

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E INIBIÇÃO DO
CRESCIMENTO MICELIAL, PELO FOSFITO DE POTÁSSIO, DO
AGENTE CAUSAL DA MANCHA FOLIAR DA *MACADAMIA*
INTEGRIFOLIA MAIDEN E BETCHE**

CARLOS CARNEIRO DOS SANTOS

VITÓRIA DA CONQUISTA
BAHIA – BRASIL
JULHO – 2016

CARLOS CARNEIRO DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E INIBIÇÃO DO
CRESCIMENTO MICELIAL, PELO FOSFITO DE POTÁSSIO, DO
AGENTE CAUSAL DA MANCHA FOLIAR DA *MACADAMIA*
INTEGRIFOLIA MAIDEN E BETCHE**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Quelmo Silva de Novaes (UESB)

VITÓRIA DA CONQUISTA
BAHIA – BRASIL
JULHO – 2016

CARLOS CARNEIRO DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E INIBIÇÃO DO
CRESCIMENTO MICELIAL, PELO FOSFITO DE POTÁSSIO, DO
AGENTE CAUSAL DA MANCHA FOLIAR DA *MACADAMIA*
INTEGRIFOLIA MAIDEN E BETCHE**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 27 de julho de 2016.

Comissão Examinadora:

Prof. Armínio Santos (D.Sc., Agronomia) – UESB

Prof. Cantídio Fernando Gouvêa (D.Sc., Ciências) – UFS

Prof. Quelmo Silva de Novaes (D.Sc., Agronomia (Fitopatologia)) – UESB
Orientador

Aos meus pais, Maria e José

Aos meus irmãos, Tainara e Talison

À minha avó Loura

Ofereço

À minha avó Miúda (*in memoriam*), que me criou, cuidou, ensinou, amou... que partiu para junto do Senhor e me deixou a maior herança, a simplicidade, bondade e humildade que ela tinha como ninguém.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me dar a força para lutar e a graça de alcançar os objetivos.

Aos meus pais por estarem presentes nessa caminhada.

À minha família.

À minha namorada, Rafaella, pela presença constante em qualquer lugar que eu esteja, enchendo-me de carinho, amor e muito companheirismo.

Ao meu orientador, prof. Quelmo Silva de Novaes, por ter me fornecido uma magnífica orientação tanto academicamente como pessoalmente e pela sua simplicidade, compreensão, apoio para eu chegar ao doutorado e o laço de amizade que quero carregar para toda a vida.

À futura colega de profissão Joyce pela intensa parceria e dedicação em todos os trabalhos que realizamos, conte comigo.

Ao prof. Armínio Santos, que me proporcionou conhecimentos além das Ciências Agrárias.

Ao prof. Cantídio Fernando Gouvêa por ter aceitado fazer parte da banca examinadora e sempre me incentivado a entrar na Pós-Graduação.

À prof.^a Patrícia Anjos Bittencourt Barreto pela atenção dispensada sempre que a procurei para sanar algumas dúvidas e pelas boas conversas.

A todos os professores que fizeram parte desta jornada contribuindo para ampliar meus conhecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos bons colegas que dividiram comigo o mesmo orientador, Geraldo e Gisele, por sempre poder contar com eles para qualquer auxílio e ajuda nessa caminhada acadêmica, hoje grandes amigos.

Ao meu grande amigo “Ceceu” por sempre acreditar na minha capacidade e me incentivar em mais uma etapa de minha vida.

Aos amigos Arthur e Everton, que mesmo de longe sempre mantiveram o contato.

À rapaziada do apartamento 301 por ter me recebido de abraços abertos.

Aos colegas de laboratório de Fitopatologia e Virologia Vegetal da UESB Cátia e Caio por não negarem ajuda.

Ao colega Raoni, que passou seus conhecimentos em inglês para toda a equipe do laboratório e sempre está ali para nos auxiliar.

