificamente e validada, torna-se uma ferramenta muito importante para ações de defesa vegetal e pesquisa, diminuindo a subjetividade das tomadas de decisão ao determinar para quais pragas serão desenvolvidos planos de contingência, além de orientar decisões referentes à vigilância (LARANJEIRA *et al.* 2017). Frente ao histórico e epidemiologia da monilíase do cacauero, o fitopatógeno foi inserido entre as 20 PQA de maior prioridade para o Brasil, apresentando nível alto para o risco de entrada, estabelecimento e dispersão, bem como impacto potencial para o país (LARANJEIRA *et al.* 2017).

Diante dos riscos apresentados, a doença foi incluída no Programa Nacional de Prevenção e Vigilância (PNPV), que tem como objetivos evitar a introdução de uma PQA, manutenção do

sistema de vigilância para detecção e identificação, bem como autoriza a aplicação de medidas de mitigação de risco no caso de suspeita de entrada de uma PQA em território nacional (BRASIL, 2019).

Indica-se a adoção de medidas de precaução moderada para a exportação de sementes e estacas de cacaueteiro para enxertia, recomendando a aplicação de um protocolo de desinfecção utilizando fungicidas para redução do inóculo e um período de quarentena do material, não é recomendada a exportação de frutos, pois apresentam alto risco para a dispersão de *M. rozeri*, sendo necessárias maiores esforços para prevenir a movimentação de frutos de áreas afetadas para áreas indenidas (END *et al.*, 2017).

## 5. LEVEDURAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE

O controle biológico de doenças em plantas baseia-se na redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença pela introdução em massa de um ou mais antagonistas (BAKER; COOK, 1983). Vem sendo estudado desde 1926, a partir de estudos sobre fatores que afetavam a patogenicidade de *Streptomyces scabies*, tornando-se uma prática empregada em diversas culturas de importância agrônômica (SANFORD, 1926). Organismos de diferentes naturezas podem apresentar várias interações antagônicas e serem empregados no controle de outros organismos, tais como insetos, nematoides e fungos fitopatogênicos (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Muitos mecanismos envolvidos no biocontrole ainda não foram compreendidos, sendo aqueles que envolvem fungos fitopatogênicos e seus antagonistas os mais estudados e melhor caracterizados, como competição por espaço e nutrientes, antibiose, micoparasitismo, predação, a indução de resistência, compostos orgânicos voláteis, formação de biofilme, compostos termoestáveis e produção de enzimas (CHET, 1992; HARAN *et al.*, 1996; LIMA *et al.*, 2000; FREIMOSER, 2019, SUN *et al.*, 2018). Os diferentes mecanismos apresentados pelos agentes de biocontrole atuam de forma sinérgica durante a interação antagônica (FIALHO *et al.*, 2010).

Dentro do reino Fungi, leveduras junto a outros alguns gêneros de fungos filamentosos apresentam-se mais promissoras como agentes de biocontrole (LARANJEIRA *et al.*, 1996). As leveduras biocontroladoras vêm sendo bastante estudadas, principalmente por apresentarem sucesso no controle de doenças pós-colheita (EL-TARABILY, 2004). Apresentam diferentes mecanismos de atuação no biocontrole, tais como: competição por espaço e nutrientes, parasitismo, antibiose, produção de enzimas líticas e indução de resistência em plantas (MORAES *et al.*, 1991), além de poder interagir diretamente com as hifas dos fitopatógenos e produzirem enzimas líticas, causando a quebra da parede celular (CASTORIA *et al.*, 1997;

VALDEBENITO-SANHUEZA *et al.*, 2000).

Estudos indicam que as leveduras controlam patógenos da parte aérea, principalmente, por competição de nutrientes e por indução de resistência (BETTIOL; MORANDI, 2009). A habilidade de competir por espaço as tornam excelentes colonizadores de tecidos feridos, sendo assim mais eficiente que o fitopatógeno no consumo de nutrientes, prevenindo o estabelecimento deles e consequentemente o desenvolvimento da doença (DROBY *et al.*, 2009).

A competição por nutrientes e espaço é apresentada por todos microrganismos, competindo entre si e seus hospedeiros. Essa relação é considerada como o modo de ação primário apresentado por leveduras no biocontrole (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2005; SPADARO; DROBY, 2016; WISNIEWSKI *et al.*, 2007). Este é um mecanismo difícil de ser estudado, no entanto, a comunidade ecológica e a competição por nicho e nutrientes têm se mostrado determinante na diversidade de espécies (FREIMOSER *et al.*, 2019).

A formação de biofilme também se mostra como uma estratégia importante na competição por espaço, sendo uma característica importante para o emprego de leveduras no biocontrole principalmente na filosfera e carposfera (FREMOISER, *et al.*, 2019). Ocorre através do desenvolvimento de microrganismos em diferentes tipos de superfícies, com células agregadas, envolvendo geralmente alterações na parede celular, secreção de uma matriz extracelular e frequentemente a formação de hifas e pseudo-hifas (CAVALHEIRO; TEIXEIRA 2018; COSTA-ORLANDI *et al.* 2017).

Plantas apresentam sistema imune inato que reconhece e responde a presença de microrganismos (CHISHOLM *et al.*, 2006; JONES; DANGL, 2006). Essa característica pode induzir a resistência sistêmica, que se apresenta como base para utilização de microrganismos como fertilizantes e fortificantes de plantas (GOZZO; FAORO, 2013; PIETERSE *et al.*, 2014). Leveduras podem elicitar resistência sistêmica de plantas contra uma ampla gama de patógenos, sugerindo que essa atividade contribua no controle de fitopatógenos (BARDA *et al.*, 2015; BUXDORF *et al.*, 2013a, b; LEE *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2016).

Compostos orgânicos voláteis (COV) são compostos de baixo peso molecular (<300 DA) produzidos durante o metabolismo primário e secundário de leveduras, fungos filamentosos e bactérias (KORPI *et al.*, 2009). Através da microextração desses compostos em fase, a identificação desses compostos é realizada por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (BUZZINI *et al.*, 2003; DI FRANCESCO *et al.*, 2015). Os COV identificados pertencem, principalmente, aos grupos do Álcoois (etanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 2-feniletanol), Ésteres (acetato de etila, octanoato de etila) (FIALHO *et al.*, 2010) e

Aldeídos (2-metil-2-hexenal, 2-isopropil-5-metil-2-hexenal) (BUZZINI *et al.*, 2003).

Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade em padrão temporal de esporos aderidos a materiais inertes e a sobrevivência de propágulos do fitopatógeno em sementes doentes submetidas ao processo de fermentação, bem como isolar, selecionar e identificar leveduras que apresentem características para o biocontrole da monilíase do cacauero, estudando *in vitro* mecanismos de ação antagonista que podem ser apresentados na relação com o fitopatógeno, bem como a produção de biofilme pelos isolados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, 97 (5), p. 1012-1022, 2005.
- ALI, S. S. *et al.* Combination of RNAseq and SNP nanofluidic array reveals the center of genetic diversity of cacao pathogen *Moniliophthora roreri* in the upper Magdalena Valley of Colombia and its clonality. **Front. Microbiol**, 6, 850, p. 1-13, 2015.
- APROTOSOAIÉ, A. *et al.* Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 15 (1), p. 73-91, 2015.
- ARMENGOT, L. *et al.* Cacao agroforestry systems do not increase pest and disease incidence compared with monocultures under good cultural management practices, **Crop Protection**, p 1-31, 2020.
- BARDA, O. *et al.* *Pseudozyma aphidis* induces salicylic-acid-independent resistance to *Clavibacter michiganensis* in tomato plants. **Plant. Dis.**, 99, p. 621-626, 2015.
- BARROS, O. Algunos aspectos de la "Escoba de Bruja" en Colombia. **El Cacaotero Colombiano**, 7 (2), p. 43-56, 1978.
- BARUA, P. *et al.* A rapid and miniaturized system using Alamar blue to assess fungal spore viability: implications for biosecurity. **Eur. J. Plant Pathol**, 12p., 2016.
- BAILEY, B. A. *et al.* *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot. **Molecular Plant Pathology**, 19(7), p. 1580-1594, 2018.
- BARUA, P. *et al.* Long-term viability of the northern anthracnose pathogen, *Kabatiella caulivora*, facilitates its transportation and spread. **Plant Pathology**, 9p., 2017.
- BAKER, K. F.; COOK, R. J. Biological control of plant pathogens. In: COOK, R. J.; BACKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. 1. ed. Saint Paul: The american phytopathological society, 1983.
- BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco, United States, 1974.
- BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 2 ed. London: Chapman and Hall, 1994.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Impactos das mudanças climáticas sobre o controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. B. (Eds.) **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, 2009. p. 29-48.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, 2009.
- BEZERRA, J.L. *Ceratocystis fimbriata* causing death of budded cocoa seedlings in Bahia, Brazil. **Incoped Newsletter**, v.1, 6p., 1997.

BHATTACHARJEE, R. R.; KUMAR, P.L. Cacao. In: KOLE, C. (Ed.), **Genome mapping and molecular breeding in plants**, v 6. Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, 2007. p. 127-142.

BIENG, M. A. N. *et al.* Tree spacing impacts the individual incidence of *Moniliophthora roreri* disease in cacao agroforests. **Pest Management Science**, 73 (11), 27p., 2017.

BOWERS, J. H. *et al.* The impact of plant diseases on world chocolate production. **Plant Health Progress**, 15p., 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cacau: Informações de mercado**. Brasília, 2011.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – (MAPA). Instrução normativa nº 39, de 1 de outubro de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 11-14, 2018.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – (MAPA). Portaria nº 131, de 27 de Junho de 2019. Institui o Programa Nacional de Prevenção e Vigilância de Pragas Quarentenárias Ausentes - PNPV-PQA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 8p., 2019.

BUXDORF, K. *et al.* The epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* induces jasmonic acid- and salicylic acid/nonexpressor of PR1-independent local and systemic resistance. **Plant Physiol**, 161, p. 2014-2022, 2013a.

BUXDORF, K. *et al.* *Pseudozyma aphidis* induces ethylene-independent resistance in plants, *Plant Signaling & Behavior*, 8:11, e26273, 4p., 2013b.

BUZZINI, P. *et al.* A study on volatile organic compounds (VOCs) produced by tropical ascomycetous yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 84, p. 301-311, 2003.

CABI. *Ceratocystis fimbriata* (original text by Harrington, T. C. and Baker, C.). In: **Crop protection compendium**. Wallingford: CAB International, 2015.

CABRERA, O. G. *et al.* Ceratocystis Wilt Pathogens: History and Biology - Highlighting *C. cacaofunesta*, the Causal Agent of Wilt Disease of Cacao. In: BAILEY, B. A.; MEINHARDT, L. W. (Eds.) **Cacao Diseases, A History of Old Enemies and New Encounters**, 2016. p. 383-428.

CARDOSO, G. **Análise de viabilidade econômica dos principais modais de produção de cacau no Sul da Bahia: Cabruca e SAF Cacau-Seringueira**. 2019. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Economia, Campinas - SP.

CASTORIA, R. *et al.*  $\beta$ -1,3- glucanase activity of two saprophytic yeas and possible mode of actions as biocontrol agents against postharvest diseases. **Postharvest Biology and Technology**, v.12, p. 293- 300, 1997.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. Candida Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. **Frontiers in medicine**, 5: 28, 15p., 2018.

COSTA-ORLANDI, C. *et al.* **Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases**. **Journal of Fungi**, 3(2), 22, 24p., 2017.

CHET, I. Microbial control of plant diseases. In: CHET, I. **Environmental microbiology**. New York, p. 335-354, 1992.

CHIAPETTI, J. **O uso corporativo do território brasileiro e o processo de formação de um espaço derivado: transformações e permanências na Região Cacaueira da Bahia**. 2009. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, São Paulo.

CHISHOLM, S. T. *et al.* Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. **Cell**, 124(4), p. 803-814, 2006.

DAND, R. **The international cocoa trade (3rd ed.)**. Cambridge: Woodhead Publishing. 647p., 2011.



- DI FRANCESCO, A. *et al.* Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. **Biological Control**, 81, p. 8-14, 2015.
- DÍAZ-VALDERRAMA, J. R.; AIME, M. C. The cacao pathogen *Moniliophthora roreri* (Marasmiaceae) produces rhexolytic thallic conidia and their size is influenced by nuclear condition. **Mycoscience**, 9p., 2016.
- DROBY, S. *et al.* Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology and Technology**, 52(2), p. 137-145, 2009.
- ENGELBRECHT, C.J.B; HARRINGTON, T.C. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. **Mycologia**, v. 97, p. 57-69, 2005.
- END, M. J. *et al.* Technical guidelines for the safe movement of cacao germplasm. **Revised from the FAO/IPGRI Technical Guidelines**, No. 20 (Third Update, October 2017). Global Cacao Genetic Resources Network (CacaoNet), Bioversity International, Roma, Itália., 89p., 2017.
- EL-TARABILY, K. A. Suppression of *Rhizoctonia solani* disease of sugar beet by antagonistic and plant growth-promotion yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 1, p. 69-75, 2004.
- EVANS, H. C. A reassessment of *Moniliophthora* (monilia) pod rot of cocoa. **Cocoa Growers Bulletin**, 37, p. 34-43, 1986.
- EVANS, H. C. Cacao diseases – The trilogy revisited. **Phytopathology**, v. 97, p. 1640-1643, 2007.
- EVANS, H. C. Frosty Pod Rot (*Moniliophthora roreri*). In: BAILEY, B. A.; MEINHARDT, L. W. (Eds.) **Cacao Diseases, A History of Old Enemies and New Encounters**, 2016. p. 63-96.
- EVANS, H. C. Invasive neotropical pathogens of tree crops. In: WATLING, R. *et al.* (Eds.), **Tropical mycology. Micromycetes**, Wallingford: CAB International, v. 2, 2002. p. 83-112.
- EVANS, H. C. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora* (*Monilia*) *roreri*. **Phytopathological Papers**, v. 24, 44p., 1981.
- EVANS, H. C. *et al.* On the taxonomy of *Monilia roreri*: an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. **Canadian Journal of Botany**, 56, p. 2528-2532, 1978.
- EVANS, H. C.; *et al.* Research on cocoa diseases in Ecuador: past and present. **PANS**, v. 23, p. 68-80, 1977.
- EVANS H. C. *et al.* What's in a name: Crinipellis, the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cocoa? **Mycologist**, 16, p. 148-152, 2002.
- FAO. Pest risk analysis for quarantine pests, including analysis of environmental risks and living modified organisms. **Int. Stand. Phytosanit. Meas.** Number 11, Food Agric. Organ., Roma, 2004.
- FIALHO, M. B. *et al.* Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **World J. Microb. Biot.** 26, p. 925-932, 2010.
- FHIA – Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. La Moniliasis del Cacao: el enemigo a vencer. **Proyecto Promoción de Sistemas Agroforestales de Alto Valor con Cacao en Honduras**, 1a ed. La Lima, Cortés, Honduras, 2012.
- FREIMOSER, F. M. *et al.* Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 35(10), 19p., 2019.
- GANPAT, W.; ISAAC, W. A. Environmental sustainability and climate change adaptation strategies. **IGI Global**, Hershey, PA. 2017.
- GANPAT, W. *et al.* Caribbean plant quarantine officers' self-perceived competencies and training needs for

regional food security. **Journal of Agricultural & Food Information**, 20 (2), p. 1-12, 2019.

GRIFFITH, G. W. *et al.* Witches' brooms and frosty pods: Two major pathogens of cacao. **New Zealand Journal of Botany**, 41, p. 423–435, 2003.

GOZZO, F.; FAORO, F. Systemic acquired resistance (50 years after discovery): moving from the lab to the field. **J Agric Food Chem** 61, p. 12473-12491, 2013.

HARAN, S. *et al.* Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. **Phytopathology**, v. 86, p. 980-985, 1996.

HARRINGTON, T. C. Host specialization and speciation in the American wilt pathogen. **Fitopatologia Brasileira**, 25, p. 262–263, 2000.

HEBBAR, P. K. Cacao diseases: a global perspective from an industry point of view. **Phytopathology**, v. 97, p. 1658-1663, 2007.

HERRERA, F. A. M. **Efecto de factores nutricionales y físicos sobre el crecimiento y esporulación de *Moniliophthora roreri* in vitro**. 1988. 159f. Tese (Doutorado). Universidad de Costa Rica/a/Centro Agronómico Tropical de Investigacion y Ensenanza. Turrialba, Costa Rica.

HERVÉ, K. S. *et al.* A review on cocoa plant diseases and importance of *Bacillus subtilis* to induce resistance on crops in agriculture. **Indian J. Agric. Res.**, 53, p. 125-132, 2019.

IBGE – **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola Estatística da Produção Agrícola: dezembro de 2019**. 148p., 2020.

ICCO - International Cocoa Organization. **Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XLV, No.3, Cocoa year 2018/19**, 2019. Disponível em: [https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/doc\\_download/4414-production-qbcs-xlv-no-3.html](https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/doc_download/4414-production-qbcs-xlv-no-3.html). Acesso em: 02/04/2020.

ICCO – International Cocoa Organization. What are the effects of intensive commercial production of cocoa on the environment? Westgate House W5 1YY, United Kingdom. **Rapport Annuel ICCO**, pp. 25, 2015.

IFTIKHAR, Y.; SAJID, A. Quarantine and Regulations. In: UL HAQ, I.; IJAZ, S. (Eds.) **Plant Disease Management Strategies for Sustainable Agriculture through Traditional and Modern Approaches. Sustainability in Plant and Crop Protection**, vol 13. Springer, Cham, p. 279-293, 2020.

ISARD, S. A. *et al.* Principles of the atmospheric pathway for invasive species applied to soybean rust. **Bioscience**, v. 55 (10), p. 851–861, 2005.

JANISIEWICZ, W. J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review Phytopathology**, v. 40, p. 411–441, 2002.

JONES, J. D.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, 444, p. 323–329, 2006.

KRAUSS, U. *et al.* Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in cocoa (*Theobroma cacao*). **Biological Control**, v. 54, p. 230-240, 2010.

KORPI, A. *et al.* Volatile Organic Compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, 39: 2, p. 139-193, 2019.

KUBITZKI, K.; CHASE, M.W. Introduction to Malvales. In: KUBITZKI, K., BAYER, C. (Eds.). **The Families and Genera of Vascular Plants**, v. 5, Flowering Plants, Dicotyledons: Expanded Caryophyllales, Capparales and Malvales. Springer, Berlin, 2003. p. 12–16.

LARANJEIRA, D. *et al.* Efeito de diferentes substratos na esporulação de espécies de *Trichoderma*. **Summa phytopathologica**, v. 22, p. 178-181, 1996.

LARANJEIRA, F. F. *et al.* **Priorização de pragas quarentenárias ausentes: metodologia e lista das 20**

**pragas mais importantes**, Cruz das almas, Bahia – Brasil, 2017.

LEAICH, L. L.; PAPA, K. E. Identification of diploids of *Aspergillus flavus* by the nuclear condition of conidia. **Mycologia**, 67, p. 674-678, 1975.

LEE, G. *et al.* Foliar application of the leaf-colonizing yeast *Pseudozyma churashimaensis* elicits systemic defense of pepper against bacterial and viral pathogens. **Scientific Reports**, 7(1), p. 13, 2017.

LIMA, L. H. C. *et al.* Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariuna: Embrapa meio ambiente, v. 2, 2000, p. 263-304.

LIU, P. *et al.* Comparative transcriptional profiling of orange fruit in response to the biocontrol yeast *Kloeckera apiculata* and its active compounds. **BMC Genomics**, 17(1), p. 14, 2016.

MAZÓN, M. *et al.* Effectiveness of different trap types for control of bark and ambrosia beetles (*Scolytinae*) in Criollo cacao farms of Mérida, Venezuela. **International Journal of Pest Management**, 59(3), p. 189–196, 2013.

MEINHARDT, L.W. *et al.* *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? **Mol. Plant Pathol.**, 9, p. 577-588, 2008.

MOTAMAYOR, J. C. *et al.* Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity**, 89, p. 380-386, 2002.

MORAES, I. O. *et al.* Multiplicação de agentes de controle biológico. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 253-272.

MORAES, W. B. *et al.* Ananalysis of the risk of cocoa moniliasis occurrence in Brazil as the result of climate change. **Summa Phytopathologica**, v. 38, p. 30-35, 2012.

NYASSE, S. *et al.* Integrated management of Phytophthora diseases on cocoa (*Theobroma cacao* L.): impact of plant breeding on pod rot incidence. **Crop Prot.**, 26, p. 40-45, 2017.

OCHOA-FONSECA, L. E. *et al.* Control in vivo de *Moniliophthora roreri* em *Theobroma cacao*, utilizando polisulfuro de calcio y silicosulfocálcico. **Revista Ciencia y Agricultura**. v. 14 (2), Tunja (Boyacá) - Colombia, p. 59-66, 2017.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E.D.M.N. **Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil**. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT, 2005.

OPOKU, I. Y. *et al.* Management of black-pod disease of cocoa with reduced number of fungicide application and crop sanitation. **Afr. J. Agric. Res.**, 2, p. 601-604, 2007.

OREA, M. D. D. *et al.* Current Status of Cocoa Frosty Pod Rot Caused by *Moniliophthora roreri* and a Phylogenetic Analysis. **Plant Pathol. J.**, 16, p. 41-53, 2017.

PEREIRA, J. L. *et al.* Witches-broom disease of cocoa in Bahia—attempts at eradication and containment. **Crop Protection**, 15, p. 743-752, 1996.

PHILLIPS-MORA, W. Origin, **Biogeography, Genetic Diversity and Taxonomic Affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.* as Determined Using Molecular, Phytopathological and Morpho-Physiological Evidence**, 2003. Tese (Doutorado) - Universidade de Reading, Reading.

PHILLIPS-MORA, W. *et al.* Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. **Plant Pathol.** 54, p. 483-490, 2005.

PHILLIPS-MORA, W. *et al.* First report of frosty pod rot (moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Belize. **Plant Pathology**, v.55, 2006.

