

ROSICLÉIA DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E PREVALÊNCIA DE FUNGOS ASSOCIADOS À CULTURA DA
MACADÂMIA**

Botucatu

2022

ROSICLÉIA DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E PREVALÊNCIA DE FUNGOS ASSOCIADOS À CULTURA DA
MACADÂMIA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Campus de Botucatu, para a obtenção do título mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientador: Prof. Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira

Botucatu

2022

S586i

Silva, Rosicleia da

Identificação e prevalência de fungos associados à cultura da macadâmia / Rosicleia da Silva. -- Botucatu, 2022

80 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu

1. Microrganismos fitopatogênicos. 2. Macadamia integrifolia. 3. Cladosporium xanthochromaticum. 4. Colletotrichum siamense. 5. Lasiodiplodia pseudotheobromae.

I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: IDENTIFICAÇÃO E PREVALÊNCIA DE FUNGOS ASSOCIADOS À CULTURA DA MACADÂMIA

AUTORA: ROSICLÉIA DA SILVA

ORIENTADOR: BERNARDO DE ALMEIDA HALFELD VIEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. BERNARDO DE ALMEIDA HALFELD VIEIRA (Participação Virtual)
Laboratório de Quarentena / Embrapa Meio Ambiente

Pesquisadora Dr.^a ALESSANDRA KEIKO NAKASONE (Participação Virtual)
Embrapa Amazônia Oriental / Embrapa

Pesquisador Dr. IVAN HERMAN FISCHER (Participação Virtual)
Pesquisa e Desenvolvimento / Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - Pólo Regional Centro Oeste

Botucatu, 28 de março de 2022

*À minha mãe Antonia, às minhas
irmãs Vilanir e Rosana e aos meus sobrinhos
Camila, Arthur, Denison Filho e Paula,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me iluminar e manter minha fé, mesmo nos momentos mais difíceis. À minha mãe Antonia Valderina e às minhas irmãs Vilanir e Rosana por todo o amor e por sempre acreditarem no meu potencial. Aos meus sobrinhos Camila, Arthur, Denison Filho e Paula por tornarem a minha vida mais leve. À minha avó Josefa (*in memorian*) e ao meu pai Ronaldo (*in memorian*) por terem sido exemplo de força.

À Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp (FCA), campus de Botucatu, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Proteção de Plantas) e aos docentes por todo o conhecimento compartilhado.

Às amigas Mariane, Naiara, Jennifer, Larissa, Pamela, Rafa e Letícia por todos os momentos divertidos durante essa caminhada.

À banca avaliadora pela disponibilidade e pelas correções sugeridas para a melhoria desta dissertação.

Ao meu orientador, prof. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira, pela orientação, por todo o profissionalismo, paciência, incentivo e confiança em realizar este trabalho. À prof.^a Kátia de Lima Nechet pela disponibilidade, atenção, sugestões e auxílio.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Meio Ambiente por toda a infraestrutura disponibilizada. Às técnicas do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA) Rosely, Neusa, Elke e Ana Carolina pela dedicação e carinho. Ao técnico Paulo e equipe pelo apoio na casa de vegetação do setor Campos Experimentais. À dona Rose e toda a equipe de auxiliares de limpeza. A todos os amigos do LMA pelas conversas e gargalhadas. Ao Valdeir pela amizade e ajuda em todas as etapas deste trabalho. À Gabriela pelo apoio e carinho. Ao estagiário do projeto, Murilo, pelo suporte na condução dos ensaios realizados.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e com o apoio da empresa QueenNut Macadamia pelo suporte técnico e financeiro por meio do projeto tipo III, SEG: 30.19.90.012.00.00, contrato FAPED/CNPMA/QUEENNUT, SAIC 21300.19/0072-1.

RESUMO

A macadâmnia é uma noz originária das florestas tropicais e subtropicais da Austrália, e vem ganhando destaque devido a sua importância no setor alimentício e de cosméticos. A produção mundial é liderada pela África do Sul e Austrália. No Brasil, o estado de São Paulo é o maior produtor. Dada a importância dessa cultura em expansão e à escassez de informações referentes a problemas fitossanitários no Brasil, o presente trabalho teve como objetivos identificar os microrganismos associados e os fitopatogênicos à cultura da macadâmnia, bem como definir as suas épocas de ocorrência, temperatura ideal de crescimento e sensibilidade a fungicidas. Os órgãos da planta com sintomas de doenças e/ou sinais de colonização fúngica foram coletados mensalmente, por três anos consecutivos (2019, 2020 e 2021) em áreas de cultivo de macadâmnia, predominantemente, em Dois Córregos, SP. Isolados representativos com patogenicidade confirmada foram identificados por caracterização morfológica e molecular. Ensaio do efeito da temperatura no crescimento micelial de *Cladosporium* sp., utilizando as temperaturas 20-30 °C, e dos isolados *Lasiodiplodia* sp. e *Colletotrichum* sp. com as temperaturas 23-30 °C foram realizados bem como a sensibilidade desses isolados a seis fungicidas distintos. As principais doenças, seus agentes causais e época de prevalência foram: cancro do caule, causado por *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (novembro a abril); seca do rácemo causada por *Cladosporium xanthochromaticum* (março a agosto) e podridão do fruto causada por *Colletotrichum siamense* (abril de 2021). Os fungos *C. xanthochromaticum* e *C. siamense* apresentaram melhor desenvolvimento a 23 °C e *L. pseudotheobromae* a 30 °C. Quanto aos fungicidas, hidróxido de cobre inibiu a germinação de *C. xanthochromaticum*; epoxiconazol + piraclostrobina, clorotalonil, azoxistrobina + ciproconazol e fluxapiroxade + piraclostrobina inibiram tanto *C. xanthochromaticum*, *L. pseudotheobromae* e *C. siamense*; e procimidona inibiu somente o crescimento de *L. pseudotheobromae*. Os três fungos associados às doenças na macadâmnia são relatados pela primeira vez no Brasil, sendo o primeiro relato de *C. xanthochromaticum* e *C. siamense* como agentes causais da seca do rácemo e podridão do fruto em macadâmnia, respectivamente.

Palavras-chave: *Macadamia integrifolia*; *Lasiodiplodia pseudotheobromae*; *Cladosporium xanthochromaticum*; *Colletotrichum siamense*; epidemiologia.

ABSTRACT

Macadamia is a nut tree native to the tropical and subtropical forests of Australia and has been rising in prominence due to its importance in the food and cosmetics markets. South Africa and Australia are the world's greatest producers of this nut, and in Brazil, São Paulo is the state with the largest national production. Given the importance of this expanding culture and the scarcity of information regarding phytosanitary problems in Brazil, the present work had the objectives of identifying the microorganisms associated and phytopathogenic to the macadamia culture, as well as defining their seasons of occurrence, the ideal temperature of growth and sensitivity to fungicides. Plant organs with disease symptoms and/or signs of fungal colonization were collected monthly, for three consecutive years (2019, 2020, and 2021) in macadamia growing areas, predominantly, in Dois Córregos, SP. Representative isolates with confirmed pathogenicity were identified by morphological and molecular characterization. Tests of the effect of temperature on mycelial growth of *Cladosporium* sp. using temperatures 20-30 °C, and of *Lasiodiplodia* sp. and *Colletotrichum* sp. isolates using temperatures 23-30 °C were performed as well as the sensitivity of these isolates to six different fungicides. The main diseases, their causal agents, and season of prevalence were stem canker, caused by *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (November to April), raceme blight caused by *Cladosporium xanthochromaticum* (March to August), and husk rot caused by *Colletotrichum siamense* (April 2021). The fungi *C. xanthochromaticum* and *C. siamense* showed better development at 23 °C and *L. pseudotheobromae* at 30 °C. As for the fungicides, copper hydroxide inhibited the germination of *C. xanthochromaticum*, epoxiconazole + pyraclostrobin, chlorothalonil, azoxystrobin + cyproconazole, and fluxapyroxad + pyraclostrobin inhibited both *C. xanthochromaticum*, *L. pseudotheobromae*, and *C. siamense*, and procymidone inhibited only the growth of *L. pseudotheobromae*. The three fungi associated with diseases in macadamia are reported for the first time in Brazil, with the first report of *C. xanthochromaticum* and *C. siamense* as causal agents of raceme blight and husk rot in macadamia, respectively.

Keywords: *Macadamia integrifolia*; *Lasiodiplodia pseudotheobromae*; *Cladosporium xanthochromaticum*; *Colletotrichum siamense*; epidemiology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Macadâmia: origem e características botânicas	18
2.2	Importância econômica	19
2.3	Principais doenças na macadâmia	21
2.3.1	Mancha da fruto	22
2.3.2	Podridão do fruto causada por <i>Phomopsis</i> sp.	23
2.3.3	Podridão do fruto causada por <i>Colletotrichum</i> sp.	24
2.3.4	Seca do rácemo	25
2.3.5	Seca do rácemo causada por <i>Cladosporium</i> sp.	26
2.3.6	Cancro do caule causado por <i>Phytophthora</i> sp.	27
2.3.7	Cancro do caule causado por <i>Lasiodiplodia</i> sp.	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Local de obtenção dos isolados	29
3.2	Isolamento dos possíveis fitopatógenos associados	29
3.3	Obtenção de culturas monospóricas	30
3.4	Caracterização cultural e morfológica	31
3.5	Testes de patogenicidade	32
3.5.1	Em rácemos destacados em laboratório	32
3.5.2	Em rácemos em campo	33
3.5.3	Em folhas	35
3.5.4	Em caule	35
3.5.5	Em fruto	36
3.6	Identificação molecular	37
3.6.1	Obtenção de massa micelial	37
3.6.2	Extração de DNA	38
3.6.3	Reação em Cadeia da Polimerase - PCR	38
3.6.4	Análise filogenética	40
3.7	Ensaio de sensibilidade a fungicidas	40
3.8	Determinação da temperatura ideal de crescimento	41
4	RESULTADOS	43
4.1	Isolados obtidos e suas épocas de ocorrência	43
4.2	Teste de patogenicidade	46

4.2.1	Em ráceros destacados em laboratório	46
4.2.2	Em ráceros em campo	47
4.2.3	Em folhas	49
4.2.4	Em caule.....	49
4.2.5	Em frutos	50
4.3	Caracterização cultural e morfológica.....	51
4.4	Análise filogenética.....	53
4.5	Sensibilidade de isolados a fungicidas.....	59
4.6	Temperatura ideal de crescimento	61
5	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÕES.....	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

Espécies de macadâmia (*Macadamia integrifolia*, *M. tetraphylla* e híbridos) são nativas da Austrália, e cultivadas em regiões tropicais e subtropicais pelo mundo, devido às suas nozes comestíveis, com alto teor de óleo (TRUEMAN, 2013).

É uma planta perene cuja produção média de frutos, quando adulta, é de 8 kg a 13 kg e possui vários usos, como: noz inteira, noz triturada como ingrediente alimentar (biscoito, bolo ou sorvete, etc.) e óleo vegetal de cozinha (AZAD et al., 2017).

A produção mundial é liderada pela África do Sul e Austrália que contabilizaram 29% e 22% da participação mundial em 2019, respectivamente. Acompanhando o ritmo de crescimento observado nos últimos 10 anos, safras de 2019 foram aumentando em comparação com a temporada anterior na maioria dos países produtores, tais como: Guatemala, Vietnã, Brasil, Malawi, China e Quênia (INC, 2020).

No Brasil, a macadâmia encontrou condições favoráveis para seu cultivo nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, sul de Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, leste do Mato Grosso do Sul e oeste do Paraná (SCHNEIDER et al., 2012).

O estado de São Paulo é o maior produtor nacional cuja maioria dos produtores de noz macadâmia pertence à Associação Brasileira de Noz Macadâmia (ABM) fundada no ano de 1991. Grande parte da produção do estado é vendida para a beneficiadora QueenNut Macadamia, localizada no município de Dois Córregos-SP (SOBIERAJSKI et al., 2006; PENONI, 2011).

Os pomares de macadâmia no Brasil são considerados jovens. Os primeiros plantios comerciais surgiram em Limeira-SP entre 1976 e 1980 (TOLEDO PIZA; PIZA; ALMEIDA NETO, 2019). Em virtude disso, nas condições edafoclimáticas brasileiras, ainda são escassas as informações sobre ocorrência de doenças na cultura.

Um dos poucos materiais a respeito é o informativo de Pesquisa & Tecnologia da APTA Regional, em que se menciona a incidência de antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, podridão radicular causada principalmente por *Phytophthora cinnamomi*, seca de flores em que se atribui associação com o fungo

Botrytis cinerea e mancha do fruto causada pelo fungo *Pseudocercospora macadamiae* (FISCHER; PERDONÁ; CRUZ, 2014).

Apesar da ocorrência de alguns desses patógenos ser reportada em diversas culturas, não há comprovação formal da ocorrência desses organismos como agentes causais de doenças em plantas de macadâmia no país.

Os únicos agentes etiológicos associados a essa noqueira no Brasil, reportados em veículo de comunicação científica, são os fungos *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl, causando cancro no caule (FISCHER et al., 2017) e *Neopestalotiopsis clavisporea* (G. F. Atkinson) Maharachch, K. D. Hyde & Crous, agente da mancha foliar (SANTOS et al., 2019).

Essas doenças interferem não somente no desenvolvimento das plantas e redução da produção da macadâmia, como também na qualidade das nozes (FORTUNATO; DEBONA; RIOS, 2019).

Por essa razão, são importantes estudos que caracterizem os agentes etiológicos que ocorrem na cultura no país, bem como medidas de manejo para tais, pois os agricultores que investem no cultivo dessa noqueira contam com poucos produtos registrados para a cultura.

No Agrofit (2022), há somente quatro produtos registrados para a cultura da macadâmia – acibenzolar-S-metílico, fluxapiroxade + piraclostrobina, hidróxido de cobre e azoxistrobina + difenoconazol – indicados para o controle da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) que, no Brasil, não tem comprovação formal de ocasionar doença à cultura.

Assim, devido à escassez de trabalhos publicados sobre a etiologia de doenças em macadâmia no país, objetivou-se identificar os principais patógenos na cultura e suas épocas de ocorrência em plantios de macadâmia em Dois Córregos-SP e entorno, além de fornecer subsídios básicos para adoção de medidas de controle.

Os seguintes objetivos específicos foram propostos: (i) identificar a diversidade de patógenos fúngicos e oomicetos associados às amostras de órgãos sintomáticos de macadâmia, por meio de informações de sintomatologia, patogenicidade, caracterização morfocultural e análise filogenética; (ii) obter uma coleção de fitopatógenos associados aos órgãos vegetais de macadâmia; (iii) relacionar a ocorrência do agente causal ao período sazonal; (iv) avaliar a

sensibilidade dos agentes etiológicos a fungicidas e; (v) estudar o efeito de diferentes temperaturas sobre o desenvolvimento dos fitopatógenos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Macadâmia: origem e características botânicas

Abrangendo de 75 a 80 gêneros, e cerca de 1700 espécies, a família Proteaceae consiste de arbustos e árvores que podem ser encontradas em regiões tropicais e subtropicais, especialmente Austrália e África do Sul (SIMPSON, 2010).

A família Proteaceae inclui, aproximadamente, 10 espécies do gênero *Macadamia*, duas das quais produzem nozes comestíveis são a *Macadamia integrifolia* e *M. tetraphylla* ou híbridos destas. A principal espécie comercializada é a *M. integrifolia* (HOKMABADI; SEDAGHATI, 2014).

As árvores *M. integrifolia* e *M. tetraphylla* têm origem na Austrália. As árvores são cultivadas nos Estados Unidos, principalmente no Havaí e na Califórnia, desde o final de 1800 e, no Brasil, as primeiras macadâmias foram plantadas na década de 1940 (GWALTNEY-BRANT, 2012; SOBIERAJSKI et al., 2006).

A noqueira-macadâmia é uma árvore perene de crescimento rápido e tamanho médio com folhagem verde escura e densa. Suas folhas que são pontiagudas, oblongas e medem 30 centímetros ou mais, se desenvolvem em espirais de dois, três ou quatro, mas raramente são solitárias. As flores de macadâmia são pequenas, esbranquiçadas e crescem em pontas compridas. O fruto da macadâmia é identificado como um folículo, e possui pericarpo verde escuro (AGMRC, 2021; SUSILOWATI; KUSUMA; KHOLIBRINA, 2019).

No Brasil, o intumescimento das gemas florais ocorre em maio, com ápice da floração no mês de junho (SACRAMENTO; PEREIRA, 2003).

A caracterização dos períodos de florescimento e de frutificação é classificada em: gemas intumescidas, crescimento do rácemo, formação dos botões florais, flores em pré-antese, flores abertas, flores senescentes, flores fecundadas; frutificação efetiva, crescimento dos frutos, final do período de crescimento dos frutos; frutos maduros e queda natural dos frutos (SOBIERAJSKI et al., 2007).

Na Austrália, a caracterização dos períodos de florescimento e de frutificação podem ser descritos como: pré-floração; floração precoce, pico de floração, conjunto de nozes, nozes do tamanho de uma ervilha e pericarpo formado (BRIGHT, 2018).

Quando cultivada em condições adequadas, a macadâmia produz nozes após

4 ou 5 anos e alcança sua produção total em 12 a 15 anos, podendo continuar por mais de 100 anos, havendo registros de pomares com plantas de 60 anos em plena produção comercial (WOOD; GARG, 2011; TOLEDO PIZA; MORIYA, 2014).

Apesar da origem Australiana, a *Hawaii Agricultural Experiment Station* (HAES) é o local onde se desenvolveram as principais variedades e clones plantados no mundo (PIMENTEL, 2007), entre elas: HAES 788, HAES 344, HAES 246, HAES 741, HAES 333, HAES 508, HAES 660, HAES 800, HAES 224 e HAES 816 (PEACE et al., 2005).

As variedades de macadâmia mais utilizadas no Brasil são as do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e do *Hawaii Agricultural Experiment Station* (HAES), e entre as disponíveis para o plantio se encontram HAES 741, HAES 816, HAES 246 e IAC 4-12B (PERDONÁ et al., 2010; ABM, 2019a).

A seleção de cultivares é de fundamental importância para a formação de um pomar produtivo. Ela deve ser feita de acordo com o clima, solo, densidade, topografia, e forma de manejo (PIO; ENTELMAN, 2019).

2.2 Importância econômica

A noz de macadâmia é um ingrediente utilizado na preparação de pratos doces e salgados, como acompanhamento de carnes, na fabricação de sorvetes, na indústria de chocolate, entre outros. Além disso, é utilizada na indústria de cosméticos devido ao seu óleo ser rico nos ácidos linoleico e linolênico, que são insaturados. Esse óleo também é comestível (BEUCHAT; WORTHINGTON, 2007).

Essa noz pode, também, ser empregada na produção da farinha de macadâmia, para atender o mercado de produtos isentos de glúten; o isolamento da proteína, como constituinte de suplementos alimentares e para uso na indústria farmacêutica, na forma de cápsulas de óleo para o tratamento de doenças cardiovasculares (NAVARRO; RODRIGUES, 2016).

Além da produção de nozes, outra medida importante para comercialização da macadâmia é a denominada taxa de recuperação ($TR = \frac{\text{Peso da amêndoa}}{\text{Peso da noz}} \times 100$) que representa a porcentagem de amêndoas obtida após o beneficiamento, um indicador da eficácia dos controles de pragas e doenças e dos procedimentos de

colheita e pós-colheita (SOBIERAJSKI et al., 2006; TOLEDO PIZA; PIZA; ALMEIDA NETO, 2019).

Em virtude de suas aplicações, a produção global de macadâmia está aumentando, com regiões de cultivo estabelecidas expandindo seus plantios e regiões emergentes, particularmente a China, com expectativa de participação significativa na produção global futura (AMS, 2019).

O consumo mundial de macadâmia vem crescendo a um ritmo superior a 8% ao ano, sendo, portanto, a noz que tem o consumo em maior expansão (ABM, 2019b; INC, 2018).

Seguindo a tendência dos dez anos anteriores, a produção global de macadâmia continuou a aumentar, com a safra de 2020 atingindo mais de 62 mil toneladas de amêndoas, um aumento de 4% em relação à temporada anterior e 45% maior do que a média nos 10 anos anteriores. Austrália e África do Sul são os fornecedores líderes mundiais, respondendo, cada um, por 25% da produção global (INC, 2021).

O Brasil tem aproximadamente 6.000 hectares plantados, distribuídos nos Estados de São Paulo (38%), Espírito Santo (32%), Minas Gerais (10%), Bahia (10%), Rio de Janeiro (6%), Paraná (2%), Mato Grosso do Sul (1%) e Goiás (1%) (TOLEDO PIZA; PIZA; ALMEIDA NETO, 2019).

Há alguns anos, grande parte da macadâmia produzida no país tinha como destino a exportação, porém esta tendência vem sendo revertida. Os principais motivos são o aumento da produção nacional, a implantação de pequenas processadoras para atendimento ao mercado interno e o lançamento de produtos contendo macadâmia, por grandes indústrias das áreas de panificação, chocolates, sorvetes e drageados (TOLEDO PIZA, MORIYA, 2014).