À Dra. Viviane, da Embrapa Tabuleiros Costeiros, e ao seu esposo, prof. Frederico, que mesmo distantes não me negaram apoio quando deles precisei.

A todos os colegas do mestrado, em especial aos colegas da primeira turma do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais.

Às secretárias do PPGCIFLOR Milena e Fabrícia pela disposição e assistência.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização de mais esta etapa.

Muito obrigado!

“Alguns homens veem as coisas como são e dizem ‘Por quê?’
Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”

(George Bernard Shaw)

RESUMO

SANTOS, Carlos Carneiro, M.Sc., Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, julho de 2016. **Caracterização morfológica, molecular e inibição do crescimento micelial, pelo fosfito de potássio, do agente causal da mancha foliar da *Macadamia integrifolia* Maiden e Betche.** Orientador: Quelmo Silva de Novaes.

A macadâmia (*Macadamia integrifolia* Maiden e Betche) é uma árvore muito apreciada no mundo por diversos consumidores frequentes de seus frutos. Porém, plantas de macadâmia localizadas no campus da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, em Vitória da Conquista (BA), vêm apresentando problemas de ordem fitossanitária, tais como: manchas foliares provocadas por fungos, as quais podem reduzir a produtividade desta cultura. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização morfológica e molecular do fungo *Neopestalotiopsis* sp., o qual encontra-se associado a tais manchas, bem como testar o efeito do fosfito de potássio na inibição micelial do fungo em condições *in vitro*. Isolados de *Neopestalotiopsis* sp. foram obtidos de amostras de plantas de *M. integrifolia* com sintomas de manchas foliares. Foram realizados testes de patogenicidade em que folhas desinfestadas superficialmente foram ligeiramente feridas com uma agulha estéril e, em seguida, inoculadas com discos de BDA (batata-dextrose-ágar) de 5 mm de diâmetro contendo estruturas fúngicas do patógeno em condições *in vitro*. Na caracterização morfológica, cem conídios foram examinados quanto a forma, tamanho, número de células e cor. Para a caracterização molecular, o DNA do patógeno foi extraído e purificado. As amostras de DNA genômico obtidas do isolado de *Neopestalotiopsis* sp. foram submetidas à PCR para a amplificação do gene nuclear 5.8S com os dois espaçadores transcritos internos flanqueadores ITS 1 e ITS2 (ITS), sequências parciais do gene β -tubulina (TUB2) e fator de alongação 1- α (TEF1), utilizando os *primers* ITS1 e ITS4, Bt2a e Bt2b e EF-F e tef997R, respectivamente. Com os “amplicons” gerados foi realizada a análise filogenética com sequências concatenadas de *Neopestalotiopsis*. Para verificar a ação do fosfito de potássio sobre o crescimento micelial do *Neopestalotiopsis*, utilizou-se o produto comercial Phytogard Potássio. O fosfito de potássio foi adicionado em meio de cultura BDA, fundente a 45-50 °C, diluídos em

série, de modo a se obter as respectivas concentrações do produto comercial: 0, 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 ppm. A avaliação do crescimento micelial do *Neopestalotiopsis* sp. foi realizada a cada dois dias até a testemunha preencher toda placa de Petri (totalizando 10 dias de cultura), por meio da medição do diâmetro das colônias. Os testes de patogenicidade foram positivos para todas as folhas inoculadas com o patógeno. Tanto a caracterização morfológica quanto a molecular identificou o agente causal da mancha foliar da macadâmia como sendo o *Neopestalotiopsis clavispora*. O fosfito de potássio promoveu inibição satisfatória do crescimento micelial do fungo, mesmo na concentração de 10 ppm (17%), atingindo inibições efetivas, acima de 50%, a partir da concentração de 250 ppm, mostrando ser um produto eficiente no controle da mancha foliar da macadâmia.

Palavras-chave: *Neopestalotiopsis clavispora*, mancha foliar, controle.