- PHILLIPS, D. J. *et al.* Size, nuclear number, and aggressiveness of *Botrytis cinerea* spores produced on media of varied glucose concentrations. **Phytopathology**, 77, p. 1606-1608, 1987.
- PHILLIPS-MORA, W.; WILKINSON, M. J. Frosty Pod of Cacao: A Disease with a Limited Geographic Range but Unlimited Potential for Damage. **Phytopathology**, v. 97, p. 1644-1647, 2007.
- PIETERSE, C. M. *et al.* Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annu Rev Phytopathol**, 52, p. 347-375, 2014.
- PLOETZ, R. The Impact of Diseases on Cacao Production: A Global Overview. In: BAILEY, B. A., MEINHARDT, L. W. **Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters**, Springer International Publishing, 2016. p. 33-59.
- PORRAS V.H.; ENRÍQUEZ G. **Spread of monilia pod rot of cocoa through Central America**. San José, Costa Rica: IICA, 20p., 1998.
- PORRAS V. H.; GONZÁLEZ L. C. Epifitiología de la moniliasis del cacao (*Monilia rozeri*) y su relación con el ciclo de producción en la zona de Matina, Costa Rica. **Fitopatología**. v. 19. n. 2, p. 78-84, 1984.
- PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: Biology, epidemiology, and management. **Annual Review of Phytopathology**, 34, p. 573-594, 1996.
- RAM, A. **Biology, epidemiology and control of moniliasis (*Moniliophthora rozeri*) of cacao**. 1989. 286f. Tese (Doutorado) - University of London, England.
- ROCHA, L. B. **A região cacauceira da Bahia – dos coronéis à vassoura-de-bruxa: saga, percepção, representação**. Ilhéus – BA, 2008.
- RANGEL, J. F. **Ceplac/cacao**, ano 25. Brasília: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, Escritório no Brasil, Unidade de Informação e Documentação, 1982.
- RORER, J.B. **Diseases and pests of cacao in Ecuador and methods appropriate to the cultivation of cacao**. Guayaquil, Ecuador, p 1-80, 1918.
- SANFORD, G. B. Some factors affecting the pathogenicity of *Actinomyces scabies*. **Phytopathology**, v. 16, p. 525-547, 1926.
- SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. A nutritive view on the hostpathogen interplay. **Trends Microbiol**, 13, p. 373-380, 2005.
- SCHROTH, G. *et al.* Pests and diseases in agroforestry systems of the humid tropics. **Agrofor. Syst.** 50, p. 199-241, 2000.
- SILVA, S. D. V. M. *et al.* Cacao "Jaca" Resistente a *Ceratocystis fimbriata* na Região Cacauceira da Bahia, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 538-540, 2004.
- SOBERANIS, W. *et al.* Increased frequency of phytosanitary pod removal in cacao (*Theobroma cacao*) increases yield economically in eastern Peru. **Crop Protect.** 18, p. 677-685, 1999.
- SOUZA, C. A. S.; DIAS, L. A. S. Melhoramento ambiental e sócio economia In.: DIAS, L. A. S. (Ed.) **Melhoramento genético do cacauceiro**. Viçosa, FUNAPE, UFG, 2001. p. 1-47.
- SPADARO, D.; DROBY, S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends Food Sci Technol**, 47, p. 39-49, 2016.
- SUN, C. *et al.* Autoclaved yeast enhances the resistance against *Penicillium expansum* in postharvest pear fruit and its possible mechanisms of action. **Biological Control**, 119, p. 51-58, 2018.
- SURUJDEO-MAHARAJ, S. *et al.* Black pod and other Phytophthora induced diseases of cacao: history,

biology, and control. In: BAILEY, B. A.; MEINHART, L. W. (Eds). **Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters**. Springer International Publishing, Suíça, p. 213-266, 2016.

SUSILENE, E. L. D. S. *et al.* Resistance gradient of black pod disease in cocoa and selection by leaf disk assay. **Crop Breed Appl Biot.**, 11. p. 297-303, 2011.

THÉVENIN, J. M.; TROCMÉ, O. La moniliose du cacaoyer. La moniliasis del cacao. **Plantations, Recherche, Développement**, v. 3, França, p. 397-406, 1996.

TORRES, M. **Progreso temporal y manejo integrado de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.*) del Cacao (*Teobroma Cacao*) en Tabasco, México**. 2010. Tese (Doutorado) - Institución de la Enseñanza e Investigación en ciências Agrícolas.

TORRES-DE-LA-CRUZ, M. *et al.* Control químico de *Moniliophthora roreri* en México. **Biotecnia**, v. 21, nº 2, México, p. 55-61, 2019.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. V. **Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 3, 2000. p. 41-55.

WISNIEWSKI, M. *et al.* **Postharvest biocontrol: new concepts and applications**, 2007.

WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Cocoa**, ed. 4, 1985.

ZUGAIB, A. C. C. Mudanças cambiais e o efeito dos fatores de crescimento ou declínio das receitas de exportações brasileiras de cacau em amêndoas. **Revista Bahia Agrícola**, v.8, n. 2, p. 43-48, nov. 2008.

**CAPÍTULO II****Sobrevivência de propágulos de *Monilophthora roreri* em fômites e sementes**

1 **SOBREVIVÊNCIA DE PROPÁGULOS DE *Moniliophthora roreri* EM FÔMITES E**  
2 **SEMENTES**

3  
4  
5 ESTRELA JÚNIOR, A. S. <sup>1</sup>; GRAMACHO, K. P. <sup>2</sup>; SOLÍS, Z. K. <sup>3</sup>; VERA, D. I. <sup>3</sup>;  
6 LARANJEIRA, D.\*<sup>1</sup>

7  
8 <sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade  
9 Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

10 <sup>2</sup>Laboratório de Fitopatologia Molecular, Centro de Pesquisa de Cacau (CEPEC)/CEPLAC,  
11 Ilhéus, Bahia, Brasil.

12 <sup>3</sup>Departamento Nacional de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias  
13 (INIAP), Quevedo, Los Ríos, Equador.

14  
15 \*Autor para correspondência

16 Correio eletrônico: delson.laranjeira@ufrpe.br

## 17 RESUMO

18

19 Diversos tipos de materiais podem atuar como substrato no transporte de propágulos de pragas.  
20 *Moniliophthora roreri* classifica-se como uma Praga Quarentenária Ausente no Brasil, cujo os  
21 propágulos infectantes são os esporos assexuais produzidos na superfície de frutos doentes dos  
22 gêneros *Theobroma* e *Herrania*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência de  
23 propágulos de *M. roreri* em sementes doentes submetidas ao processo de fermentação, bem  
24 como avaliar a viabilidade de esporos secos aderidos a materiais inertes, utilizados usualmente.  
25 Massas de sementes cacau sadia e doente foram submetidas ao processo de fermentação em  
26 caixas de poliestireno e sementes doentes em sacos de nylon telado foram dispostas nas massas.  
27 A produção de propágulos foi avaliada no início do processo (0 horas) e a cada 24 horas até a  
28 sua finalização, dado às 96 horas, utilizando sementes doentes fermentadas, não submetidas a  
29 fermentação e *in natura* secas ao sol por 3 dias, através do cultivo indireto do fitopatógeno em  
30 meio batata dextrose ágar e da esporulação em testas de sementes, submetidas a câmara úmida  
31 por 24 horas, após um período de 7 dias. A viabilidade dos esporos secos, inoculados  
32 previamente em amostras de 1 cm<sup>2</sup> de papel, tecido, plástico, vidro, borracha, rafia, alumínio,  
33 foi avaliada através da germinação de uma suspensão de esporos do fitopatógeno recuperado  
34 dos materiais em meio Saboraud-ágar, suplementado com extrato de levedura, submetidos a  
35 câmara úmida por 72 horas, realizada aos 7, 15, 30, 45 e 100 dias após a inoculação, contando  
36 de forma aleatória 100 esporos. Não foi observado crescimento de colônias de *M. roreri* em  
37 meio BDA a partir de sementes doentes fermentadas por no mínimo de 48 horas, a esporulação  
38 em testas de sementes ocorreu apenas naquelas não submetidas a fermentação. Os esporos secos  
39 inoculados em materiais inertes mostraram-se viáveis durante todo o período de avaliação,  
40 apresentando média 26,6% de esporos viáveis aos 100 dias.

41

42 **Palavras-chave:** monilíase, viabilidade, biossegurança, fermentação



43 **ABSTRACT**

44

45 A diversity of inert and organic material can play a role in the transport of plagues, being  
46 infected or infested. *Moniliophthora roreri* is featured as a Quarantine Pest Absent in Brazil,  
47 the unique infective propagule of the pathogen are their asexual spores, produced by the  
48 infection of pods from the genus *Theobroma* and *Herrania*. The present study aims to evaluate  
49 the survival of *M. roreri* in unhealthy cocoa beans under fermentation, and *M. roreri* spores  
50 viability adhered to inert materials, commonly used. Healthy and unhealthy beans mass were  
51 fermented in polystyrene boxes, unhealthy beans were placed in nylon screened bags deposited  
52 in the bean masses. The propagule production was evaluated by unhealthy beans *in natura* and  
53 sun-dried for 3 days, and every 24 hours of fermentation, until the finalization, after 96 hours,  
54 proceeding the plating of the unhealthy beans in potato dextrose agar medium for every time  
55 evaluated, watching the rise of fungal colonies by 7 days and sporulation in forehead beans  
56 subjected to humid chamber. The spores viability, inoculated in 1 cm<sup>2</sup> samples of inert material  
57 surface commonly used as paper, fabric, plastic, glass, tire, raffia and aluminum, was assessed  
58 by the rate of spores germination in Sabouraud agar medium, supplemented with yeast extract,  
59 by 72 hours at 7, 15, 30, 45 e 100 days after inoculation, counting 100 spores randomly.  
60 Sporulation in unhealthy beans forehead and growing in culture medium was presented in the  
61 initial evaluated periods of beans fermentation (0 and 24 hours), *M. roreri* propagules was not  
62 observed in unhealthy beans fermented up to 48 hours. Spores showed being viable in all the  
63 materials tested during the evaluated period, with a maximum rate of 26,6% viable spores 100  
64 days after the inoculation.

65

66 **Keywords:** froty pod rot, viability, biosecurity, fermentation

## 67 INTRODUÇÃO

68 Um grande limitador para a produção de cacau a nível mundial é a monilíase do cacauzeiro,  
69 doença causada pelo fungo *Moniliophthora roreri* (Cif.) H. C. Evans, Stalpers, Smason &  
70 Benny (1978), que pode ocasionar redução da produtividade em torno de 20 a 90% (EVANS,  
71 2002, 2007; GOTSCH, 1997), o que, na safra de 2012, correspondeu a cerca de 50 mil toneladas  
72 de amêndoas a menos produzidas a nível mundial (PLOETZ, 2016). A doença já foi identificada  
73 em 13 países das Américas do Sul e Central, incluindo Colômbia, Peru, Venezuela e Bolívia  
74 (END *et al.*, 2017), que fazem divisa com o Brasil, que se encontra até então isento da presença  
75 do patógeno (BRASIL, 2018).

76 *M. roreri* é um fitopatógeno especializado que infecta apenas os frutos de espécies dos  
77 gêneros *Theobroma* e *Herrania* (PHILLIPS-MORA *et al.*, 2006; PORRAS; GONZÁLEZ,  
78 1984). O seu ciclo de vida começa com a formação de esporos na superfície de frutos doentes,  
79 apresentando mecanismos bastante eficientes de dispersão, podendo produzir até 7 bilhões de  
80 esporos em um único fruto maduro infectado, os quais são facilmente transportados pelo vento  
81 e água (CAMPUZANO LONDOÑO, 1981; RAM, 1989). A infecção dos frutos do cacauzeiro  
82 pode ocorrer em qualquer fase do seu desenvolvimento, sendo a maior taxa de suscetibilidade  
83 apresentada aos 45 dias de formação, decrescendo com o avanço da idade do fruto (EVANS,  
84 1981).

85 Durante a fase não sintomática da doença, o fitopatógeno se desenvolve no interior dos  
86 frutos, destruindo completamente suas sementes, que apresentam podridão aquosa e ficam  
87 aderidas umas às outras e à parede interna dos frutos (EVANS, 2016; LEACH *et al.*, 2002).  
88 Posteriormente, são apresentadas pequenas manchas cloróticas, espalhadas na superfície dos  
89 frutos infectados, que coalescem para lesões marrons, onde se forma uma massa pulverulenta  
90 na superfície do fruto, o pseudoestroma, local de produção dos esporos (EVANS, 2016).

91 Seus esporos apresentam elevada viabilidade em diversas condições ambientais,  
92 resistindo a condições adversas, como radiação e dessecação (RAM, 1989; PHILLIPS-MORA,  
93 2014). Isso garante sua sobrevivência por cerca de dois anos em frutos mumificados e por  
94 períodos mais curtos quando caem ao solo ou em frutos desprendidos das árvores, em materiais  
95 infestados podem sobreviver por um período de até 9 meses, o que aumenta a chance de  
96 introdução antrópica do patógeno em áreas indenes (WOOD; LASS, 1985; RAM, 1989;  
97 EVANS, 1986).

98 Os homens são grandes responsáveis pela disseminação de doenças a longa distância,  
99 sobrepondo barreiras geográficas (END *et al.*, 2017). A introdução de pragas em áreas indenes

100 pode ocorrer através da importação e movimentação de plantas e produtos vegetais,  
101 ocasionando a limitação da produção e restrição do acesso ao mercado de exportação  
102 (GANPAT *et al.*, 2019). O trânsito de pessoas e o transporte ilegal de materiais vegetais nas  
103 fronteiras com países vizinhos apresenta-se como um risco para a cacauicultura brasileira  
104 (MORAES *et al.*, 2012).

105 Desde a crise da vassoura de bruxa do cacau no Brasil, o país apresentou um forte  
106 declínio na produção de amêndoas de cacau, passando a importar amêndoas para suprir a  
107 demanda das indústrias moageiras nacionais (ZUGAIB, 2017), prevendo uma participação de  
108 cerca de 4,5% do mercado moageiro a nível mundial na safra 2019/2020 (ICCO, 2020). Essas  
109 amêndoas podem apresentar sujidades, indicadores de insetos, ácaros e roedores, e fungos,  
110 como espécies dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizopus* (KREIBICH *et al.*, 2014).

111 Medidas vêm sendo tomadas para impedir ou retardar a sua entrada no país (BRASIL,  
112 2018; LARANJEIRA *et al.* 2017), através da integração de ações de defesa sanitária vegetal,  
113 educação, pesquisa e extensão rural, estabelecidas a nível nacional (BRASIL, 2007). Devido a  
114 possibilidade de infestação de veículos, material vegetativo e embalagens, sacarias, roupas,  
115 sapatos, e outros objetos por esporos de *M. royeri*, aconselha-se o descarte ou lavagem de roupas  
116 utilizadas ao visitar uma área de ocorrência da praga e evitar visitar áreas livres por alguns dias,  
117 pois seus esporos podem também permanecer viáveis em pedaços de tecidos ou sobre o corpo  
118 humano (PHILLIPS-MORA, 2014).

119 Este estudo visa esclarecer questões acerca da viabilidade de esporos de *M. royeri* em  
120 artigos regulamentados como sacarias e amêndoas, bem como outros materiais inertes que  
121 podem atuar como veículos de dispersão do patógeno, avaliando a viabilidade a longo prazo  
122 dos propágulos de *M. royeri*, além de avaliar sua sobrevivência submetido a processos de  
123 beneficiamento de sementes. Este estudo torna-se fundamental para o estabelecimento de  
124 medidas de mitigação do risco de introdução da monilíase no Brasil via antrópica, bem como  
125 por meio de amêndoas importadas.

## 126 MATERIAL E MÉTODOS

127 Os ensaios experimentais de fermentação e viabilidade de esporos foram conduzidos nos  
128 laboratórios de Proteção Vegetal do Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias  
129 Pichilinge (INIAP), Quevedo, Equador, durante os meses de maio e dezembro de 2019.

### 130 1. Sobrevivência de *M. royeri* durante o processo de fermentação

#### 131 Obtenção de sementes de cacau

132 Frutos de diferentes genótipos de cacau nacional do Equador sadios e com sintomas  
133 característicos da monilíase do cacau foram coletados dentro da área experimental da

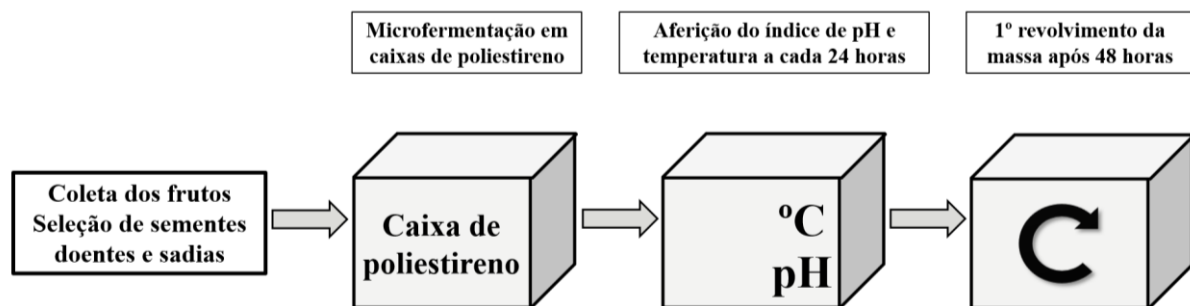
134 Estação Experimental Tropical Pichilingue (EETP) – INIAP, na cidade de Quevedo, Equador.  
 135 Os frutos coletados foram partidos após a colheita e as sementes retiradas dos frutos, separando-  
 136 as em lotes de sementes doentes e sadias para posterior utilização.

### 137 **Microfermentação de sementes de cacau**

138 Dois tratamentos de sementes de cacau foram submetidos a microfermentação, utilizando  
 139 massas de sementes: (i) sadias e (ii) doentes (proporção 1:1 de sadias e doentes). 4 kg das  
 140 massas de cada tratamento foram transferidas para caixas térmicas de poliestireno de 5 L com  
 141 perfurações no fundo, proporcionando o escoamento da polpa liquefeita da massa (EFRAIM,  
 142 2009). Cinco sementes doentes foram depositadas em sacos de nylon telado, estes foram  
 143 fechados e dispostos nas massas no início do processo de fermentação. O primeiro revolvimento  
 144 para aeração das massas foi realizado 48 horas após o início do processo de fermentação, sendo  
 145 então realizado a cada 24 horas até a finalização do processo, o qual foi dado após a observação  
 146 de queda abrupta de temperatura da massa.

147 A determinação da temperatura e pH das massas foi realizado no período inicial (0 horas)  
 148 e a cada 24 horas durante o processo de fermentação. Para determinação do pH 10 g de sementes  
 149 foram coletadas em triplicata, das extremidades e do centro da massa, transferidas para  
 150 Béqueres com 100 mL de água destilada (LATIMER, 2012) e aferidas com o auxílio de um  
 151 pHmetro de bancada Thermo Scientific Orion. A temperatura foi determinada em três pontos  
 152 da massa, nas extremidades da caixa e no centro da massa, com o auxílio de um termo  
 153 higrômetro digital (figura 3).

154 **Figura 3** – Esquema do processo de microfermentação de sementes de cacau, isolamento indireto e esporulação em testas de  
 155 sementes de cacau do fitopatógeno *Moniliophthora roreri*.



156

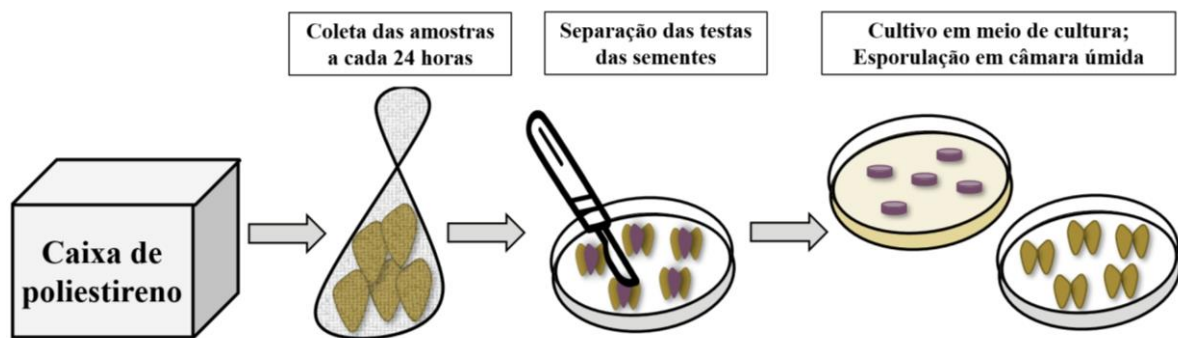
157 Fonte: Elaborada pelo autor

### 158 **Isolamento e esporulação de *M. roreri* em sementes doentes**

159 Um saco de nylon telado foi retirado das massas de sementes sadias e doentes a cada 24  
 160 horas até a finalização do processo de microfermentação, como controle foram utilizadas 5  
 161 sementes doentes e 5 sementes sadias antes do início do processo, bem como 5 e as sementes  
 162 sadias e doentes foram secas ao sol durante três dias.

163 Em câmara de fluxo laminar as testas foram retiradas das sementes coletadas com o  
 164 auxílio de uma pinça e bisturi estéreis, cortadas e 5 fragmentos de cada semente foram  
 165 transferidos para uma placa de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) com adição de  
 166 cloranfenicol (0,5 g/L), totalizando 5 placas por tratamento, as quais foram seladas com plástico  
 167 filme e incubadas a  $26 \pm 1^\circ \text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas e a emergência de colônias fúngicas  
 168 foi avaliada no decorrer de 7 dias e identificação dos gêneros foi realizada a partir de  
 169 características morfológicas dos fungos. As testas de 5 sementes retiradas das massas sadias e  
 170 doentes em cada período de avaliação foram transferidas para placas de Petri de 20 cm estéreis  
 171 em condições de câmara úmida por 24 horas (figura 4).

172 **Figura 4** – Processo de cultivo em meio de cultura batata dextrose ágar e esporulação em câmara úmida do fitopatógeno  
 173 *Moniliophthora roreri* a partir de sementes doentes submetidas a microfermentação.



174

175 Fonte: Elaborada pelo autor

176 O período de observação de esporulação foi correspondente a 7 dias. Esporos foram  
 177 transferidos para placas com meio BDA a fim de confirmar a emergência de colônias de *M.*  
 178 *roreri* de acordo com características morfológicas. O delineamento foi inteiramente  
 179 casualizado, com 5 repetições por tratamento e o experimento realizado em duplicata.

## 180 2. Viabilidade de esporos aderidos a materiais inertes

### 181 Obtenção de esporos de *M. roreri*

182 Frutos de cacaueteiro com sintomas típicos de monilíase foram coletados dentro da área  
 183 experimental da (EETP) – INIAP. A superfície dos frutos foi lavada em água corrente com o  
 184 auxílio de uma escova para remoção do micélio externo, limpa com álcool 70% e seca com o  
 185 auxílio de um papel toalha.

186 Os frutos foram fragmentados em discos por corte transversal com espessura de  
 187 aproximadamente 3 cm. Estes discos foram dispostos a uma distância de aproximadamente 5  
 188 cm em um palito de madeira estéril, transferidos e acondicionados em câmara úmida por 2 dias,  
 189 sendo posteriormente retirados da câmara úmida e deixados para secar por 5 dias em

190 temperatura ambiente. Ao final do processo os esporos produzidos na superfície dos discos  
191 foram coletados com o auxílio de um pincel estéril e armazenados em placa de Petri a  
192 temperatura de  $26 \pm 2$  °C.

### 193 **Inoculação dos materiais inertes**

194 Amostras de 1 cm<sup>2</sup> de papel, vidro, plástico, tecido, borracha (câmara de ar), papel  
195 alumínio e rafia, materiais utilizados comumente em campo, armazenamento e transporte de  
196 amêndoas de cacau, foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a temperatura de 121 °C  
197 e 1 atm de pressão. Posteriormente as amostras foram depositadas aleatoriamente em placas de  
198 cultivo de células de 24 poços com três repetições por tratamento, os esporos secos foram  
199 inoculados na superfície dos materiais com o auxílio de um pincel estéril. As placas foram  
200 fechadas com as tampas, vedadas com plástico filme e armazenadas no escuro a uma  
201 temperatura de  $26 \pm 2$  °C.

202 Os tratamentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado com três  
203 repetições por tratamento.

### 204 **Avaliação da viabilidade de esporos de *M. royeri***

205 A viabilidade dos esporos foi avaliada aos 7, 15, 30, 45 e 100 dias após inoculação (DAI)  
206 com base na germinação de esporos. Foi realizada uma suspensão de concentração  $1 \times 10^5$   
207 esporos mL<sup>-1</sup> em água destilada, inoculada em placas de Petri contendo meio Sabouraud  
208 Dextrose Ágar (SDA), suplementado com extrato de levedura (YE) (1,5 g L<sup>-1</sup>) e adicionado  
209 cloranfenicol (50 mg L<sup>-1</sup>). As placas foram acondicionadas em câmara úmida no escuro por 72  
210 horas a uma temperatura de  $26 \pm 2$  °C. Após este período foram contados 100 esporos ao acaso  
211 em microscópio ótico, considerando germinados aqueles que apresentaram tubo germinativo  
212 maior que o tamanho do esporo. A viabilidade foi calculada em relação ao percentual de  
213 germinação do controle, avaliado antes da montagem do experimento, seguindo a seguinte  
214 fórmula:

$$215 \text{ Viabilidade (\%)} = [(GC - GT) / GC] \times 100$$

216 Onde GC: Germinação do controle de esporos de *M. royeri*. GT: Germinação de esporos de  
217 *M. royeri* dos tratamentos em cada período de avaliação.