No Brasil, existem 3 beneficiadoras exportadoras de macadâmia de médio porte que, juntas, processaram 79% da safra brasileira em 2012; QueenNut Macadamia (33%, São Paulo), Coopemac (21%, Espírito Santo) e Tribeca (15%, Rio de Janeiro) e outras 20 pequenas (31%) completam o panorama da indústria brasileira (TOLEDO PIZA; MORIYA, 2014).

2.3 Principais doenças na macadâmia

Perdas econômicas significativas devido a ocorrência de doenças, reduzindo a produtividade dos pomares de macadâmia são uma grande preocupação para os produtores. Os potenciais aumentos recentes de produção de plantações estão ameaçados por patógenos endêmicos e emergentes (BRIGHT, 2018).

Na macadâmia, as doenças causadas por *Phytophthora* e fungos são as que mais ameaçam a produtividade agrícola. A disseminação potencial e o impacto econômico dessas doenças para a macadâmia são classificados como altos (AKINSANMI, 2015).

A diagnose correta das doenças de plantas pode auxiliar produtores e profissionais da área agrícola a evitar possíveis equívocos no manejo e a consequente recomendação inadequada de medidas de controle, principalmente no uso de agrotóxicos (NORONHA; ATHAYDE SOBRINHO, 2008).

A detecção de patógenos também tem importância para impedir a introdução de patógenos exóticos numa determinada área (MICHEREFF; BARROS, 2001).

As principais doenças registradas no mundo são: mancha do fruto (*Pseudocercospora macadamiae* Beilharz, Mayers & Pascoe), podridão do fruto (*Phomopsis* sp., *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp.), seca do râmico (*Botrytis* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Neopestalotiopsis* sp. e *Cladosporium* sp.), cancro do caule (*Phytophthora* sp. e *Lasiodiplodia* sp.) e mancha foliar (*Colletotrichum* sp. e *Pestalotiopsis* sp.) (DRENTH; AKINSANMI; MILES, 2009; AKINSANMI, 2015).

Dado ao recente cultivo comercial de macadâmia no Brasil, com início entre 1976 e 1980 (TOLEDO PIZA; PIZA; ALMEIDA NETO, 2019), poucos são os estudos de danos causados por doenças no país. Há relatos de patógenos associados à macadâmia no Brasil, porém, até o momento, a patogenicidade comprovada foi para os fungos *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl (FISCHER et al., 2017) e *Neopestalotiopsis clavispora* (G. F. Atkinson) Maharachch, K. D. Hyde & Crous (SANTOS et al., 2019).

O fungo *L. theobromae* já foi relatado causando exsudações de goma que culminaram em galhos secos em plantas de macadâmia provenientes de um pomar de 8 anos no Brasil, no qual, pelo menos, 10 plantas estavam sintomáticas (FISCHER et al., 2017).

Em 2015, foram observadas manchas irregulares de cor marrom claro nas folhas de macadâmia em Vitória da Conquista, Bahia. A doença é causada pelo fungo *N. clavispora*, e seus sintomas iniciais são caracterizados por pequenas manchas medindo de 6 a 12 mm, que aumentam e coalescem cobrindo uma extensa área foliar cuja severidade da doença foi estimada em cerca de 25% (SANTOS et al., 2019).

2.3.1 Mancha do fruto

Pseudocercospora pertencente à família Mycosphaerellaceae, é um gênero cosmopolita que abrange diversas espécies fitopatogênicas, comumente associadas a manchas em folhas e frutos, em uma ampla gama de hospedeiros vegetais. Ocorrem tanto em ambientes áridos como úmidos e em uma ampla variedade de climas, incluindo regiões temperadas, subtropicais e tropicais (CROUS et al., 2013).

Esse fungo apresenta micélio intercelular de coloração marrom-claro; conidióforos pálidos a castanho-amarelados, frequentemente, curvos; e conídios isolados, filiformes, marrom-oliva-claro, curvos, estriados ou retos com ponta obtusa (C; MAYERS; PASCOE, 2003).

A mancha do fruto da macadâmia, causada por *Pseudocercospora macadamiae*, é uma doença severa que afeta a cultura na Austrália (BEILHARZ; MAYERS; PASCOE, 2003). A colonização de *P. macadamiae* no pericarpo foi observada como sendo intercelular, sem produção de estruturas como haustórios (MILES et al., 2009). A depender das condições para o seu desenvolvimento, o período latente ou quiescente, varia de 39 a 68 dias, após o qual manchas cloróticas aparecem, expandem-se e se tornam necróticas e de coloração marrom (AKINSANMI; DRENTH, 2010).

Pseudocercospora macadamiae se disseminou a partir de Maleny em Queensland, onde foi relatado pela primeira vez em 1981 (BEILHARZ; MAYERS; PASCOE, 2003), para todas as áreas de produção no sudeste da Austrália. Como o patógeno só infecta os frutos da macadâmia e as árvores só começam a dar frutos a partir dos 4 anos de idade, a disseminação não ocorre na fase de estabelecimento do pomar (AKINSANMI; DRENTH, 2010).

Observações em campo indicam que as perdas de rendimento de até 90% ocorrem em pomares onde a mancha do fruto não é controlada. Quando frutos

imaturos doentes são colhidos e misturados com frutos maduros, os lotes são, geralmente, rebaixados na fase de processamento, resultando em perdas financeiras (AKINSANMI; MILES; DRENTH, 2008).

Outro aspecto do impacto econômico causado pela doença é a abscisão prematura dos frutos, quando ainda imaturos e com baixo teor de óleo, tornando-os inadequados para o processamento e consumo (AKINSANMI; MILES; DRENTH, 2007).

2.3.2 Podridão do fruto causada por *Phomopsis* sp.

O gênero *Phomopsis* (teleomorfo: *Diaporthe*) compreende fungos fitopatogênicos importantes em diversos hospedeiros, com distribuição mundial e impacto relevante em diversas culturas como: citros, videira e girassol (GUARNACCIA; CROUS, 2017; THOMPSON et al., 2011; UDAYANGA et al., 2011; VAN NIEKERK et al., 2005).

Phomopsis é caracterizado por produzir micélio imerso, ramificado, marrom-pálido e conidióforos hialinos, ramificados, ocasionalmente, septados e filiformes. Os conídios são de dois tipos para a maioria das espécies: alfa e beta. Os alfa-conídios são hialinos, elipsóides ou fusiformes, retos, asseptados e bigutulados comuns. Os betaconídios são hialinos, filiformes, asseptados, retos ou curvos e agutulados (CRISTESCU, 2003).

A podridão causada por *Phomopsis* é uma grande ameaça à produção de macadâmia na Austrália e na África do Sul, causando queda prematura de frutos em várias cultivares (AKINSANMI; DRENTH, 2017).

Os sintomas dessa doença são caracterizados pela formação rápida e esporádica de lesões macias, esponjosas e pretas com cerca de 5-10 mm de diâmetro que contrastam com o pericarpo verde de frutos saudáveis (AKINSANMI; DRENTH, 2017).

As nozes de macadâmia nos estágios iniciais de desenvolvimento, como tamanho de ervilha, são mais suscetíveis à infecção natural do que os frutos maduros (FABI, 2015).

2.3.3 Podridão do fruto causada por *Colletotrichum* sp.

O gênero *Colletotrichum* inclui uma série de fitopatógenos de importância econômica, causando doenças em uma grande variedade de plantas lenhosas e herbáceas. Incide principalmente em regiões tropicais e subtropicais, ocasionando doença em diversas culturas de importância econômica como a antracnose do feijão, algodão, curcubitáceas, cebola, pimenta, tomate, morango, etc. (AGRIOS, 2005; CANNON et al., 2012).

O gênero já foi considerado o oitavo grupo mais importante de fungos fitopatogênicos do mundo, com base na percepção de importância científica e econômica (DEAN et al., 2012).

Colletotrichum é a forma anamórfica de *Glomerella*, pertencente à divisão Ascomycota. Sua forma assexuada é caracterizada por produzir acérvulos, os quais dão origem a conídios unicelulares hialinos, produzidos a partir de monofiálides, também hialinas ou levemente pigmentadas (CANNON et al., 2012; PEREIRA; SOARES, 2012).

Durante o processo de infecção, o patógeno entra em estágios consecutivos da fase biotrófica, na qual as células e tecidos internos são infectados, mas não apresentam os sintomas. A infecção, então, inicia a fase necrótica, na qual o patógeno coloniza as células e os tecidos levando à morte das células vegetais e, portanto, às lesões necróticas que podem ser observadas externamente (LIAO et al., 2012).

Em 2018, na Austrália, uma mancha foliar exibindo lesões irregulares de coloração marrom-escura foram observadas em mudas e árvores de macadâmia no campo e, mais tarde, essa mancha foi distinguida como mancha foliar de *Colletotrichum* causada por *C. siamense* cujo relato é o primeiro na Austrália (PRASANNATH; GALEA; AKINSANMI, 2020).

Na Austrália, a podridão do fruto é às vezes referida como "podridão de Antracnose" quando anéis concêntricos de picnídios de *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* ocorrem nas lesões escuras (AKINSANMI; DRENTH, 2017).

Os fungos da podridão do fruto podem se desenvolver rapidamente causando descoloração total da superfície do fruto. A podridão de *C. gloeosporioides* é diferente da causada por *Phomopsis*, pela presença de anéis concêntricos na lesão,

que, por sua vez, é diferente da mancha causada por *Pseudocercospora macadamiae*, cujas lesões, quando pressionadas, são duras enquanto as lesões de *Colletotrichum* e *Phomopsis* são macias (BRIGHT, 2021).

2.3.4 Seca do ráculo

Diversos agentes fitopatogênicos são relatados como sendo capazes de causar doença em ráculos. Os sintomas específicos da mancha de flores são denominados conforme o agente causal: mancha de *Botrytis* (mofo cinzento) quando causados por *Botrytis cinerea* Pers, mancha de *Cladosporium* (mofo verde) por *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G. A. de Vries, mancha de *Pestalotiopsis* (flor seca) por *P. macadamiae* e *Neopestalotiopsis macadamiae* R. G. Shivas & Akinsanmi, e mancha de *Phytophthora* (mofo úmido) quando causado por *Phytophthora capsici* Leonian e *P. palmivora* (E. J. Butler) E. J. Butler (PRASANNATH; GALEA; AKINSANMI, 2021; AKINSANMI et al., 2017; HUNTER; ROHRBACH; KUNIMOTO, 1972).

O mofo cinzento, causado pelo fungo *B. cinerea*, ocorre principalmente em flores maduras. As flores doentes aparecem na cor marrom-escuro e se agrupam na ráquis, e os filamentos miceliais ficam recobertos por esporos acinzentados, daí a aparência de mofo cinzento (BRIGHT, 2018).

Já os sintomas de seca do ráculo causados por *C. cladosporioides* são caracterizados por pequenas lesões encharcadas na flor que mais tarde se tornam necróticas, com os ráculos doentes cobertos por uma massa de coloração cinza-oliva constituída por micélio e conídios (AKINSANMI et al., 2017).

A doença seca das flores, causada por *P. macadamiae* e *N. macadamiae*, é caracterizada por proporcionar aspecto seco ao ráculo. Os sintomas de necrose aparecem em flores infectadas e ocasionalmente na ráquis, desde o início da floração até a antese completa. Botões ou flores imaturas podem se tornar manchadas em poucos dias, passando de marrom a marrom-escuro, e permanecem presos às ráquis ainda de coloração verde (AKINSANMI et al., 2017).

Outro agente causal de doenças em inflorescências é *P. capsici*. Este patógeno causa manchas nas flores em macadâmia e já foi relatado no Havaí, onde a doença foi caracterizada por lesões necróticas escuras extensas e irregulares nas

partes da planta afetadas, incluindo todo o rácemo, folha, brotos jovens e frutos imaturos (KUNIMOTO; ARAGAKI; HUNTER; KO, 1976).

A seca do rácemo é uma doença severa da macadâmia em todo o mundo, podendo resultar em redução da frutificação, com perda de produção de mais de 80% (AKINSANMI, 2015).

A incidência dessa doença varia entre as estações, dependendo da cultivar de macadâmia e das condições climáticas prevalentes no período de floração (AKINSANMI, 2015).

2.3.5 Seca do rácemo causada por *Cladosporium* sp.

Cladosporium é um dos gêneros mais comuns de fungos que ocorrem em vários substratos e inclui espécies que habitam os mais diversos nichos (BENSCH et al., 2012).

Esse gênero é um dos que mais diversos e heterogêneos dentre os fungos, compreendendo mais de 772 nomes, e incluindo espécies endofíticas, patogênicas a humanos, fitopatogênicas e saprófitas (DUGAN; SCHUBERT; BRAUN, 2004; BENSCH et al., 2012).

O gênero *Cladosporium* pertence à divisão Ascomycota e à família Cladosporiaceae; as colônias, em sua maioria, apresentam coloração marrom-olivácea a marrom-escura ou com aparência cinza-olivácea e aveludada; hifas superficiais ramificadas e septadas; e conídios solitários ou catenados, em cadeia não ramificadas ou ramificadas, forma e septo variável, limoniformes a cilíndricos, sub-hialinos a pigmentados e lisos (ELLIS, 1971; SCHUBERT; BRAUN, 2005).

Com seus pequenos conídios, geralmente, formados em cadeias ramificadas, são bem adaptados para se disseminarem facilmente em grandes números por longas distâncias (BENSCH et al., 2012).

Uma epidemia severa de seca do rácemo, causada por *C. cladosporioides*, foi relatada na África do Sul, os primeiros sinais foram pontas necróticas da ráquis, que muitas vezes, curvavam-se para um lado com a necrose se espalhando para cima, resultando na chamada “cauda de rato” (VAN DEN BERG et al., 2008).

Os outros sintomas são caracterizados por pequenas anasarcas na flor que mais tarde se tornam necróticas, com os rácemos doentes cobertos por micélio de cor cinza-olivácea (VAN DEN BERG et al., 2008).

Enquanto uma epidemia de seca do rácemo foi relatada na África do Sul, na Austrália, essa seca causada por *Cladosporium* sp. está se tornando um problema comum (BRIGHT, 2021).

2.3.6 Cancro do caule causado por *Phytophthora* sp.

As espécies pertencentes à divisão Oomycota e ao gênero *Phytophthora* contêm um grande número de patógenos vegetais significativos em ecossistemas naturais e agrícolas, infectando mais de 5.000 espécies de plantas diferentes (HARDHAM; BLACKMAN, 2018).

Globalmente, cinco espécies de *Phytophthora* foram relatadas como causadoras de doenças em pomares comerciais de macadâmia. Dentre essas, *P. cinnamomi* e *P. palmivora* são as mais comumente relatadas como agentes causais da podridão da raiz de *Phytophthora* e do cancro do caule na macadâmia em todo o mundo (JEFF-EGO et al., 2020).

Frequentemente, *Phytophthora* aparece na parte inferior das encostas propícias ao acúmulo de água, bem como nas linhas de drenagem e no topo das encostas onde o solo sofreu erosão (BRIGHT, 2018).

P. cinnamomi infecta caules de macadâmia causando cancro ou lesões necróticas e gomose do tronco (MBAKA et al., 2009). Os ramos podem ser diretamente infectados pelo patógeno ou através da infecção do caule principal ou raízes, com sintomas de exsudação de goma e posterior morte (JEFF-EGO et al., 2018).

Além disso, com o tempo, a casca acumula camadas de cortiça, ficando profundamente sulcada, podendo ser facilmente descascada, revelando um lenho de cor avermelhada (BRIGHT, 2021).

Na Austrália, há relatos de morte de milhares de árvores de macadâmia devido ao *P. cinnamomi*, e a perda econômica causada por este patógeno para a indústria de macadâmia australiana é estimada em mais de 20 milhões de dólares, anualmente (AKINSANMI; DRENTH, 2013).

2.3.7 Cancro do caule causado por *Lasiodiplodia* spp.

O gênero *Lasiodiplodia*, anamorfo de *Botryosphaeria*, é um ascomiceto pertencente à família Botryosphaeriaceae. Esta família inclui espécies que são patógenos de plantas lenhosas que incidem em uma ampla gama de culturas hortícolas, porém variam em virulência e em suas habilidades de infectar seus hospedeiros a partir de diferentes partes da planta, como flores, brotos verdes, galhos lenhosos, etc. (SCHOCH et al., 2020; GARCIA, 2021).

Os membros dessa família são caracterizados por produzirem ascósporos grandes, ovoides a oblongos, tipicamente hialinos, asseptados, que podem se tornar marrons e septados com a idade (PHILLIPS et al., 2005).

Os patógenos podem causar morte descendente, podridões de frutos e cancos em vários hospedeiros lenhosos e, em alguns casos, o estresse hídrico pode induzir sintomas graves em diferentes plantas hospedeiras infectadas por eles, embora, por vezes, aparentemente inócuos (SMITH et al., 1994).

A infecção ocorre por meio de ferimentos em tecidos jovens e lenhosos ou por aberturas naturais em flores, frutos, folhas e brotos. Os patógenos produzem enzimas e/ou toxinas que matam células e tecidos dos vários órgãos da planta que atacam (GARCIA et al., 2021a).

Uma grande preocupação para a indústria da macadâmia é a morte crescente de árvores associada à morte de ramos por *Botryosphaeria*. Várias espécies de fungos pertencentes à família Botryosphaeriaceae foram obtidas de diferentes tecidos de macadâmia (JEFF-EGO; AKINSANMI, 2018; LIDDLE; AKINSANMI; GALEA, 2019).

Seis espécies de Botryosphaeriaceae já foram confirmadas, causando lesões necróticas e morte da planta de macadâmia, tais como: *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, que foi a espécie mais prevalente; seguida por *Neofusicocum parvum*; *L. iraniensis*; *N. luteum*; *L. theobromae* e *N. australe* (JEFF-EGO; AKINSANMI, 2018).

Em agosto de 2013, *L. theobromae* foi isolado de amostras de galhos e cascas de tronco de um pomar comercial de macadâmia no Brasil que apresentaram sintomas de cancro no caule, enquanto outras plantas apresentaram exsudação de goma, culminando em ramos terminais secos (FISCHER et al., 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de obtenção dos isolados

Os isolados foram obtidos mensalmente, a partir de mudas e partes de plantas adultas de macadâmia (rácemos, segmentos do caule, ramos, folhas e frutos) com sintomas e/ou sinais de fitopatógenos, identificados pelos técnicos, nas áreas de produção da empresa QueenNut Macadamia. Os órgãos e mudas de 145 amostras, devidamente armazenados e identificados foram encaminhados para o Laboratório de Microbiologia Ambiental - LMA da Embrapa Meio Ambiente, localizado no município de Jaguariúna, São Paulo.

Cada amostra foi catalogada em um banco de dados, no qual foram anotados o gênero fúngico associado, por meio de identificação morfológica, o código da amostra, a origem geográfica, o órgão da planta que foi observada a sua associação e a data de coleta.

A partir do banco de dados estruturado e de dados de temperatura média e umidade média de Dois Córregos-SP coletados da estação automática mais próxima e em funcionamento, Barra Bonita (A741), do Instituto Nacional de Meteorologia – INMET (<https://tempo.inmet.gov.br/>), as épocas de ocorrência de cada fungo foram determinadas.

3.2 Isolamento dos fitopatógenos associados

Para isolamentos indiretos, as amostras foram lavadas e secas cuidadosamente e, em seguida, a área de transição entre a área sadia e a área lesionada e/ou com sinal de fitopatógeno das amostras foi fragmentada em pequenos segmentos para posterior desinfestação em álcool 70% por 30 segundos; hipoclorito de sódio (NaClO_2) 10% por 1 min, seguido de duas lavagens consecutivas em água destilada esterilizada (ADE). Para isolamentos diretos, as estruturas do patógenos foram transferidas, com o auxílio de uma alça de repicagem, diretamente para o meio de cultura.

O método para obtenção do isolado, a preparação do inóculo e o tipo de meio de cultura adotado variou de acordo com o tipo de microrganismo associado aos sintomas no órgão vegetal. Para isolamento e preparação dos inóculos de

organismos fúngicos, utilizou-se as metodologias descritas por Alfenas et al. (2016) conforme o órgão afetado. Os fitopatógenos foram cultivados em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar – BDA (39g/L de BDA, AD e 2,5 ml/L de ácido láctico 85%) ou meio suco V8-ágar (200 ml/L de suco V8, 3g/L de CaCO₃, 20g/L de ágar e AD).

Para isolamento de *Phytophthora*, utilizou-se o método de isca segundo Erwin; Ribeiro (1996). Em um recipiente de plástico, foi adicionado, cobrindo-o com gaze, depois acoplado a outro recipiente com um furo embaixo, completando com água destilada e, na superfície, alguns fragmentos de folhas sadias de macadâmia higienizadas (álcool 70%, NaClO₂ 5% e ADE) foram depositadas. Após 48 h, esses fragmentos foram transferidos para placas contendo meio de cultura Ágar Água - AA (39 g/L de ágar e AD) e meio *Corn Meal Agar* (40 g/L de fubá de milho; 1 L de ADE e 15 g/L de ágar) contendo antibióticos e fungicidas (0,025 g/L de ampicilina; 0,01 g/L de benomyl; 0,02 g/L de cloranfenicol e 0,1 g/L de PCNB).