ABSTRACT

SANTOS, Carlos Carneiro, M.Sc., Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, July, 2016. **Morphological and molecular characterization and inhibition of mycelial growth with potassium phosphite of the causal agent of foliar spot on *Macadamia integrifolia* Maiden e Betche.** Adviser: Quelmo Silva de Novaes.

The macadamia (*Macadamia integrifolia* Maiden & Betche) is a popular tree among consumers assiduous by its nut, considered tasty and appreciated for those who seek a natural and healthy diet. However, macadamia trees located at Bahia Southwest State University, in Vitoria da Conquista (BA), have been facing phytosanitary issues, as fungal leaf spot, which may reduce macadamia productivity. This paper's objective was to give a molecular and morphological characterization of *Neopestalotiopsis* sp., which has been seen associated to the macadamia leaf spot, and also to test the effect of potassium phosphite on fungus's mycelial inhibition. *Neopestalotiopsis* sp. were isolated from macadamia tree samples with the leaf spot symptoms. Pathogenicity tests were conducted, in which disinfested leaves were injured utilizing a sterile needle, and inoculated with 5 mm diameter containing the fungal reproductive structures. As control treatment, healthy macadamia leaves were inoculated with pure BDA culture media. To the morphological characterization 100 conidia were examined regarding form, size, cell number, and color utilizing a light microscope Carl Zeiss Axiostar Plus MicroImaging GmbH 37081, (Gottigen, Germany). To the molecular characterization of the fungi, the DNA was extracted and purified. The genomic DNA samples obtained from isolated *Neopestalotiopsis clavispora* were submitted to PCR for gene nuclear amplification 5.8S with two internal transcribed spacers flanking ITS 1 and ITS2 (ITS), partial sequence from gene β -tubulin (TUB2) and elongation factor, utilizing primers ITS1 and ITS4, Bt2a and Bt2b and EF-F e tef997R, respectively. With the generated amplicons was constructed a phylogenetic analysis with *Neopestalotiopsis*'s concatenated sequences. To verify the potassium phosphite action on *Neopestalotiopsis* mycelial growth Phytogard Potassium was utilized. The potassium phosphite was added to BDA (potato-dextrose-agar) culture media, melting at 45-50°C, and diluted in series to give the respective concentrations of the commercial product: 0, 10, 50, 100, 250, 500 and 1000 ppm. The *Neopestalotiopsis* mycelial

growth was evaluated every two days until the control treatment occupy all the Petri plate (10 days), by measuring colony diameter. The pathogenicity tests were positive to all inoculated leaves. Both morphological and molecular characterization had identified the causal agent of macadamia leaf spot as *Neopestalotiopsis clavispora*. The potassium phosphite promoted a satisfactory inhibition upon fungal mycelial growth even with 10 ppm concentration (17%), reaching effective inhibition above 50%, starting with 250 ppm concentration, being an effective product on macadamia leaf spot.