218 Os dados foram submetidos à análise de variância e os tratamentos comparados pelo teste  
219 de Tukey (P<0,05) utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

## 220 **RESULTADOS**

### 221 **1. Sobrevivência de *M. royeri* durante o processo de fermentação**

#### 222 **Obtenção de sementes de cacau**

223 Os sintomas observados nos frutos coletados em campo e suas sementes foram



224 característicos da monilíase do cacauero, como descrito por Evans (1981), com manchas  
 225 necróticas na casca dos frutos e sementes agregadas umas às outras e à casca do fruto.

### 226 **Microfermentação de sementes de cacau**

227 A metodologia utilizada para o processo de microfermentação das massas de sementes  
 228 de cacau sadias e doentes mostrou-se eficiente, promovendo incremento no índice de pH e  
 229 apresentando variação de temperatura durante o período avaliado (figura 5).

230 **Figura 5** - Processo de microfermentação de sementes de cacau. A, B) Massa de sementes de cacau sadias doentes;  
 231 C) Sementes de cacau em sacos de nylon telado; D) Caixas de poliestireno utilizadas no processo de  
 232 microfermentação de sementes de cacau; E, F) Massas de sementes sadias e doentes após 96h de fermentação

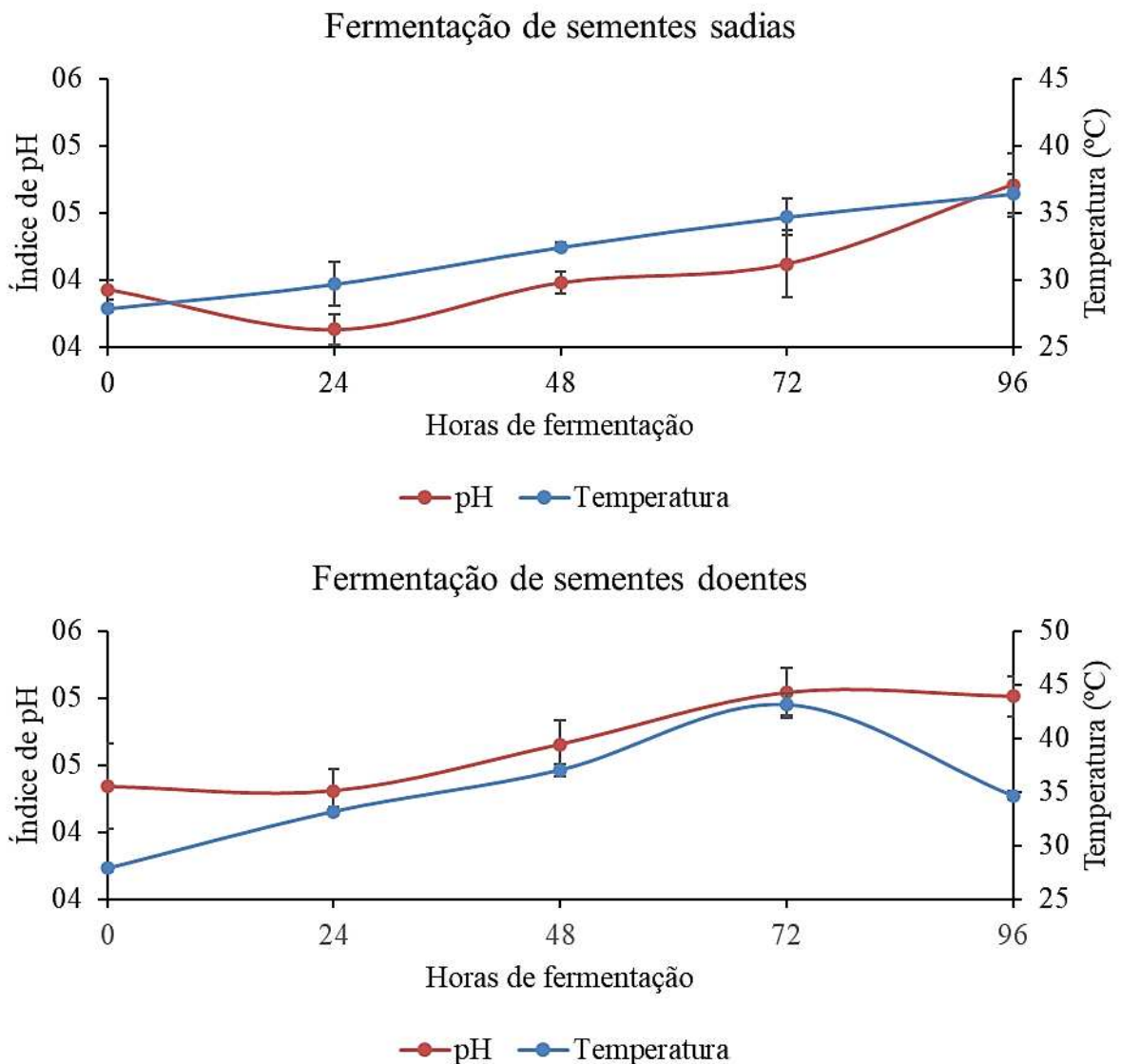


233

234 Fonte: Elaborada pelo autor

235 A temperatura média de ambas as massas de sementes no início do processo de  
 236 fermentação ficou próxima a 26° C. As massas de semente doentes apresentaram pico de  
 237 temperatura máxima às 72 horas de fermentação, chegando próxima a 45° C, a temperatura  
 238 máxima apresentada pela massa de sementes saudias foi de 38 °C as 96 horas. O índice de pH  
 239 apresentou incremento desde o início até ao final do processo, dado às 96 horas, dados  
 240 apresentados na figura 6.

241 **Figura 6** - Comportamento da temperatura e índice de pH avaliado a cada 24 horas do processo de microfermentação  
 242 de massas de sementes de cacau sadia e doente em caixas de poliestireno, apresentado em valores médios e seus  
 243 respectivos desvios padrão



244

245 Fonte: Elaborada pelo autor

246 Durante a avaliação realizada as 96 horas, as massas de sementes doentes apresentaram  
 247 uma queda abrupta da temperatura, após o pico apresentado pela às 72 horas, esse  
 248 comportamento marcou o fim do processo de fermentação. As massas de sementes saudias, por



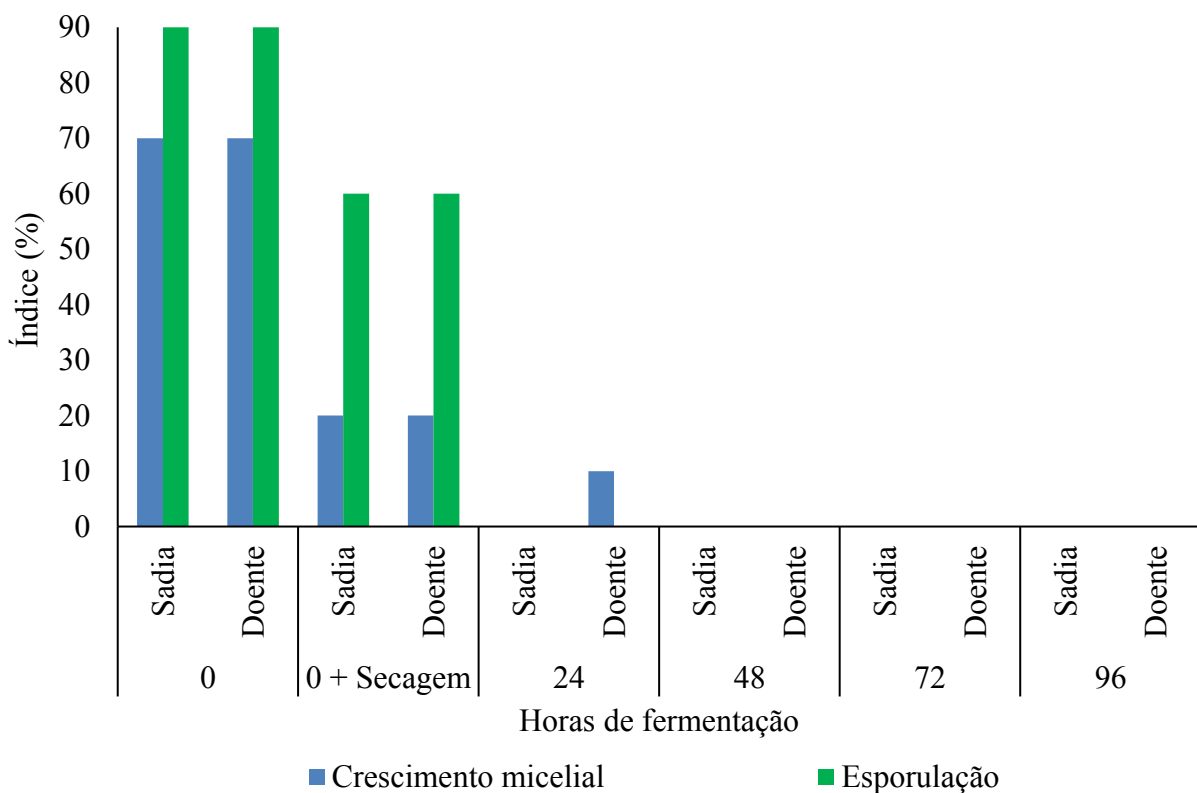
249 sua vez, não apresentaram queda abrupta na temperatura durante o período avaliado, no entanto,  
250 a fermentação também foi finalizada às 96 horas.

251 O índice de pH dentro de cada tratamento elevou-se durante o período avaliado, as massas  
252 de sementes saudáveis apresentaram pH entre 3,5 a 4,8, do início ao fim da fermentação, e as  
253 massas de sementes doentes apresentaram pH variando entre 4,0 a 5,0.

#### 254 **Isolamento e esporulação de *M. roreri* em sementes doentes**

255 A presença de *M. roreri* em sementes de cacau doentes, observada através do  
256 plaqueamento em meio de cultura, foi constatada em sementes doentes não submetidas a  
257 microfermentação (0 horas), não submetidas a microfermentação (0 horas) e secas por três dias  
258 ao sol, bem como após 24 horas do processo de microfermentação. A esporulação de *M. roreri*  
259 em testas de sementes enfermas, submetidas a câmara úmida, foi observada apenas naquelas  
260 não submetidas ao processo de microfermentação, não sendo observada esporulação de *M.*  
261 *roreri* durante os demais períodos de avaliação realizados. (figura 2.4).

262 **Figura 7** - Percentual de colônias de *Moniliophthora roreri* obtidas através do isolamento indireto em meio batata  
263 dextrose ágar a partir de sementes de cacau doentes, submetidas a fermentação em massas de sementes saudáveis e  
264 doentes, avaliadas em padrão temporal, e não submetidas a fermentação *in natura* e secas ao sol por 3 dias



265

266 Fonte: Elaborada pelo autor

## 267 **2. Viabilidade de esporos aderidos a materiais inertes**

### 268 **Obtenção de esporos de *M. roreri***

269 A metodologia utilizada para obtenção de esporos de *M. royeri*, a partir de discos de  
 270 frutos doentes submetidos a câmara úmida, foi eficiente, obtendo quantidade de esporos  
 271 superior a requerida para a montagem do experimento (figura 8).

272 **Figura 8** - Processo de obtenção de esporos secos provenientes de frutos de cacaueteiro com sintomas de monilíase  
 273 do cacaueteiro. A, B) Discos de frutos de cacaueteiro doentes em câmara úmida; C) Crescimento micelial de *M. royeri*  
 274 após 48 horas em câmara úmida; D) Iscas fora da câmara úmida após 72 horas; E, F) Coleta de esporos secos do  
 275 fitopatógono



276

277

Fonte: Elaborada pelo autor

278

### **Avaliação da viabilidade de esporos de *M. royeri***

279

Os esporos de *M. royeri* inoculados em materiais inertes apresentaram-se viáveis em

280 todos os períodos avaliados, mostrando uma redução gradativa da sua viabilidade ao longo do  
 281 período de avaliação. A viabilidade dos esporos apresentou diferença significativa ( $P < 0,05$ )  
 282 entre as médias dos tratamentos avaliados durante os períodos de 15 e 45 dias, sendo as médias  
 283 máximas apresentadas 7 dias após a inoculação (DAI) e as menores médias esporos viáveis  
 284 observadas durante a última avaliação, realizada aos 100 DAI (tabela 1).

285 **Tabela 1** – Viabilidade média de esporos de *Moniliophthora roreri* aderidos a materiais inertes avaliados em padrão temporal

Materiais	Viabilidade média (%) por período de avaliação (Dias)				
	7	15	30	45	100
<b>Alumínio</b>	77,9 ± 8,6	61,5 ± 15,8 ab*	30 ± 9,4	26,8 ± 3,7 bc	23,3 ± 4,6 ab
<b>Papel</b>	70,9 ± 16,8	55,4 ± 4,5 ab	31,9 ± 16,3	21,1 ± 5,1 ab	20,7 ± 2,5 ab
<b>Plástico</b>	88,3 ± 4,5	74,2 ± 4,3 ab	44,1 ± 12,0	35,9 ± 4,9 bc	26,6 ± 4,0 a
<b>Borracha</b>	76,1 ± 7,0	60,1 ± 15,5 b	28,2 ± 7,5	30,5 ± 2,9 c	14,7 ± 4,0 b
<b>Ráfia</b>	73,2 ± 6,1	55,4 ± 10,8 b	26,6 ± 7,2	18,8 ± 2,2 c	24,0 ± 3,5 ab
<b>Tecido</b>	90,6 ± 7,1	87,8 ± 6,4 a	46,3 ± 10,8	46,0 ± 2,9 a	20,0 ± 4,6 ab
<b>Vidro</b>	79,3 ± 2,9	54,5 ± 0,8 b	31,0 ± 8,6	23,9 ± 6,5 bc	21,7 ± 0,3 ab
<b>Média</b>	79,5 ± 10,1	64,1 ± 10,4	33,3 ± 12,2	29 ± 9,7	21,6 ± 4,7
<b>CV (%)</b>	12,7	16,22	36,63	33,45	21,75

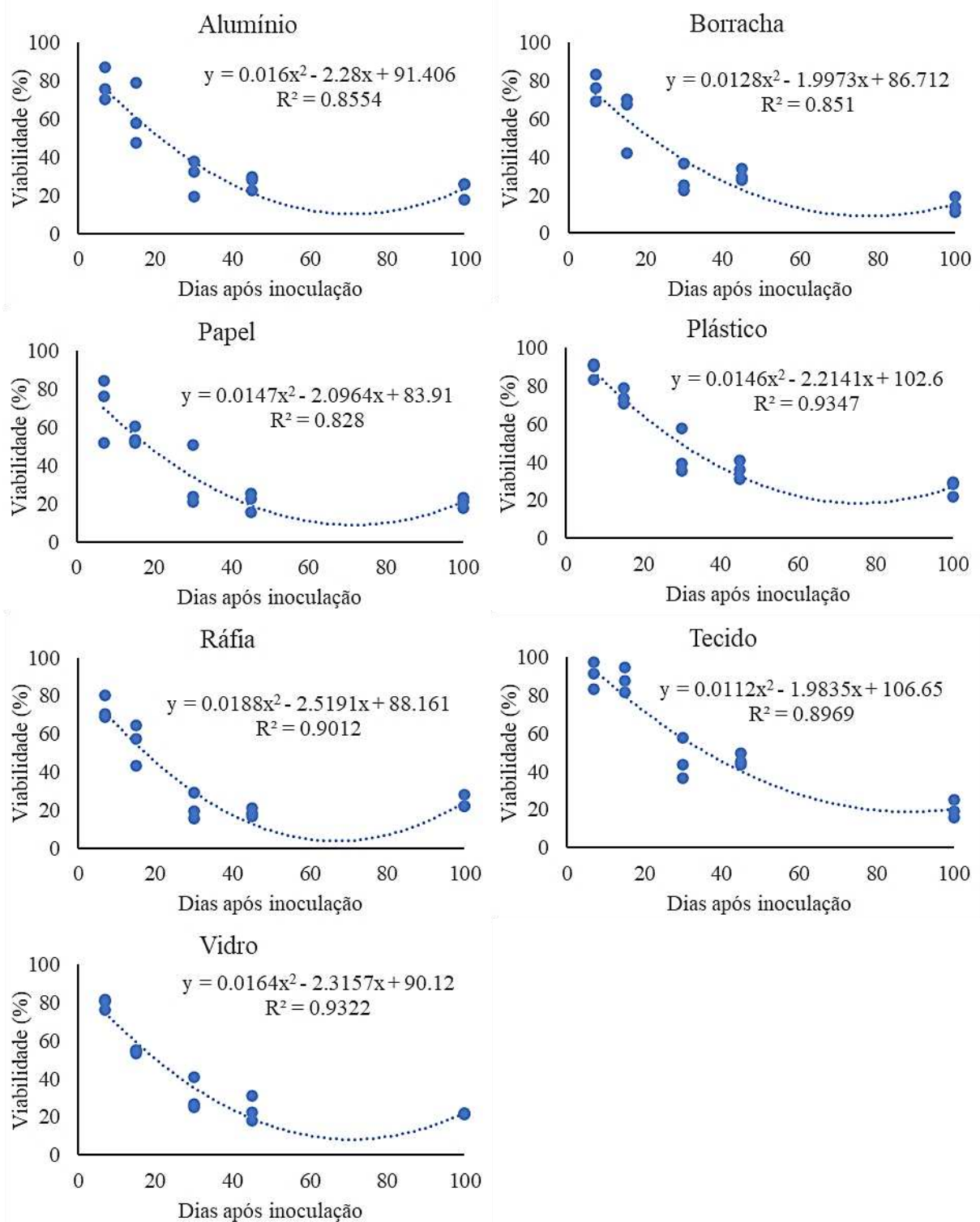
286 Fonte: Elaborada pelo autor

287 \*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de  
 288 probabilidade.

289 O maior percentual de esporos viáveis foi apresentado pelos esporos recuperados a partir  
 290 de fragmentos de plástico, o qual apresentou média máxima de 88,3% aos 7 DAI e mínima de  
 291 28,7% de esporos viáveis aos 100 DAI, não apresentando diferença significativa entre as médias  
 292 dos outros tratamentos. Os esporos recuperados da inoculação em borracha apresentaram o  
 293 menor percentual médio de esporos viáveis aos 100 DAI, com média de 14,7%. Com os dados  
 294 obtidos foram calculadas equações polinomiais que apresenta o comportamento da viabilidade  
 295 dos esporos aderidos a materiais inertes durante o tempo de avaliação (figura 9).

296  
297  
298

**Figura 9** - Regressão polinomial da viabilidade em padrão temporal de esporos de *Moniliophthora roreri* aderidos a materiais inertes, avaliado através da germinação de esporos em meio Saboraud-agar, suplementado com extrato de levedura



299

300

Fonte: Elaborada pelo autor

301

## DISCUSSÕES

302

A fermentação de sementes de cacau apresenta-se como um dos processos primários necessários para adquirir características comerciais, junto com a colheita e quebra de

303

304 frutos de cacau e secagem das sementes fermentadas (COPETTI, 2009). Durante o processo, a  
305 inibição do desenvolvimento de patógenos ocorre, provavelmente, em decorrência das  
306 alterações do pH e temperatura ocasionados pela ação de outros microrganismos  
307 (OLANBIWONINU *et al.*, 2018).

308 A temperatura da massa de sementes de cacau apresenta um incremento na temperatura,  
309 apresentando valor superior a 40 °C, podendo atingir até 50 °C (SCHWAN; WHEALS, 2004).  
310 Esse incremento é considerado típico, ocasionado pela ação de leveduras que se proliferam  
311 liberando enzimas pectinolíticas e metabolizam açúcares na polpa das sementes para etanol,  
312 posteriormente oxidado a ácido acético por meio de uma reação exotérmica (LOPEZ; DIMICK,  
313 1995; SCHWAN; WHEALS, 2004; NIELSEN, 2006). Essa faixa de temperatura é superior a  
314 faixa considerada ótima para o crescimento *in vivo* de *M. royeri*, que varia entre 25-26 °C, com  
315 máxima de 33 °C (EVANS, 2016).

316 O valor do índice de pH inicial associam-se, principalmente, a presença de ácido cítrico  
317 na polpa das sementes (THOMPSON; FLEET, 2003). O aumento no valor desse índice se dá  
318 através da metabolização de carboidratos (glicose e frutose) e ácido cítrico pelos  
319 microrganismos presentes nas massas de sementes (BASTOS, 2016). A diversidade da  
320 microbiota presente durante a fermentação é decorrente de uma ação antrópica, associada ao  
321 manejo dos frutos (colheita, transporte e quebra) e sementes de cacau, bem como ao local onde  
322 o processo se realiza (SCHWAN; WHEALS, 2004).

323 O cultivo indireto de microrganismos através do plaqueamento de sementes doentes em  
324 meio de cultura tem sido o método mais implementado para determinação da diversidade  
325 microbiana durante o processo de fermentação de sementes de cacau em diversos trabalhos  
326 (SCHWAN; WHEALS, 2004), ainda que métodos moleculares apresentarem maior eficiência  
327 na identificação (PAPALEXANDRATOU *et al.*, 2011). Apesar de consideradas  
328 microbiologicamente estéreis quando no interior dos frutos (SCHWAN; WHEALS, 2004), as  
329 sementes de cacau provenientes de frutos doentes apresentaram estruturas viáveis cultiváveis  
330 do patógeno.

331 Esporos de diferentes ascomicetos e basidiomicetos aderidos a fômites, como metais,  
332 tecidos, madeira e plástico, podem apresentar-se viáveis por um período de até um ano, mesmo  
333 quando submetidos a diferentes regimes de temperatura (BARUA *et al.*, 2016; 2017; 2018). De  
334 modo geral, fungos e seus esporos apresentam mais resistentes que vírus e bactérias, resistindo  
335 a desidratação, reidratação, bem como a radiação UV (COX, 1989, 1998; KARRA;  
336 KATSIVELA, 2007). De acordo com a sobrevivência dos propágulos fúngicos, materiais  
337 inertes podem atuar no transporte de patógenos entre áreas (BARUA *et al.*, 2016). Os esporos

338 produzidos por *M. royeri* apresentam resistência a altas temperaturas e radiações UV e solar, o  
 339 que garante sua viabilidade por até 9 meses quando em condições secas (RAM, 1989).

340 Dessa maneira, de acordo com os resultados obtidos, observa-se que a fermentação é uma  
 341 prática importante para inibir o desenvolvimento de *M. royeri* a partir de sementes doentes,  
 342 impedindo o desenvolvimento micelial em meio de cultura e a esporulação em testas de  
 343 sementes doentes, e que esporos de *M. royeri* podem manter-se viáveis por meses em materiais  
 344 inertes, os quais podem atuar no transporte de propágulos entre áreas.