Uma identificação inicial para determinar os possíveis gêneros dos fitopatógenos associados foi realizada, com o auxílio de literatura específica, através de observações, em lâminas temporárias, das estruturas dos microrganismos, utilizando microscópio óptico e estereoscópico. Esses fitopatógenos foram armazenados e mantidos na coleção de trabalho do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente (LMA), ressaltando que, somente os isolados mais representativos foram submetidos aos outros ensaios realizados.

3.3 Obtenção de culturas monospóricas

Para a obtenção de culturas monospóricas, os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio BDA acidificado ou meio suco V8-ágar e mantidos em incubadora do tipo BOD (± 25 °C) sob regime alternado de luz/escuro (12/12 h) durante 7 dias para induzir a produção de conídios.

Para cada isolado, preparou-se uma suspensão de esporos com a adição de 20 ml de água destilada na placa e, com uma alça de Drigalski, foram realizados movimentos delicados sobre a colônia para a liberação dos conídios dos conidióforos na suspensão. Em seguida, foram feitas diluições seriadas até 10⁵ conídios ml⁻¹ da concentração inicial, com o intuito de garantir a uniformidade genética para fins de identificação.

Uma alíquota de 100 µl, 200 µl e 500 µl de suspensão de inóculo de cada isolado foram depositadas em placas de Petri contendo meio AA e espalhada na superfície com uma alça de Drigalski, seguida de incubação em BOD (± 25 °C) sob regime alternado de luz (12/12 h). Esporos recém-germinados foram transferidos para o meio BDA em placas de Petri. As culturas foram mantidas, por repicagens periódicas, em tubos com BDA inclinado, em Castellani e, por criopreservação a -80 °C (GONÇALVES; ALFENAS; MAFIA, 2016) para serem utilizadas quando necessário.

3.4 Caracterização cultural e morfológica

A caracterização foi realizada somente para os isolados mais representativos, segundo as doenças que mais ocorreram no campo. As avaliações de coloração e textura das colônias ocorreu no intervalo de 10 a 20 dias de crescimento das culturas, observando ambos os lados da placa, frente e verso.

Para observações e obtenção de imagens de estruturas fúngicas, foi realizada a metodologia de microcultura segundo Mafia; Alfenas (2016). Discos de BDA foram colocados sobre a lâmina esterilizada e, em seguida, fragmentos de micélio foram transferidos para o centro de cada face lateral do disco, os quais foram cobertos pela lamínula esterilizada. Essa lâmina foi suportada por dois palitos de madeira dentro de uma câmara úmida formada por placa de Petri, contendo papel filtro umedecido.

Depois de 7 dias, a lamínula foi retirada, cuidadosamente, com vestígios de crescimento e a observação das estruturas decorreu com o uso de ADE e com glicerina 50%.

Foram avaliados formas e tamanhos de 10 conídios imaturos e maduros, conidióforos, formação de apressórios e presença de clamidósporos dos isolados representativos. Foram tomadas medições das estruturas e de imagens utilizando microscópio Leica DM 5000 e *software* LAS v.4.1.

3.5 Testes de patogenicidade

3.5.1 Em ráceros destacados em laboratório

Os isolados foram repicados em meio de cultura BDA acidificado, incubados a 25 °C em incubadora do tipo BOD sob regime alternado de luz/escuro de 12h/12h. As suspensões de conídios foram preparadas com a adição de 20 ml de ADE às placas de Petri. Os conídios foram extraídos da superfície da cultura por raspagem com auxílio de uma alça de Drigalski. As suspensões de conídios foram filtradas em camada dupla de gaze, em seguida calibradas para a concentração de 10^5 conídios ml^{-1} em câmara de Neubauer.

O teste de patogenicidade nas inflorescências de macadâmia da variedade IAC 4-12 B foi realizado em ráceros nos estádios de pré-antese e flor fecundada, conforme a classificação de Sobierajski et al. (2007). Os ráceros não passaram por assepsia a fim de evitar o desprendimento das flores da raquis. A partir disso, foram utilizados 5 isolados para cada estágio de desenvolvimento e 5 repetições mais a testemunha. Os isolados utilizados foram MAC42 (*Pestalotiopsis* sp.), MAC45 (*Fusarium* sp.), MAC60 (*Cladosporium* sp.), MAC63 (*Cladosporium* sp.) e MAC69 (*Cladosporium* sp.). Os ráceros foram organizados em caixas gerbox, contendo papel toalha umedecido com ADE, formando uma câmara úmida (figura1-A). A avaliação focou no aparecimento de sinais e sintomas e durou três dias.

Com o fim de verificar se a condição de alta umidade influenciaria na incidência da doença, ráceros de macadâmia (5 isolados para cada estágio de desenvolvimento e 5 repetições mais a testemunha) foram dispostos com a base da ráquis imersa em ADE, dentro de frascos tubulares transparentes de 100 ml (figura1-C). A inoculação foi realizada por meio de pulverizadores manuais. Os isolados utilizados foram os mesmos do ensaio em caixas gerbox ajustados na concentração de 10^5 conídios ml^{-1} . A avaliação desse ensaio também frisou no aparecimento de sinais e sintomas e durou quatro dias.

Das amostras que não apresentaram sintomas ou sinais, no ensaio realizado em frascos tubulares, foram retiradas 5 flores de cada rácermo por tratamento [por exemplo: 5 flores de cada repetição (5 repetições) do MAC63 pré-antese] e postos em câmara úmida formada por caixas gerbox (2 repetições) e substrato de papel de filtro (*Blotter test*) umedecido com ADE sob luz e temperatura ambiente, para induzir

o possível crescimento dos fungos inoculados (figura1-B). Esse ensaio teve como avaliação aparecimento de sinais e sintomas e durou cinco dias.

Figura 1- Teste de patogenicidade em rácemos destacados



(A) teste em caixas gerbox, (B) *Blotter test*, (C) teste em frascos tubulares.

3.5.2 Em rácemos em campo

Os ensaios de campo foram realizados na área de produ o da empresa QueenNut Macadamia, na cidade de Dois Córregos-SP, em dois anos consecutivos, 2020 e 2021. Em 2020, o ensaio ocorreu na área georreferenciada com as coordenadas 22 19'9,6"S e 48 22'9,0"W, e a variedade representativa na qual os isolados foram inoculados, foi a A38. Os testes de patogenicidade compreenderam 4 isolados, MAC63 (*Cladosporium* sp.); MAC60 (*Cladosporium* sp.); MAC45 (*Fusarium* sp.) e MAC42 (*Pestalotiopsis* sp.) mais a testemunha (ADE), com 5 repeti es cada. As concentra es dos isolados foram ajustadas para 10^5 conídios ml^{-1} na câmara de Neubauer. Os isolados foram aplicados com pulverizadores em cada 2 a 3 est dios de desenvolvimento de rácemos distintos (figura 2) - pr -antese, flor aberta e flor fecundada (SOBIERAJSKI et al., 2007) - independente da  rvore.

Os rácemos foram mantidos em câmara úmida, por 24 h, formada por um saco plástico umedecido com ADE e fechados com o auxílio de um fio de barbante.

Após esse período, os sacos plásticos foram retirados e substituídos por sacos de porosos. No 9º dia após a inoculação (DAI), os ramos foram destacados e transportados para o LMA a fim de serem avaliados quanto à incidência da doença.

No ano de 2021, em localidade com as coordenadas 22°19'10"S e 48°20'31"W, ramos da variedade IAC 4-12 B foram inoculados com os isolados MAC99 (*Pestalotiopsis* sp.); MAC63 (*Cladosporium* sp.) e MAC103 (*Phomopsis* sp.). Nessa etapa, foram utilizados os 3 isolados mais a testemunha (ADE), com 3 repetições cada. As concentrações dos isolados foram ajustadas, com auxílio de uma câmara de Neubauer, para 10^5 conídios ml^{-1} . Os isolados foram aplicados com pulverizadores manuais nos 3 estádios em diferentes fases de desenvolvimento dos ramos já citados, independentemente da árvore.

Os ramos foram mantidos em câmara úmida, formada por um saco plástico umedecido com ADE e fechados com o auxílio de um fio de barbante por 0, 24, 48 e 72 h a fim de avaliar a influência da umidade na patogenicidade dos isolados. No 10º DAI, os ramos foram destacados, organizados e transportados para o LMA para avaliação da incidência da doença.

Figura 2- Estádios de desenvolvimento das flores em macadâmia



Variedade de macadâmia IAC 4-12 B: (A) flor fecundada, (B) flor aberta, (C) flor em pré-antese.

3.5.3 Em folhas

Para os testes de patogenicidade em folhas, estas foram destacadas das mudas de macadâmia mantidas em casa de vegetação da Embrapa Meio Ambiente e submetidas a assepsia em NaClO_2 5% por 5 minutos e duas lavagens em água destilada.

A inoculação do isolado fúngico de *Rhizoctonia* sp. (MAC80) associado à queima-de-fio foi realizada por meio de discos da cultura postos entre a inserção do pecíolo e o limbo foliar, utilizando-se 4 repetições mais a testemunha (apenas discos de BDA). Essas amostras permaneceram em caixas gerbox, em câmara úmida, por 14 dias, quando se avaliou o aparecimento de sinal e/ou sintoma.

O isolado MAC103 (*Phomopsis* sp.) foi submetido ao teste de patogenicidade em folhas destacadas. Foram utilizados o isolado mais a testemunha (ADE). A suspensão de esporos foi ajustada para 10^5 conídios ml^{-1} , na câmara de Neubauer, e a inoculação ocorreu por meio da pulverização da suspensão, nas folhas, até o ponto de gotejamento. Essas amostras permaneceram em caixas gerbox, em câmara úmida, por 12 dias, avaliando-se o aparecimento de sintomas e/ou sinais.

Os isolados de *Cladosporium* sp. - MAC60, MAC63 e MAC69 - foram inoculados em folhas, nas mudas de macadâmia, porque se observou presença de *Cladosporium* sp. em folhas de mudas de macadâmia quando submetidas à câmara úmida. A suspensão de esporos foi preparada, ajustada na câmara de Neubauer para 10^5 conídio ml^{-1} , e pulverizada nas folhas até o ponto de gotejamento. Para esse teste, utilizou-se cinco folhas para cada isolado que permaneceram por 24 h em câmara úmida, constituída por saco plástico umedecido, e em observação por 10 dias, avaliando-se o aparecimento de sintomas e/ou sinais.

3.5.4 Em caule

A inoculação dos isolados MAC1, MAC84 e MAC87, associados à *Lasiodiplodia* sp., consistiu na disposição de três discos da cultura crescida em meio suco V8-ágar, em fermentos previamente realizados, com o auxílio de lâminas de corte esterilizadas, em caules de mudas de macadâmia, de 10 meses de idade, ambientados no setor de casa de vegetação da Embrapa Meio Ambiente. A área

inoculada foi recoberta por um filme de PVC contendo um chumaço de algodão umedecido a 2-3 cm abaixo do ponto de inoculação, com a finalidade de manter a umidade (figura 3). Na testemunha se utilizou apenas discos de meio suco V8-ágar. A avaliação seguiu com o aparecimento de sinal do patógeno e/ou ocorrência de lesões.

Figura 3-Teste de patogenicidade em mudas na casa de vegetação



Mudas com bandagem plástica, formando câmara úmida, para teste de isolados associados à *Lasiodiplodia* sp.

3.5.5 Em fruto

O isolado MAC29 (*Fusarium* sp.), obtido de fruto com lesão necrótica, foi inoculado em frutos sadios de macadâmia, na fase de endurecimento do carpelo (*shell hardening*) ou seguindo a escala fenológica elaborada por Sobierajski et al. (2007), no estágio de crescimento do fruto ao estágio final de crescimento do fruto. Os frutos foram submetidos a assepsia em NaClO₂ 5% por 5 minutos e lavados duas vezes em água destilada. Foram utilizadas três repetições para este isolado mais a testemunha.

A inoculação foi realizada em frutos com e sem ferimentos. Nos frutos com ferimentos, 4 lesões superficiais equidistantes foram feitas, com uma agulha histológica, no carpelo e sobre cada ferimento 20 µl da suspensão, ajustada para 10^5 conídios ml^{-1} na câmara de Neubauer, foi depositada. Na testemunha, utilizou-se somente ADE. Nos frutos sem ferimentos, as suspensões e tratamento controle utilizados foram os mesmos, porém, depositou-se uma alíquota de 20 µl da suspensão em um único local sobre o carpelo. Os frutos foram mantidos em câmara úmida, em caixas gerbox, e foram avaliados segundo o aparecimento de sinais do patógeno e/ou sintomas.

O isolado MAC121 (*Colletotrichum* sp.) foi inoculado em frutos sadios de macadâmia - na fase de endurecimento do carpelo (*shell hardening*) ou seguindo a escala fenológica elaborada por Sobierajski et al. (2007), no estágio de crescimento do fruto ao estágio final de crescimento do fruto - através da deposição de disco da cultura. Os frutos passaram pelo mesmo processo de assepsia dos frutos inoculados com MAC29. Foram utilizadas 4 repetições, utilizando frutos com e sem ferimentos. Na testemunha, apenas discos de BDA foram postos. As amostras foram dispostas em caixas gerbox e permaneceram em câmara úmida, constituída por papel toalha umedecido com ADE. A avaliação do ensaio seguiu com o aparecimento de sinais do isolado inoculado e/ou a ocorrência de lesões.

3.6 Identificação molecular

3.6.1 Obtenção de massa micelial

A produção da massa micelial foi realizada com a transferência de 1 disco da cultura para Erlenmeyers contendo 100 ml de meio de cultura líquido estéril (3,0 g/L de extrato de malte; 0,5 g/L de KH_2PO_4 ; 2 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Os recipientes foram mantidos em incubadora do tipo BOD a 25 °C por 7 dias. Após 7 dias, realizou-se a filtração da massa micelial, utilizando um funil de Büchner, contendo papel filtro esterilizado, acoplado a um Kitassato por meio de um alongador, e este a uma bomba de vácuo. A amostra (micélio em meio líquido) foi lavada três vezes com ADE, e após seco, o micélio foi depositado em envelope de papel alumínio e armazenado a - 40 °C.

3.6.2 Extração de DNA

As massas miceliais foram transferidas para um tubo de 1,5 ml, pesadas (180 a 250 mg) e maceradas com o auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, 500 µl de CTAB (2%) foi adicionado e a extração seguiu a metodologia descrita por Brandão et al. (2019).

A quantificação e a qualidade do DNA genômico dos isolados foram estimadas no espectrofotômetro NanoDrop 2000, e verificadas em gel de agarose 1,2% (1,2 g de agarose e 100 ml de TAE 1X) pela intensidade da banda.

3.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

As reações foram realizadas em alíquota de 25 µl, composta por uma mistura de água ultrapura do tipo I, produzida pelo sistema de purificação Milli-Q, tampão (5X, Ludwig-Biotec), MgCl₂ (25 mM, Invitrogen), dNTPs (10 mM), *primers forward e reverse* (10 mM, Genone, quadro 1), Taq polimerase (5U, Invitrogen) e DNA molde (quadro 1). As amplificações de PCR foram realizadas no termociclador *Applied Biosystems VeritiPro* (Thermo Fisher Scientific).

Quadro 1- Regiões e primers utilizados na identificação dos isolados

Isolado*	Região	Primer
MAC1 ¹	Espaçador Interno Transcrito (ITS)	ITS5 e ITS4
MAC84 ¹	Espaçador Interno Transcrito (ITS) Fator de Alongamento de Tradução 1-alfa (EF1α)	ITS5 e ITS4 EF1-688F e EF1-1251R
MAC87 ¹	Espaçador Interno Transcrito (ITS) Fator de Alongamento de Tradução 1-alfa (EF1α)	ITS5 e ITS4 EF1-688F e EF1-1251R
MAC63 ²	Espaçador Interno Transcrito (ITS) Fator de Alongamento de Tradução 1-alfa (EF1α) Actina (ACT)	ITS5 e ITS4 EF1-728F e EF1-986R ACT-512F e ACT-783R
MAC121 ³	Espaçador Interno Transcrito (ITS) Histona (H3) Actina (ACT) β-tubulina (β-TUB)	ITS5 e ITS4 CYLH3F e CYLH3R ACT-512F e ACT-783R BT2A e BT2B

*Código de trabalho dos isolados. 1- MAC1, MAC84 e MAC87 (*Lasioidiplodia* sp.), 2- MAC63 (*Cladosporium* sp.), 3- MAC121 (*Colletotrichum* sp.). Isolados representativos em negrito.

Os primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') foram organizados em programação descrita por White et al. (1990) com alterações, utilizando desnaturação de 94 °C por 4 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, seguido do anelamento de 54 °C por 45 segundos, extensão por 72 °C por 40 segundos e final de extensão de 72 °C por 5 minutos.

Os primers EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') e EF1-986R (5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3') e o par ACT-512F (5'-ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC-3') e ACT-783R (5'-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-3') seguiram o protocolo de Carbone; Kohn (1999) com modificações nas quais a desnaturação foi de 95 °C por 8 minutos, 35 ciclos de 95 °C por 15 segundos, anelamento de 56 °C por 20 segundos, extensão de 72 °C por 60 segundos e extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Os primers EF1-688F (5'-CGGTCACTTGATCTACAAGTGC-3') e EF1-1251R (5'-CCTCGAACTCACCAGTACCG-3') seguiram o mesmo protocolo descrito por Carbone; Kohn (1999), mas com temperatura de anelamento de 52 °C para o isolado MAC84 (*Lasiodiplodia* sp.) e 56 °C para o isolado MAC87 (*Lasiodiplodia* sp.).

A programação do par de primers BT2A (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') e BT2B (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'), primers ACT-512F e ACT-783R e ITS4 e ITS5 para o MAC121 (*Colletotrichum* sp.) foi disposta segundo Prasannath; Galea; Akinsanmi (2020), com desnaturação inicial de 95 °C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação de 95 °C for 30 segundos, anelamento de 58 °C por 30 segundos e extensão de 72 °C for 1 min, com final de extensão de 72 °C por 5 minutos.

Os primers CYLH3F (5'-GCAACATCTCGTCCGCTCT-3') e CYLH3R (5'-TGAAGTGGGGAGAAGGGAA-3') seguiram a programação realizada conforme Mahmodi et al. (2014) com modificações, utilizando desnaturação inicial de 94 °C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação de 94 °C por 40 segundos, anelamento de 60 °C por 30 segundos, extensão de 72 °C por 1 minuto e final de extensão de 72 °C por 7 minutos.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com GelRed (Biotium), com posterior visualização em fotodocumentador (L-Pix EX, Locus) e quantificado no fluorômetro (Qubit, Thermo Fisher Scientific).

Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o kit de purificação de DNA (Wizard Genomic Kit, Promega). Os fragmentos gênicos foram sequenciados nas direções senso e antisenso, pela empresa ACTgene.

3.6.4 Análise filogenética

Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente por meio do programa Bioedit 7.7.1 (HALL, T., <https://thalljscience.github.io/>) e a região de consenso do DNA foi montada manualmente no mesmo programa. As sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI usando o procedimento *Basic Local Alignment Search Tool* - BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A fim de prover consistência e qualidade das sequências, essas foram verificadas e alinhadas usando o *software* MEGA X (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) e a exclusão de ambiguidades no alinhamento múltiplo foi realizada por meio do Gblock server 0.91b/2002 (CASTRESANA, J., http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html).

Para cada conjunto de sequências de nucleotídeos, a identidade de cada isolado foi determinada por comparação com isolados disponíveis no banco de dados do GenBank do NCBI usando o procedimento BLAST.

A construção da árvore foi realizada pelo método Máxima Verossimilhança com o *software* MEGA X e editada no *software* Inkscape 1.1.1.

3.7 Ensaio de sensibilidade a fungicidas

Para esse ensaio, utilizou-se os isolados MAC63 (*Cladosporium* sp.), MAC84 (*Lasiodiplodia* sp.) e MAC121 (*Colletotrichum* sp.) cultivados em meio BDA e mantidos em incubadora BOD a 25 °C, em fotoperíodo de 12 h, por 9 dias para o MAC63 e por 7 dias para os demais isolados.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos mais a testemunha e 3 repetições para o MAC63 e 5 repetições para os demais isolados. Na testemunha, utilizou-se ADE no ensaio com o MAC63 e BDA inócuo no ensaio com os isolados MAC84 e MAC121 e, para os fungicidas, a concentração foi mantida segundo a dose recomendada pelo fabricante de cada produto. Os

ingredientes ativos e suas respectivas concentrações utilizados foram: T1- procimidona (500 g/L); T2- hidróxido de cobre (538 g/Kg); T3- epoxiconazol + piraclostrobina (160 g/L + 260 g/L); T4- clorotalonil (720 g/L); T5- azoxistrobina + ciproconazol (200 g/L + 80 g/L) e T6- fluxapiroxade + piraclostrobina (167 g/L + 333 g/L).