Keywords: *Neopestalotiopsis clavispora*, foliar spot, control.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Sintomas da mancha foliar da macadâmia (A) e acérvulos do *Neopestalotiopsis* sp. presentes na lesão na face adaxial da folha (B).....28
- Figura 2** – Lesões necróticas em folhas de macadâmia inoculadas com 1 e 2 discos de BDA com o patógeno. A) Testemunha. B) Folha com 1 disco. C) Folha com 2 discos. D) Folhas com 2 discos e coalescimento da mancha.29
- Figura 3** – Conídios de *Neopestalotiopsis clavispora*, em meio BDA.31
- Figura 4** – Árvore filogenética construída por Inferência Bayesiana baseada na concatenação de sequências ITS, TUB2 e TEF1 de isolados de *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*. Os números nos nós são valores de probabilidade posterior bayesiana. O isolado destacado em negrito é referente a este estudo **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5** – Crescimento micelial do *N. clavispora* sobre diferentes concentrações de fosfito de potássio no meio BDA na primeira avaliação.34
- Figura 6** – Crescimento micelial do *N. clavispora* sobre diferentes concentrações de fosfito de potássio no meio BDA. A) Segunda avaliação. B) Terceira avaliação.35
- Figura 7** – Crescimento micelial do *N. clavispora* sobre diferentes concentrações de fosfito de potássio no meio BDA. A) Quarta avaliação. B) Quinta avaliação.36
- Figura 8** – Crescimento micelial de *Neopestalotiopsis clavispora* em diferentes concentrações de fosfito de potássio aos 10 dias de incubação. A) 0 ppm. B) 250 ppm. C) 500 ppm.....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem de inibição <i>in vitro</i> do <i>Neopestalotiopsis clavispora</i> em meio de cultura BDA sobre diferentes concentrações de fosfito de potássio durante 10 dias de incubação.	37
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA MACADÂMIA	17
2.2. CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS	18
2.3. CONDIÇÕES SILVICULTURAIS E INFLUÊNCIAS EDAFOCLIMÁTICAS.....	18
2.4. O CULTIVO DA MACADÂMIA NO BRASIL.....	19
2.5. <i>PESTALOTIOPSIS</i> SP. EM <i>MACADAMIA INTEGRIFOLIA</i>	20
2.6. O GÊNERO <i>NEOPESTALOTIOPSIS</i>	20
2.7. FOSFITO COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	23
3.2. OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>NEOPESTALOTIOPSIS CLAVISPORA</i>	23
3.3. TESTE DE PATOGENICIDADE	24
3.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	24
3.5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO PATÓGENO	25
3.6. EFEITO <i>IN VITRO</i> DE FOSFITO DE POTÁSSIO NO CRESCIMENTO MICELIAL DO <i>NEOPESTALOTIOPSIS CLAVISPORA</i> DA <i>MACADAMIA INTEGRIFOLIA</i>	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DO PATÓGENO	28
4.2. PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE <i>NEOPESTALOTIOPSIS</i> SP.	28
4.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO <i>NEOPESTALOTIOPSIS CLAVISPORA</i>	30
4.4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO <i>NEOPESTALOTIOPSIS CLAVISPORA</i>	32
4.5. EFEITO <i>IN VITRO</i> DO FOSFITO DE POTÁSSIO NO CRESCIMENTO MICELIAL DO <i>NEOPESTALOTIOPSIS CLAVISPORA</i> DA <i>MACADAMIA INTEGRIFOLIA</i>	34
5. CONCLUSÕES	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

A macadâmia (*Macadamia integrifolia* Maiden e Betche) é uma noqueira que produz um fruto bastante saboroso e apreciado no mundo inteiro. Em função da alta procura desses frutos para compor a alimentação diária de vários apreciadores mundo afora, a produção mundial de macadâmia teve um acréscimo de mais de 70% de 2004 a 2014 (INC, 2016).

A noz-macadâmia é uma espécie subtropical nativa da Austrália. O gênero *Macadamia* possui aproximadamente dez espécies, sendo que apenas duas delas são cultivadas em larga escala, com destaque para *Macadamia integrifolia* e *Macadamia tetraphylla*. A primeira é cultivada comercialmente para produção de nozes e a segunda é empregada como porta-enxerto (CEREDA e MARCHI, 1991). As outras espécies não possuem frutos comestíveis (DIERBERGER e MARINO NETTO, 1985).

Os sete principais países com área plantada em hectares com noz-macadâmia em 2012 foram África do Sul (19 mil), Austrália (17,5 mil), China (16,5 mil), Quênia (12 mil), Guatemala (9 mil), Havaí (EUA) (6,8 mil) e Brasil (6,5 mil) (TOLEDO PIZA e MORIYA, 2014). Contudo, a Austrália continua sendo a maior produtora de noz em casca do mundo, com 35.500 toneladas (AMS, 2012), ao passo que no Brasil em 2012 a produção de noz-macadâmia em casca foi de 4.200 toneladas, sendo pago para o produtor R\$ 3,15/kg em casca (TOLEDO PIZA e MORIYA, 2014).