### 345 CONCLUSÕES

- 346 • Sementes de cacau infectadas por *M. royeri*, quando não submetidas ao processo de  
 347 fermentação em caixas de poliestireno, apresentam crescimento do patógeno em meio de  
 348 cultura, mesmo quando secas ao sol por 3 dias;
- 349 • O processo de fermentação em caixas de poliestireno interfere no desenvolvimento de *M.*  
 350 *royeri* em meio de cultura, não sendo observado crescimento micelial do patógeno a partir  
 351 de sementes coletadas entre 48 e 96 horas de fermentação, apresentando-se como um  
 352 processo fundamental para a morte do patógeno;
- 353 • Esporos secos de *M. royeri* quando inoculados em materiais inertes, tais como alumínio,  
 354 papel, plástico, borracha, rafia, tecido e vidro, permanecem viáveis mesmo após dias após  
 355 a inoculação;

### 356 AGRADECIMENTOS

357 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela  
 358 concessão da bolsa de estudo; à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), ao  
 359 Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia e à Comissão Executiva do Plano da Lavoura  
 360 Cacaueira (CEPLAC) pelo suporte; ao Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias  
 361 (INIAP) – Equador, pelo suporte para o desenvolvimento do trabalho e ao Ministério Público  
 362 da Bahia pelo financiamento.

### 363 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 364 BARUA, P. *et al.* A rapid and miniaturized system using Alamar blue to assess fungal spore viability:  
 365 implications for biosecurity. **Eur. J. Plant Pathol**, p. 1-12, 2016.  
 366
- 367 BARUA, P. *et al.* Extended survival of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* urediniospores: implications for  
 368 biosecurity and on-farm management. **Plant Pathology**, 67(4), p. 799–809, 2017.  
 369
- 370 BARUA, P. *et al.* Inert Materials as Long-Term Carriers and Disseminators of Viable *Leptosphaeria maculans*  
 371 Ascospores and Wider Implications for Ascomycete Pathogens. **Plant disease** 102 (4), p. 720-726, 2018.  
 372
- 373 BASTOS, V S. **Sucessão microbiana e dinâmica de substratos e metabólitos durante a fermentação**  
 374 **espontânea de grãos de cacau (*Theobroma cacao* L.), variedade clonal TSH 565, cultivado no sul da Bahia.**  
 375 2016. 132f. Tese (Doutorado) - UFRJ/IQ, Rio de Janeiro-RJ.  
 376



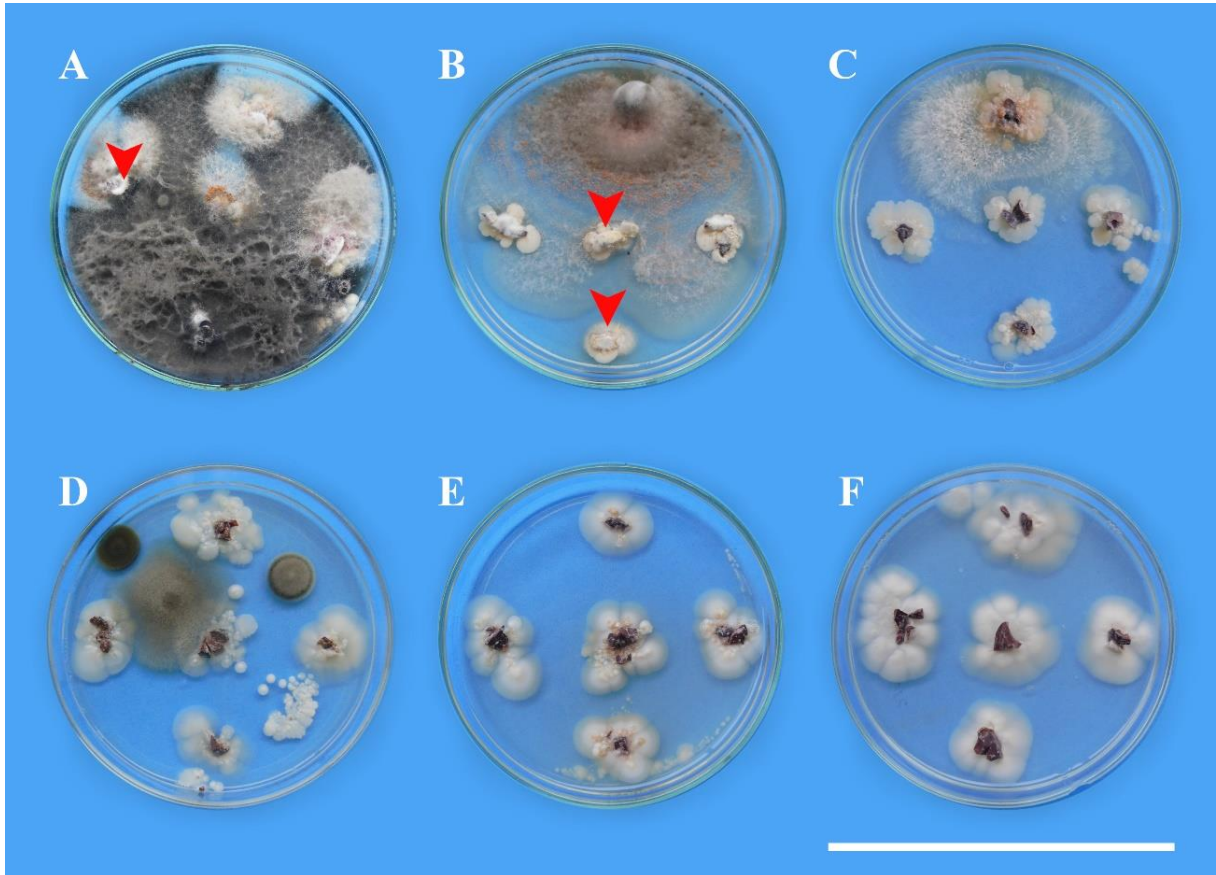
- 377 BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – (MAPA). Instrução normativa nº 39, de 1 de  
378 outubro de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 11-14, 2018.
- 379
- 380 BRASIL, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA) - Secretaria de defesa agropecuária.  
381 **Plano de Contingência para Monilíase do Cacaueiro (*Moniliophthora roreri*)**, 2007.
- 382
- 383 CAMPUZANO LONDOÑO, H. Fluctuaciones de población de esporas de *Monilia roreri* y su viabilidad durante  
384 un ciclo completo de afección. In: **Actas. 8. Conferencia Internacional de Investigación en Cacao**. Cartagena  
385 (Colombia); 18-23 Oct 1981p. 425-428.
- 386
- 387 COPETTI, M. V. **Micobiota do cacau: fungos e micotoxinas do cacau ao chocolate**. 2009.173f. Tese  
388 (Doutorado) – UNICAMP, Campinas - SP.
- 389
- 390 COX, C. S. Airborne bacteria and viruses. **Science Progress** (1933-), p. 469-499, 1989.
- 391
- 392 COX, C. S. The microbiology of air. In: COLLIER L.; BALOWS A.; SUSSMAN M. (Eds). **Topley & Wilson's**  
393 **microbiology and microbial infections**, ed. 9, London, UK, 1998. p. 339-350.
- 394
- 395 EFRAIM, P. **Contribuição à melhoria de qualidade de produtos de cacau no Brasil, por meio da**  
396 **caracterização de derivados de cultivares resistentes à vassoura-de-bruxa e de sementes danificadas pelo**  
397 **fungo**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). 2009. 226f. Universidade Estadual de Campinas,  
398 Campinas – SP.
- 399
- 400 EL-TARABILY, K. A. Suppression of *Rhizoctonia solani* disease of sugar beet by antagonistic and plant growth-  
401 promotion yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 1, p. 69-75, 2004
- 402
- 403 END, M. J. *et al.* Technical guidelines for the safe movement of cacao germplasm. **Revised from the**  
404 **FAO/IPGRI Technical Guidelines**, No. 20 (Third Update, October 2017). Global Cacao Genetic Resources  
405 Network (CacaoNet), Bioversity International, Roma, Itália, 89p., 2017.
- 406
- 407 EVANS, H. C. Cacao diseases – The trilogy revisited. **Phytopathology**, v. 97, p. 1640-1643, 2007.
- 408
- 409 EVANS, H. C. Frosty Pod Rot (*Moniliophthora roreri*). In: BAILEY, B. A.; MEINHARDT, L. W. (Eds.) **Cacao**  
410 **Diseases, A History of Old Enemies and New Encounters**, 2016. p. 63-96.
- 411
- 412 EVANS, H. C. Invasive neotropical pathogens of tree crops. In: WATLING, R. *et al.* (Eds.), **Tropical**  
413 **mycology. Micromycetes**, Wallingford: CAB International, v. 2, 2002. p. 83-112.
- 414
- 415 EVANS, H. C. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora (Monilia) roreri*. **Phytopathological Papers**, v. 24,  
416 1981.
- 417
- 418 EVANS, H. C. *et al.* On the taxonomy of *Monilia roreri*: an important pathogen of *Theobroma cacao* in South  
419 America. **Canadian Journal of Botany**, 56, p. 2528-2532, 1978.
- 420
- 421 FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-  
422 1042, 2011.
- 423
- 424 GANPAT, W. *et al.* Caribbean plant quarantine officers' self-perceived competencies and training needs for  
425 regional food security. **Journal of Agricultural & Food Information**, 20 (2), p. 1-12, 2019.
- 426
- 427 GOTSCH, N. Cocoa crop protection: An expert forecast on future progress, research priorities and policy with  
428 the help of the Delphi survey. **Crop Protection**, 16, p. 227-233, 1997.
- 429
- 430 ICCO – International Cocoa Organization. **Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics**, Vol. XLVI, No. 1, Cocoa  
431 year 2019/20, 2020. Disponível em: [https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-](https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/doc_download/4565-grindings-qbcs-xlvi-no-1.html)  
432 [agreements/doc\\_download/4565-grindings-qbcs-xlvi-no-1.html](https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/doc_download/4565-grindings-qbcs-xlvi-no-1.html). Acesso em: 08/04/2020.
- 433
- 434 KARRA, S.; KATSIVELA, E. Microorganisms in bioaerosol emissions from wastewater treatment plants during  
435 summer at a Mediterranean site. **Water Research**, 41, p. 1355-1365, 2007.
- 436

- 437 KREIBICH, H. H. *et al.* Insetos, Ácaros e Fungos - Indicadores de Segurança de Produtos de Cacau (*Theobroma*  
438 *cacao* L.) e sua Relação com Qualidade. In: CONFERÊNCIA BRASILEIRA DE PÓS-COLHEITA. **Anais [...]**,  
439 2014. Disponível em: [http://eventos.abrapos.org.br/anais/paperfile/110\\_20142111\\_01-58-29\\_4810.pdf](http://eventos.abrapos.org.br/anais/paperfile/110_20142111_01-58-29_4810.pdf). Acesso  
440 em 13 de abril de 2020.
- 441  
442 LARANJEIRA, F. F. *et al.* **Priorização de pragas quarentenárias ausentes: metodologia e lista das 20**  
443 **pragas mais importantes**, Cruz das Almas, Bahia – Brasil, 2017.
- 444  
445 LATIMER, G. W. AOAC International. **Official methods of analysis of AOAC International**. 19th ed.  
446 Gaithersburg, MD, USA: AOAC International, 2012.
- 447  
448 LEACH, A. W. *et al.* Modelling *Moniliophthora roreri* in Costa Rica. **Crop Protection**, 21, p. 317-326, 2002.
- 449  
450 LOPEZ, A. S.; DIMICK, P. S. Cocoa Fermentation. In: REHM, H.; REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W  
451 (Eds.). **Biotechnology**. Enzymes, Biomass, Food and Feed, 2nd edition. VCH, Weinheim: Alemanha, v.9, 1995.  
452 p. 561-577.
- 453  
454 MORAES, W. B. *et al.* An analysis of the risk of cocoa moniliasis occurrence in Brazil as the result of climate  
455 change. **Summa Phytopathologica**, v. 38, p. 30-35, 2012.
- 456  
457 NIELSEN, D. S. **The microbiology of Ghanaian cocoa fermentation**. 2006. 82f. Tese (Doutorado) - The  
458 Royal Veterinary and Agricultural University, Dinamarca.
- 459  
460 OLANBIWONINU, A. *et al.* Survival of selected pathogens during the production and storage of *Iru* a  
461 fermented vegetable condiment. **Annals. Food Science and Technology**, Volume 19, Issue 3, p. 608-6015,  
462 2018.
- 463  
464 PAPALEXANDRATOU, Z.; CAMU, N.; FALONY, G.; DE VUYST, L. Comparison of the bacterial species  
465 diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. **Food**  
466 **Microbiology**, v.28, p. 964-973, 2011.
- 467  
468 PHILLIPS-MORA, W. *et al.* First report of frosty pod rot (moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri*  
469 on cacao in Belize. **Plant Pathology**, v.55, 2006.
- 470  
471 PHILLIPS-MORA, W. *Moniliophthora Pod Rot* (Frosty Pod Pot or moniliasis disease). In: END, M. J.;  
472 DAYMOND, A. J.; HADLEY, P. (Eds.). **Technical guidelines for the safe movement of cacao germplasm**.  
473 Revised from the FAO/IPGRI Technical Guidelines No. 20, 2014. p. 29-31.
- 474  
475 PLOETZ, R. The Impact of Diseases on Cacao Production: A Global Overview. In: BAILEY, B. A.,  
476 MEINHARDT, L. W. **Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters**, Springer  
477 International Publishing, 2016. p. 33-59.
- 478  
479 PORRAS V. H.; GONZÁLEZ L. C. Epifitología de la moniliasis del cacao (*Monilia roreri*) y su relación con el  
480 ciclo de producción en la zona de Matina, Costa Rica. **Fitopatología**. v. 19. n. 2, p. 78-84, 1984.
- 481  
482 RAM, A. **Biology, epidemiology and control of moniliasis (*Moniliophthora roreri*) of cacao**. 1989. 286f.  
483 Tese (Doutorado) - University of London, England.
- 484  
485 SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality.  
486 Critical Reviews. **Food Science and Nutrition**. v.44, p. 205-221, 2004.
- 487  
488 THOMPSON, M. M.; FLEET, G. H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia.  
489 **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.86, n.1-2, p. 87-99, 2003.
- 490  
491 WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Cocoa**, ed. 4, 1985.
- 492  
493 ZUGAIB, A. C. C.; ANDRADE, F. C. A. Uma análise dos mercados nacional e internacional de cacau e  
494 chocolate. In: GOMES, A. S.; PIRES, M. M (Eds.). **Cacaucultura: estrutura produtiva, mercados e**  
495 **perspectivas**, 2017. p. 207-228.



## 496 ANEXO I – FIGURAS

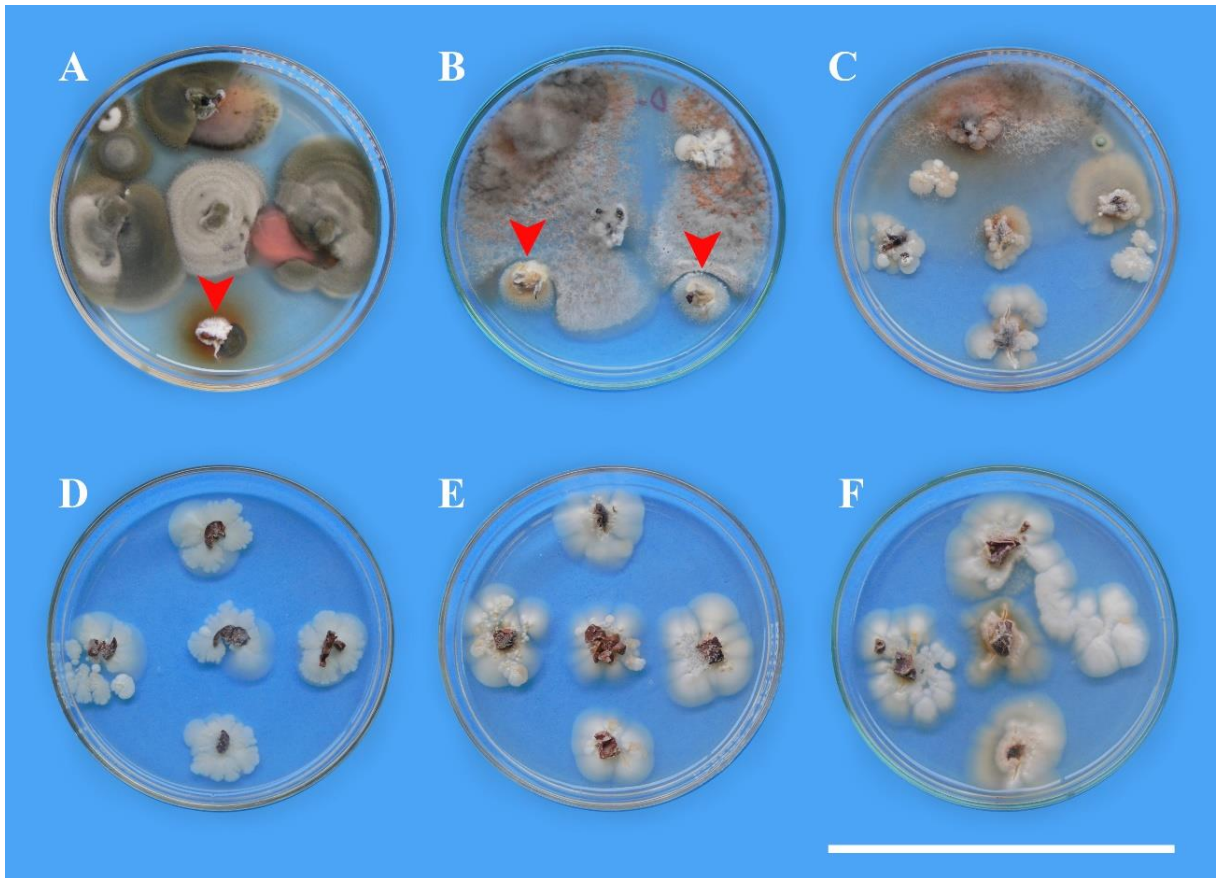
497 **Figura 10** - Cultivo de *Moniliophthora roreri* em meio batata dextrose ágar a partir de sementes de cacau doentes  
498 submetidas a fermentação em massa de sementes saudas. Tratamentos (sementes): A) Não fermentadas secas por  
499 3 dias; B) Não fermentadas; C) 24h de fermentação; D) 48h de fermentação; E) 72h de fermentação; F) 96h de  
500 fermentação. Setas indicam colônias de *M. roreri*. Barra = 9 cm



501  
502

Fonte: Elaborada pelo autor

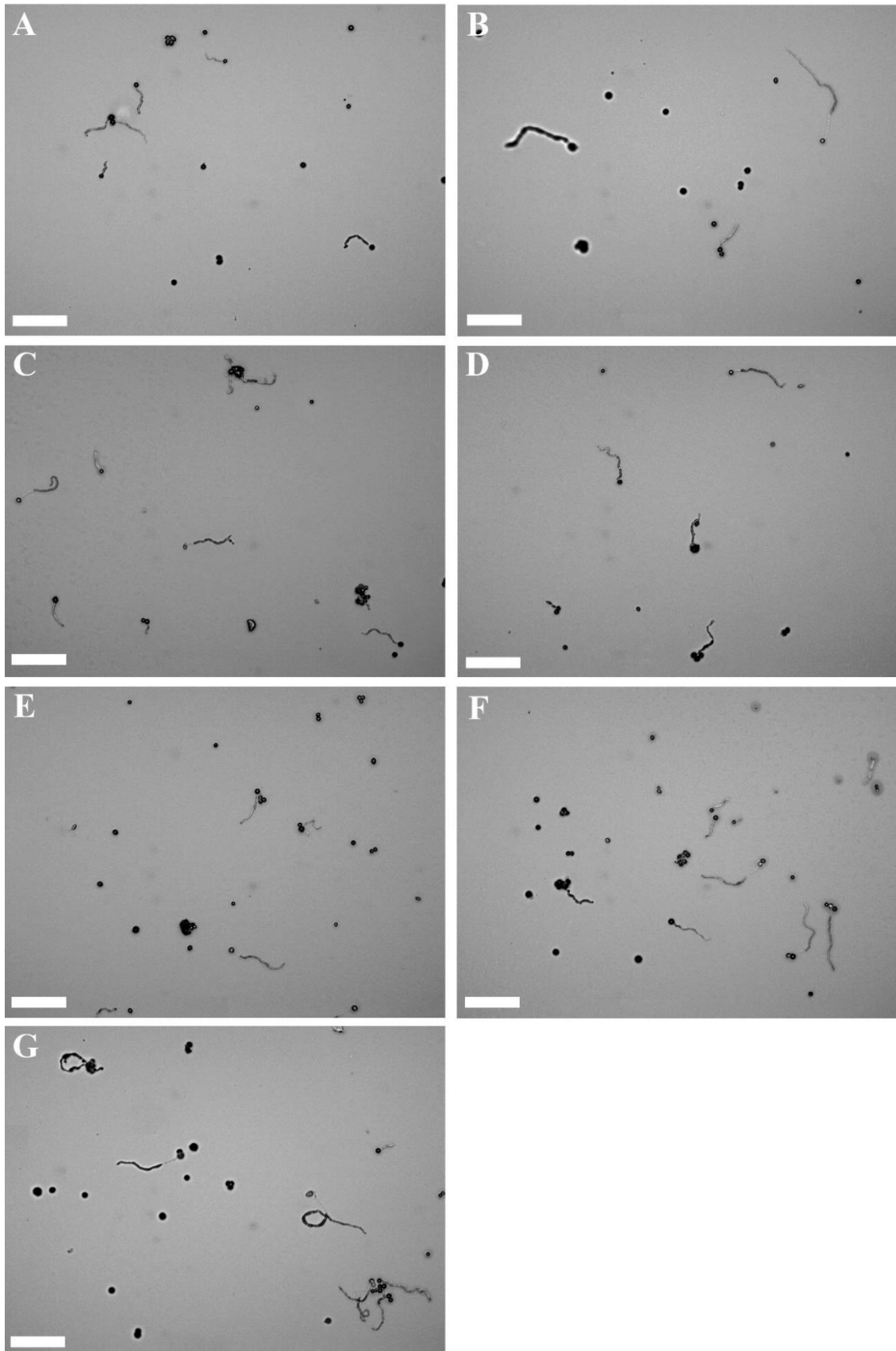
503 **Figura 11** - Cultivo de *Moniliophthora roreri* em meio batata dextrose ágar a partir de sementes de cacau doentes  
504 submetidas a fermentação em massa de sementes doentes. Tratamentos (sementes): A) Não fermentadas secas por  
505 3 dias; B) Não fermentadas; C) 24h de fermentação; D) 48h de fermentação; E) 72h de fermentação; F) 96h de  
506 fermentação. Setas indicam colônias de *M. roreri*. Barra = 9 cm



507  
508

Fonte: Elaborada pelo autor

509 **Figura 12** - Germinação de esporos de *Moniliophthora roreri* observados em microscópio óptico sob objetiva de  
510 40X. Esporos recuperados 45 dias após inoculação em materiais inertes: A) Alumínio; B) Papel; C) Plástico; D)  
511 Borracha; E) Ráfia; F) Tecido; G) Vidro. Barra = 1000  $\mu$ m



512

513

Fonte: Elaborada pelo autor

**CAPÍTULO III****Leveduras da carposfera e filosfera de cacauzeiros no biocontrole da monilíase do  
cacauzeiro (*Moniliophthora roreri*)**

1           **LEVEDURAS DA CARPOSFERA E FILOSFERA DE CACAUEIROS NO**  
2           **BIOCONTROLE DA MONILÍASE DO CACAUEIRO (*Moniliophthora roreri*)**

3  
4  
5 ESTRELA JÚNIOR, A. S. <sup>1</sup>; GRAMACHO, K. P. <sup>2</sup>; PIMENTA NETO, A. A. <sup>3</sup>; DIORATO, V.  
6 S. <sup>2</sup>; SOLÍS, Z. K. <sup>4</sup>; VERA, D. I. <sup>4</sup>; LARANJEIRA, D. <sup>1</sup>

7  
8 <sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade  
9 Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

10 <sup>2</sup>Laboratório de Fitopatologia Molecular, Centro de Pesquisa de Cacau (CEPEC)/CEPLAC,  
11 Ilhéus, Bahia, Brasil.