A avaliação da germinação utilizando o isolado MAC63 aconteceu em virtude do crescimento do *Cladosporium* sp. formar várias colônias no meio de cultura, inviabilizando uma medição precisa se o ensaio avaliasse o crescimento micelial. A suspensão do MAC63 foi preparada adicionando-se ADE sobre a cultura e a liberação dos conídios ocorreu com o auxílio de uma alça de Drigalski.

O ensaio foi disposto em microplaca de poliestireno do tipo ELISA, na qual se misturou 100 µl da suspensão concentrada de esporos e 100 µl da solução do tratamento adaptada segundo a dose recomendada pelo fabricante. A microplaca foi envolvida por um plástico filme para evitar evaporação e contaminação e permaneceu por 24 h em BOD a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h. Após esse período, a determinação da percentagem de conídios germinados foi determinada por meio de contagem em uma câmara de Neubauer com o auxílio de um microscópio de luz.

Para os demais isolados analisados, o ensaio foi disposto em placas de Petri. Discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram depositados no centro de placas contendo meio BDA + fungicida. Para cada tratamento, retirou-se da suspensão estoque de cada fungicida a quantidade proporcional à quantidade de BDA utilizada, mantendo a concentração recomendada na bula.

A placas foram mantidas em luz e temperatura ambiente, que variou de 22 a 31 °C. O crescimento micelial foi medido, ortogonalmente, diariamente, com auxílio de um paquímetro, até que os isolados da testemunha cobrissem a placa.

A comparação das médias foi realizada por meio do teste Tukey a 5% de significância, utilizando o *software* Minitab 17.1.0.

3.8 Determinação da temperatura ideal de crescimento

O isolado MAC63 (*Cladosporium* sp.) foi cultivado em BDA acidificado e mantido em incubadora a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h, avaliando-se o desenvolvimento até os 9 dias após o semeio. O MAC84 (*Lasiodiplodia* sp.) e o

MAC121 (*Colletotrichum* sp.) foram cultivados sob as mesmas condições, mas cresceram por 7 dias.

Após esse período, discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram depositados no centro de placas contendo meio BDA e incubados nas temperaturas 20, 25, 28 e 30 °C, com fotoperíodo de 12 h para o MAC63. No segundo ensaio, para os isolados MAC84 e MAC121, testou-se em um dos tratamentos o crescimento micelial em temperatura ambiente que foi 23,5 °C (média da temperatura ambiente medida em dezembro de 2021 no LMA) e se avaliou, também, as temperaturas 23, 25 e 30 °C.

O crescimento da colônia foi medido, ortogonalmente, a cada dois dias durante 15 dias, com auxílio de um paquímetro, até que os isolados em um dos tratamentos cobrissem toda a superfície do meio de cultura na placa. O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado com 3 repetições para o MAC63 e 5 repetições para os isolados MAC84 e MAC121, sendo cada repetição uma placa de Petri.

Os dados foram ajustados a diferentes modelos de regressão por meio do *software* Minitab 17.1.0.

4 RESULTADOS

4.1 Isolados obtidos e suas épocas de ocorrência

Os isolados de microrganismos obtidos a partir de material vegetal de pomares de macadâmia da área de produção da empresa QueenNut Macadâmia, predominantemente em Dois Córregos-SP, com sintomas de doença e, ocasionalmente com sinais de algum microrganismo, pertencem ao Reino Fungi e foram adquiridos no período de dezembro de 2019 a setembro de 2021 (quadro 2). Oomicetos não foram observados associados ou recuperados em nenhuma das amostras.

Quadro 2- Isolados fúngicos associados às amostras de macadâmia

Gênero associado	Isolado*	Origem geográfica	Órgão coletado	Data
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC1	22°19'08"S 48°22'01"W	Seção do tronco	Dez/2019
<i>Phoma</i>	MAC2	22°19'08"S 48°22'01"W	Folha	Dez/2019
<i>Phomopsis</i>	MAC8	22°19'08"S 48°22'01"W	Folha	Mar/2020
<i>Cladosporium</i>	MAC22	22°19'11"S 48°22'04"W	Rácemo	Abr/2020
<i>Fusarium</i>	MAC29	22°19'03"S 48°20'34"W	Fruto	Abr/2020
<i>Phoma</i>	MAC30	22°19'8,3"S 48°20'02"W	Folha	Mai/2020
<i>Cladosporium</i>	MAC39	22°17'1"S 48°01'47"W	Rácemo	Jun/2020
<i>Fusarium e Cladosporium</i>	MAC40	22°17'1"S 48°01'47"W	Rácemo	Jun/2020
<i>Fusarium</i>	MAC41	22°17'1"S 48°01'47"W	Rácemo	Jun/2020
<i>Cladosporium e Pestalotiopsis</i>	MAC42	22°17'1"S 48°01'47"W	Rácemo	Jun/2020
<i>Fusarium e Cladosporium</i>	MAC43	22°17'1"S 48°01'47"W	Rácemo	Jun/2020
<i>Phoma</i>	MAC44	22°17'1"S 48°01'47"W	Folha	Jun/2020
<i>Cladosporium e Fusarium</i>	MAC45	22°17'1"S 48°01'47"W	Rácemo	Jun/2020
<i>Cladosporium</i>	MAC47	22°17'1"S 48°01'47"W	Rácemo	Jun/2020
<i>Cladosporium</i>	MAC49	22°17'1"S 48°01'47"W	Rácemo	Jun/2020
<i>Cladosporium</i>	MAC50	22°17'1"S 48°01'47"W	Rácemo	Jun/2020
<i>Cladosporium</i>	MAC51	22°17'1"S 48°01'47"W	Rácemo	Jun/2020
<i>Cladosporium</i>	MAC60	22°19'12"S 48°22'02"W	Rácemo	Jul/2020
<i>Cladosporium</i>	MAC61	22°19'12"S 48°22'02"W	Rácemo	Jul/2020
<i>Cladosporium</i>	MAC62	22°19'12"S 48°22'02"W	Rácemo	Jul/2020
<i>Cladosporium</i>	MAC63	22°19'12"S 48°22'02"W	Rácemo	Jul/2020
<i>Cladosporium</i>	MAC68	22°19'12"S 48°22'02"W	Rácemo	Jul/2020
<i>Cladosporium</i>	MAC69	22°19'12"S 48°22'02"W	Rácemo	Jul/2020
<i>Cladosporium</i>	MAC72	22°19'08"S 48°22'04"W	Rácemo	Mar/2020
<i>Cladosporium</i>	MAC73	22°19'08"S 48°22'04"W	Rácemo	Mar/2020

<i>Cladosporium</i>	MAC74	22°19'08"S 48°22'04"W	Rácemo	Mar/2020
<i>Cladosporium</i>	MAC75	22°19'08"S 48°22'04"W	Rácemo	Ago/2020
<i>Cladosporium</i>	MAC76	22°19'08"S 48°22'04"W	Rácemo	Ago/2020
<i>Cladosporium</i>	MAC77	22°19'08"S 48°22'04"W	Rácemo	Ago/2020
<i>Rhizoctonia</i>	MAC80	17°21'00"S 39°35'06"W	Ramo	Set/2020
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC84	22°19'14"S 48°22'20"W	Seção de tronco	Nov/2020
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC87	22°19'05"S 48°22'00"W	Seção de tronco	Nov/2020
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC92	22°18'45"S 48°22'47"W	Fruto	Fev/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC93	22°19'08"S 48°22'01"W	Seção do tronco	Fev/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC94	22°18'41"S 48°22'16"W	Seção do tronco	Fev/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC95	22°18'56"S 48°22'00"W	Seção do tronco	Fev/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC96	22°18'45"S 48°22'47"W	Seção do tronco	Fev/2021
<i>Pestalotiopsis</i>	MAC97	22°18'41"S 48°22'16"W	Ramo	Fev/2021
<i>Pestalotiopsis</i>	MAC98	22°18'08"S 48°22'01"W	Fruto	Fev/2021
<i>Pestalotiopsis</i>	MAC99	22°18'03"S 48°22'11"W	Folha	Fev/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC101	22°18'50"S 48°22'02"W	Seção de tronco	Fev/2021
<i>Phomopsis</i>	MAC103	22°18'50"S 48°22'02"W	Folha	Fev/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC108	22°18'50"S 48°22'02"W	Seção de tronco	Fev/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC110	22°22'02"S 48°27'22"W	Seção de tronco	Abr/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC111	22°22'02"S 48°27'22"W	Seção de tronco	Abr/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC112	22°22'02"S 48°27'22"W	Seção de tronco	Abr/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC113	22°22'02"S 48°27'22"W	Seção de tronco	Abr/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC114	22°22'02"S 48°27'22"W	Seção de tronco	Abr/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC115	22°22'02"S 48°27'22"W	Seção de tronco	Abr/2021
<i>Pestalotiopsis</i>	MAC116	22°22'02"S 48°27'22"W	Seção de tronco	Abr/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC117	22°22'02"S 48°27'22"W	Seção de tronco	Abr/2021
<i>Pestalotiopsis</i>	MAC118	22°22'02"S 48°27'22"W	Seção de tronco	Abr/2021
<i>Pestalotiopsis</i>	MAC119	22°22'02"S 48°27'22"W	Seção de tronco	Abr/2021
<i>Pestalotiopsis</i>	MAC120	22°22'02"S 48°27'22"W	Seção de tronco	Abr/2021
<i>Colletotrichum</i>	MAC121	22°18'52"S 48°22'12"W	Fruto	Abr/2021
<i>Colletotrichum</i>	MAC122	22°18'52"S 48°22'12"W	Fruto	Abr/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC124.2	22°19'17"S 48°22'26"W	Seção de tronco	Abr/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC125.2	22°19'21"S 48°22'25"W	Seção de tronco	Abr/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC126.1	22°19'21"S 48°22'25"W	Folha	Abr/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC126.2	22°19'21"S 48°22'25"W	Seção de tronco	Abr/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC129.1	22°19'02"S 48°22'26"W	Folha	Abr/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC131.2	22°19'01"S 48°22'24"W	Seção de tronco	Abr/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC134.2	22°19'53"S 48°21'58"W	Seção de tronco	Abr/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC135.1	22°18'52"S 48°22'12"W	Folha	Abr/2021
<i>Lasiodiplodia</i>	MAC137.2	22°18'44"S 48°22'28"W	Seção de tronco	Abr/2021
<i>Colletotrichum</i>	MAC143	17°10'15"S 39°34'34"W	Folha	Set/2021
<i>Pestalotiopsis</i>	MAC144	17°10'15"S 39°34'34"W	Folha	Set/2021

*Código de trabalho dos isolados. Isolados representativos em negrito.

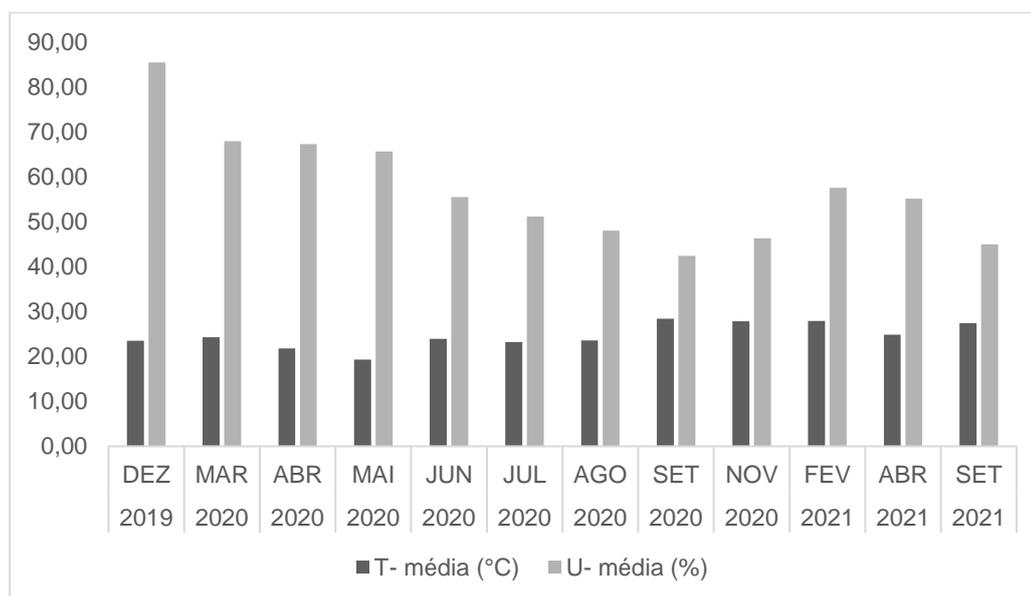
Os isolamentos realizados de amostras de secção de tronco, apresentando sintoma aparentemente causado por *Phytophthora*, indicaram que tais sintomas não foram associados a esse microrganismo.

Em dezembro de 2019, os fungos *Lasiodiplodia* e *Phoma* foram isolados de amostras recebidas com sintoma de mancha tronco e mancha na folha, respectivamente (quadro 2).

No ano de 2020, nas amostras analisadas, observou-se associação dos fungos *Cladosporium* (rácemo), *Fusarium* (rácemo e fruto), *Pestalotiopsis* (rácemo), *Phoma* (folha) e *Phomopsis* (folha) aos sintomas de doenças e sinais nos materiais vegetais nos órgãos coletados. Em 2021, as amostras analisadas foram, em sua maioria, associadas à *Lasiodiplodia* tanto em folhas como em seções de troncos e, em algumas amostras os sintomas em folhas e frutos foram associados aos fungos *Colletotrichum* (fruto e folha), *Phomopsis* (folha) e *Pestalotiopsis* (folha, fruto, ramo e seção de tronco).

No período da coleta, segundo dados do Instituto Nacional de Meteorologia-INMET, a temperatura média foi de 19 a 28 °C e a umidade de 42 a 85%, de acordo com os meses de registro (figura 4).

Figura 4- Dados mensais meteorológicos de 2019, 2020 e 2021



Dados compilados a partir do gráfico anual da estação automática Barra Bonita (A741) do Instituto Nacional de Meteorologia - INMET (<https://tempo.inmet.gov.br/>).
T-média (temperatura média) e U-média (umidade média).

Cladosporium (rácemo) foi o patógeno prevalente na área e ocorreu de março a agosto de 2020, que é a época de franca floração da macadâmia e quando a temperatura ficou em torno dos 23 °C e a umidade em 59% em Dois Córregos-SP.

4.2 Teste de patogenicidade

4.2.1 Em ráceros destacados em laboratório

Os dados do ensaio em caixas gerbox, com manutenção de alta umidade em todo o rácemo, indicaram que quanto mais avançado o estágio de desenvolvimento do rácemo, maior foi a prevalência de sintomas (anasarcas que, depois, tornam-se necróticas na ráquis) e sinais (rácemo envolvido por micélio de cor verde-oliváceo) dos isolados de *Cladosporium* sp. (MAC60, MAC63 e MAC69). Para os tratamentos com flores fecundadas, em que houve a inoculação dos isolados citados, observou-se 100 % de incidência dos isolados três DAI, visto que sinais do fungo e secamento dos ráceros foram observados (figura 5-A), enquanto o tratamento com flores em pré-antese não apresentou sintomas ou sinais dos isolados inoculados.

O isolado *Pestalotiopsis* sp. (MAC42), no tratamento com flores fecundadas, apresentou crescimento micelial, em 100% dos ráceros três DAI, mas não foi possível confirmar se era o isolado inoculado, pois não produziu conídios ou manifestou sintomas; o mesmo ocorreu com o isolado *Fusarium* sp. (MAC45). Para esses dois isolados, no tratamento em flores em pré-antese, não houve aparecimento de sintoma ou qualquer sinal. A testemunha, em flores fecundadas, apresentou crescimento micelial esbranquiçado, sem a produção de conídios; e a testemunha com flores em pré-antese continuou inócua.

Em relação à condução em frascos tubulares contendo ADE, sem exposição constante das flores a alta umidade, como não houve aparecimento dos sinais dos fungos inoculados, um *blotter test* foi realizado (figura 5-B).

Após dois dias de incubação, os isolados de *Cladosporium* sp., MAC60 em flores pré-antese, MAC60 em flores fecundadas, MAC63 em flores pré-antese, MAC63 flores fecundadas e MAC69 em flores fecundadas apresentaram 100% de incidência (sinal do patógeno: crescimento micelial) dos isolados inoculados enquanto o isolado MAC69 em flores em pré-antese apresentou 80% de incidência deste fungo.

O isolado MAC45 em flores em pré-antese e em flores fecundadas apresentou 100% de incidência de sinais do isolado em questão e também sinais de *Cladosporium*, que poderiam estar aguardando condições favoráveis para o seu desenvolvimento. Os tratamentos MAC42 em flores fecundadas e MAC42 em flores

em pré-antese não apresentaram sinais do isolado em questão, mas exibiram sinais de *Cladosporium* em 100% das flores. A testemunha em flores fecundadas e em flores em pré-antese apresentaram 100% de incidência de *Cladosporium*. A não observação de sinais nos ensaios realizados nos frascos tubulares indica que, embora *Cladosporium* esteja presente nas amostras, a manutenção de alta umidade é importante para que possa esporular e completar o seu ciclo.

Figura 5- Teste de patogenicidade, em laboratório, de rácemos destacados de macadâmia



(A) Rácemo coberto por micélio do isolado MAC63 do tratamento em caixas gerbox; (B) *blotter test* com flores cobertas por micélio do MAC63 oriundo do tratamento em frascos tubulares.

4.2.2 Em rácemos em campo

Os rácemos, do tratamento controle, não apresentaram sinais de crescimento fúngico ou sintomas de doença. Dos isolados de *Cladosporium* sp. inoculados, o único que apresentou sinais (micélio de cor verde-oliváceo) e sintomas (necrose na ráquis e pontas necróticas) foi o MAC63 em flores em pré-antese e flores abertas. Os sintomas foram os mesmos observados em condi es naturais de ocorrência da doença (Figura 6).

Comparando com os resultados do ensaio, em laboratório, com rácemos destacados, em que as condi es experimentais em câmara úmida de longo prazo favoreceram o crescimento de fungos saprófitos não capazes de incitar doença quando em condi es de campo; neste ensaio em campo, somente o MAC63 apresentou consistência em reproduzir os sintomas, originalmente, observados nas amostras recebidas do campo.

Os resultados também indicam que há diferença de agressividade entre os isolados deste fungo. Cabe ressaltar que os experimentos em campo foram realizados quando a temperatura média foi de 25,4 °C e umidade média de 55%. O isolado MAC63 foi capaz de manter capacidade em reproduzir os sintomas e sinais consistentemente, tanto em laboratório, com condição de temperatura e umidade controlados, quanto em campo.

Figura 6- Sintomas causados por *Cladosporium* sp. (MAC63) observados em ramos de macadâmia provenientes do ensaio de campo realizado em 2020



(A) Micélio verde-oliváceo do MAC63 em ramos (flor fecundada); (B) necrose na ráquis do ramo causada pelo MAC63; (C) micélio verde-oliváceo do MAC63 em ramos (flor fecundada).

No ensaio realizado em 2021, o MAC63 foi o único isolado capaz de causar sintomas (necrose na ponta da ráquis, as vezes curvando-a, formando a “cauda de rato”) em ramos de macadâmia (figura 7). Desse modo, constatou-se que o isolado em questão conseguiu colonizar os ramos, 10 DAI, em todos os períodos de câmara úmida, mas, no estágio de flores em pré-antese, submetidas a 48 e 72 horas de umidade, houve apenas o aparecimento de necrose na ráquis, principalmente na ponta, sem sinal do isolado MAC63 ou conídios.

Os isolados MAC99 e MAC103 não apresentaram sintomas ou sinais dos isolados inoculados em nenhum estágio de desenvolvimento ou período de câmara úmida. A testemunha também estava sem nenhuma alteração no período em que os tratamentos com MAC63 foram analisados.

Figura 7- Sintomas causados por *Cladosporium* sp. (MAC63) observados em rácemos provenientes do ensaio de campo realizado em 2021



Racemos inoculados com MAC63 submetidos a 24 h de câmara úmida: (A) rácemo em estádio de flor fecundada apresentando necrose inicial na extremidade da ráquis; (B) rácemo em estádio de flor aberta apresentando necrose na extremidade da ráquis; (C) rácemo em estádio de flor fecundada com necrose e encurvamento da extremidade da ráquis, formando a “cauda de rato”.

4.2.3 Em folhas

Algumas amostras de folhas com queima de bordos demonstraram a presença de fungos morfolologicamente semelhantes a *Phoma/Phomopsis*, associados ao tecido necrosado. Desse modo, o isolado representativo MAC103 foi inoculado em folhas sadias destacadas de macadâmia, mas não induziu nenhum sintoma ou sinal.

Em relação ao isolado de *Rhizoctonia* sp. (MAC80), nenhum sintoma foi observado, visto que o sintoma esperado seria queima, iniciando pelo pecíolo.