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 (SOBIERAJSKI et al., 2005; SCHNEIDER et al., 2012).

As informações sobre a ocorrência de doença para a maioria das espécies florestais, principalmente as nativas, ainda são pouco conhecidas e investigadas. Contudo, a macadâmia apresenta alguns relatos de microrganismos causadores de doenças para as espécies cultivadas no Brasil e em outros países, como: antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, podridão radicular causada principalmente por *Phytophthora cinnamomi*, seca de flores causada na maioria das

vezes pelo fungo *Botrytis cinerea* e mancha do fruto causada pelo fungo *Pseudocercospora macadamiae* (FISCHER et al., 2014).

Uma doença que frequentemente vem atacando as árvores de macadâmia em Vitória da Conquista, na Bahia, é a mancha foliar causada por fungo, então conhecido como *Pestalotiopsis* sp., recentemente denominado de *Neopestalotiopsis* (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Azevedo et al. (2011) relatou o ataque desse fungo à *Macadamia integrifolia* na cidade de Vitória da Conquista (BA), porém, naquela ocasião, não foi possível a identificação da espécie. Entretanto, o primeiro relato de manchas foliares na macadâmia foi realizado por Rawal e Muniyappa (1981), na Índia, os quais atribuíram ao fungo *Pestalotiopsis (Pestalotia) versicolor* Spag. a causa da doença.

A mancha foliar de *Neopestalotiopsis* sp. em *M. integrifolia* é considerada como uma doença recente para os cultivos brasileiros, demandando estudos que caracterizem a espécie do patógeno causador da doença e pesquisas que possam inferir medidas de controle para tal problema fitossanitário.

Diante disso, os objetivos deste estudo abrangem a caracterização morfológica e molecular do fungo *Neopestalotiopsis* sp., o qual encontra-se associado à mancha foliar da *Macadamia integrifolia*, e à realização de teste do efeito do fosfito de potássio na inibição micelial do fungo, a fim de um possível controle da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características gerais da Macadâmia

A noqueira macadâmia é uma árvore pertencente à família botânica das Proteaceae, sendo as espécies *Macadamia integrifolia* e *Macadamia tetraphylla* as de maior destaque (SOBIERAJSKI et al., 2006). É uma planta arbórea originária da Austrália, mais precisamente dos estados de Queensland (leste e sudeste) e Nova Gales do Sul (norte), ambos os estados na costa leste australiana. Seu *habitat* natural são as florestas tropicais e subtropicais, o que favoreceu a sua adaptação em outros países, tais como Estados Unidos/Havaí, África do Sul, países da América Central e Brasil (SOBIERAJSKI, 2012). A maioria dos plantios é de cultivares da espécie *M. integrifolia* e, em menor número, de *M. tetraphylla* e de híbridos interespecíficos (CEREDA e MARCHI, 1991).

A macadâmia foi descoberta em 1828 por Allan Cunningham e em 1857 iniciaram-se os primeiros estudos Botânicos da espécie. O nome macadâmia partiu de uma homenagem a John MacAdam, que caracterizou diversas espécies de plantas no continente australiano (PIMENTEL, 2007). Depois disso começaram os primeiros plantios de macadâmia na Austrália no ano de 1870, em Alstonville. Em 1877, a espécie foi introduzida no Havaí e, em 1881, na Califórnia (ENTELMANN, 2012). A partir de 1931 começou a ser cultivada comercialmente no Havaí, onde os primeiros pomares foram implantados nas cidades de Keahou e Kona, e os primeiros experimentos passaram a ser desenvolvidos pela Estação Experimental Havaiana (HAES) (DIERBERGUER e MARINO NETO, 1985).