12 <sup>3</sup>Cesupi - Faculdade de Ilhéus, Ilhéus, Bahia, Brasil.

13 <sup>4</sup>Departamento Nacional de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigaciones  
14 Agropecuarias (INIAP), Quevedo, Los Ríos, Equador.

15  
16 \*Autor para correspondência

17 Correio eletrônico: [delson.laranjeira@ufrpe.br](mailto:delson.laranjeira@ufrpe.br)

18 **RESUMO**

19

20 A monilíase do cacau é uma doença agressiva que pode reduzir significativamente a  
21 produção da cultura, apresenta-se como a doença de maior importância para os países  
22 produtores nas Américas, não havendo relato de ocorrência da doença no Brasil. Seu manejo é  
23 realizado, principalmente, através do controle cultural, uma vez que o controle químico da  
24 doença é pouco eficaz e oneroso, não havendo variedades de cacau resistentes à doença. O  
25 presente trabalho teve como objetivo isolar leveduras presentes na microbiota de tecidos do  
26 cacau promissoras para o biocontrole da doença, selecionar *in vitro* isolados antagônicos a  
27 *Moniliophthora roreri*, identificar a nível molecular os isolados selecionados e estudar seus  
28 mecanismos de ação antagônica ao fitopatógeno. A seleção inicial foi feita através do  
29 confronto em cultivo pareado em meio batata dextrose ágar de 2 isolados de *M. roreri*,  
30 provenientes de regiões diferentes do Equador, com 44 isolados de leveduras, cultivados  
31 individualmente, e quanto a sobrevivência dos isolados cultivados a temperatura corporal. A  
32 identificação molecular dos isolados foi realizada com o primers específicos para a subunidade  
33 maior do RNA ribossomal (LSU rRNA), e a caracterização da ação antagônica se deu através  
34 da avaliação da inibição do crescimento micelial do fitopatógeno por cultivo conjunto, pela  
35 ação antifúngica de compostos orgânicos filtrados e termoestáveis, bem como a ação de  
36 metabólitos orgânicos voláteis, além de avaliar a produção de biofilme. Foram selecionados 7  
37 isolados de leveduras, os quais apresentaram percentual médio de inibição de crescimento  
38 micelial superior a 71% em cultivo pareado, os quais não cresceram a temperatura corporal. Os  
39 isolados de leveduras mostraram diferentes índices de formação de biofilme e ação inibitória  
40 do fitopatógeno por diferentes mecanismos, apresentando-se promissoras para o controle de *M.*  
41 *roreri in vivo*.

42

43 **Palavras-chave:** cacau, controle biológico, antagonismo.

44 **ABSTRACT**

45

46 Frosty pod rot is the most important disease of cacao in Central and South America, strongly  
47 decreasing the production in these regions, except in Brazil, where the disease is not present.  
48 The majority of the disease control is carried out by cultural control, chemical control is not  
49 efficient and there is not any resistant cocoa variety. The aim of this study is to isolate yeasts  
50 from cocoa tissues for the biocontrol of the disease, select Brazilian and Ecuadorian samples  
51 that show promising characteristics to the biocontrol of *Moniliophthora roreri* through *in vitro*  
52 studies, identify the selected isolates molecularly and study the antagonistic mechanisms of  
53 action to the phytopathogen. The initial *screening* was carried out through dual cultivation with  
54 2 *M. roreri* Ecuadorian isolates and 44 yeast isolates, cultivated individually, and their survival  
55 cultivated in body temperature. The selected isolates were identify using primer pairs to the  
56 region of the large subunit ribosomal ribonucleic acid (LSU rRNA), and the characterization of  
57 their antagonistic action was made through the inhibition growth tests by joint cultivation,  
58 action of volatile organic compounds, secretome and thermostable compounds, besides  
59 evaluate the biofilm formation. Seven yeast isolates were selected, showing inhibitory index up  
60 to 71% in the dual cultivation study, which did not grow in body temperature. The yeast isolates  
61 present different biofilm formation index and inhibitory action to the phytopathogen by  
62 different mechanisms, showing promise to the control of *M. roreri in vivo*.

63

64 **Keywords:** cacao, biological control, antagonism.

## 65 INTRODUÇÃO

66 *Moniliophthora roreri* (Cif.) H. C. Evans, Stalpers, Smason & Benny (1978) é um  
67 basidiomiceto hemibiotrófico responsável por ocasionar doença em frutos de espécies dos  
68 gêneros *Theobroma* e *Herrania* (BAILEY *et al.*, 2018). A monilíase do cacauero é responsável  
69 por uma elevada redução da produção de cacau a nível mundial, considerada como limitante à  
70 produção na América tropical (BAILEY *et al.*, 2018; PLOETZ, 2016).

71 No Brasil não há relato da presença do patógeno, considerada uma Praga Quarentenária  
72 Ausente (PQA) no sistema fitossanitário brasileiro, a monilíase do cacauero está classificada  
73 entre as 20 doenças ausentes de maior prioridade para o país (BRASIL, 2018; LARANJEIRA  
74 *et al.* 2017). Diante do risco de introdução do patógeno no país, a doença faz parte atualmente  
75 do Programa Nacional de Prevenção e Vigilância que visa evitar o ingresso de uma PQA,  
76 manutenção do sistema de vigilância para detecção e identificação, bem como autoriza a  
77 aplicação de medidas de mitigação de risco no caso de suspeita de entrada de uma PQA em  
78 território nacional (BRASIL, 2019).

79 Em áreas afetadas, o sistema de manejo integrado da doença apresenta estratégias de  
80 controle cultural, químico, biológico e genético (PHILLIPS-MORA; WILKINSON, 2007).

81 A remoção de frutos doentes em campo, visando a redução de fontes de inóculo, tem sido  
82 a estratégia mais adotada pelos produtores rurais (EVANS, 2016; PHILLIPS-MORA;  
83 WILKINSON, 2007). A frequência de remoção é um fator importante para o manejo da doença,  
84 que exige trabalho laboral excessivo e de alto custo, fato que pode desencorajar a participação  
85 do produtor a depender do nível de produção e preço do mercado (BAILEY *et al.*, 2018;  
86 HEBBAR, 2007; KRAUS *et al.* 2010).

87 A determinação do espaçamento entre plantas e a regulação do sombreamento nas áreas  
88 de cultivo correlacionam-se com a incidência de frutos doente (WOOD; LASS, 1985). A  
89 adequação dessas características altera o microclima, limitando a umidade, além de criar um  
90 efeito de barreira para na dispersão de esporos, podendo reduzir até 90% da incidência da  
91 doença (BIENG *et al.*, 2017; SCHROTH *et al.*, 2000).

92 O patógeno apresenta sensibilidade a uma diversidade de compostos químicos sistêmicos  
93 e protetores, no entanto, o emprego de fungicidas químicos isoladamente não é indicado, uma  
94 vez que frequência de aplicações necessárias para o controle da doença em campo torna a  
95 prática onerosa (EVANS, 2016; TORRES-DE-LA-CRUZ *et al.*, 2019).

96 O controle genético da monilíase do cacauero baseia-se no emprego de variedades  
97 tolerantes, sendo a fonte de resistência/tolerância mais comum na América do Sul o ICS-95 e  
98 seu clone CCN-51 (PHILLIPS-MORA *et al.*, 2005).



99 Alternativas de controle para inserção no manejo da monilíase são extensamente  
100 estudadas, sejam elas culturais, químicas, genéticas ou biológicas (PHILLIPS-MORA;  
101 WILKINSON, 2007).

102 O controle biológico baseia-se na atuação de microrganismos na redução de inóculo ou  
103 da atividade de produção de doença ocasionada por patógeno (BAKER; COOK, 1974). Os  
104 modos de ação comumente apresentados são: competição por espaço e nutrientes, e indução  
105 indireta da resistência do hospedeiro (BETTIOL; GHINI, 2009). Podem atuar por antibiose,  
106 através da secreção de enzimas, produção de toxinas e compostos orgânicos voláteis,  
107 micoparasitismo, predação, e promoção de crescimento do hospedeiro (MEDEIROS *et al.*  
108 2018; FREIMOSER *et al.*, 2019). Os diferentes mecanismos apresentados pelos agentes  
109 biocontroladores atuam de forma sinérgica no controle dos patógenos (FIALHO *et al.*, 2010).

110 O emprego de espécies de fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Clonostachys* tem sido  
111 utilizado no biocontrole da monilíase do cacau, inibindo o desenvolvimento do patógeno  
112 (OREA *et al.*, 2017). Leveduras apresentam-se como alternativa no controle de doenças da  
113 parte aérea prevenindo infecções e a propagação do patógeno de maneira direta e/ou indireta  
114 (BAILEY *et al.*, 2006; BETTIOL; GHINI, 2009).

115 O presente trabalho teve como objetivo isolar leveduras provenientes de tecidos vegetais  
116 sadios de cacau, selecionar *in vitro* aquelas que apresentem ação antagônica ao  
117 desenvolvimento do patógeno, identificar a nível molecular os isolados selecionados e avaliar  
118 *in vitro* mecanismos de ação que possam indicar o uso desses organismos no biocontrole da  
119 monilíase do cacau.

## 120 MATERIAL E MÉTODOS

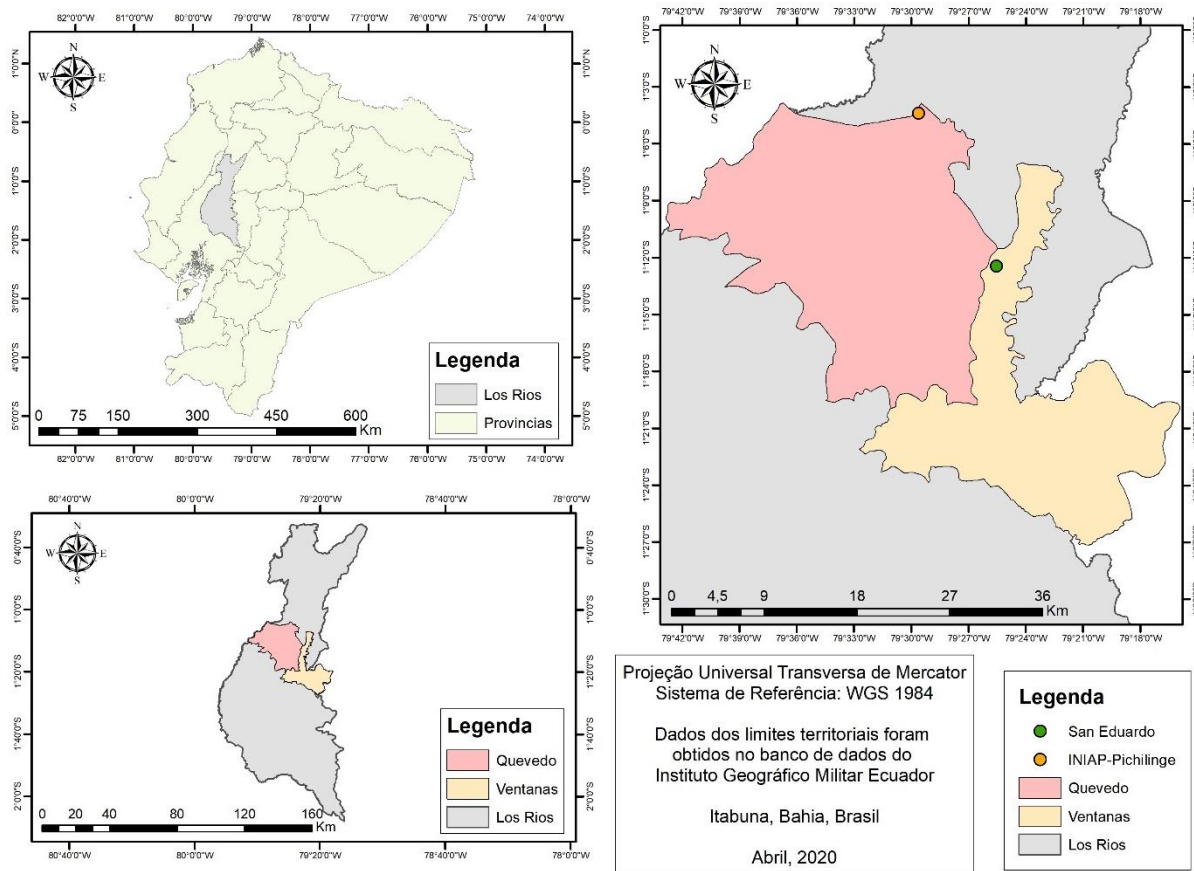
121 Os ensaios experimentais foram realizados nos laboratórios de Proteção Vegetal do  
122 Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Pichilinge/Equador, laboratório  
123 de Fungos do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife – PE e  
124 laboratório de Fitopatologia Molecular do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC/CEPLAC),  
125 Ilhéus - BA, no período de janeiro a dezembro de 2019.

### 126 Obtenção de isolados de *M. royeri*

127 Frutos de cacau dos genótipos Nacional e CCN 51 com sintomas típicos da  
128 monilíase do cacau foram coletados, respectivamente, dentro da Estação Experimental  
129 Tropical Pichilingue (EETP) – INIAP, na cidade de Quevedo, e em uma propriedade localizada  
130 no vilarejo de San Eduardo, pertencente ao cantão Ventanas, ambas situadas na província Los  
131 Ríos, Equador (figura 13).

132  
133

**Figura 13** - Localização dos pontos de coleta de frutos de cacauero com sintomas de monilíase para isolamento do fitopatógeno *Moniliophthora roreri* localizados em Quevedo e San Eduardo, província Los Ríos, Equador



134

135 Fonte: Elaborada pelo autor

136 Conforme metodologia modificada de Barros e Sanchez (1979), os frutos foram lavados  
137 com água corrente utilizando uma escova para remoção do micélio externo do patógeno. Após  
138 a lavagem os frutos foram secos com um papel toalha. A camada externa da casca do fruto foi  
139 removida com o auxílio de um bisturi, posteriormente fragmentos necrosados da casca de  
140 aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> foram dispostos em placas de Petri contendo meio Batata-dextrose-  
141 ágar (BDA). As placas foram incubadas em temperatura de 26 ± 1 °C por 7 dias, as colônias  
142 emergentes foram repicadas, registradas e armazenadas.

### 143 **Obtenção dos isolados de leveduras**

144 Para o isolamento das leveduras foram coletadas folhas jovens (FJ), folhas maduras  
145 (FM) e frutos sadios (FR) de cacauero aleatoriamente em 5 lotes diferentes dentro da área da  
146 EETP - INIAP, Equador, as quais apresentavam incidência de monilíase. Os isolados foram  
147 obtidos a partir da imersão de 1 g de fragmentos dos tecidos coletados em tubos de ensaio  
148 contendo 10 mL de água de torneira esterilizada (AE) contendo cloranfenicol (50 mg L<sup>-1</sup>). Em  
149 seguida os tubos foram submetidos à agitação em vórtex, realizando posteriormente a diluição  
150 dessa suspensão (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>). Alíquotas de 0,1 mL da suspensão foram distribuídas em placas de

151 Petri contendo meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar (SDA), suplementado com extrato de  
 152 levedura (YE) (1,5 g L<sup>-1</sup>) e cloranfenicol (50 mg L<sup>-1</sup>), sendo espalhadas uniformemente sobre a  
 153 superfície do meio com auxílio de uma alça Drigalski. As placas foram incubadas por um  
 154 período de 72 horas à temperatura de 26 ± 2° C, realizando a repicagem das colônias emergentes  
 155 para placas com meio SDA+YE. Os isolados provenientes dos materiais vegetais coletados  
 156 foram repicados em tubos contendo meio BDA, registrados e preservados a 4 °C.

157 Seis isolados de leveduras obtidos no Brasil, isolados a partir de tecidos vegetais de  
 158 cacauzeiros pertencentes ao Banco de Germoplasma (BAG) de cacau da CEPLAC, Bahia, os  
 159 quais estão depositados na Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos "Prof<sup>a</sup> Maria  
 160 Menezes" - Universidade Federal Rural de Pernambuco, também foram utilizados nas  
 161 avaliações, totalizando 44 isolados de leveduras.

#### 162 **Teste de crescimento em temperatura corpórea**

163 Os isolados de leveduras foram cultivados em placas de Petri em meio SDA, distribuídos  
 164 sobre toda a superfície do meio com o auxílio de uma alça de semeadura. As placas foram  
 165 mantidas em estufa incubadora Demanda Bioquímica do Oxigênio (BOD) a temperatura de 37  
 166 ± 2 °C durante 5 dias. O experimento constou de três repetições para cada isolado, avaliando o  
 167 crescimento das colônias após este período de incubação.

#### 168 **Seleção *in vitro* de leveduras antagônicas a *M. royeri***

169 Para a seleção *in vitro* os isolados de leveduras foram cultivados por 48 horas em meio  
 170 SDA+YE, com o auxílio de uma alça de semeadura de volume 10 µL, foi realizada uma estria  
 171 em meio BDA para cada isolado individualmente a uma distância de 3 cm da borda de placa de  
 172 Petri. Foram utilizados dois isolados de *M. royeri*, os quais foram transferidos individualmente  
 173 para as placas um disco de micélio de 0,5 cm contendo estruturas de cada patógeno, proveniente  
 174 de um cultivo de 7 dias em BDA. Os discos de micélio foram posicionados a 3 cm da borda  
 175 oposta da placa, disposta a 3 cm da estria de leveduras. O controle consistiu em placas contendo  
 176 somente disco de micélio, sem a presença dos isolados de leveduras, disposto a distância de 3  
 177 cm da borda das placas.

178 As placas foram incubadas a 26 ± 1° C, sob fotoperíodo de 12 horas, aferindo dois  
 179 diâmetros perpendiculares da colônia do patógeno após 15 dias de cultivo, subtraindo o  
 180 tamanho do disco de micélio inicial (0,5 cm), obtendo o percentual de inibição de crescimento  
 181 micelial (PICM) através da seguinte fórmula:

$$182 \text{ PICM (\%)} = [(D1-D2) / D1] \times 100 \quad (1)$$

183 Onde D1: Diâmetro de *M. royeri* nas placas controle. D2: Diâmetro de *M. royeri* nas placas  
 184 tratadas com leveduras.

185 Entre os isolados que proporcionaram percentual maior que 70%, foram selecionados os  
186 4 com maior PICM para cada isolado do patógeno, os quais foram utilizados nos testes  
187 posteriores e identificados a nível molecular.

188 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições por  
189 tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os tratamentos  
190 comparados pelo teste de Scott knott a 5% de probabilidade utilizando o programa SISVAR  
191 (FERREIRA, 2011).

#### 192 **Extração de DNA dos isolados de leveduras**

193 A extração do DNA de culturas puras dos isolados de leveduras, cultivados previamente  
194 em meio SDA+YE por 2 dias, foi realizado utilizando o kit PureLink™ Microbiome DNA  
195 Purification (Thermo Fisher Scientific). Cerca de 0,05 g de amostra de células das colônias foi  
196 coletada por meio de raspagem da superfície do meio de cultura com o auxílio de um bisturi  
197 estéril, macerada em nitrogênio líquido e transferida para tubo eppendorf. Foi adicionado 600  
198 µL do S1- tampão de lise celular aos tubos, o seu conteúdo foi agitado com auxílio de um vórtex  
199 e, posteriormente, adicionados 100 µL de S2 – melhorador de tampão de lise celular, incubando  
200 as amostras a 65 °C por 10 minutos. Após o período de incubação, a suspensão foi  
201 homogeneizada por 10 minutos em vórtex e, logo após, centrifugada a 14.000 rpm por 5  
202 minutos. Foram transferidos 400 µL do sobrenadante para novos tubos, agregando 250 µL de  
203 S3 - tampão de limpeza, incubando em gelo por 10 minutos. Após esse período, as amostras  
204 foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm por 1 minuto, transferindo 500 µL do  
205 sobrenadante para novos tubos, adicionando 900 µL de S4 – tampão de ligação. Foram  
206 transferidos 700 µL da mistura para um conjunto de tubo de coluna giratória, centrifugando a  
207 14.000 rpm por 1 minuto. O fluido foi descartado e o procedimento repetido com o restante da  
208 mistura. A coluna foi posta em um tubo limpo, agregando 500 µL de S5 – tampão de lavagem,  
209 centrifugando a 14.000 rpm por 1 minuto. O fluido foi descartado, centrifugando novamente a  
210 coluna a 14.000 rpm por 30 segundos, para eliminação de resquícios de S5 – tampão de  
211 lavagem.

212 A coluna foi transferida para novos tubos, aos quais foram adicionados 100 µL de S6-  
213 tampão de eluição, incubando por 1 minuto a temperatura ambiente. Após esse período, o  
214 conjunto de tubo de coluna giratória foi centrifugada a 14.000 rpm por 1 minuto, as colunas  
215 foram descartadas obtendo o DNA purificado nos tubos. A qualidade do DNA obtido foi  
216 verificada através de eletroforese de DNA em gel de agarose 1,5% (p/v) com solução de tampão  
217 TAE 1x.

#### 218 **Identificação molecular**

219 Com as amostras de DNA extraído, foi realizada reação de PCR, amplificando segmentos  
 220 de DNA utilizando o par de primers B4 e R6 para o domínio D1/D2 da grande subunidade  
 221 (LSU) do gene RNA ribossomal, amplamente utilizados na identificação de leveduras (tabela  
 222 2).

223 **Tabela 2** - Primers utilizados na amplificação e sequenciamento do DNA de isolados de leveduras

Gene	Primer	Sequência (5' → 3')	Referência
D1 / D2	NL1 (forward)	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	FERREIRA <i>et al.</i> , 2010
	NL4 (reverse)	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	

224 Fonte: Elaborada pelo autor

225 As amplificações ocorreram em um volume final de 50 µL de uma mistura composta 3  
 226 µL de DNA extraído (com concentração total de 30 ng), 1X de tampão, 0,2 µM de cada primer  
 227 (método duplex), 1,5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mmol de cada dNTP (Fermentas), e 1 U de Taq  
 228 DNA polimerase (Fermentas) e água ultra-pura. As amplificações foram realizadas em  
 229 termociclador Veriti 96 Well Thermo Cyclor/Apllied Bisystems usando método touchdown  
 230 (TD) nas condições: 94°C por 8 min, 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, TD 55-58°C usando  
 231 1°C de decréscimo, 72°C por 1 min, e 72°C por 5 min, e uma extensão final de 4°C por 30  
 232 minutos.

233 Foi realizada a purificação do produto da PCR com o intuito de eliminar resto dos  
 234 reagentes utilizados na amplificação. O protocolo de purificação foi realizado adicionando 2,6  
 235 µL de EDTA 125 mM e 30 µL de etanol 100 % gelados ao produto da reação, misturadas por  
 236 inversão e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, prosseguiu-se a  
 237 centrifugação a 4.500 rpm, aceleração 9, por 45 minutos a 4 °C, seguido de descarte do  
 238 sobrenadante. Adicionou-se 30 µL de etanol 70% gelado, submetendo a centrifugação nas  
 239 mesmas condições citadas anteriormente durante 15 minutos. O sobrenadante novamente  
 240 descartado realizando um spin invertido até 200 rpm com aceleração 0. As placas foram secas  
 241 a 65 °C por 10 minutos para evaporação do restante do etanol.

242 Após evaporação do etanol 70%, o DNA purificado de cada amostra foi ressuspensionado  
 243 em 10 µL de formamida, as amostras foram desnaturadas a 95 °C por 3 minutos. Após essa  
 244 etapa, as amostras foram levadas ao Sequenciador Automático de DNA, modelo ABI 3500®  
 245 Genetic Analyzer/AplliedBiosystems.