Os isolados de *Cladosporium* sp. (MAC60, MAC63 e MAC69) inoculados em mudas, não foram capazes de incitar nenhum sintoma ou promover a visualização de sinais dos fungos inoculados.

4.2.4 Em caule

Os isolados de *Lasiodiplodia* sp. (MAC1, MAC84 e MAC87) foram capazes de colonizar o tecido das mudas de macadâmia e causar doença. Os primeiros sinais foram notados aos 30 DAI. Esses isolados foram capazes de necrosar o tecido, por

vezes com presença de exsudação de goma, resultando em cancro no caule, conforme os sintomas visualizados em condições de campo (figura 8). O isolado MAC84 foi escolhido como isolado representativo.

Figura 8- Sintomas causados pelo isolado MAC84 de *Lasiodiplodia* sp. em caule de macadâmia



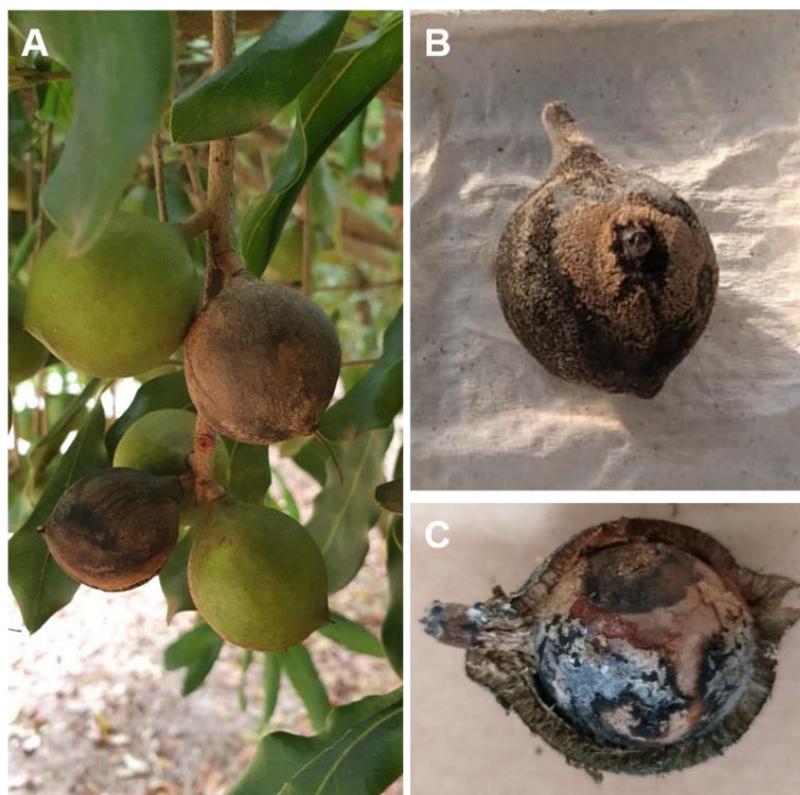
(A) Sintomas associados à *Lasiodiplodia* sp. no campo (foto: Leonardo Moriya), (B) sintomas causados pelo MAC84, em casa de vegetação.

4.2.5 Em frutos

O isolado de *Fusarium* sp. (MAC29), obtido de fruto com associação com fungo causando lesão necrótica, foi inoculado em frutos sadios de macadâmia, mas não se observou sintomas de doença em frutos com e sem ferimentos.

Aos 15 dias após a inoculação do isolado *Colletotrichum* sp. (MAC121), os frutos com e sem ferimentos apresentaram sinais do isolado (mucilagem de cor laranja) e lesões, que quando pressionadas promoviam facilmente afundamento do carpelo e posterior lesão do endocarpo, reproduzindo os sintomas observados originalmente na amostra recebida (figura 9).

Figura 9- Sintomas e sinais causados pelo isolado MAC121 de *Colletotrichum* sp. no fruto de macadâmia



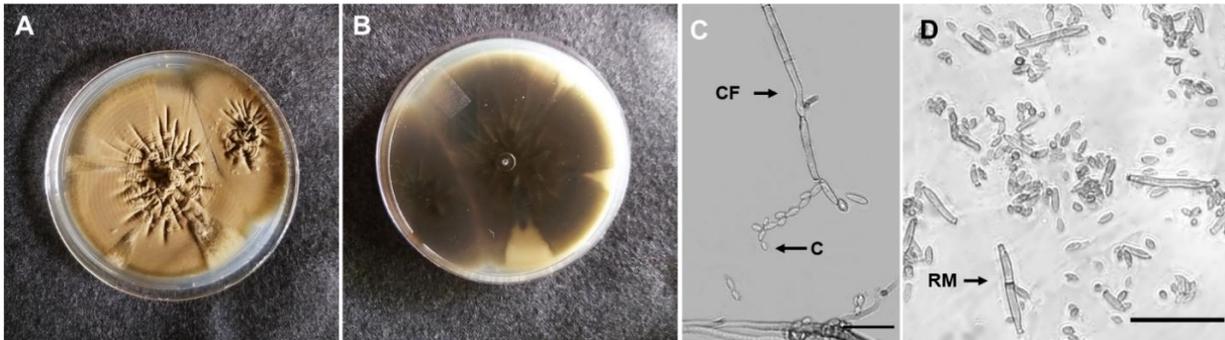
(A) Sintomas e sinais observados em campo (foto: Leonardo Moriya), (B) sintomas e sinais observados em laboratório após a inoculação do MAC121, (C) podridão causada pelo isolado MAC121 na noz.

4.3 Caracterização cultural e morfológica

A caracterização cultural foi realizada nos isolados comprovadamente patogênicos. O isolado de *Cladosporium* sp. (MAC63) caracterizou-se por apresentar um crescimento formando sulcos no meio, eventualmente, com o centro da colônia proeminente e por exibir colônias de coloração cinza a verde-oliváceo com aspecto pulverulento ou aveludado (figura 10-A); e no verso, a coloração variou de verde escuro a preto-oliváceo, por vezes difundindo pigmento amarelado ou alaranjado no meio de cultura (figura 10-B).

O isolado produziu conidióforos macronematosos ou micronematosos, retos ou levemente flexuosos (figura 10-C); ramoconídios cilíndricos-oblongos, septados, medindo de 14,4 a 31,3 μm de comprimento e 2,6 a 3,7 μm de largura (figura 4-D); e numerosos conídios, ocasionalmente em cadeia, hialinos, limoniformes a elipsoides, medindo de 5,8 a 7,6 μm de comprimento e 2,8 a 3,5 μm de largura (figura 10-C).

Figura 10- Caracterização do isolado MAC63 de *Cladosporium* sp.



(A) Frente da colônia; (B) verso da colônia; (C) conidióforo - CF e conídio - C, Bars= 10 µm; (D) ramoconídio - RM, Bars= 10 µm.

O crescimento do isolado de *Lasiodiplodia* sp. (MAC84) teve como característica colônia com micélio aéreo e posterior formação de conidíomas. A coloração da colônia foi branca, no início do crescimento, e após alguns dias se tornou cinza-claro a escuro, com textura cotonosa (figura 11-A). No verso, a colônia possui coloração branca, no início do crescimento e, após alguns dias, também se tornou cinza-claro a escuro, sendo possível visualizar a presença de picnídios no meio de cultura (figura 6-B).

Os conídios imaturos se apresentaram hialinos, elipsoidais e asseptados e os conídios maduros castanho-escuros, elipsoidais e arredondados nas extremidades, com o septo transversal centralizado, medindo de 21,2 a 29 µm de comprimento e 14,3 a 17 µm de largura. Não foi visualizada a formação de paráfises (figura 11-C).

Figura 11- Caracterização do isolado *Lasiodiplodia* sp. (MAC84)



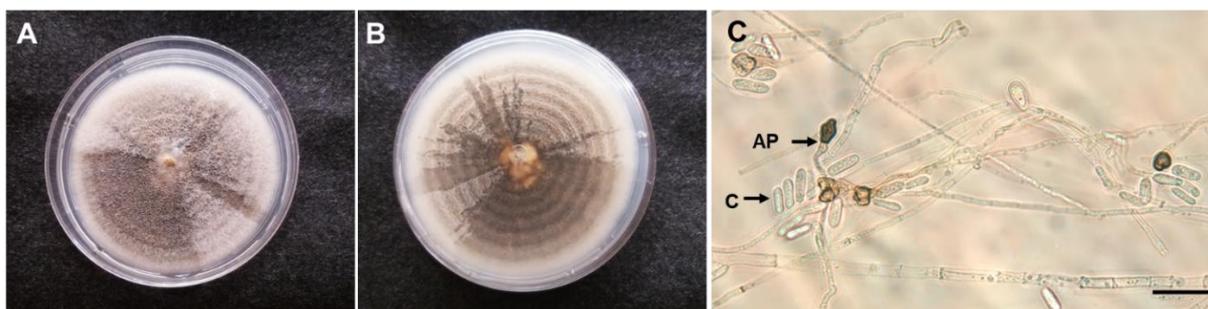
(A) Frente da colônia; (B) verso da colônia; (C) conídios maduros, Bars= 10 µm.

O isolado de *Colletotrichum* sp. (MAC121) teve crescimento radial e micélio aéreo denso. A colônia, inicialmente, apresenta coloração branca, tornando-se marrom-clara a acinzentada com bordas de cor branca, produz mucilagem

alaranjada (massa de conídios) no centro, e textura algodoadosa (figura 12-A). No verso, a colônia, inicialmente, apresenta coloração branca, tornando-se marrom-clara a acinzentada com bordas de cor branca, com presença de picnídios, e a mucilagem é aparente no ponto do cultivo (figura 12-B).

Os conídios se apresentaram unicelulares, hialinos, fusiformes com extremidades levemente arredondadas, às vezes oblongo, medindo de 11,5 a 17,3 μm de comprimento e 4,3 a 5,6 μm de largura. Os apressórios foram produzidos apenas por meio de microculturas, possuindo formato alongado, as vezes com forma de bastão. Não foi visualizado em material vegetal, cultura comum ou microcultura, a presença de setas (figura 12-C).

Figura 12- Caracterização do isolado de *Colletotrichum* sp. (MAC121)



(A) Frente da colônia; (B) verso da colônia; (C) apressório - AP e conídio - C, Bars= 10 μm .

4.4 Análise filogenética

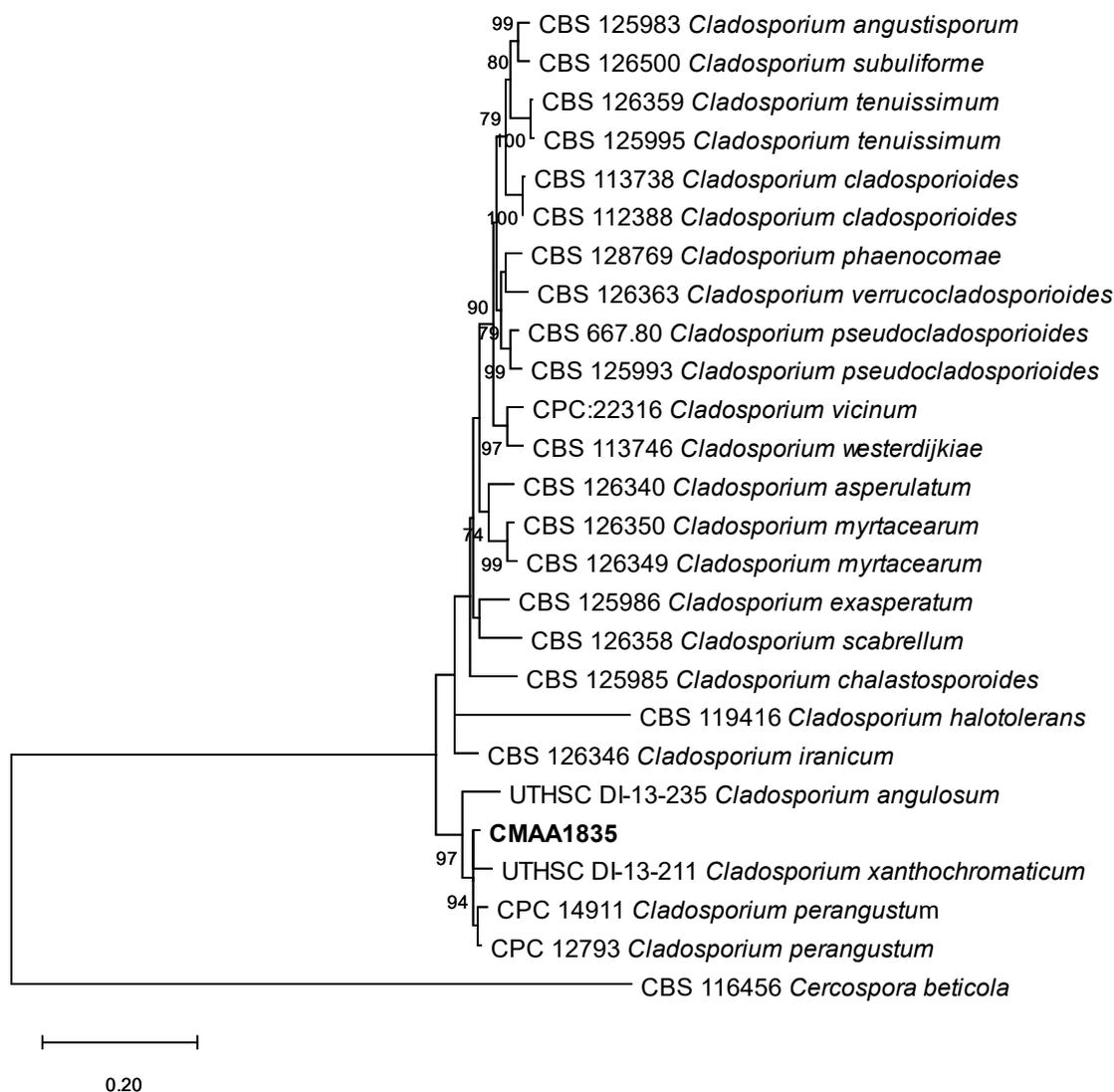
A identificação de *Cladosporium* sp. (MAC63) foi confirmada por meio da análise da região ITS, EF1 α e ACT. A análise foi gerada através do alinhamento do MAC63 com isolados contendo os mesmos genes com acesso no *GenBank* (tabela 1). A árvore filogenética resultou em agrupar isolados similares geneticamente (figura 13), agrupando MAC63 ao acesso do *GenBank* para *Cladosporium xanthochromaticum* (UTHSC DI-13-211), indicando alta similaridade genética entre esses isolados. Ao ser confirmada a espécie do isolado, o isolado foi depositado na Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) com o código CMAA1835.

Tabela 1- Espécies e isolados de *Cladosporium* usados na análise filogenética com números de acesso do GenBank

Espécie	Isolado	N° de acesso no GenBank		
		ITS	EF1 α	ACT
<i>Cladosporium</i> sp.	CMAA1835	-----	-----	-----
<i>Cladosporium angulosum</i>	UTHSC DI-13-235*	LN834425	LN834521	LN834609
<i>C. angustisporum</i>	CBS 125983*	HM147995	HM148236	HM148482
<i>C. asperulatum</i>	CBS 126340*	HM147998	HM148239	HM148485
<i>C. chalastosporioides</i>	CBS 125985*	HM148001	HM148242	HM148488
<i>C. cladosporioides</i>	CBS 113738	HM148004	HM148245	HM148491
<i>C. cladosporioides</i>	CBS 112388*	HM148003	HM148244	HM148490
<i>C. exasperatum</i>	CBS 125986*	HM148090	HM148334	HM148579
<i>C. halotolerans</i>	CBS 119416*	DQ780364	JN906989	EF101397
<i>C. iranicum</i>	CBS 126346*	HM148110	HM148354	HM148599
<i>C. myrtacearum</i>	CBS 126350*	HM148117	HM148361	HM148606
<i>C. myrtacearum</i>	CBS 126349	HM148116	HM148360	HM148605
<i>C. perangustum</i>	CPC 14911	HM148148	HM148392	HM148637
<i>C. perangustum</i>	CPC 12793	HM148137	HM148381	HM148626
<i>C. phaenocomae</i>	CBS 128769*	JF499837	JF499875	JF499881
<i>C. pseudocladosporioides</i>	CBS 667.80	HM148165	HM148409	HM148654
<i>C. pseudocladosporioides</i>	CBS 125993*	HM148158	HM148402	HM148647
<i>C. scabrellum</i>	CBS 126358*	HM148195	HM148440	HM148685
<i>C. subuliforme</i>	CBS 126500*	HM148196	HM148441	HM148686
<i>C. tenuissimum</i>	CBS 126359	HM148198	HM148443	HM148688
<i>C. tenuissimum</i>	CBS 125995*	HM148197	HM148442	HM148687
<i>C. verrucocladosporioides</i>	CBS 126363	HM148226	HM148472	HM148717
<i>C. vicinum</i>	CPC:22316	MF473311	MF473734	MF474161
<i>C. westerdijkiae</i>	CBS 113746	HM148061	HM148303	HM148548
<i>C. xanthochromaticum</i>	UTHSC DI-13-211*	LN834415	LN834511	LN834599
<i>Cercospora beticola</i>	CBS 116456	NR_121315	AY840494	AY840458

*Espécie tipo. ITS - Espaçador Interno Transcrito, EF1 α - Fator de Alongamento de Tradução 1-alfa e ACT - Actina. A espécie deste estudo está em fonte negrito e o isolado *Cercospora beticola* CBS 116456 foi utilizado como *outgroup*.

Figura 13- Topologia de árvore de Máxima Verossimilhança de *Cladosporium* baseada em um alinhamento multilocus



Árvore inferida pelo método Máxima Verossimilhança, usando o modelo de evolução Tn93 G+I (Tamura-Nei), obtida a partir das sequências combinadas ITS, TEF1 α e ACT de isolados de espécies de *Cladosporium*. A(s) árvore(s) inicial(is) para a busca heurística foi(m) obtida(s) automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas usando o modelo Tamura-Nei e, em seguida, selecionando a topologia com valor de probabilidade logarítmico superior. A árvore possui como *outgroup* o fungo *Cercospora beticola* CBS 116456. Os números nos ramos representam valores de suporte de *bootstrap* a partir de 70%.

A identificação do isolado de *Lasiodiplodia* sp. (MAC84) foi confirmada por meio da análise da região ITS e TEF1 α . A topologia gerada a partir do alinhamento do MAC84 com outros isolados (tabela 2) evidenciou que esse isolado, obtido do cancro no tronco de macadâmia, agrupou com os isolados de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* - CBS116459 e IBL201 - com 99% de *bootstrap* (figura 14). Ao ser confirmada a espécie do isolado, ele foi depositado na Coleção de

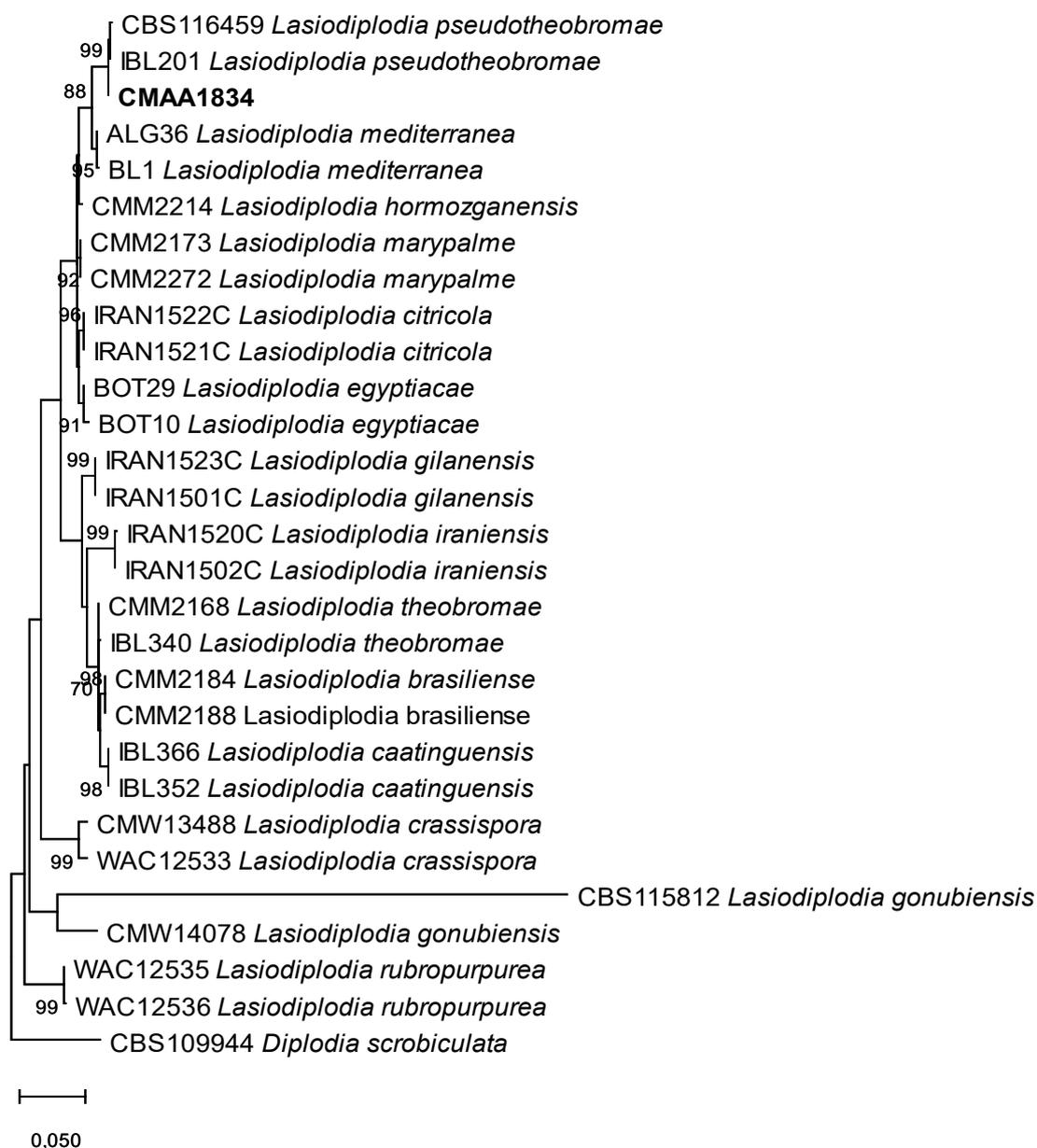
Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) com o código CMAA1834.