No mundo inteiro existem aproximadamente dez espécies do gênero *Macadamia*, porém somente as espécies *M. integrifolia* e *M. tetraphylla* produzem nozes comestíveis e propiciam possibilidades econômicas. Além disso, a *M. tetraphylla*, em geral, é mais utilizada como porta-enxerto (BRENES, 1983). A macadâmia é uma fruteira muito utilizada como base de medicamentos e cosméticos por tribos aborígenes e a sua noz é considerada a mais saborosa entre as nozes comercializadas, destacando-se em todas as partes do mundo (DE VILIERIS e JOUBERT 2003).

2.2. Características botânicas

A *Macadamia integrifolia* é uma árvore de porte alto, considerada perene, podendo atingir 20 metros de altura e com uma copa que pode chegar a 15 metros de diâmetro. Suas folhas são estreitas e alongadas, bastante duras, cerosas e verdes durante todo o ano. Medem entre 10 e 30 cm, podem apresentar espinhos em suas bordas e em cada entrenó aparecem três folhas (PERDONÁ et al., 2014). As flores estão contidas em inflorescências racemosas em pêndulos axilares, medindo entre 10 e 30 cm de comprimento, com flores perfumadas e brancas. Os frutos são do tipo noz, ovoides, deiscentes, sendo a noz extremamente dura, em cujo interior se encontra a amêndoa de sabor adocicado (LORENZI et al., 2006).

A espécie possui frutos carnosos, compostos por uma casca verde, externa, chamada carpelo, que se abre quando aqueles estão maduros, em torno de seis a sete meses depois da florada. Ao abrir o fruto, aparece uma segunda casca, lisa, marrom e extremamente dura, que protege em seu interior uma noz branca (amêndoa), muito rica em óleo (JOUBERT, 1994; SOBIERAJSKI et al., 2007). O fruto geralmente completa seu desenvolvimento entre os meses de outubro a dezembro (SOBIERAJSKI et al., 2006).

2.3. Condições silviculturais e influências edafoclimáticas

Os fatores edafoclimáticos podem interferir no desenvolvimento e produção da *M. integrifolia*. Os aspectos climáticos e do solo para a implantação da espécie numa região são de extrema importância para seu desenvolvimento, florescimento e produção (SÃO JOSÉ, 1991).

A macadâmia desenvolve-se normalmente em solos com pH em 5,5. A precipitação pluviométrica considerada adequada para o cultivo da noqueira numa região é cerca de 1.200 mm anuais, com temperaturas médias anuais de 24 °C e, no inverno, a temperatura média ideal é em torno de 17° C (PERDONÁ et al., 2014). A região de cultivo deve ter boa distribuição de chuvas durante o ano. Em caso da falta

de chuva deve-se lançar mão da irrigação, principalmente durante os períodos críticos, como na floração (STEPHENSON et al., 2003).

A fertilização recomendada para a cultura no estado de São Paulo é o parcelamento da adubação NPK em quatro vezes ou em dose única para os dois últimos elementos (QUAGGIO et al., 1997).

2.4. O cultivo da macadâmia no Brasil

Apesar de a noz-macadâmia ser encontrada em várias regiões do Brasil, seu cultivo, principalmente comercial, é dado como recente no país. Com isso as informações e recomendações para a cultura têm sido adaptadas de pesquisas realizadas no Havaí e na Austrália. Contudo, a falta de pesquisas que apresentem constantemente dados atualizados torna a produtividade brasileira inferior à de outros países (PERDONÁ et al., 2014; SACRAMENTO et al., 1999; SOBIERAJSKI et al., 2006).

O Brasil é responsável por apenas 3% da produção mundial e tem uma área plantada com espécies de macadâmia com aproximadamente 6 mil hectares (PIMENTEL et al., 2007). Entretanto, estudos de zoneamento agroclimático indicam a disponibilidade de grandes áreas com condições favoráveis para a expansão dessa cultura em solos brasileiros, pois, com exceção do Rio Grande do Norte e Ceará, o litoral de todo o Brasil mais o sul de Minas Gerais, leste do Mato Grosso do Sul e oeste do Paraná apresentam condições climáticas favoráveis ao cultivo da macadâmia (SCHNEIDER et al., 2012).