246 As sequências foram tratadas através do software Geneious (KEARSE *et al.*, 2012) e, em  
 247 seguida, foram realizadas comparações com as sequências disponíveis no banco de dados do  
 248 National Center for Biotechnology Information (NCBI), por meio da ferramenta Basic Local  
 249 Alignment Search Tool para sequência de nucleotídeos (BLASTn)

250 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Foram utilizados 51 acessos de espécies encontrados no banco  
 251 de dados do NCBI para fim de comparação com as sequências obtidas no sequenciamento  
 252 (tabela 3).

253 **Tabela 3** – Acessos de espécies depositadas no National Center of Biotechnology Information GenBank (NCBI) apresentando  
 254 alto grau de similaridade com os isolados utilizados neste estudo, utilizadas para identificação molecular

Número de acesso no GenBank	Espécie	ID (%)	Número de acesso no GenBank	Espécie	ID (%)
LC497842	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	KU179841	<i>Dioszegia hungarica</i>	92
NG 059094	<i>Derxomyces linzhiensis</i>	94	NG058303	<i>Hanaella surugaensis</i>	92
JN939776	<i>Derxomyces hubeiensis</i>	94	HE650892	<i>Hanaella oryzae</i>	90
JN939787	<i>Derxomyces schimicola</i>	93	JQ754129	<i>Hanaella oryzae</i>	92
KY107625	<i>Derxomyces pseudoschimicola</i>	93	KY107783	<i>Hanaella oryzae</i>	92
NG059151	<i>Derxomyces pseudoschimicola</i>	93	JQ754139	<i>Hanaella oryzae</i>	92
JN939790	<i>Derxomyces yunnanensis</i>	93	JN544023	<i>Hanaella coprosmae</i>	93
KY107623	<i>Derxomyces nakasei</i>	93	KY107778	<i>Hanaella coprosmae</i>	93
NG066179	<i>Derxomyces nakasei</i>	93	AB462340	<i>Cryptococcus</i> sp.	93
JN939795	<i>Derxomyces hanainensis</i>	93	KX758403	<i>Hanaella</i> sp.	93
KY107621	<i>Derxomyces mrakii</i>	92	FJ828959	<i>Hanaella pagnoccae</i>	99
KY109525	<i>Saitozyma paraflava</i>	92	JQ672598	<i>Hanaella pagnoccae</i>	99
KY109523	<i>Saitozyma flava</i>	85	KJ917974	<i>Hanaella coprosmae</i>	99
MK182934	<i>Saitozyma flava</i>	85	LC053707	<i>Hanaella pagnoccae</i>	99
KY110032	<i>Vishniacozyma peneaus</i>	96	LC326048	<i>Hanaella pagnoccae</i>	99
NG058433	<i>Vishniacozyma peneaus</i>	96	LC498361	<i>Hanaella pagnoccae</i>	99
KX078411	<i>Cryptococcus carnescens</i>	96	MN124394	<i>Hanaella pagnoccae</i>	99
KX110023	<i>Vishniacozyma carnescens</i>	96	LC053944	<i>Hanaella pagnoccae</i>	99
NG 058430	<i>Vishniacozyma carnescens</i>	96	LC053946	<i>Hanaella</i> sp.	99
JX188138	<i>Cryptococcus victoriae</i>	95	LC176974	<i>Hanaella pagnoccae</i>	99
KY110044	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	95	KT388115	Uncultured <i>Hanaella</i> clone	98
KY110047	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	95	KY107787	<i>Hanaella pagnoccae</i>	99
KY110029	<i>Vishniacozyma heimaeyensis</i>	96	KY107789	<i>Hanaella sinensis</i>	94
NG058432	<i>Vishniacozyma heimaeyensis</i>	96	KY107791	<i>Hanaella sinensis</i>	94
JN939773	<i>Derxomyces anomala</i>	93	NG058304	<i>Hanaella zeae</i>	97
NG059093	<i>Derxomyces anomalus</i>	93			

255 Fonte: Elaborada pelo autor

256 O alinhamento das sequências foi realizado no Mafft (KATOH; ROZEWICKI;  
257 YAMADA, 2019) e a relação filogenética foi determinada utilizando a ferramenta iTol  
258 (LETUNIC; BORK, 2019), enraizada pela espécie *Saccharomyces cerevisiae*. O isolado LEV  
259 169, proveniente de estudos com *M. pernicioso* no Brasil por Pimenta Neto (2016), foi  
260 identificado anteriormente como *Rhodospiridium paludigenum* (Fell & Tallman).

### 261 **Capacidade de formação de biofilme**

262 A avaliação da formação de biofilme seguiu metodologia indicada por Parafati *et al.*  
263 (2015), com modificações. Células dos isolados de leveduras foram cultivadas por 48 horas em  
264 meio SDA+YE, transferidas com auxílio de uma alça de 10 µL para Erlenmeyers contendo meio  
265 SDA+YE líquido, e ajustada a concentração final de  $10^7$  células  $\text{ml}^{-1}$ . Aliquotas (100 µl) foram  
266 depositadas em poços de placa de poliestireno de 96 poços fundo ‘U’ em quadruplicata e  
267 incubadas durante três horas a 28 °C em agitador a 70 a 75 rpm para adesão das células às  
268 paredes dos poços. Como controle, quatro poços foram tratados de semelhante modo, com a  
269 adição dos mesmos componentes exceto as células de leveduras.

270 Após a fase de adesão, as suspensões foram descartadas e as paredes de cada poço foram  
271 lavadas duas vezes com 200 µL de PBS, adicionando posteriormente 100 µL de YEPD líquido,  
272 reabastendo diariamente por aspiração do meio utilizado, adicionando o mesmo volume de  
273 meio fresco. As placas foram incubadas a 28 °C a 70 a 75 rpm e avaliadas em intervalos de 24  
274 e 48 h.

275 Após os intervalos de incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS, como  
276 descrito anteriormente, e corados com 100 µL de solução aquosa de cristal de violeta a 0,4%,  
277 durante 45 min. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com água destilada estéril água  
278 (ADE), e imediatamente descorados com 200 µL de Etanol a 95%. Após 45 min da ação do  
279 etanol, 100 µl de solução de descoloração foi transferida para uma nova placa de poliestireno  
280 com 96 cavidades fundo chato.

281 Todos os ensaios foram realizados duas vezes e a quantidade de cristal violeta presente  
282 na solução foi avaliada de acordo com a intensidade da coloração dos poços, onde os poços de  
283 coloração fraca foram interpretados como (+1); os de coloração mediana (+2 a +3) e os  
284 fortemente corados (+4), respectivamente.

### 285 **Antagonismo por cultivo conjunto**

286 Uma suspensão de  $10^8$  células  $\text{ml}^{-1}$  em solução tampão PBS 1X foi preparada a partir dos  
287 isolados de leveduras, cultivados por 48 horas em meio SDA+YE. Aliquotas de 1mL foram  
288 semeadas em placas de Petri contendo meio BDA e espalhadas na superfície do meio com  
289 auxílio de um swab estéril, após a secagem da superfície do meio, depositou-se um disco de 5

290 mm, contendo cultura de 7 dias do fitopatígeno, foi transferido para o centro das placas. As  
291 culturas foram incubadas a  $26 \pm 2^\circ \text{C}$  durante vinte dias em fotoperíodo de 12h. A porcentagem  
292 de inibição foi calculada através da fórmula PICM citada anteriormente, medindo dois  
293 diâmetros perpendiculares da colônia de *M. royeri*.

#### 294 **Ação antifúngica de compostos orgânicos filtrados**

295 Cada isolado foi cultivado em Erlenmeyers (capacidade de 250 mL) contendo 50 mL de  
296 meio SD líquido por 72 horas a  $26 \pm 2^\circ \text{C}$  sob agitação a 150 rpm, na ausência de luz. A  
297 suspensão de células em meio líquido foi filtrada em membrana Millipore® (0,22  $\mu\text{m}$ ), a fim  
298 de se obter um filtrado livre de células de levedura, adaptação da técnica de Frighetto e Melo,  
299 (1995). Amostras de 10 mL de cada filtrado foram transferidas para 90 mL de BDA fundente.  
300 Os meios correspondentes a cada tratamento foram vertidos em placas de Petri e, após a  
301 solidificação, um disco de meio de cultura de 5 mm de diâmetro, contendo cultura de 7 dias do  
302 fitopatígeno, foi depositado no centro das placas sobre o meio. O controle correspondeu ao  
303 fitopatígeno cultivado em meio BDA sem a adição dos filtrados das células. As culturas foram  
304 incubadas a  $26 \pm 2^\circ \text{C}$  durante vinte dias em fotoperíodo de 12h. A avaliação foi realizada pela  
305 aferição do diâmetro médio da colônia de *M. royeri* e cálculo da porcentagem de inibição,  
306 através da fórmula PICM citada anteriormente.

#### 307 **Ação antifúngica de compostos orgânicos termoestáveis**

308 Os isolados de leveduras foram cultivados em meio líquido, conforme descrito na  
309 metodologia descrita anteriormente. Após o período de cultivo, amostras de 10 mL de cada  
310 cultivo dos isolados de leveduras foram transferidas para frascos contendo 90 mL de BDA e  
311 então esterilizadas em autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 20 minutos.

312 Os meios tratados termicamente correspondentes a cada tratamentos foram vertidos em  
313 placas de Petri e, após solidificação, um disco de meio de cultura de 5 mm de diâmetro contendo  
314 o fitopatígeno crescido por 7 dias foi transferido para o centro das placas. O controle  
315 correspondeu ao patógeno crescido em meio BDA sem a presença da suspensão do cultivo. As  
316 culturas foram incubadas em estufa para BOD a  $26 \pm 2^\circ \text{C}$  durante vinte dias e a avaliação foi  
317 efetuada por meio da medição do diâmetro médio da colônia de *M. royeri*, em dois sentidos  
318 perpendiculares, obtendo a porcentagem de inibição por meio da fórmula PICM.

#### 319 **Ação de metabólitos orgânicos voláteis**

320 A ação de metabólitos orgânicos voláteis produzidos pelos isolados de leveduras  
321 selecionados foi avaliada sobre a inibição do crescimento micelial e esporulação de dois  
322 isolados de *M. royeri in vitro*. Um disco de 0,5 cm contendo estruturas do patógeno, proveniente  
323 de um cultivo de 7 dias em BDA, foi transferido para o centro de uma placa de Petri contendo



324 meio BDA.

325 Os isolados de leveduras foram semeados em placas contendo na superfície do meio SDA  
326 (20 µL da suspensão de leveduras na concentração final de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>), espalhados com  
327 o auxílio de uma alça de Drigalsk. As placas semeadas com os isolados de leveduras e do  
328 patógeno foram justapostas e vedadas com parafilme. No tratamento controle foram utilizadas  
329 placas contendo disco dos isolados do patógeno cultivado em meio BDA e uma placa justaposta  
330 contendo meio SDA, não semeada com levedura. A inibição do crescimento micelial foi  
331 avaliado após vinte dias de incubação, por meio da aferição do diâmetro médio das colônias do  
332 patógeno e cálculo do PICM, conforme mencionada no tópico seleção *in vitro*.

333 Também se avaliou a inibição da esporulação de *M. roreri*, a partir do preparo de  
334 suspensões de esporos das colônias do patógeno, com adição de 20 mL de ADE em cada placa,  
335 seguida de raspagem das colônias do patógeno com o auxílio de um pincel. Para cada suspensão  
336 de esporos, uma alíquota de 100 µL foi retirada e transferida para uma câmara de Neubauer,  
337 onde procedeu-se a contagem de esporos em microscópio ótico. A porcentagem de inibição da  
338 esporulação média (PIEM) foi calculada através da seguinte fórmula:

$$339 \text{PIEM (\%)} = [(E1-E2) / E1] \times 100 \quad (2)$$

340 Onde E1: Esporulação de *M. roreri* nas placas controle. E2: esporulação de *M. roreri* nas placas  
341 tratadas com leveduras.

### 342 **Análises estatísticas**

343 O delineamento experimental utilizado para estudo dos mecanismos de ação apresentados  
344 pelos isolados de leveduras foi inteiramente casualizado, com 5 repetições para cada isolado de  
345 leveduras, para cada isolado de *M. roreri*. Os experimentos foram repetidos e os dados  
346 submetidos à análise de variância, comparando os tratamentos pelo teste de Tukey (P<0,05)  
347 utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

### 348 **Análise de componentes principais (PCA)**

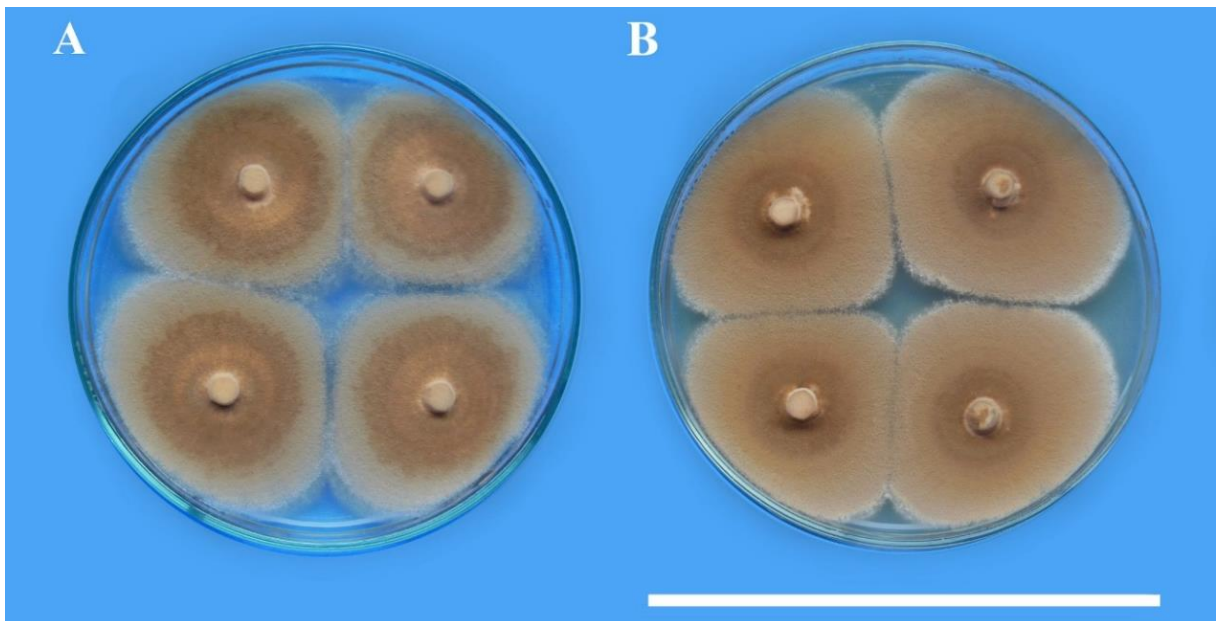
349 Os resultados de inibição de *M. roreri* por mecanismos antagônicos apresentado pelos  
350 isolados de leveduras foram submetidos a análise de componentes principais, realizada com no  
351 software PAST (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001), a fim de identificar as variáveis que  
352 melhor expliquem o controle de *M. roreri* pelos isolados de leveduras, gerando gráficos de  
353 dispersão bidimensional da relação dos mecanismos de ação antagônica apresentado por  
354 isolados de leveduras selecionados e clusters de distância Euclidiana.

## 355 RESULTADOS

### 356 Obtenção de isolados de *M. roreri*

357 A partir do isolamento indireto, através do cultivo de fragmentos de frutos que  
 358 apresentavam sintomas típicos de monilíase do cacauero em meio BDA, foram obtidos dois  
 359 isolados de *M. roreri*, os quais foram denominados como *M. roreri* Lote Musacea (Mr LM),  
 360 obtido na EETP – INIAP, no cantão Quevedo, Equador, e *M. roreri* San Eduardo (Mr SE),  
 361 obtido em uma fazenda na cidade de San Eduardo, no cantão Ventanas, Equador (figura 14).

362 **Figura 14** - Colônias de *Moniliophthora roreri* cultivadas em meio batata-dextrose-ágar. A) Isolado Mr LM; B) Isolado Mr  
 363 SE. Barra = 9 cm.



364  
 365 Fonte: Elaborada pelo autor

### 366 Obtenção dos isolados de leveduras

367 Foram obtidos 38 isolados de leveduras provenientes de tecidos de cacauero coletados  
 368 em áreas diferentes dentro da EETP – INIAP (Equador), dois quais 81% foram isolados a partir  
 369 de folhas de cacauero, 19 dos isolados foram provenientes de folhas jovens e 12 isolados  
 370 provenientes de folhas maduras, os outros 7 isolados foram obtidos a partir de frutos de  
 371 cacauero (tabela 4).

372 **Tabela 4** – Informações das áreas de coleta de tecidos vegetais de diferentes genótipos de cacaueteiro, onde FJ: Folha  
 373 jovem, FM: Folha madura, FRI: Fruto imerso, suas respectivas posições geográficas e registro dos isolados de leveduras

ÁREA	GENÓTIPO	LATITUDE (S)	LONGITUDE (O)	SIGLA	NÚMERO DE REGISTRO
1	103	01° 05' 03,297"	79° 29' 03,617"	FJ	111, 112, 121, 122, 123, 131, 311, 321, 331, 332, 333, 334, 335
3	AU	01° 05' 16,902"	79° 27' 52,754"	FM	311, 322, 323, 324, 331, 332, 333
				FRI	312
4	GD	01° 04' 28,859"	79° 29' 26,001"	FRI	421, 422, 423
				FM	421, 422
5	EET 800	01° 04' 23,271"	79° 29' 37,853"	FJ	521, 523
				FRI	511, 512, 521
				FM	511
6	EET 300	01° 04' 38,635"	79° 29' 19,482"	FJ	611, 612, 621, 623
				FM	611, 612

374 Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: GD: Genótipo desconhecido.

### 375 **Teste de crescimento em temperatura corpórea**

376 Dos 44 isolados de leveduras, quatorze apresentaram desenvolvimento em temperatura  
 377 de 38 °C por 5 dias, sendo eles: FM 121, FM 311, FM 331, FM 422, FM 611, FJ 311, FJ 322,  
 378 FJ 325, FJ 332, FJ 333, FJ 421, FJ 523 e FJ 611. O restante dos isolados não apresentaram  
 379 desenvolvimento de colônias durante o período de cultivo a temperatura média corporal.

### 380 **Seleção *in vitro* de leveduras com potencial antagônico a *M. royeri***

381 Entre os 44 isolados de levedura submetidos ao cultivo pareado com os isolados de *M.*  
 382 *royeri* não foi apresentada interação entre os fatores isolados de leveduras e do fitopatógeno,  
 383 apresentando comportamento para cada isolado do fitopatógeno. Foi apresentada diferença  
 384 estatística ( $P < 0,05$ ) entre as médias de PICM, variando entre média mínima em torno de 26%  
 385 e máxima de aproximadamente 75% de redução no crescimento micelial do fitopatógeno. Entre  
 386 os isolados que apresentaram PICM superior a 70%, um dos isolados de levedura apresentou  
 387 resultado semelhante em ambos isolados de *M. royeri* obtendo, dessa maneira, 7 isolados de  
 388 leveduras para os ensaios subsequentes, sendo eles: FJ 111, FJ 112, FJ 123, FJ 521, FJ 612, FM  
 389 324 e LEV 169 (tabela 5).

390  
391**Tabela 5** - Percentual de inibição do crescimento micelial (PICM) médio de *Moniliophthora roreri* pela ação antagonônica de isolados de leveduras através do cultivo pareado em placa de petri

Isolado	PICM (%)		Isolado	PICM (%)	
	Mr LM	Mr SE		Mr LM	Mr SE
<b>FJ 111</b>	<b>74,96 ± 1,64 a</b>	<b>75,29 ± 0,24 b</b>	<b>FM 324</b>	70,73 ± 4,74 a	71,3 ± 3,48 a
<b>FJ 112</b>	<b>72,99 ± 2,54 a</b>	<b>68,68 ± 1,44 b</b>	FM 331	64,79 ± 1,53 a	59,38 ± 9,37 a
FJ 121	49,85 ± 1,23 b	55,13 ± 2,02 b	FM 332	69,82 ± 3,06 a	54,53 ± 10,84 a
FJ 122	65,15 ± 6,97 a	63,55 ± 7,92 b	FM 333	33,39 ± 9,39 c	41,28 ± 22,76 a
<b>FJ 123</b>	<b>66,00 ± 6,07 a</b>	<b>74,42 ± 7,61 b</b>	FM 421	41,27 ± 14 c	55,98 ± 11,25 a
FJ 131	67,89 ± 7,56 a	68,93 ± 1,78 b	FM 422	50,18 ± 2,42 b	46,07 ± 8,48 a
FJ 311	52,76 ± 3,28 b	54,16 ± 16,6 b	FM 511	50,75 ± 10,02 b	67,83 ± 8,41 a
FJ 321	61,84 ± 12,96 a	61,93 ± 5,35 b	FM 611	39,89 ± 23,71 c	47,46 ± 7,89 a
FJ 331	58,14 ± 14,69 a	51,6 ± 16,49 b	FM 612	40,71 ± 7,19 c	39,1 ± 16,36 a
FJ 332	53,22 ± 7,94 b	56,73 ± 3,38 b	FRI 312	53,64 ± 17,72 b	51,23 ± 18,52 a
FJ 333	64,24 ± 4,57 a	55,74 ± 14,57 b	FRI 421	51,96 ± 4,99 b	68,49 ± 7,36 a
FJ 334	66,76 ± 6,34 a	64,99 ± 4,68 b	FRI 422	70,8 ± 5,45 a	62,19 ± 12,11 a
FJ 335	57,38 ± 10,73 a	56,25 ± 14,51 b	FRI 423	64,09 ± 9,07 a	57,89 ± 11,44 a
<b>FJ 521</b>	<b>71,65 ± 5,79 a</b>	<b>67,86 ± 1,57 b</b>	FRI 511	64,85 ± 1,75 a	62,36 ± 5,87 a
FJ 523	36,54 ± 14,11 c	53,86 ± 12,65 b	FRI 512	65,36 ± 3,98 a	70,28 ± 3,31 a
FJ 611	59,66 ± 10,31 a	54,39 ± 15,56 b	FRI 521	65,25 ± 1,07 a	66,45 ± 1,84 a
<b>FJ 612</b>	<b>71,78 ± 1,77 a</b>	<b>65,27 ± 2,84 b</b>	LEV 098	63,37 ± 1,66 a	62,1 ± 3,21 a
FJ 621	69,18 ± 8,84 a	66,49 ± 13,09 b	LEV 162	51,11 ± 0,83 b	55,52 ± 5,26 a
FJ 623	26,83 ± 4,9 c	38,64 ± 10,26 b	<b>LEV 169</b>	<b>68,89 ± 3,76 a</b>	<b>74,59 ± 1,32 a</b>
FM 311	60,81 ± 10,21 a	52,11 ± 6,12 b	LEV 206	63,92 ± 11,67 a	55,38 ± 5,81 a
FM 322	61,83 ± 6,57 a	63,91 ± 9,89 b	LEV 207	69,87 ± 3,95 a	69,01 ± 5,65 a
FM 323	53,13 ± 9,42 b	54,28 ± 12,03 b	LEV 210	56,47 ± 8,34 a	65,37 ± 6,67 a
<b>Média geral</b>	58,95 ± 13,38	59,73 ± 12,22	-	-	-
<b>CV (%)</b>	19,25	15,02	-	-	-

392  
393

Fonte: Elaborada pelo autor. \*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

394

#### Extração de DNA dos isolados de leveduras

395

O método de extração de DNA utilizado foi eficiente na extração de todas as amostras de

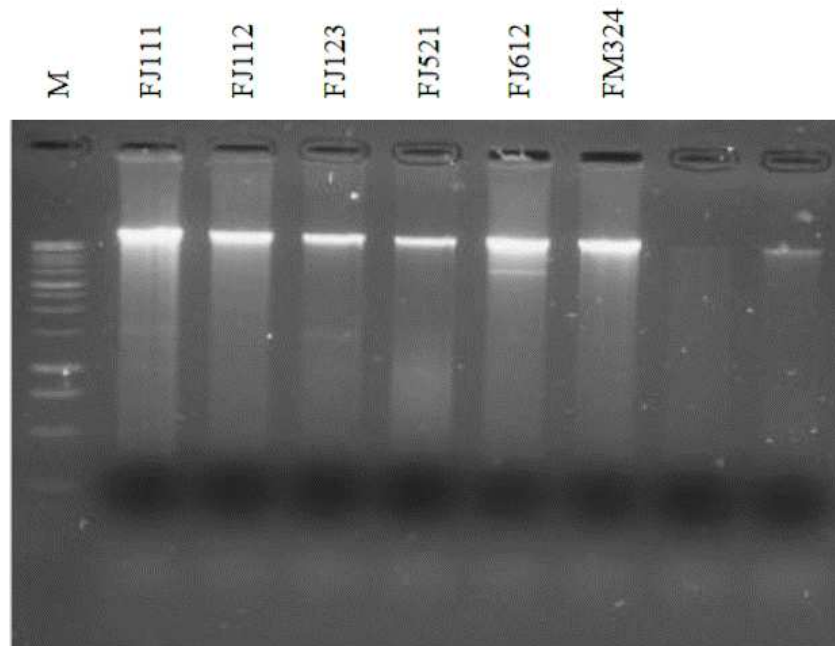
396

leveduras, a qualidade do DNA extraído foi observada em gel de agarose a 1,5%, onde pôde

397

observar-se a presença de DNA dos 6 microrganismos isolados (figura 15).