Tabela 2- Espécies e isolados de *Lasiodiplodia* usados na análise filogenética com números de acesso do GenBank

Espécie	Isolado	N° de acesso no GenBank	
		ITS	EF1 α
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	CMAA1834	-----	-----
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	CMM2184	KC484801	KC481531
<i>L. brasiliense</i>	CMM2188	KC484807	KC481537
<i>L. caatinguensis</i>	CMM1325	KT154760	KT008006
<i>L. caatinguensis</i>	IBL352*	KT154759	KT154753
<i>L. citricola</i>	CBS124707*	GU945354	GU945340
<i>L. citricola</i>	IRAN 1521C	GU945353	GU945339
<i>L. crassispora</i>	CMW 13448	DQ103552	DQ103559
<i>L. crassispora</i>	CMW 14691*	DQ103550	DQ103557
<i>L. egyptiaca</i>	BOT 29	JN814401	JN814428
<i>L. egyptiaca</i>	CBS 130992	JN814397	JN814424
<i>L. gilaniensis</i>	CBS 124704	GU945351	GU945342
<i>L. gilaniensis</i>	IRAN 1501C	GU945352	GU945341
<i>L. gonubiensis</i>	CBS 115812*	DQ458892	DQ458860
<i>L. gonubiensis</i>	CMW 14078	AY639594	DQ103567
<i>L. hormozganensis</i>	CBS 124709*	GU945355	GU945340
<i>L. hormozganensis</i>	CMM 2214	KC484837	KC481561
<i>L. iraniensis</i>	CBS 124710*	GU945348	GU945336
<i>L. iraniensis</i>	IRAN 1502C	GU945347	GU945335
<i>L. mediterranea</i>	ALG36	KJ638314	KJ638333
<i>L. mediterranea</i>	CBS137783*	KJ638312	KJ638331
<i>L. marypalme</i>	CMM 2173	KC484839	KC481563
<i>L. marypalme</i>	CMM 2172	KC484842	KC481566
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS116459*	EF622077	EF622057
<i>L. pseudotheobromae</i>	IBL201	KT247478	KT247482
<i>L. rubropurpurea</i>	WAC 12535*	DQ103553	DQ103571
<i>L. rubropurpurea</i>	WAC 12536	DQ103554	DQ103572
<i>L. theobromae</i>	CBS 164.96*	AY640255	AY640258
<i>L. theobromae</i>	IBL340	KT247466	KT247472
<i>Diplodia scrobiculata</i>	CBS 109944	AY236952	AY236901

*Espécie tipo. ITS - Espaçador Interno Transcrito e EF1 α - Fator de Alongamento de Tradução 1-alfa. A espécie deste estudo está em fonte negrito e o isolado *Diplodia scrobiculata* CBS 109944 foi utilizado como *outgroup*.

Figura 14- Topologia de árvore de Máxima Verossimilhança de *Lasiodiplodia* baseada em um alinhamento multilocus



Árvore inferida pelo método Máxima Verossimilhança, usando o modelo de evolução K2+G (Kimura 2), obtida a partir das sequências combinadas ITS e *tef1* de isolados de espécies de *Lasiodiplodia*. A(s) árvore(s) inicial(is) para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas usando a abordagem *Maximum Composite Likelihood* (MCL) e, em seguida, selecionando a topologia com valor de probabilidade logarítmica superior. A árvore possui como *outgroup* o fungo *Diplodia scrobiculata* CBS 109944. Os números nos ramos representam valores de suporte de *bootstrap* a partir de 70%.

A relação filogenética do isolado de *Colletotrichum* sp. (MAC121), utilizando sequências das regiões ITS, ACT, β -TUB e H3 (tabela 3) permitiram demonstrar que esse patógeno agrupou com o isolado de *Colletotrichum siamense* OCAC8 com

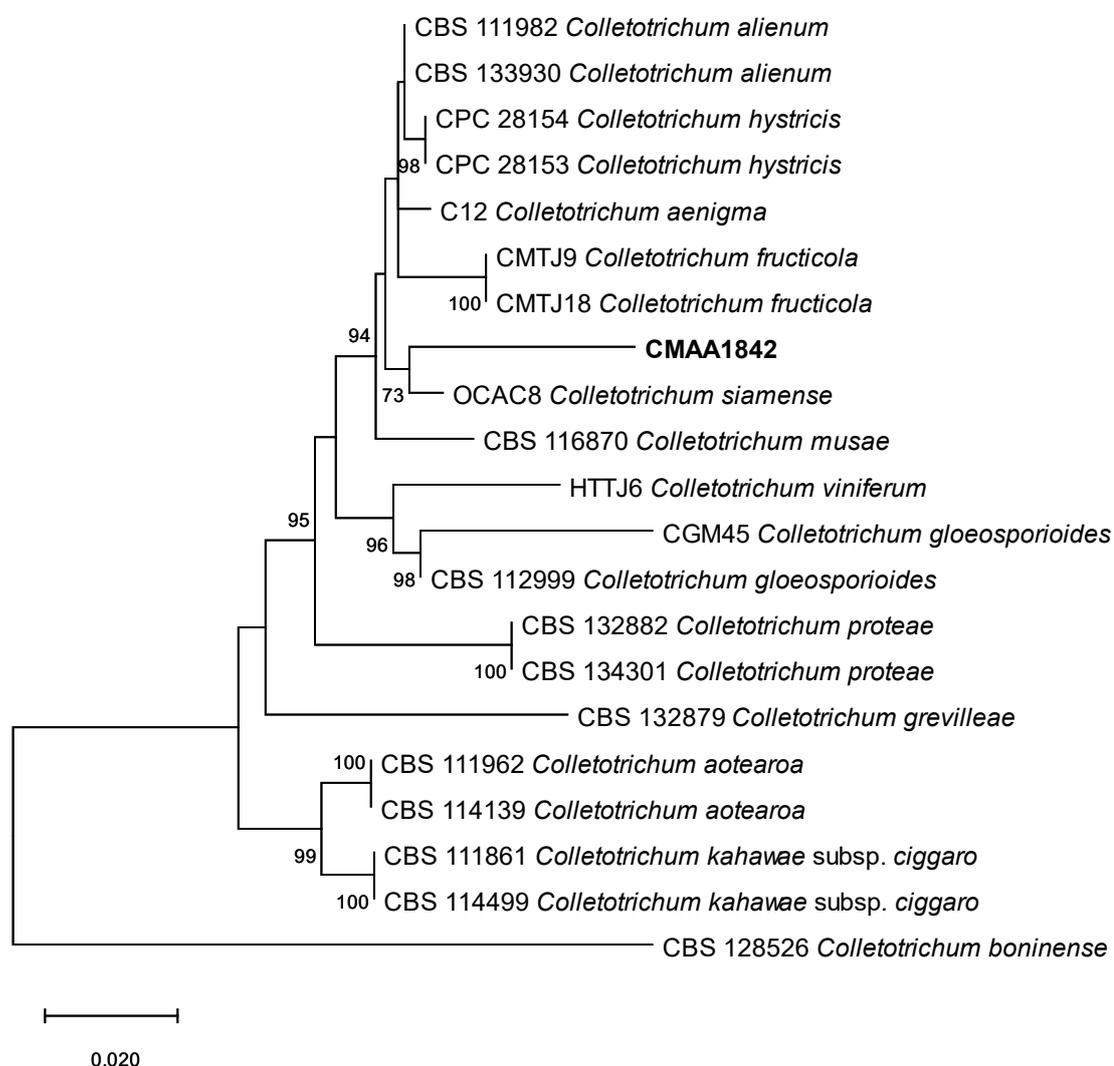
bootstrap de 73% (figura 15). Ao ser confirmada a espécie do isolado, ele foi depositado na Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) com o código CMAA1842.

Tabela 3- Espécies e isolados de *Colletotrichum* usados na análise filogenética com números de acesso do GenBank

Espécie	Isolado	Nº de acesso no GenBank			
		ITS	ACT	β -TUB	H3
<i>Colletotrichum</i> sp.	CMAA1842	-----	-----	-----	-----
<i>C. aenigma</i>	C12	KY986880	KY986883	KY986882	KY986886
<i>C. alienum</i>	CBS 111982	KC297069	KC296932	KC297091	KC297034
<i>C. alienum</i>	CBS 133930	KC297076	KC296938	KC297096	KC297038
<i>C. aotearoa</i>	CBS 111962	KC297061	KC296926	KC297084	KC297050
<i>C. aotearoa</i>	CBS 114139	KC297063	KC296927	KC297087	KC297055
<i>C. fructicola</i>	CMTJ9	MH092006	MH113861	MH113908	MH113873
<i>C. fructicola</i>	CMTJ18	MH092008	MH113863	MH113910	MH113874
<i>C. gloesporioides</i>	CGM45	JX669445	JX827425	JX827449	JX827443
<i>C. gloesporioides</i>	CBS 112999	JQ005152	JQ005500	JQ005587	KY856316
<i>C. grevilleae</i>	CBS 132879	KC297078	KC296941	KC297102	KC297056
<i>C. hystricis</i>	CPC 28154	KY856451	KY856024	KY856533	KY856366
<i>C. hystricis</i>	CPC 28153	KY856450	KY856023	KY856532	KY856365
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i>	CBS 111861	KC297057	KC296922	KC297080	KC297046
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i>	CBS 114499	KC297058	KC296919	KC297081	KC297047
<i>C. musae</i>	CBS:116870	JQ005777	JQ005840	JQ005861	JQ005819
<i>C. proteae</i>	CBS 132882	KC297079	KC296940	KC297101	KC297045
<i>C. proteae</i>	CBS 134301	KC842385	KC842373	KC842387	KC842383
<i>C. siamense</i>	OCAC8	KJ813608	KJ813458	KJ813483	KJ813533
<i>C. viniferum</i>	HTTJ6	MH092013	MH113868	MH113915	MH113875
<i>C. boninense</i>	CBS 128526	JQ005162	JQ005510	JQ005596	JQ005423

ITS - Espaçador Interno Transcrito, ACT - Actina, β -TUB - β -Tubulina e H3 - Histona. A espécie deste estudo está em fonte negrito e o isolado *Colletotrichum boninense* CBS128526 foi utilizado como *outgroup*.

Figura 15- Topologia de árvore de Máxima Verossimilhança de *Colletotrichum* baseada em um alinhamento multilocus



Árvore inferida pelo método Máxima Verossimilhança, usando o modelo de evolução Tn93+G (Tamura-Nei), obtida a partir das sequências combinadas ITS, ACT, β -TUB e H3 de isolados de espécies de *Colletotrichum*. A(s) árvore(s) inicial(is) para a pesquisa heurística foram obtidas automaticamente através da aplicação dos algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias estimadas em pares usando o modelo Tamura-Nei, e depois selecionando a topologia com valor de probabilidade logarítima superior. A árvore possui como *outgroup* o fungo *Colletotrichum boninense* CBS128526. Os números nos ramos representam valores de suporte de *bootstrap* a partir de 70%.

4.5 Sensibilidade de isolados a fungicidas

A sensibilidade do isolados CMAA1835 (*Cladosporium xanthochromaticum*) a diferentes fungicidas está apresentada na tabela 4. T2 (hidróxido de cobre), T3 (epoxiconazol+ piraclostrobina), T4 (clorotalonil), T5 (azoxistrobina + ciproconazol) e

T6 (fluxapirroxade + piraclostrobina) diferiram da testemunha, porém não foram diferentes entre si, sendo capazes de reduzir, significativamente, a germinação dos conídios em cerca de 84% a 98,67%. O ingrediente ativo procimidona (T1) não teve efeito inibitório na germinação do CMAA1835 (tabela 4).

Tabela 4- Influência dos fungicidas sobre a germinação do isolado *Cladosporium xanthochromaticum* (CMAA1835)

Tratamento	Taxa de germinação (%)
Testemunha	90,67a
T1	80,00a
T2	16,00b
T3	0,00b
T4	1,33b
T5	1,33b
T6	6,67b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). T1 (procimidona), T2 (hidróxido de cobre), T3 (epoxiconazol+ piraclostrobina), T4 (clorotalonil), T5 (azoxistrobina + ciproconazol) e T6 (fluxapirroxade + piraclostrobina).

Quanto ao crescimento micelial, a resposta de sensibilidade variou de acordo com o fungicida. O isolado CMAA1834 (*Lasiodiplodia pseudotheobromae*) apresentou taxa de crescimento que variou de 0,77 (procimidona) a 5,29 cm/dia (testemunha). O teste demonstrou que apenas o ingrediente ativo hidróxido de cobre não foi diferenciado da testemunha (tabela 5).

Tabela 5- Influência dos fungicidas sobre o crescimento do isolado *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (CMAA1834)

Tratamento	Taxa de crescimento (cm/dia)
Testemunha	5,29a
T2	3,93ab
T4	2,54b
T5	2,41bc
T3	2,34bc
T6	2,31bc
T1	0,77c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). T1 (procimidona), T2 (hidróxido de cobre), T3 (epoxiconazol+ piraclostrobina), T4 (clorotalonil), T5 (azoxistrobina + ciproconazol) e T6 (fluxapirroxade + piraclostrobina).

O ingrediente ativo clorotalonil (T4) promoveu inibição total do crescimento micelial do CMAA1842 (*Colletotrichum siamense*), não diferindo dos ingredientes

ativos azoxistrobina + ciproconazol (T5), mas diferindo da testemunha e dos demais tratamentos. T1 (procimidona) e T2 (hidróxido de cobre) não diferiram da testemunha, promovendo uma taxa de crescimento micelial de 0,88 e 1,35 cm/dia, respectivamente (tabela 6).

Tabela 6- Influência dos fungicidas sobre o crescimento do isolado *Colletotrichum siamense* (CMAA1842)

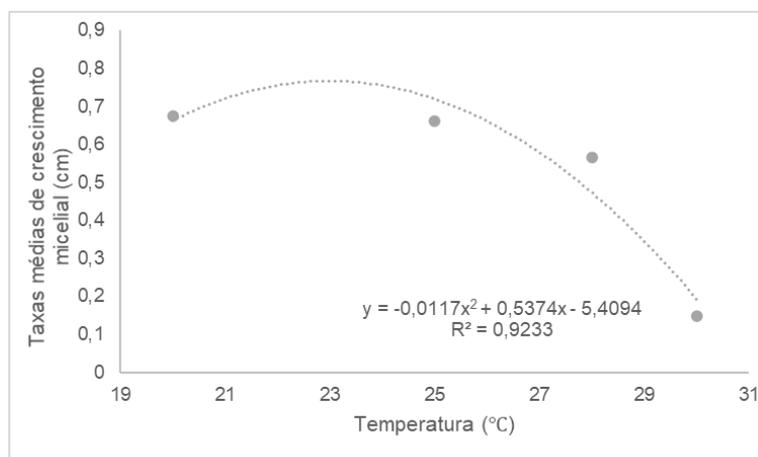
Tratamento	Taxa de crescimento (cm/dia)
Testemunha	1,35a
T2	1,35a
T1	0,88ab
T6	0,87b
T3	0,79b
T5	0,44bc
T4	0,00c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). T1 (procimidona), T2 (hidróxido de cobre), T3 (epoxiconazol+ piraclostrobina), T4 (clorotalonil), T5 (azoxistrobina + ciproconazol) e T6 (fluxapiróxade + piraclostrobina).

4.6 Temperatura ideal de crescimento

A temperatura influenciou o crescimento do isolado avaliado. O micélio de CMAA1835 (*C. xanthochromaticum*) foi capaz de crescer em todas as temperaturas (20, 25, 28 e 30 °C). Contudo a temperatura ideal de crescimento estimada pelo modelo quadrático foi de 23 °C (figura 16).

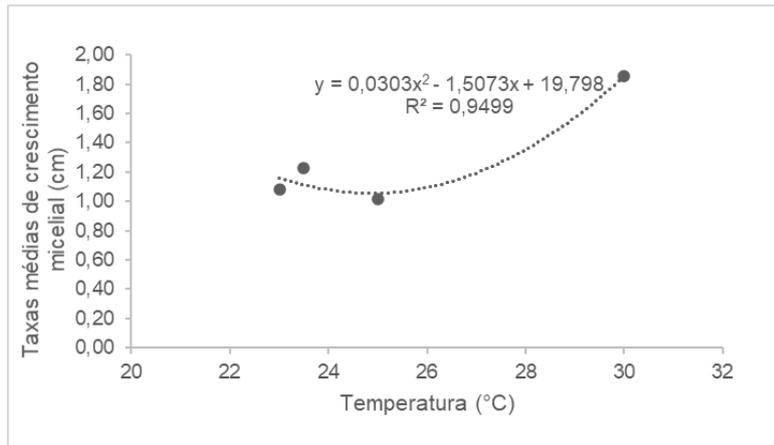
Figura 16- Taxas de crescimento micelial do *Cladosporium xanthochromaticum* (CMAA1835) submetido a diferentes temperaturas



Taxas médias do crescimento micelial de CMAA1835.

O isolado CMAA1834 (*L. pseudotheobromae*) teve crescimento micelial em todas as temperaturas avaliadas (23; 23,5; 25 e 30 °C), apresentando uma maior taxa de crescimento à 30 °C e uma menor taxa à 25 °C (figura 17).

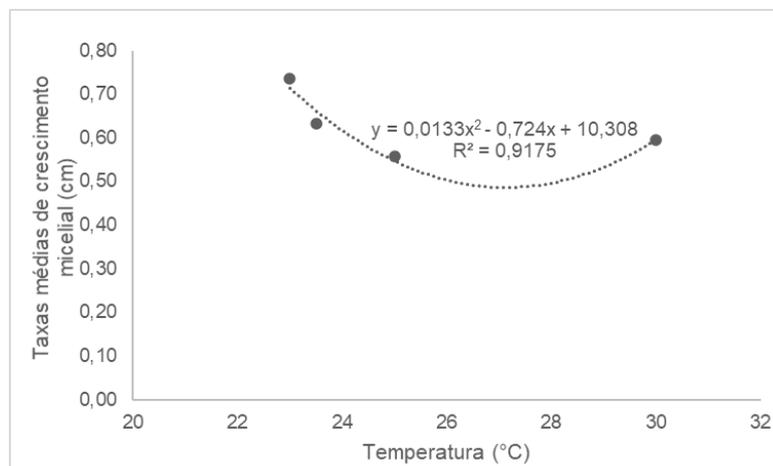
Figura 17- Taxa de crescimento micelial do isolado *Lasiodiplodia pseudotheobromae* CMAA1834 submetido a diferentes temperaturas



Taxas médias do crescimento micelial do CMAA1834.

O isolado CMAA1842 (*C. siamense*) também cresceu em todas as temperaturas avaliadas (23; 23,5; 25 e 30 °C), mas se desenvolveu melhor à temperatura de 23 °C, com menor índice de crescimento, estimado pelo modelo quadrático a 27°C (figura 18).

Figura 18- Taxa de crescimento micelial do isolado *Colletotrichum siamense* CMAA1842 submetido a diferentes temperaturas



Taxas médias de crescimento micelial do CMAA1842.

5 DISCUSSÃO

Na cultura da macadâmia, considera-se que as principais doenças são causadas por fungos, dentre as quais aquelas causadas por *Phomopsis* (AKINSANMI; DRENTH, 2017), *Cladosporium* (VAN DEN BERG et al., 2008), *Lasiodiplodia* (JEFF-EGO; AKINSANMI, 2018), *Colletotrichum* (AKINSANMI; DRENTH, 2017) e *Pestalotiopsis* (AKINSANMI et al., 2017), que foram isolados neste trabalho, associados à sintomas de doenças na cultura em diversos órgãos da planta. *Phomopsis* foi associado à mancha foliar e *Pestalotiopsis* foi associado à seca do rácemo, mas ao realizar os procedimentos para o cumprimento dos postulados de Koch, não ocasionaram doença ou revelaram sinal do patógeno.