O Brasil ocupa a sétima posição entre os produtores mundiais de noz-macadâmia, ficando atrás somente da África do Sul, Austrália, China, Quênia, Guatemala e Havaí (EUA) (TOLEDO PIZA e MORIYA, 2014). Entre os estados brasileiros produtores da noz, destacam-se São Paulo (51%), Espírito Santo (15,8%), Minas Gerais (11,9%), Bahia (9%), Rio de Janeiro (7%), Mato Grosso (5,1%) e Paraná (0,2%) (ENTELMANN, 2012).

2.5. *Pestalotiopsis* sp. em *Macadamia integrifolia*

O primeiro relato do fungo *Pestalotiopsis* (*Pestalotia*) causando mancha foliar em *Macadamia integrifolia* foi descrito por Rawal e Muniyappa (1981). Esses autores observaram em agosto de 1980 que os plantios de *M. integrifolia* do Instituto Indiano de Pesquisa Hortícola em Hessaraghatta, na Índia, apresentavam folhas com estágio inicial de infecção, formando pequenas manchas circulares e irregulares e com o passar do tempo essas manchas se coalesciam e formavam manchas foliares irregulares. Por meio da caracterização morfológica do patógeno, os autores descreveram como sendo o agente causal dessa doença a espécie *Pestalotiopsis* (*Pestalotia*) *versicolor* Spag.

Na descrição apresentada por Rawal e Muniyappa (1981) do *P. versicolor* em macadâmia, o fungo apresenta aspecto cotonoso, de cor branca, em meio BDA (BDA (batata-dextrose-ágar). Os acérvulos são notados em meio de cultura após 4 ou 5 dias de cultivo. Os conídios apresentam 5 células, com forma elevada ou elíptica; as 3 células intermediárias são marrons-escuros e as células basal e apical, hialinas. No final das células apicais, apresentam-se inseridos 3 apêndices individualizados e hialinos. Conídios produzidos em BDA medem entre 16-23,5 µm x 3,5-6,5 µm, enquanto os conídios obtidos a partir do hospedeiro medem entre 15-25 µm x 3,5-7 µm.

2.6. O gênero *Neopestalotiopsis*

O gênero *Pestalotiopsis* Steyaert (1949) é o anamorfo de *Pestalosphaeria* M.E. Barr (1975), pertence à família Amphisphaeriaceae e possui várias espécies de fungos, podendo ser patógenos com atividades endofíticas ou saprófitas. Recentemente, Maharachchikumbura et al. (2014) reclassificou algumas espécies de *Pestalotiopsis*, enquadrando-as em um novo gênero, sendo este denominado de *Neopestalotiopsis*.

Uma das maiores revisões do gênero *Neopestalotiopsis*, denominado na época como *Pestalotia*, foi realizada por Guba (1961) em seu trabalho “Monografia sobre *Pestalotia* e *Monochaetia*”, no qual descreveu mais de 200 espécies. Guba (1961) classificou as espécies de *Pestalotia* com base nas diferenças das seções e na coloração das células medianas. As seções foram separadas em quadriloculatae (conídios unicelulares de 4 septos), quinqueloculatae (conídios unicelulares de 5 septos) e sexloculatae (conídios unicelular 6 septos). Para células medianas, o autor atribui as seguintes colorações: concolor; versicolor: olivácea escura e versicolor: olivácea fuliginosa.

Os conidióforos são produzidos dentro de um corpo de frutificação compacto, conhecido como acérvulo (SUTTON, 1980). As características como estrutura de frutificação, comprimento e morfologia de conídios muitas vezes são diferentes para cada espécie e essas características também podem sofrer alterações com mudanças no ambiente, dificultando a identificação correta da espécie (KARAKAYA, 2001).