398 **Figura 15** - DNA total extraídos dos isolados de leveduras selecionados, visualizados em gel de agarose a 1,5%



399

400

Fonte: Elaborada pelo autor

#### 401 **Identificação molecular dos isolados selecionados**

402 A região D1/D2 do rRNA foi amplificada com sucesso utilizando o par de primers. A  
403 identificação dos isolados de leveduras foi realizada a partir das sequências obtidas baseadas  
404 no gene 28S rRNA, comparadas com sequências depositadas no Genbank. Os resultados  
405 apresentaram 2 gêneros diferentes, e 3 diferentes espécies, da seguinte maneira: FJ 111, FJ  
406 112 e FM 324 – *Hannaella pagnoccae*; FJ 521 – *Hannaella zae*; FJ 612 – *Vishniacozyma*  
407 *peneaus*. A análise não foi suficiente para identificar a nível de espécie o isolado FJ 123, o qual  
408 foi identificado apenas a nível de gênero, sendo *Hannaella* spp. A árvore filogenética com a  
409 identificação dos isolados é apresentada na figura 16.

410 **Figura 16** - Árvore filogenética baseada em sequências da região do gene 28S da subunidade maior do RNA ribossomal (LSU),  
 411 apresentando as posições dos isolados de leveduras selecionados em respeito às espécies correlacionadas



#### 414 **Capacidade de formação de biofilme**

415 Os isolados de levedura apresentaram diferentes índices de expressão de formação de  
 416 biofilme, às 24 de cultivo 2 isolados apresentaram alto índice de formação de biofilme (+4), 3  
 417 isolados apresentaram índice mediano (+2 e +3), e 2 isolados apresentaram índice baixo (+1),

418 relacionado a uma fraca formação de biofilme, na avaliação realizada às 48 horas 3 isolados  
419 apresentaram índice +4, o restante dos isolados apresentaram índice entre +3 e +2 (tabela 6).

420 **Tabela 6** - Índice de formação de biofilme por isolados de leveduras selecionadas em estudos *in vitro*, onde +1 indica fraca  
421 intensidade da formação de biofilme, +2 a +3 formação mediana e +4 alta formação

Isolados de leveduras	Formação de biofilme	
	24 horas	48 horas
<b>FJ 111</b>	+1	+2/+3
<b>FJ 112</b>	+1	+4
<b>FJ 123</b>	+4	+4
<b>FJ 521</b>	+4	+4
<b>FJ 612</b>	+2/+3	+2/+3
<b>FM 324</b>	+2/+3	+2/+3
<b>LEV 169</b>	+2/+3	+2/+3

422 Fonte: Elaborada pelo autor

#### 423 Antagonismo por cultivo conjunto

424 Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) para o PICM apresentado através ação das  
425 leveduras em cultivo conjunto para ambos isolados de *M. roseri*, onde os isolados de leveduras  
426 reduziram o crescimento micelial dos isolados do fitopatógeno, variando o PICM entre média  
427 mínima de 84,66 e máxima de 99,01% no isolado Mr LM, e mínima de 89,92% e máxima de  
428 99,63% (tabela 7).

429 **Tabela 7** - Antagonismo *in vitro* de isolados de levedura sobre o crescimento micelial de isolados de *Moniliophthora roseri*.  
430 Resultados apresentados como percentual médio de inibição de crescimento micelial (PICM) e  $\pm$  desvio padrão respectivo  
431 para cada média

Leveduras	PICM (%) dos isolados de <i>Moniliophthora roseri</i>		Média por isolado de levedura
	MR LM	MR SE	
<b>FJ111</b>	98,19 $\pm$ 3,91 a*	97,45 $\pm$ 2,68 ab	97,82 $\pm$ 3,29
<b>FJ112</b>	92,94 $\pm$ 7,56 ab	89,92 $\pm$ 16,15 b	91,43 $\pm$ 12,37
<b>FJ123</b>	84,66 $\pm$ 18,19 b	96,57 $\pm$ 5,93 ab	90,62 $\pm$ 14,52
<b>FJ521</b>	98,29 $\pm$ 3,04 a	99,05 $\pm$ 2,13 ab	98,67 $\pm$ 2,59
<b>FJ612</b>	98,47 $\pm$ 2,82 a	99,63 $\pm$ 1,16 ab	99,05 $\pm$ 2,18
<b>FM324</b>	98,74 $\pm$ 3,97 a	96,47 $\pm$ 5,97 a	97,6 $\pm$ 5,08
<b>LEV169</b>	99,01 $\pm$ 3,12 a	99,62 $\pm$ 1,19 a	99,32 $\pm$ 2,32
<b>Média</b>	95.76 $\pm$ 9.10	96.96 $\pm$ 7.43	96.36 $\pm$ 8.30
<b>CV (%)</b>	8,3	7,2	-

432 Fonte: Elaborada pelo autor. \*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o  
433 Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

#### 434 Ação antifúngica de compostos orgânicos filtrados

435 As médias de ação por compostos orgânicos filtrados produzidos pelos isolados de  
436 leveduras apresentaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ), mostrando baixa ação antifúngica em

437 relação ao crescimento micelial dos diferentes isolados do fitopatígeno, onde o maior PICM  
 438 para o isolado Mr LM foi de 9,8% e de 18,5 % para o isolado Mr SE. O crescimento micelial  
 439 das colônias de *M. roreri*, quando cultivados em meio de cultura suplementado com os  
 440 compostos orgânicos filtrados produzidos pelos isolados de leveduras, apresentou também  
 441 incremento médio de até 10,6% do isolado Mr LM, em relação ao desenvolvimento do controle.

#### 442 **Ação antifúngica de compostos orgânicos termoestáveis**

443 A adição de compostos orgânicos tratados termicamente ao meio de cultura afetou o  
 444 comportamento de crescimento micelial dos isolados do fitopatígeno, apresentando diferença  
 445 significativa ( $P < 0,05$ ) entre as médias, no entanto, apenas o isolado LEV 169, no isolado Mr  
 446 LM, inibiu em média 17% o crescimento micelial do fitopatígeno. Todos os outros tratamentos  
 447 proporcionaram incremento do crescimento micelial do patógeno, apresentando média de até  
 448 19,1% de incremento no desenvolvimento das colônias, em relação ao controle.

#### 449 **Ação de metabólitos orgânicos voláteis**

450 Diferença estatística ( $P > 0,05$ ) do PICM através da ação de metabólitos orgânicos voláteis  
 451 produzidos pelos isolados de leveduras foi apresentada apenas com o isolado Mr LM, variando  
 452 entre médias mínima de 24,27% e máxima de 76,27% de redução na produção de esporos. As  
 453 médias de porcentagem de inibição da esporulação para o isolado Mr SE mínima e máxima,  
 454 respectivamente, variaram entre 7,13% e 75,39%, com um incremento apresentado pelo isolado  
 455 FM 324 (tabela 8).

456 **Tabela 8** – Inibição da esporulação por isolados de *Moniliophthora roreri* em estudo de inibição por metabólitos orgânicos  
 457 voláteis emitidos por isolados de leveduras, apresentados como percentual médio de inibição da esporulação (PIE) e  $\pm$  desvio  
 458 padrão respectivo de cada média

Leveduras	PIEM (%) dos isolados de <i>Moniliophthora roreri</i>		Média por isolado de levedura
	MR LM	MR SE	
<b>FJ111</b>	70,11 $\pm$ 25,69 a*	22,17 $\pm$ 101,21	46,14 $\pm$ 75,96
<b>FJ112</b>	24,27 $\pm$ 49,93 b	33,44 $\pm$ 39,80	28,86 $\pm$ 43,66
<b>FJ123</b>	76,27 $\pm$ 20,92 a	75,39 $\pm$ 29,92	75,83 $\pm$ 25,12
<b>FJ521</b>	74,5 $\pm$ 24,43 a	7,13 $\pm$ 93,59	40,81 $\pm$ 75,01
<b>FJ612</b>	53,62 $\pm$ 40,02 ab	64,64 $\pm$ 38,62	59,13 $\pm$ 38,70
<b>FM324</b>	62,2 $\pm$ 25,89 ab	-35,82 $\pm$ 182,92	13,19 $\pm$ 136,73
<b>LEV169</b>	84,4 $\pm$ 34,05 a	17,32 $\pm$ 127,35	50,86 $\pm$ 97,03
<b>Média</b>	63,63 $\pm$ 36,46	26,32 $\pm$ 103,31	44,97 $\pm$ 79,42
<b>CV (%)</b>	51,51	387,01	-

459 Fonte: Elaborada pelo autor. \*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
 460 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

#### 461 **Análise de componentes principais (PCA)**

462 A análise de componentes principais do isolado Mr LM indicou que o primeiro vetor



463 (Componente Principal - CP 1) explicou 63,27% da variabilidade total dos dados e as variáveis  
 464 que tiveram maior peso na sua constituição foram, em ordem decrescente, os isolados FJ 123,  
 465 FJ 612, FJ 111 e LEV 169, e por valores negativos os isolados FM 324, FJ 112 e FJ 521. Os  
 466 valores mais altos obtidos (positivos e/ou negativos) foram apresentados pelos isolados FJ 123  
 467 e FM 324. O segundo vetor (CP 2) explicou 22,72% da variabilidade dos dados e os valores  
 468 mais altos (positivos e/ou negativos) foram obtidos pelos isolados LEV 169 e FJ 123 (tabela 9).

469 **Tabela 9** - Estimativas dos autovetores (Componentes principais - CP) e os respectivos pesos de cada variável para sua  
 470 constituição para o isolado Mr LM de *Moniliophthora roreri*

Variáveis	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
FJ 111	2,8636	-4,1195	3,6223	-3,0852	0,61366
FJ 112	-29,549	-7,8467	-1,5202	0,95546	-1,9
FJ 123	8,7233	-3,2063	-8,0172	-0,080008	1,4405
FJ 521	9,6157	11,645	-1,8078	-1,8556	-1,6389
FJ 612	-15,483	10,389	1,7622	2,3932	1,059
FM 324	-15,447	-2,3073	3,1943	-0,49309	1,0057
LEV 169	39,276	-4,554	2,7664	2,1653	-0,57991

471 Fonte: Elaborada pelo autor.

472 Para o isolado Mr SE, o primeiro vetor (CP 1) explicou 86,04% da variabilidade total dos  
 473 dados e as variáveis que tiveram maior peso na sua constituição foram, em ordem decrescente,  
 474 os isolados LEV 169, FJ 521, FJ 123 e FJ 111 e por valores negativos os isolados FJ112, FJ  
 475 612 e FM 324. Os valores mais altos obtidos (positivos e/ou negativos) foram apresentados  
 476 pelos isolados LEV 169 e FJ 112. O segundo vetor (CP 2) explicou 10,04% da variabilidade  
 477 dos dados e os valores mais altos (positivos e/ou negativos) foram obtidos com os isolados FJ  
 478 521 e FJ 612 (tabela 10).

479 **Tabela 10** - Estimativas dos autovetores (Componentes principais - CP) e os respectivos pesos de cada variável para sua  
 480 constituição para o isolado Mr SE de *Moniliophthora roreri*

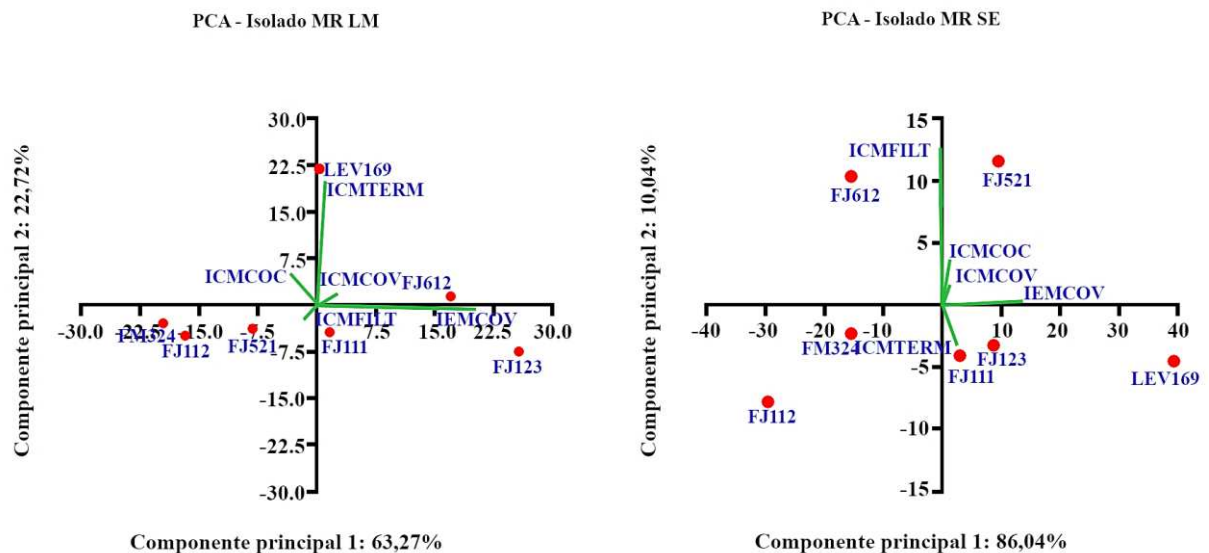
Variáveis	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
FJ 111	1,562	-4,3995	1,3218	-0,72528	-6,3406
FJ 112	-16,756	-4,9453	-3,5572	-5,1465	-0,25852
FJ 123	25,717	-7,4417	-2,3312	-4,2907	2,7822
FJ 521	-8,0881	-3,7582	11,61	0,74894	2,1289
FJ 612	17,015	1,4541	-1,2543	7,253	-0,5747
FM 324	-19,64	-2,8562	-5,7804	4,6655	1,9873
LEV 169	0,18935	21,947	-0,0081717	-2,505	0,27535

481 Fonte: Elaborada pelo autor

482 Para melhorar a interpretação dos resultados obtidos no estudo de mecanismos de inibição  
 483 antagonica *in vitro* por isolados de leveduras a *M. royeri*, foi realizada a Análise de  
 484 Componentes Principais (ACP), determinando a distribuição espacial dos tratamentos em um  
 485 espaço de dimensão menor e a relação das amostras com os atributos em cada um dos  
 486 tratamentos.

487 A partir da análise foi possível verificar e classificar os isolados utilizados no estudo sobre  
 488 5 diferentes atributos, índices de inibição de crescimento médios por compostos orgânicos  
 489 voláteis (ICMCOV), compostos orgânicos filtrados (ICMFILT), compostos orgânicos  
 490 termoestáveis (ICMTERM), por cultivo conjunto (ICMCOC) e inibição da esporulação média  
 491 por compostos orgânicos voláteis (IEMCOV), que explicaram os agrupamentos  
 492 adequadamente, com base nos vetores (Figura 17).

493 **Figura 17** – Diagrama da análise de componentes principais, com os isolados de leveduras e os mecanismos de antagonismos  
 494 *in vitro* apresentados por isolados de leveduras sobre o isolados de *Moniliophthora royeri*

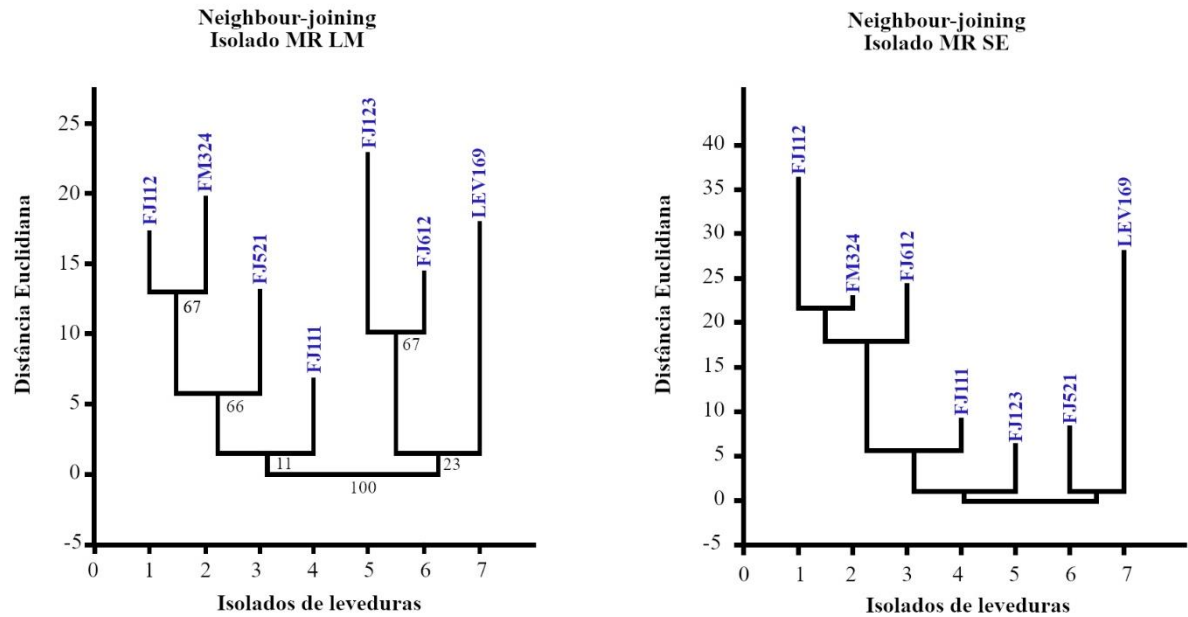


495

496 Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: Índices de inibição de crescimento médios por compostos orgânicos voláteis  
 497 (ICMCOV), compostos orgânicos filtrados (ICMFILT), compostos orgânicos termoestáveis (ICMTERM), por cultivo conjunto  
 498 (ICMCOC) e inibição da esporulação média por compostos orgânicos voláteis (IEMCOV).

499 Por meio dos resultados obtidos na análise de componentes principais, é possível observar  
 500 que os isolados FJ 112, FJ 123, FM 324 e LEV 169 são os que apresentaram maiores valores  
 501 nos componentes que mais explicaram as variáveis estudadas. A matriz de dissimilaridade  
 502 permitiu agrupar os isolados de leveduras em dois grupos, para os diferentes isolados de *M.*  
 503 *royeri*, o que permite visualizar a diferença entre a atividade dos diferentes isolados (figura 18).

504 **Figura 18** – Dendrograma da distância euclidiana das variáveis antagônicas apresentada por isolados de leveduras em  
 505 diferentes isolados de *Moniliophthora rozeri*



506

507 Fonte: Elaborada pelo autor

## 508 DISCUSSÕES

509 Grande parte dos isolados de leveduras foi proveniente do filoplano do cacauieiro, esse  
 510 habitat tem sido caracterizado significativamente para organismos neutros, espécies que  
 511 promovem o crescimento, bem como a saúde das plantas e também de espécies patogênicas,  
 512 apresentando uma grande diversidade de espécies de leveduras (WANG *et al.*, 2016). Na  
 513 superfície foliar de frutíferas, apresentam-se com frequência espécies de *Aureobasidium*  
 514 *pullulans*, *Cryptococcus laurentii*, e *Metschnikowia pulcherrima*, apresentando também outras  
 515 espécies de maneira menos frequente, como *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia anomala*,  
 516 *Rhodotorula glutinis* e *Saccharomyces cerevisiae* (SLÁVIKOVÁ *et al.*, 2009)

517 A habilidade apresentada por isolados de leveduras de se desenvolver a temperatura  
 518 corporal dos mamíferos consiste em uma característica fundamental para fungos patogênicos a  
 519 humanos (PERFECT, 2006), espécies de *Cryptococcus* apresentam a capacidade de se  
 520 desenvolver em temperatura próxima a 40 °C, sendo responsáveis por ocasionar doenças em  
 521 animais que leva à morte milhares de pessoas imunocomprometidas a cada ano (JOHNSTON  
 522 *et al.*, 2016; PARK *et al.*, 2009). Essa característica torna-se um critério muito importante para  
 523 seleção e obtenção de um agente de controle biológico, órgãos de registro global recomendam  
 524 que os agentes de biocontrole não apresentem capacidade de crescimento acima de 37 °C  
 525 (MEDEIROS *et al.*, 2018).

526 Os resultados mostram que nenhum dos isolados de levedura foi capaz de inibir

527 completamente o desenvolvimento do patógeno através do cultivo pareado, no entanto uma  
528 grande parcela dos isolados apresentou redução de crescimento micelial do patógeno acima de  
529 50%, e máxima de 75,3% de inibição. Esse percentual foi superior ao encontrado por Chen *et*  
530 *al.* (2018) em estudos com *Botrytis cinerea*, onde seis isolados de leveduras apresentaram  
531 percentual de inibição variando entre 18,7 a 36,5%, a ação das leveduras no cultivo conjunto  
532 foi associada a produção de compostos antifúngicos difusíveis no meio de cultura.

533 Diferentes espécies do gênero *Vishniacozyma*, isoladas a partir de tecidos vegetais de  
534 diferentes culturas, têm sido estudadas no controle de fitopatógenos de frutíferas, os quais  
535 apresentam comportamento promissor como agente de biocontrole, apresentando diferentes  
536 mecanismos antagônicos de ação (CORDERO-BUESO *et al.*, 2017; MARIAN; SHIMIZU,  
537 2019; NATARATAT *et al.*, 2014; ROJAS *et al.*, 2020). Espécies de *Hannaella* podem ser  
538 encontradas em plantas e no solo (LANDELL *et al.*, 2014; NAVARRO, 2014), alguns isolados  
539 de espécies do gênero podem apresentar características positivas como biofertilizador,  
540 produzindo ácido indolacético, o qual proporciona incremento do desenvolvimento de  
541 diferentes espécies vegetais (SUN *et al.*, 2014; NATARATAT *et al.*, 2014).