Outros fungos isolados a partir do material recebido como *Fusarium* (rácemo e fruto) e *Rhizoctonia* (ramos), também não tiveram sua patogenicidade comprovada e, portanto, não atenderam a todas etapas dos postulados de Koch.

Oomicetos, como *Phytophthora* (JEFF-EGO et al., 2020), podem causar doenças nessa noqueira, mas os isolamentos a partir de material com sintomas aparentes (cancro no caule) não tiveram associação com tal patógeno.

Neste trabalho, baseando-se em características morfológicas e identificação molecular, os agentes causais associados ao cancro do caule, causado por *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (CMAA1834); seca do rácemo, causada por *Cladosporium xanthochromaticum* (CMAA1835); e a podridão do fruto, causada por *Colletotrichum siamense* (CMAA1842), foram identificados como principais problemas da macadâmia em levantamento realizado na cultura durante três anos consecutivos em Dois Córregos, São Paulo, principal região produtora do Brasil.

Esse é o primeiro relato de *L. pseudotheobromae*, *C. xanthochromaticum* e *C. siamense* associados ao cancro do caule, seca do rácemo e podridão do fruto, respectivamente, em macadâmia, no Brasil. *C. xanthochromaticum* e *C. siamense* são descritas, pela primeira vez, no mundo, para tais associações.

A patogenicidade de *C. xanthochromaticum* em rácemos foi analisada em condições de laboratório e campo. O ensaio em laboratório demonstrou a capacidade do isolado em infectar rácemos em estágio de flores fecundadas, as quais ficaram cobertas por micélio do isolado. Houve também reprodução de sintomas de seca dos rácemos.

Em campo, no ano de 2020, *C. xanthochromaticum* foi capaz de causar doença em ráceros nos estádios flores em pré-antese e flores abertas e, em 2021, causou doença em todos os estádios avaliados (pré-antese, flores abertas e flores fecundadas) e em todos os períodos de câmara úmida (0, 24, 48 e 72 h), porém, no estádio de pré-antese submetido a 48 e 72 h de câmara úmida, apenas os sintomas apareceram, sem sinal ou visualização de conídios do isolado MAC63.

Para uma ampla gama de fungos, a presença de água na superfície dos tecidos é outro fator do ambiente considerado indispensável para a germinação da maioria dos esporos e para penetração do tubo germinativo, além de aumentar a suscetibilidade das plantas a certos patógenos afetando a incidência e a severidade da doença (AGRIOS, 2005).

Na Austrália, considera-se que no estádio de emissão dos brotos ao estádio de flores abertas há maior favorabilidade da macadâmia ser infectada por *C. cladosporioides*, expressando sintomas (BRIGHT, 2021).

A espécie deste estudo pertence ao complexo *C. cladosporioides* e agrupa-se com *C. angulosum* e *C. perangustum*, formando uma linhagem basal caracterizada por terem como características a presença de conídios estreitos, conidióforos e conídios levemente rugosos. (SANDOVAL-DENIS et al., 2016).

Não há relatos de *C. xanthochromaticum* em macadâmia. As espécies de *Cladosporium* já reportadas como incidentes nessa cultura são *C. devikae*, *C. macadamiae*, *C. proteacearum* e *C. cladosporioides* em inflorescências de macadâmia, com sintomas de seca do rácermo, na Austrália (BRIGHT, 2021; PRASANATH et al., 2021) e, na África do Sul, *C. cladosporioides* é o agente etiológico da seca do rácermo (VAN DEN BERG et al., 2008).

Embora essa seja a primeira associação com macadâmia, devemos considerar que *C. xanthochromaticum* foi isolado pela primeira vez, em 2016 (SANDOVAL-DENIS et al., 2016); portanto, há poucas publicações associando esse fitopatógeno a doenças de plantas.

No Brasil, uma das poucas publicações encontradas, associa *C. xanthochromaticum* a resíduos de folhas de *Manihot esculenta*, investigado como um dos possíveis fungos endofíticos capaz de produzir peptidases que hidrolisam o glúten (GARCIA; BERSANETTI; DE ARAÚJO MORANDIM-GIANNETT, 2021).

Dado ao seu recente isolamento e a informação que pode se agrupar a *C. perangustum*, há a possibilidade de espécies de *Cladosporium* anteriormente

associadas às doenças de plantas, por falta de material para comparação, terem sido identificadas como *C. perangustum*, a exemplo da mancha foliar causada por *C. perangustum* em *Syagrus oleracea*, no Brasil (OLIVEIRA et al., 2014).

A patogenicidade de CMAA1834 (*L. pseudotheobromae*) no caule de macadâmia foi realizada, resultando no aparecimento de sintomas típicos como das amostras recebidas de campo; onde causou cancro no caule e exsudação de goma.

L. pseudotheobromae já foi identificada associada à podridão do fruto de macadâmia em 2016, na China (CHANG et al., 2019).

Em estudo sobre identificação de agentes causais da morte de ramos de macadâmia em Queensland, na Austrália, verificou-se que 53% dos isolados, obtidos de amostras com sintomas de morte dos ramos e lesão necrótica no lenho, pertencem à espécie *L. pseudotheobromae* (JEFF-EGO; AKINSANMI, 2018).

No Brasil, *L. pseudotheobromae* já foi relatada causando podridão do fruto em caqui - *Diospyros kaki* (JÚNIOR et al., 2017); lesões necróticas na haste do café *Coffea arabica* (FREITAS-LOPES; MACHADO; LOPES, 2020); seca descendente em bacurizeiro - *Platonia insignis* (NAKASONE et al., 2020) e podridão do caule do mamão - *Carica papaya* (NETTO et al., 2014).

Em relação ao isolado de *C. siamense* (CMAA1842), a confirmação da patogenicidade, após inoculação em frutos sadios de macadâmia, foi determinada.

Em macadâmia, *C. siamense* já foi reportado causando mancha foliar na Austrália e na China (PRASANNATH; GALEA; AKINSANMI, 2020; QIU et al., 2020), mas o agente causal da podridão do fruto é frequentemente atribuído à *Colletotrichum* sp.; e já foi identificado, também, por meio da região ITS, *C. gloeosporioides sensu lato* associado à podridão do fruto (AKINSANMI; DRENTH 2017; BRIGHT, 2021).

Em outras culturas, no Brasil, *C. siamense* pode causar podridão do fruto em morango - *Fragaria x ananassa* (CAPOBIANGO et al., 2016); antracnose em abacate - *Persea americana* (SOARES et al., 2021), mancha foliar em *Hibiscus tiliaceus* (ROCHA et al., 2021) e podridão dos frutos de *Capsicum* spp. (SILVA et al., 2017).

A partir da identificação dos fungos associados às doenças em macadâmia, trabalhos que examinem o potencial de dano de cada um na cadeia produtiva da cultura e qual a susceptibilidade das cultivares de macadâmia aos microrganismos serão importantes para subsidiar o manejo de doenças na cultura.

O desenvolvimento de uma doença é o resultado da interação entre hospedeiro suscetível, um agente patogênico e condições ambientais favoráveis. Desses três componentes, apenas o ambiente apresenta alterações frequentes e importantes no decorrer do ciclo de uma cultura (BEDENDO; AMORIM; MATTOS JUNIOR, 2018).

Em geral, os fatores climáticos críticos que afetam o desenvolvimento de doenças foliares e frutíferas são a temperatura e a umidade relativa (ROGERS; STEVENSON, 2006; RAID et al., 2008). Na região estudada de Dois Córregos, há pouca variação da temperatura média mensal (19,3 a 28,4 °C) e umidade média mensal (42,4% a 85,4%), sendo os meses de setembro de 2020 e fevereiro de 2021 os de maior temperatura média; e dezembro de 2019 e março de 2020 os meses em que a umidade média foi mais alta.

Em campo, *Lasiodiplodia* foi associada ao sintoma cancro do caule em dezembro de 2019, e no período de novembro de 2020 a abril de 2021.

Em laboratório, a avaliação do crescimento micelial do CMAA1834 (*L. pseudotheobromae*), sob diferentes temperaturas, indicou que 30 °C ocasionou incrementos na sua taxa de crescimento.

Em relação a isso, não há estudos publicados sobre a biologia e o ciclo da doença provocada por *Lasiodiplodia* sp. em macadâmia, mas se sabe que temperaturas extremas afetam o crescimento e a esporulação de patógenos, sendo que as altas temperaturas são mais prejudiciais a ambos os processos (ARAÚJO et al., 2005).

Em pistache, a fase latente de *Botryosphaeria* pode se tornar ocasional, e isso pode ser devido a uma combinação de alguma forma de estresse, como tecido lenhoso exposto após a poda combinado com estresse hídrico, alta umidade e clima quente prolongado, fazendo com que a fase patogênica do fungo seja desencadeada (MA et al. 2001).

Em 2021, a ocorrência de *Lasiodiplodia* sp. em campo ocorreu quando a temperatura média mensal variou de 24,8 a 27,9 °C (quando comparada à temperatura da melhor taxa de crescimento micelial do isolado CMAA1834 em laboratório, ressaltando que o isolado cresceu em todas as temperaturas avaliadas) e a umidade média mensal variou de 46,3 a 57,5 %. Aliado a isso, algum outro fator de predisposição, como dano mecânico, pode ter facilitado o desenvolvimento do fungo no campo.

Nestas condições, *Cladosporium* associado à seca do racemo ocorreu durante o período de floração, mais especificamente nos meses de março a agosto de 2020.

Embora Akinsanmi (2015) tenha proposto que as condições climáticas úmidas e quentes possam desencadear epidemias de *Cladosporium*, não há informações sobre quais as condições propícias ao desenvolvimento desse fungo associado à queima do rácemo, tais como temperatura, umidade e precipitação ideais.

Essa informação é controversa e pode variar de acordo com a espécie em questão, uma vez que *Cladosporium* foi o fungo prevalente no período de março a agosto de 2020, quando a temperatura média mensal variou de 19,3 a 28,4 °C e umidade média mensal de 42,4 a 67,8 %, em condições de campo.

Para *C. cladosporioides* e *C. herbarum*, por exemplo, temperaturas variando de 23 a 29 °C e valores de umidade relativa em torno de 80%, seguidos rapidamente por chuvas em Vigo e Ourense, no norte da Espanha e precedidos por fortes chuvas dois dias antes de registrar os valores de pico (RODRÍGUEZ-RAJO et al., 2005), foram condições ótimas para promover a presença de grande número de esporos dessas espécies no ambiente.

Em Tangará da Serra- MT, a distribuição de *Cladosporium* sp. prevaleceu nos meses de julho a outubro de 2008, período em que umidade é baixa na cidade, a partir de amostras coletadas do ar em diferentes pontos da cidade (SILVA et al., 2009).

Para o isolado CMAA1835 (*C. xanthochromaticum*) utilizado neste trabalho, a maior taxa de crescimento micelial estimada pela função quadrática, foi quando esteve submetido à temperatura de 23 °C.

Taxas ótimas a 20 e 25°C já foram relatadas como as mais favoráveis ao crescimento micelial de espécies de *Cladosporium in vitro* (OGÓREK et al., 2012).

Outro estudo sobre o crescimento micelial de *C. cladosporioides*, resultou na faixa de temperatura ótima para crescimento e taxas reprodutivas em 21 a 25°C (PRASANNATH; GALEA; AKINSANMI, 2021).

Os resultados e as informações citadas sugerem que a seca do rácemo causada por *Cladosporium* sp. pode ocorrer em temperaturas mais amenas e relativamente úmidas.

A ocorrência de *C. siamense* (CMAA1842) em frutos de macadâmia, com sintomas de podridão do pericarpo, foi observada em abril de 2021. No mês de

ocorrência, a temperatura média foi de 24,8 °C e a umidade foi de 55,1 %. Enquanto, em laboratório, o crescimento micelial do CMAA1842 teve uma maior taxa de crescimento a 23 °C.

Akinsanmi; Drenth (2017) já mostraram que a umidade relativa média semanal e as temperaturas mínimas influenciaram a severidade da podridão do fruto em macadâmia.

Isso indica que nas temperaturas em que o fungo ocorreu no campo e o crescimento avaliado, *in vitro*, o desenvolvimento da doença pode se estabelecer mais rapidamente, tornando mais difícil o seu controle.

Com tudo isso, estudos adicionais relacionados à epidemiologia destas doenças em macadâmia darão suporte para criar modelos capazes de prever surtos de doenças e subsidiar adoção de manejo.

Na Austrália, a morte dos ramos (fungos da família *Botryosphaeriaceae*) e seca do rácemo (*C. cladosporioides*) não possuem registro de produtos para uso no seu manejo (BRIGHT, 2021). O único tipo de controle recomendado é o cultural, no qual recomenda-se, para morte dos ramos, a remoção dos ramos infectados ao ponto de não poder mais visualizar a descoloração no tecido da madeira; e para seca do rácemo, ventilar a árvore através da abertura do dossel para um melhor movimento do ar, reduzindo, dessa forma, o risco de infecção (BRIGHT, 2021; MADUKE et al., 2021).

Em relação à podridão do fruto de macadâmia (*Diaporthe* spp., *Phomopsis* spp. e *Colletotrichum* spp.), na Austrália, fungicidas à base de cobre são registrados e utilizados de forma preventiva.

No Brasil, há apenas registro de produtos químicos para o controle da antracnose, causada por *C. gloesporioides*, da macadâmia. Neste trabalho, analisou-se a sensibilidade dos fungos identificados a diferentes fungicidas. A germinação de *C. xanthochromaticum* foi inibida com a utilização dos ingredientes ativos (i.a): hidróxido de cobre, epoxiconazol + piraclostrobina, clorotalonil, azoxistrobina + ciproconazol e fluxapiroxade + piraclostrobina. Os ingredientes ativos procimidona, epoxiconazol + piraclostrobina, clorotalonil, azoxistrobina + ciproconazol e fluxapiroxade + piraclostrobina inibiram o crescimento micelial de *L. pseudotheobromae*. O crescimento micelial de *C. siamense* foi inibido pelos i.a fluxapiroxade + piraclostrobina, epoxiconazol + piraclostrobina, azoxistrobina +

ciproconazol e clorotalonil, sendo que este último inibiu totalmente o crescimento do fungo.

Dos ingredientes ativos analisados, apenas fluxapiroxade + piraclostrobina e hidróxido de cobre são registrados, no Brasil, juntamente com o fungicida azoxistrobina + difeconazol e do indutor de resistência acibenzolar-S-metílico para o controle da antracnose. Considerando estes dois ingredientes ativos registrados e que foram testados, fluxapiroxade + piraclostrobina foi eficiente na inibição da germinação de *C. xanthochromaticum* e na inibição do crescimento micelial de *L. pseudotheobromae*, enquanto hidróxido de cobre só foi eficiente na inibição da germinação do *C. xanthochromaticum*.

Portanto, os resultados desse ensaio indicam que há outros ingredientes ativos que podem ser utilizados no controle de doenças na macadâmia, ampliando assim o registro de produtos para as principais doenças da cultura no país. Ensaio complementares integrando produtos químicos, condições climáticas, cultivar de macadâmia e o ciclo da doença darão suporte para o manejo adequado de cada doença.

6 CONCLUSÕES

Uma coleção de fungos associados a sintomas em diferentes órgãos da macadâmia recebidos entre 2019, 2020 e 2021 foi estabelecida.

As principais doenças, seus respectivos agentes causais e época de prevalência foram: cancro do caule, causado por *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (novembro a abril); seca do rácemo causada por *Cladosporium xanthochromaticum* (março a agosto) e podridão do fruto causada por *Colletotrichum siamense* (abril de 2021).

Ensaio em condições de laboratório demonstraram que rácemos no estágio de flores fecundadas são mais propensas a serem infectadas por *C. xanthochromaticum* e, em campo, flores abertas e flores fecundadas são mais propensas à infecção.

A taxa de crescimento micelial em diferentes temperaturas, indicou que *C. xanthochromaticum* e *C. siamense* se desenvolvem melhor a 23 °C enquanto *L. pseudotheobromae* a 30 °C.

Os ingredientes ativos hidróxido de cobre, epoxiconazol + piraclostrobina, clorotalonil, azoxistrobina + ciproconazol e fluxapiroxade + piraclostrobina inibiram a germinação de *C. xanthochromaticum*.

Os ingredientes ativos procimidona, epoxiconazol + piraclostrobina, clorotalonil, azoxistrobina + ciproconazol e fluxapiroxade + piraclostrobina inibiram o crescimento micelial de *L. pseudotheobromae*.

Os ingredientes ativos fluxapiroxade + piraclostrobina, epoxiconazol + piraclostrobina, azoxistrobina + ciproconazole, e clorotalonil, inibiram o crescimento micelial de *C. siamense*.

REFERÊNCIAS

ABM - Associação Brasileira de Noz Macadâmia. **Plantio**. 2019a. Disponível em: <<http://www.abm.agr.br/plantio/>>. Acesso em: 23 de setembro de 2019.

ABM - Associação Brasileira de Noz Macadâmia. **Produção e consumo de noz Macadâmia**. 2019b. Disponível em: <<http://www.abm.agr.br/producao-e-consumo-denz-macadamia/>>. Acesso em: 23 de setembro de 2019.

AGMRC - Agricultural Marketing Resources Center. **Macadamia Nuts**. 2021. Disponível em: <<https://www.agmrc.org/commodities-products/nuts/macadamia-nuts>>. Acesso em: 17 de novembro de 2021.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5ª Ed. Elsevier: Academic Press. 5ed, 922p., 2005.

AGROFIT - Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. **Doenças**. 2022. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 de Janeiro de 2022.

AKINSANMI, O. Diseases affecting macadamia flowers : a significant threat to production. **Horticulture Innovation Australia**, p. 67–70, 2015.

AKINSANMI, O. A.; DRENT, A. Spatial pattern and the effects of climatic factors on husk spot disease in macadamia. *Australasian Plant Pathology*, v. 39, n. 2, p. 125–131, 2010.

AKINSANMI, O. A.; DRENT, A. Phosphite and metalaxyl rejuvenate macadamia trees in decline caused by *Phytophthora cinnamomi*. **Crop Protection**, v. 53, p. 29–36, 2013.

AKINSANMI, O. A.; DRENT, A. Characterisation of husk rot in macadamia. **Annals of Applied Biology**, v. 170, n. 1, p. 104–115, 2017.

AKINSANMI, O. A.; MILES, A. K.; DRENT, A. Timing of fungicide applications for control of husk spot caused by *Pseudocercospora macadamiae* in macadamia. **Plant Disease**, v. 91, n. 12, p. 1675–1681, 2007.

AKINSANMI, O. A.; MILES, A. K.; DRENT, A. Alternative fungicides for controlling husk spot caused by *Pseudocercospora macadamiae* in macadamia. **Australasian Plant Pathology**, v. 37, n. 2, p. 141–147, 2008.

AKINSANMI, O. A.; NISA, S.; JEFF-EGO, O. S.; SHIVAS, R. G.; DRENT, A. Dry flower disease of macadamia in Australia caused by *Neopestalotiopsis macadamiae* sp. Nov. and *Pestalotiopsis macadamiae* sp. nov. **Plant Disease**, v. 101, n. 1, p. 45–53, 2017.

ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MAFIA, R. G.; GONÇALVES, R. C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (editores). **Métodos em Fitopatologia**. Editora UFV, p. 55-91, Viçosa-MG, 2016.

AMS - AUSTRALIAN MACADAMAIA SOCIETY. **Yearbook: Australian Macadamias**. 2019. Disponível em: <Australian-Macadamias.org/trade>. Acesso em: 06 de setembro de 2021.

ARAÚJO, A. E.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; ALFENAS, A. C.; CAPDEVILLE, G.; GROSSI, J. A. Survival of *Botrytis cinerea* as mycelium in rose crop debris and as *sclerotia* in soil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 516-521, 2005.

AZAD, A. K.; RASUL, M.; KHAN, M. M.; SHARMA, S. Macadamia biodiesel as a sustainable and alternative transport fuel in Australia. **Energy Procedia**, v. 110, p. 543–548, 2017.

BEDENDO, I. P.; AMORIM, L.; MATTOS JUNIOR, D. Ambiente e doença. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (editores). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Agronomia ceres Ltda., vol.1, 5ª edição, Ouro Fino-MG, 2018.

BEILHARZ, V.; MAYERS, P. E.; PASCOE, I. G. *Pseudocercospora macadamiae* sp. nov., the cause of husk spot of macadamia. **Australasian Plant Pathology**, v. 32, n. 2, p. 279–282, 2003.

BENSCH, K.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The genus *cladosporium*. **Studies in Mycology**, v. 72, p. 1–401, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3114/sim0003>>. Acesso em: 19 de setembro de 2021.

BEUCHAT, L. R.; WORTHINGTON, R. E. Technical note: Fatty acid composition of tree nut oils. **International Journal of Food Science & Technology**, vol.13, n.4, p. 355-358, 2007.