542 A capacidade de produção de biofilme é uma característica importante para a  
543 sobrevivência de leveduras na superfície dos tecidos vegetais, bem como para aderência ao  
544 patógeno, essa característica é apresentada por Zhou *et al.* (2018) como a base do controle *in*  
545 *vivo* por *Debaryomyces nepalensis* ao fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. O biofilme  
546 consiste na agregação de células de microrganismos junto a metabólitos secundários  
547 (polissacarídeos) formando um gel que adere a superfícies e protege os microrganismos de  
548 condições adversas, esse mecanismo é apresentado por diversos organismos, como arquea,  
549 bactérias e microrganismos eucariontes (HAGGAG, 2010; RAVELLA *et al.*, 2010).

550 A ação antagônica a fitopatógenos apresentada por isolados de leveduras através do  
551 cultivo conjunto tem sido justificada pela competição por espaço e nutrientes, este mecanismo  
552 é considerado o modo de ação primário apresentado por leveduras no biocontrole, atuando em  
553 conjunto com outros mecanismos que podem ser apresentados pelas leveduras biocontroladoras  
554 (FREIMOSER *et al.*, 2019).

555 Durante o desenvolvimento das leveduras pode haver a secreção de compostos orgânicos,  
556 como quitinases, glucanases ou proteases. Essas enzimas tem sido apresentadas no antagonismo  
557 a fitopatógenos, sendo então utilizadas no controle biológico (FREIMOSER *et al.*, 2019). Na  
558 relação entre *Penicillium italicum* e diferentes isolados leveduras epifíticas, foi observado que  
559 compostos liberados pelas leveduras apresentaram efeito antagônico no desenvolvimento do  
560 isolado do fitopatógeno, no entanto, apenas um dos isolados de levedura utilizados apresentou

561 efeito inibitório no desenvolvimento de *P. digitatum*, o que evidencia uma expressão de  
562 sensibilidade diferente para diferentes isolados do fitopatógeno (LIU *et al.*, 2019).

563 Compostos orgânicos produzidos por microrganismos e utilizados em estudos para o  
564 biocontrole de fitopatógenos podem apresentar resistência ao tratamento térmico, garantindo a  
565 retenção da sua atividade de ação antagônica (SOUSA, 2018; DO CARMO SOUSA, 2018).  
566 Essa característica pode ser apresentada por alguns isolados de leveduras, os quais mantém sua  
567 atividade antagônica em relação ao crescimento micelial e germinação de esporos de  
568 fitopatógenos *in vitro* (FERRAZ *et al.*, 2018; SOUSA, 2018). Os compostos termoestáveis  
569 produzidos por isolados de leveduras podem também não apresentar indício de ação antifúngica  
570 direta *in vitro*, no entanto, ação antagônica pode ser observada também *in vivo*, estimulando a  
571 expressão enzimas e de genes de proteínas relacionadas a defesa do hospedeiro, tais como *PRI-*  
572 *like*, *endoGLU9*, *endoCHI-like* e *PR4* (SUN *et al.*, 2018).

573 Álcoois (etílico, isoamílico e fenético) e ésteres (acetato de etila e acetato de isoamila),  
574 além de acetato etílico são os compostos orgânicos voláteis comumente produzidos por  
575 diferentes gêneros de leveduras, podendo apresentar também produção de dióxido de carbono,  
576 o qual apresenta sinergismo na eficácia de compostos orgânicos voláteis no biocontrole  
577 (CONTARINO, 2019).

578 Em conclusão, leveduras encontradas naturalmente em tecidos de cacauzeiros podem  
579 apresentar diferentes mecanismos de ação antagônica a *M. royeri*, demonstrados pelos isolados  
580 de leveduras selecionados nos estudos *in vitro*, bem como apresentar outras características  
581 positivas para seleção de agentes de biocontrole, os isolados selecionados representam uma  
582 alternativa promissora para estudos *in vivo* e a possível inclusão de leveduras nas estratégias de  
583 controle biológico da doença.

## 584 CONCLUSÕES

- 585 • O método de cultivo pareado mostrou eficiente no controle *in vitro* de isolados de *M.*  
586 *royeri* pela ação de isolados de leveduras provenientes de tecidos de cacauzeiros,  
587 possibilitando a sua seleção;
- 588 • Através da amplificação de fragmentos de DNA dos isolados foi possível identificar 5  
589 dos isolados a nível de espécie, e 1 a nível de gênero;
- 590 • Os isolados FJ 123 e FJ 521 apresentaram alto índice de formação de biofilme às 24 horas  
591 de avaliação, e os isolados FJ 112, FJ 123 e FJ 521 apresentaram alto índice de formação  
592 de biofilme após 48 horas;
- 593 • A partir da ACP, foi possível identificar que os isolados FJ 112, FJ 123, FM 324 e LEV

594 169 apresentaram maiores valores nos componentes que mais explicaram as variáveis  
595 estudadas.

## 596 AGRACIAMENTOS

597 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela  
598 concessão da bolsa de estudo; à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao  
599 Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pelo suporte; à Comissão Executiva do Plano  
600 da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) e ao Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias  
601 (INIAP) – Equador, pela disponibilização da estrutura e suporte para o desenvolvimento do  
602 trabalho e ao Ministério Público da Bahia pelo financiamento.

## 603 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 604 BAILEY, B. A. *et al.* *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot. **Molecular Plant Pathology**,  
605 19(7), p. 1580-1594, 2018.  
606
- 607 BAILEY, B. A. *et al.* Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic  
608 isolates of four *Trichoderma* species. **Planta**, 224, p. 1449–1464, 2006.  
609
- 610 BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco, United States, 1974.  
611
- 612 BARROS, O.; SÁNCHEZ, J. Un método de aislamiento del hongo *Monilia roreri*, Cif y Par. Información  
613 técnica. **El cacaotero colombiano**. No. 11, 1979.  
614
- 615 BETTIOL, W.; GHINI, R. Impactos das mudanças climáticas sobre o controle biológico de doenças de plantas.  
616 In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. B. (Eds.) **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Embrapa  
617 Meio Ambiente, Jaguariúna, 2009. p. 29-48.  
618
- 619 BIENG, M. A. N. *et al.* Tree spacing impacts the individual incidence of *Moniliophthora roreri* disease in cacao  
620 agroforests. **Pest Management Science**, 73 (11), 27p., 2017.  
621
- 622 BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – (MAPA). Instrução normativa nº 39, de 1 de  
623 outubro de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 11-14, 2018.  
624
- 625 BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – (MAPA). Portaria nº 131, de 27 de junho de  
626 2019. Institui o Programa Nacional de Prevenção e Vigilância de Pragas Quarentenárias Ausentes - PNPV-PQA.  
627 **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 8p., 2019.  
628
- 629 CONTARINO, R. *et al.* Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. **Food**  
630 **Microbiology**, p. 70-74, 2019.  
631
- 632 CORDERO-BUESO, G. *et al.* Wild grape-associated yeasts as promising biocontrol agents against *Vitis vinifera*  
633 fungal pathogens. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1-15, 2017.  
634
- 635 CHEN, P. *et al.* screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* on  
636 strawberry fruits. **Mycobiology**, 46:1, p. 33-46, 2018.  
637
- 638 DO CARMO SOUZA, A. **Controle biológico de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom de**  
639 **alternaria, por *Bacillus spp.*** 79f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural).  
640 Universidade Federal de São Carlos. 2018.  
641
- 642 EVANS, H. C. *et al.* On the taxonomy of *Monilia roreri*: an important pathogen of *Theobroma cacao* in South  
643 America. **Canadian Journal of Botany**, 56, p. 2528-2532, 1978.  
644
- 645 EVANS, H. C. Frosty Pod Rot (*Moniliophthora roreri*). In: BAILEY, B. A.; MEINHARDT, L. W. (Eds.) **Cacao**

- 646 **Diseases, A History of Old Enemies and New Encounters**, 2016. p. 63-96.  
647
- 648 FERRAZ, L. P. *et al.* **Mecanismos de ação de isolados de leveduras envolvidos no biocontrole de**  
649 ***Penicillium digitatum*, agente causal do bolor verde em frutos cítricos**. Citrus Res. Technol., 39, e-1033, 11p.  
650 2018.  
651
- 652 FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-  
653 1042, 2011.  
654
- 655 FIALHO, M. B. *et al.* Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro  
656 development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **World J. Microb. Biot.** 26, p. 925-  
657 932, 2010.  
658
- 659 FREIMOSER, F. M. *et al.* Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. **World Journal of Microbiology**  
660 **and Biotechnology**, 35(10), 19p., 2019.  
661
- 662 FRIGHETO, R. T. S; MELO, I. S. Produção de antibióticos por microrganismos. In: MELO, I.S.; SANHUEZA,  
663 R.M.V. (Coords). **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos**. Jaguariúna: Embrapa  
664 Meio Ambiente, 1995. p. 40-46.  
665
- 666 GAMEZ, O. E. B. **Evaluación de la resistencia a *Monilia roleri* y su relación con algunas características**  
667 **morfológicas del fruto de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.)** 1983. 74f. Dissertação (Mestrado) -  
668 Universidad de Costa Rica.  
669
- 670 HAGGAG, W. The role of biofilm exopolysaccharides on biocontrol of plant diseases. **Biopolymers**, p. 271-  
671 284, 2010.  
672
- 673 HAMMER, Ø.; HARPER, D. A.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education  
674 and data analysis. **Palaeontologia electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.  
675
- 676 HEBBAR, P. K. Cacao diseases: a global perspective from an industry point of view. **Phytopathology**, v. 97, p.  
677 1658-1663, 2007.  
678
- 679 JOHNSTON, S. *et al.* *Cryptococcus neoformans* thermotolerance to avian body temperature is sufficient for  
680 extracellular growth but not intracellular survival in macrophages. **Sci Rep**, 6 (1), p. 1-9, 2016.  
681
- 682 KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment,  
683 interactive sequence choice and visualization. **Briefings in bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1160-1166, 2019.  
684
- 685 KEARSE, M. *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization  
686 and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.  
687
- 688 KRAUSS, U. *et al.* Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical  
689 agents against frosty pod rot (*Moniliophthora roleri*) in cocoa (*Theobroma cacao*). **Biological Control**, v. 54, p.  
690 230-240, 2010.  
691
- 692 LANDELL, Melissa Fontes *et al.* *Hannaella pagnoccae* sp. nov., a tremellaceous yeast species isolated from  
693 plants and soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. 6, p. 1970-1977,  
694 2014.  
695
- 696 LARANJEIRA, F. F. *et al.* **Priorização de pragas quarentenárias ausentes: metodologia e lista das 20**  
697 **pragas mais importantes**, Cruz das almas, Bahia – Brasil, 2017.  
698
- 699 LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. **Nucleic**  
700 **acids research**, v. 47, n. 1, p. 256-259, 2019.  
701
- 702 LIU, Y. *et al.* Different mechanisms of action of isolated epiphytic yeasts against *Penicillium digitatum* and  
703 *Penicillium italicum* on citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, 152, p. 100-110, 2019.  
704
- 705 MARIAN, M.; SHIMIZU, M. Improving performance of microbial biocontrol agents against plant

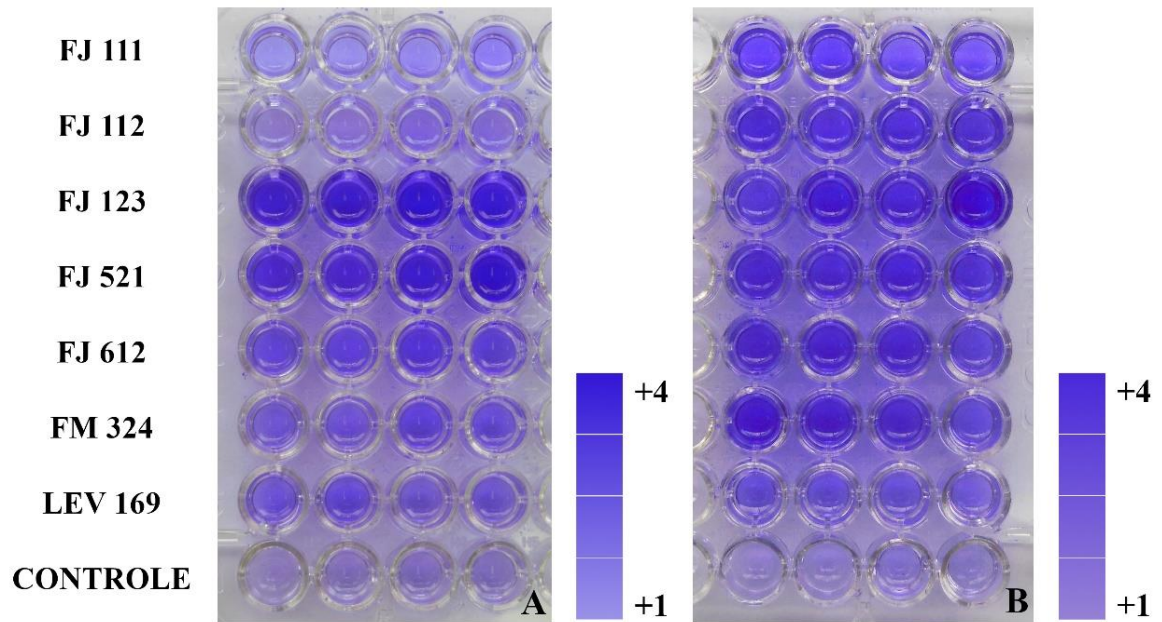
- 706 diseases. **Journal of General Plant Pathology**, p. 1-8, 2019.  
707
- 708 MEDEIROS, F. H. V. *et al.* Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L. *et al.* (Eds.) **Manual de**  
709 **Fitopatologia**, vol. 1, 5ª ed. Ceres, Ouro Fino - MG, 2018, p. 261-272.  
710
- 711 MEINHARDT, L. W. **Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters**, Springer  
712 International Publishing, 2016. p. 33-59.  
713
- 714 NAVARRO, H. M. C. Diversidade e taxonomia polifásica de leveduras associadas à família Bromeliaceae na  
715 Mata Atlântica Setentrional. 2018. 115f. Dissertação (Ciências Biológicas). Universidade Federal de Alagoas.  
716
- 717 NUTARATAT, P., *et al.* Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and  
718 sugar cane leaves in Thailand. **Fungal Biology**, 118(8), p. 683–694, 2014.  
719
- 720 OREA, M. D. D. *et al.* Current Status of Cocoa Frosty Pod Rot Caused by *Moniliophthora roreri* and a  
721 Phylogenetic Analysis. **Plant Pathol. J.**, 16, p. 41-53, 2017.  
722
- 723 PARAFATI, L. *et al.* Biocontrol ability and actions mechanism of food-isolates yeast strains against *Botrytis*  
724 *cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 47, p. 85-92, 2015.  
725
- 726 PARK, B. J. *et al.* Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with  
727 HIV/AIDS. **AIDS**, 23 (4), p. 525–530, 2019.  
728
- 729 PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot **FEMS Yeast Research**, vol. 6, Issue 4, p.  
730 463-468, 2006.  
731
- 732 PHILLIPS-MORA, W. *et al.* Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of  
733 *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. **Plant Pathol.** 54, p. 483-490, 2005.  
734
- 735 PHILLIPS-MORA, W.; WILKINSON, M. J. Frosty Pod of Cacao: A Disease with a Limited Geographic Range  
736 but Unlimited Potential for Damage. **Phytopathology**, v. 97, p. 1644-1647, 2007.  
737
- 738 PIMENTA NETO, A. A. **Novos componentes para o manejo da Vassoura de Bruxa do cacauceiro**. 2016.  
739 Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.  
740
- 741 PLOETZ, R. The Impact of Diseases on Cacao Production: A Global Overview. In: BAILEY, B. A.,  
742
- 743 RAVELLA, S. R. *et al.* Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-like fungus  
744 *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydr. Polym.** 82, p. 728-732, 2010.  
745
- 746 ROJAS, Edward C. *et al.* Selection of fungal endophytes with biocontrol potential against Fusarium head blight  
747 in wheat. **Biological Control**, v. 144, p. 1-24, 2020.  
748
- 749 SCHROTH, G. *et al.* Pests and diseases in agroforestry systems of the humid tropics. **Agrofor. Syst.** 50, p. 199-  
750 241, 2000.  
751
- 752 SLÁVIKOVÁ, E. *et al.* Yeasts colonizing the leaves of fruit trees. **Microbiol**, v. 59, p. 419-424, 2009.  
753
- 754 SOUSA, A. J. S. **Uma quitinase termoestável de *Chromobacterium violaceum* atcc 12472 expressa em**  
755 ***Escherichia coli* e que inibe a germinação de conídios de dois fungos fitopatogênicos isolados do abacaxi**  
756 **ornamental**. 111f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Ceará. 2018.  
757
- 758 SUN, C. *et al.* Autoclaved yeast enhances the resistance against *Penicillium expansum* in postharvest pear fruit  
759 and its possible mechanisms of action. **Biological Control**, 119, p. 51–58, 2018.  
760
- 761 SUN, P. *et al.* Indole-3-acetic acid-producing yeasts in the phyllosphere of the carnivorous plant *Drosera indica*  
762 L. **PloS one**, v. 9, n. 12, 2014.  
763
- 764 TORRES-DE-LA-CRUZ, M. *et al.* Control químico de *Moniliophthora roreri* en México. **Biotecnia**, v. 21, nº 2,  
765 México, p. 55-61, 2019.



- 766  
767 WANG, K. *et al.* The isolation and characterization of resident yeasts from the phylloplane of *Arabidopsis*  
768 *thaliana*. **Sci Rep**, 6 (1), p. 1-13, 2016.  
769  
770 WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Cocoa**, ed. 4, 1985.  
771  
772 ZHOU, Y. *et al.* Mechanisms of action of the yeast *Debaryomyces nepalensis* for control of the pathogen  
773 *Colletotrichum gloeosporioides* in mango fruit. **Biological Control**, 123, p. 111-119, 2018.

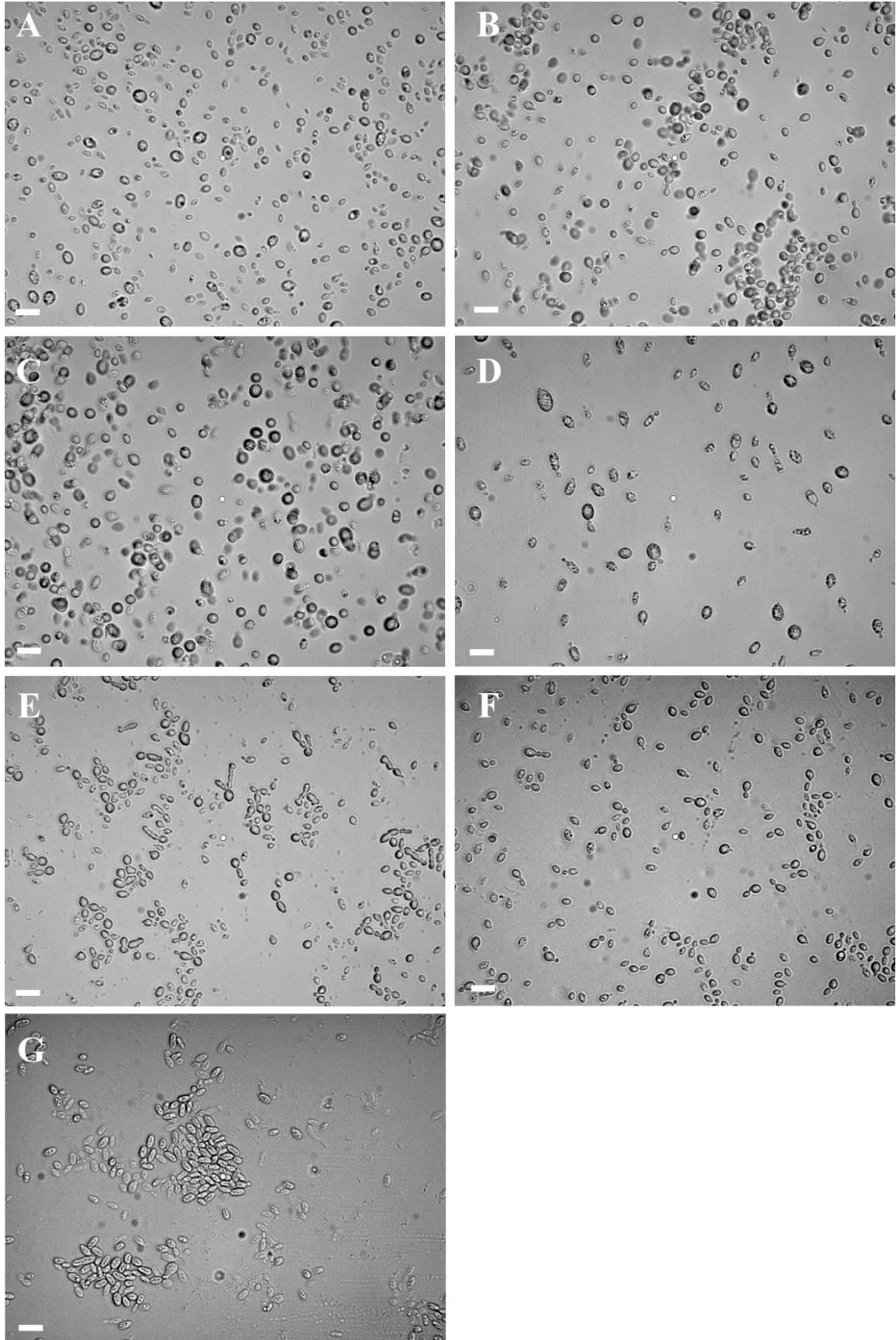
## ANEXO II – FIGURAS

**Figura 19** – Observação de possível formação de biofilme pelos isolados de leveduras provenientes de tecidos do cacauero, selecionados a partir de ensaios *in vitro*. A) Formação de biofilme após 24 horas de cultivo; B) Formação de biofilme após 48 horas cultivo



Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 20** - Isolados de leveduras selecionados a partir de cultivo pareado com *Moniliophthora roreri*, observados em microscópio ótico (100x). A) FJ 111. B) FJ 112. C) FJ 123. D) FJ 521. E) FJ 612. F) FM 324. G) LEV 169. Barra = 100  $\mu$ m.



Fonte: Elaborada pelo autor

## **CONCLUSÕES GERAIS**

---

---

## CONCLUSÕES GERAIS

- Sementes de cacau doentes *in natura* e secas por três dias ao sol apresentaram crescimento micelial de *M. royeri* em meio de cultura BDA, bem como esporulação em testas de sementes submetidas a câmara úmida.
- Sementes quando submetidas a fermentação por 24 horas em massa de sementes doentes apresentaram desenvolvimento de colônias em meio de cultura, não sendo observado desenvolvimento quando submetida a fermentação acima de 48 horas;
- Esporos secos de *M. royeri* inoculados em materiais inertes, tais como alumínio, papel, plástico, borracha, rafia, tecido e vidro, armazenados em condições de temperatura e luminosidade controlada, permaneceram viáveis mesmo após 100 dias de inoculação;
- Isolados de leveduras provenientes de tecidos de cacaueiro, selecionados através do cultivo pareado com *M. royeri*, não apresentaram crescimento à temperatura corpórea, apresentando diferentes mecanismos de ação no controle do fitopatógeno *in vitro*, bem como diferentes intensidades de formação de biofilme.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar o possível controle de *M. royeri* *in vivo* pela ação de isolados de leveduras selecionados que mais se destacaram nos estudos *in vitro*, através da inoculação de frutos de cacaueteiro em campo, avaliando incidência e severidade da doença;
- Estudar a ação do biofilme produzido pelos isolados de levedura sobre isolados de *M. royeri*, a fim de identificar se estes apresentam algum tipo de interação antagônica.