BRANDÃO, L. T. D.; CORTES, M. V. D. C. B.; DE FILIPPI, M. C. C.; SILVA-LOBO, V. L. **Protocolo de Extração de DNA Genômico para os Principais Fungos Fitopatogênicos do Arroz**. Embrapa Arroz e Feijão, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 54, 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1112790/protocolo-de-extracao-de-dna-genomico-para-os-principais-fungos-fitopatogenicos-do-arroz>>. Acesso em: 20 de setembro de 2021.

BRIGHT, J. **Macadamia plant protection guide 2018- 2019**. 2018. Disponível em: <www.dpi.nsw.gov.au>. Acesso em: 13 de agosto de 2019.

BRIGHT, J. **Macadamia plant protection guide 2020-2021**. 2020. Disponível em: <www.dpi.nsw.gov.au>. Acesso em: 9 de abril de 2020.

BRIGHT, J. **Macadamia plant protection guide 2021-2022**. 2021. Disponível em: <www.dpi.nsw.gov.au>. Acesso em: 28 de abril de 2021.

CHANG, J. M.; ZHAN, R. L.; LIU, F.; WU, J. B. First report of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causing husk rot in macadamia. **Plant Disease**, v. 103, n. 1, p. 153-153, 2019.

FABI - Forestry and Agricultural Biotechnology Institute. **Macadamia Husk Rot**. 2015 Disponível em: <https://www.fabinet.up.ac.za/images/groups/MPP/Fact_sheets/Husk_Rot.pdf>. Acesso em: 20 de setembro de 2021.

CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* - current status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 181–213, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3114/sim0014>>. Acesso em 13 de outubro de 2021.

CAPOBIANGO, N. P.; PINHO, D. B.; ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, O. L.; LOPES, U. P. Anthracnose on strawberry fruits caused by *Colletotrichum siamense* in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, n. 4, p. 859-859, 2016.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553-556, 1999.

CRISTESCU, C. A new species of *Phomopsis* Sacc. (Mitosporicfungi) in Romania. **Rev Roum Boil–Biol Veget** n. 48, p. 45–49, 2003.

CROUS, P. W.; BRAUN, U.; HUNTER, G. C.; WINGFIELD, M. J.; VERKLEY, G. J. M.; SHIN, H. D.; NAKASHIMA, C.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in *Pseudocercospora*. **Studies in Mycology**, v. 75, p. 37–114, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3114/sim0005>>. Acesso em: 12 de julho de 2021.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DIPIETRO, A.; SPANU, P. D., RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.

DRENTH, A.; AKINSANMI, O. A.; MILES, A. Macadamia diseases in Australia. **Southern African macadamia grower's association yearbook**, v. 17, n. January 2013, 2009.

DUGAN, F. M.; SCHUBERT, K.; BRAUN, U. Check-list of *Cladosporium* names. **Schlechtendalia**, v. 11, p. 1-103, 2004.

ELLIS, M. B. Dematiaceous hyphomycetes. **Mycological papers**, v. 76, 1971.

ERWIN, D. C; RIBEIRO, O. K. *Phytophthora* diseases worldwide. **American Phytopathological Society** (APS Press), St. Paul- MN, 1996.

FISCHER, I. H.; PERDONÁ, M. J.; CRUZ, J. C. S. Doenças da macadâmia. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 11, p. 6-11, 2014.

FISCHER, I. H.; PERDONA, M. J.; CRUZ, J. C. S.; FIRMINO, A. C. First report of *Lasiodiplodia theobromae* on *Macadamia integrifolia* in Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 1, p. 17900, 2017.

FORTUNATO, A. A.; DEBONA, D.; RIOS, J. A. Manejo de doenças. In: PIMENTEL, L.; BORÉM, A. (editores). **Macadâmia: do plantio à colheita**. Ed. UFV, p. 98-112. Viçosa-MG, 2019.

FREITAS-LOPES, R. do L.; MACHADO, A. R.; LOPES, U. P. Coffee Dieback caused by *Lasiodiplodia pseudotheobromae* in Brazil. **Plant Disease**, v. 104, n. 3, p. 980, 2020.

GARCIA, V. S.; BERSANETTI, P. A.; DE ARAÚJO MORANDIM-GIANNETTI, A. Peptidases production by fungi obtained from *Manihot esculenta* Crantz waste and its application in gluten hydrolysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 37, p. 102184, 2021.

GARCIA, J. F.; LAWRENCE, D. P.; MORALES-CRUZ, A.; TRAVADON, R.; MINIO, A.; HERNANDEZ-MARTINEZ, R.; ROLSHAUSEN, P. E.; BAUMGARTNER, K.; CANTU, D. Phylogenomics of Plant-Associated Botryosphaeriaceae Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. March, p. 1–18, 2021.

GONÇALVES, R. G.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (editores). **Métodos em Fitopatologia**. Editora UFV, p. 94-105, Viçosa-MG, 2016.

GUARNACCIA, V.; CROUS, P. W. Emerging citrus diseases in Europe caused by species of *Diaporthe*. **IMA Fungus**, v. 8, n. 2, p. 317–334, 2017.

GWALTNEY-BRANT, S. M. **Macadamia Nuts**. Third Edit: Elsevier Inc., 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-0717-1.00056-9>>. Acesso em: 28 de outubro de 2021.

HARDHAM, A. R.; BLACKMAN, L. M. *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 2, p. 260–285, 2018.

HOKMABADI H.; SEDAGHATI, E.. Safety of food and beverages: Nuts. In: MOTARJEMI, Y (editor). **Encyclopedia of Food Safety**. Academic Press, 2014.

HUNTER, J. E.; ROHRBACH, K. G.; KUNIMOTO, R. K. Epidemiology of *Botrytis* blight of macadamia racemes. **Phytopathology**, v. 62, n. 31, p. 6-3, 1972.

INC - International Nut & Dried Fruit. Macadamias. **Nuts & Dried Fruits: Statistical yearbook 2018/2019**. p. 30-33, 2018.

INC - International Nut & Dried Fruit. Macadamias. **Nuts & Dried Fruits: Statistical yearbook 2019/2020**. p. 30-33, 2020.

INC - International Nut & Dried Fruit. Macadamias. **Nuts & Dried Fruits: Statistical yearbook 2020/2021**. p. 29-32, 2021.

JEFF-EGO, O. S.; AKINSANMI, O. A. Botryosphaeriaceae causing branch dieback and tree death of macadamia in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 48, n. 1, p. 59–64, 2018.

JEFF-EGO, O. S.; DRENTH, A.; TOPP, B.; HENDERSON, J.; AKINSANMI, O. A. Prevalence of *Phytophthora* species in macadamia orchards in Australia and their ability to cause stem canker. **Plant Pathology**, v. 69, n. 7, p. 1270–1280, 2020.

JEFF-EGO, O. S.; TOPP, B.; DRENTH, A.; HENDERSON, J.; AKINSANMI, O. A. Resistance in wild macadamia germplasm to *Phytophthora cinnamomi* and *Phytophthora multivora*. **Annals of Applied Biology**, v. 178, n. 3, p. 519–526, 2021.

JÚNIOR, A. N.; SANTOS, R. F.; PAGENOTTO, A. C. V.; SPÓSITO, M. B. First report of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causing fruit rot of persimmon in Brazil. **New Disease Reports**, v. 36, n. 1, p. 1-1, 2017.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

KUNIMOTO, R. K.; ARAGAKI, M. HUNTER, J. E., KO, W. H. *Phytophthora capsici*, corrected name for the cause of *Phytophthora* blight of macadamia racemes. **Phytopathology**, v. 66, p. 546–548, 1976.

LIAO, C. Y.; CHEN, M. Y.; CHEN, Y. K.; KUO, K. C.; CHUNG, K. R.; LEE, M. H. Formation of highly branched hyphae by *Colletotrichum acutatum* within the fruit cuticles of Capsicum spp. **Plant Pathology**, v. 61, n. 2, p. 262–270, 2012.

LIDDLE, R. L.; AKINSANMI, O. A.; GALEA, V. J. Non-host specificity of Botryosphaeriaceae on macadamia and blueberry. **Australasian Plant Pathology**, v. 48, n. 1, p. 65-73, 2019.

MA, Z.; MORGAN, D. P.; MICHAILIDES, T. J. Effects of water stress on *Botryosphaeria* blight of pistachio caused by *Botryosphaeria dothidea*. **Plant Disease**, v. 85, n. 7, p. 745-749, 2001.

MAHMUDI, F.; KADIR, J. B.; PUTEH, A.; POURDAD, S. S.; NASEHI, A.; SOLEIMANI, N. Genetic diversity and differentiation of *Colletotrichum* spp. isolates associated with Leguminosae using multigene loci, RAPD and ISSR. **The plant pathology journal**, v. 30, n. 1, p. 10, 2014.

MADUKE, A.; SLIPPERS, B.; VAN DER LINDE, E.; WINGFIELD, M.; FOURIE, G. **Macadamia branch dieback and decline in South Africa**. Macadamia South Africa Journal NPC, p.65-66, 2021.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C. Preparações e observações microscópicas de espécimes fúngicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (editores). **Métodos em Fitopatologia**. Editora UFV, p. 145-170, Viçosa-MG, 2016.

MBAKA; WAMOCHO; TUROOP; WAIGANJO. The incidence and distribution of *Phytophthora cinnamomi* Rands on macadamia in Kenya. **Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 4, n. January 2009, 2009.

MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. UFRPE, Imprensa Universitária, 368 p., 2001.

MILES, A. K.; AKINSANMI, O. A.; SUTHERLAND, P. W.; AITKEN, E. A. B.; DRENTH, A. Infection, colonisation and sporulation by *Pseudocercospora macadamiae* on macadamia fruit. **Australasian Plant Pathology**, v. 38, n. 1, p. 36–43, 2009.

NAKASONE, A. K.; CARDOSO, S. V. D.; COUTINHO, I. B. D. L.; NECHET, K. D. L.; FERREIRA, S. D. C.; BOARI, A. D. J.; CARVALHO, J. E. U. D. Ocorrência de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* em bacurizeiro (*Platonia insignis*). **Summa Phytopathologica**, v. 46, n. 1, p. 58-59, 2020.

NAVARRO, S. L. B.; RODRIGUES, C. E. C. Macadamia oil extraction methods and uses for the defatted meal byproduct. **Trends in food science and technology Journal**, Elsevier, Pirassununga (SP), v. 54, p. 148 – 154, 2016.

NETTO, M. S.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S.; MARQUES, M. W.; LIMA, W. G.; MONTEIRO, J. H.; CÂMARA, M. P. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 67, n. 1, p. 127-141, 2014.

NORONHA, M. de A.; ATHAYDE SOBRINHO, C. **Diagnose de doenças de plantas: coleta, armazenamento e transporte**. Folder, EMBRAPA Meio Norte, Teresina-PI, 2008.

OGÓREK, R.; LEJMAN, A.; PUSZ, W.; MIŁUCH, A.; MIODYŃSKA, P. Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi. **Mikologia lekarska**, v. 19, n. 2, p. 80-85, 2012.

OLIVEIRA, R. R.; AGUIAR, R. L.; TESSMANN, D. J.; NUNES, W. M. C.; SANTOS, A. F.; VIDA, J. B. First report of leaf spot caused by *Cladosporium perangustum* on *Syagrus oleracea* in Brazil. **Plant Disease**, v. 98, n. 2, p. 280-280, 2014.

PEACE, C. P.; ALLAN, P.; VITHANAGE, V.; TURNBULL, C. N.; CARROLL, B. J. Genetic relationships amongst macadamia varieties grown in South Africa as assessed by RAF markers. **South African Journal of Plant and Soil**, v. 22, n. 2, p. 71-75, 2005.

PENONI, E. S. **Caracterização produtiva física e química de cultivares de noqueira-macadâmia**. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2011.

PERDONÁ, M. J.; SUGUINO, E.; MARTINS, A. N.; CAMPO, L. T. **Avaliação inicial de seis variedades de noqueira macadâmia em consorciação com cafeeiro arábica**. 2010. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/profile/Marcos_Perdona3/publication/269112398_AV_ALIACAO_INICIAL_DE_SEIS_VARIETADES_DE_NOGUEIRA_MACADAMIA_EM_CONSORCIAO_COM_CAFEEIRO_ARABICA/links/5481fa560cf25dbd59e9f142.pdf>. Acesso em: 15 de novembro de 2019.

PEREIRA, O. L.; SOARES, D. J. Fungos fitopatogênicos. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C.; PEREIRA, O. L. (editores). **O essencial da fitopatologia- volume 1**. Ed. UFV, Viçosa-MG, 2012.

PHILLIPS, A.; ALVES, A.; CORREIA, A.; LUQUE, J. Two new species of *Botryosphaeria* with brown septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. **Mycologia**, v. 97, n. 2, p. 513-529, 2005.

PIO, R.; ENTELMANN, F. A. Tratos culturais. In: PIMENTEL, L.; BORÉM, A. (editores). **Macadâmia: do plantio à colheita**. Ed. UFV, p. 54-67, Viçosa-MG, 2019.

PIMENTEL, L. D. The culture of macadamia nut. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, 2007.

PRASANNATH, K.; GALEA, V. J.; AKINSANMI, O. A. Characterisation of leaf spots caused by *Neopestalotiopsis clavispora* and *Colletotrichum siamense* in macadamia in Australia. **European Journal of Plant Pathology**, v. 156, n. 4, p. 1219–1225, 2020.

PRASANNATH, K.; GALEA, V. J.; AKINSANMI, O. A. Influence of climatic factors on dry flower, grey and green mould diseases of macadamia flowers in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 2, p. 1291-1306, 2021.

PRASANNATH, K.; SHIVAS, R. G.; GALEA, V. J.; AKINSANMI, O. A. Novel *Botrytis* and *Cladosporium* species associated with flower diseases of macadamia in Australia. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, p. 898, 2021.

QIU, F.; XU, G.; XIE, C. P.; LI, X.; ZHENG, F. Q.; WANG, W. L. First report of *Colletotrichum* leaf spot of macadamia caused by *Colletotrichum siamense* in China. **Plant Disease**, v. 104, n. 12, p. 3261, 2020.

RAID, R. N.; PERNEZNY, K.; HAVRANEK, N.; SANCHEZ, J.; SADDLER. Weather-based forecasting systems reduce fungicide use for early blight of celery. **Crop Protection**, v. 27, n. 3-5, p. 396-402, 2008.

ROCHA, V. A.; BARGUIL, B. M.; REGO, T. J. S.; BESERRA JR, J. E. A. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum siamense* on *Hibiscus tiliaceus* in Brazil. **Forest Pathology**, p. e12724, 2021.

RODRÍGUEZ-RAJO, F. J.; IGLESIAS, I.; JATO, V. Variation assessment of airborne *Alternaria* and *Cladosporium* spores at different bioclimatical conditions. **Mycological research**, v. 109, n. 4, p. 497-507, 2005.

ROGERS, P. M.; STEVENSON, W. R. Weather-based fungicide spray programs for control of two foliar diseases on carrot cultivars differing in susceptibility. **Plant disease**, v. 90, n. 3, p. 358-364, 2006.

SACRAMENTO, C. K.; PEREIRA, F. M. Fenologia da floração da noqueira-macadâmia (*Macadamia integrifolia* Maiden & Betche) nas condições climáticas de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.1, p.19-22, 2003.

SANDOVAL-DENIS, M.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; WIEDERHOLD, N. P.; CANO-LIRA, J. F.; GUARRO, J. New species of *Cladosporium* associated with human and animal infections. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 36, n. 1, p. 281-298, 2016.

SANTOS, C. C.; DOMINGUES, J. L.; SANTOS, R. F.; SPÓSITO, M. B.; SNATOS, A.; NOVAES, Q. S. First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing leaf spot on macadamia in Brazil. **Plant disease**, v. 103, n. 7, 2019.

SCHNEIDER, L. M.; ROLIM, G. S.; SOBIERAJSKI, G. R.; PRELA-PANTANO, A.; PERDONÁ, M. J. Zoneamento agroclimático de noqueira-macadâmia para o Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v. 34, n. 2, p. 515-524, 2012.

SCHUBERT, K.; BRAUN, U. Taxonomic revision of the genus *Cladosporium* s. lat. 1. Species reallocated to *Fusicladium*, *Parastenella*, *Passalora*, *Pseudocercospora* and *Stenella*. **Mycological Progress**, v. 4, n. 2, p. 101-109, 2005.

SCHOCH, C. L. et al. **NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools**. Database (Oxford). 2020.

SIMPSON, M. G. Diversity and classification of flowering plants: eudicots. In: SIMPSON, M. G. (editor). **Plant Systematics**. Academic Press, 2nd edition, 2010.

SILVA, F. P.; GARCIA, W. M.; CARVALHO, I. F.; DALLACORT, R. Sazonalidade de *Cladosporium* sp. (fungo anemófilo) na cidade de Tangará da Serra-MT em função dos fatores ambientais no período de um ano. In: 2^a Jornada Científica da Unemat, Barra do Bugres, Mato Grosso, 2009. **Anais eletrônicos...** Mato Grosso: UNEMAT, 2009. Disponível em: <http://www.unemat.br/eventos/jornada2009/resumos_conic/Expandido_00214.pdf>. Acesso em: 28 de janeiro de 2022.

SILVA, J. R.; CHAVES, T. P.; DA SILVA, A. R.; BARBOSA, L. D. F.; COSTA, J. F.; RAMOS-SOBRINHO, R.; ASSUNÇÃO, I. P. Molecular and morpho-cultural characterization of *Colletotrichum* spp. associated with anthracnose on *Capsicum* spp. in northeastern Brazil. **Tropical plant pathology**, v. 42, n. 4, p. 315-319, 2017.

SMITH, H.; KEMP, G. H. J.; WINGFIELD, M. J. Canker and die-back of Eucalyptus in South Africa caused by *Botryosphaeria dothidea*. **Plant pathology**, v. 43, n. 6, p. 1031-1034, 1994.

- SOARES, M. G.; ALVES, E.; SILVEIRA, A. L.; PEREIRA, F. D.; GUIMARÃES, S. S. *Colletotrichum siamense* is the main aetiological agent of anthracnose of avocado in south-eastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 70, n. 1, p. 154-166, 2021.
- SOBIERAJSKI, G. da R.; FRANCISCO, V. L. dos S.; ROCHA, P.; GHILARDI, A. A.; MAIA, M. L. Noz macadâmia : produção, mercado e situação no Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, v. 36, n. 5, 2006.
- SOBIERAJSKI, G. D. R.; BARBOSA, W.; BETTIOL NETO, J. E.; CHAGAS, E. A.; CAMPO-DALL'ORTO, F. A. Caracterização dos estágios fenológicos em sete cultivares e seleções de noqueira-macadâmia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 690-694, 2007.
- SUSILOWATI, A.; KUSUMA, Y. S.; KHOLIBRINA, C. R. Seed morphology and germination of macadamia (*Macadamia integrifolia*) from North Sumatra. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, p. 01216, 2019.
- TOLEDO PIZA, P. L. B. de; MORIYA, L. M. Cultivo da macadâmia no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 39-45, 2014.
- TOLEDO PIZA, P. L. B.; PIZA, I. M. T.; ALMEIDA NETO, J. T. P. A cultura. PIMENTEL, L.; BORÉM, A. (editores). **Macadâmia: do plantio à colheita**. Ed. UFV, p. 09-19. Viçosa-MG, 2019.
- THOMPSON, S. M.; TAN, Y. P.; YOUNG, A. J.; NEATE, S. M.; AITKEN, E. A. B.; SHIVAS, R. G. Stem cankers on sunflower (*Helianthus annuus*) in Australia reveal a complex of pathogenic *Diaporthe* (*Phomopsis*) species. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 27, p. 80–89, 2011.
- TRUEMAN, S. J. The reproductive biology of macadamia. **Scientia Horticulturae**, 150, 354–359, 2013.
- UDAYANGA, D.; LIU, X.; MCKENZIE, E. H. C.; CHUKEATIROTE, E.; BAHKALI, A. H. A.; HYDE, K. D. The genus *Phomopsis*: Biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. **Fungal Diversity**, [s. l.], v. 50, p. 189–225, 2011.
- VAN DEN BERG, N.; SERFONTEIN, S.; CHRISTIE, B.; MUNRO, C. First report of raceme blight caused by *Cladosporium cladosporioides* on macadamia nuts in South Africa. **Plant disease**, v. 92, n. 3, p. 484-484, 2008.
- VAN NIEKERK, J. M.; GROENEWALD, J. Z.; FARR, D. F.; FOURIE, P. H.; HALLEEN, F.; CROUS, P. W. Reassessment of *Phomopsis* species on grapevines. **Australasian Plant Pathology**, v. 34, n. 1, p. 27–39, 2005.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. J. W. T.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

WOOD, L. G.; GARG, M. L. Macadamia nuts (*Macadamia integrifolia* and *tetraphylla*) and their use in Hypercholesterolemic subjects. In: PREEDY, V. R.; WATSON, R. R.; PATEL, V. B. **Nuts and seeds in health and disease prevention**. Elsevier Science Ltd., p. 717-725, 2011.