Atualmente existem 234 espécies de *Pestalotiopsis* descritas¹ (KRUSCHEWSKY, 2010). Kruschewsky (2010), ao realizar um estudo de taxonomia e ecologia do gênero *Pestalotiopsis* no Brasil, descreveu que no Sul da Bahia são encontradas as seguintes espécies: *P. cf. bicolor*, *P. virgulata*, *P. microspora*, *P. suffocata*, *P. clavispora*, *P. mangiferae*, *P. mangifolia*, *P. paeoniae*, *P. carveri*, *P. neglecta*, *P. palmarum*, *Pestalotiopsis* sp.

As espécies patogênicas de *Pestalotiopsis* entram em contato com o hospedeiro, inicialmente, por meio dos conídios. O inóculo é capaz de sobreviver em condições climáticas adversas e pode causar infecções primárias. As fontes de inóculo primário são diversas, podendo ser o próprio hospedeiro ou plantas alternativas, solo infestado, restos culturais, água da irrigação e até mesmo ferramentas contaminadas (ESPINOZA e BRACEÑO, 2008; KEITH et al. 2006; ELLIOTT et al. 2004).

Segundo Bruscato (2011), apesar do reconhecimento da importância crescente do gênero *Pestalotiopsis*, a identificação de isolados em nível de espécie ainda é muito complexa e, em razão disso, há dificuldades para a classificação taxonômica das espécies. Características consideradas relevantes, em chaves baseadas

¹ Cf. o *website* Index Fungorum, disponível em <www.indexfungorum.org>. Acesso em: 13 out. 2016.

exclusivamente na morfologia, nem sempre combinam com a posição taxonômica de isolados obtida por meio de dados de sequenciamento de DNA (BRUSCATO, 2011).

2.7. Fosfito como alternativa de controle de doenças de plantas

Os fosfitos são compostos provenientes do ácido fosforoso (H_3PO_3), originados por meio de uma reação de neutralização com uma base, como hidróxido de potássio, que é o mais frequentemente utilizado como fertilizante (ROMA, 2013). Contudo, fertilizantes à base de fosfitos, por meio do conceito de manejo integrado, vêm sendo empregados no controle de doenças de plantas frutíferas (GEELEN, 1999).

A empregabilidade do fosfito na agricultura é cada vez maior. É bastante explorado como fertilizante foliar de diversas culturas agrícolas e, no território brasileiro, é recomendado com essa finalidade fertilizante. Contudo, o fosfito vem sendo recomendado para utilização no manejo de doenças ocasionadas por Oomicetos em países como Austrália, Estados Unidos e alguns países da Europa (SALA et al. 2004; MILLER et al. 2006; KOUSIK et al. 2011; BOCK et al. 2013; ROMA, 2013).

Dentre várias formulações de fosfito no mercado, a mais empregado é do fosfito de potássio. Este é um sal de ácido fosforoso ligado ao potássio e que apresenta a capacidade de induzir resistência a planta para que esta forme substâncias de autodefesa, protegendo-a do ataque de fungos (SÔNEGO et al., 2002). Sua atividade fungicida na planta deve-se à sua acidez característica, já que seu íon (HPO_3^{2-}) é oriundo do ácido fosforoso (H_3PO_3), de baixa toxidez (COHEN e COFFEY, 1986).

No Brasil, o fosfito de potássio é recomendado como fertilizante foliar. É considerado um produto de baixo custo, não fitotóxico e de baixa toxicidade a mamíferos (DALIO et al., 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização da área de estudo

O estudo foi realizado no laboratório de Fitopatologia e Virologia pertencente ao Departamento de Fitotecnia e Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), *campus* de Vitória da Conquista, na Bahia. A caracterização molecular do patógeno foi realizada em colaboração com o Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), de Piracicaba, no estado de São Paulo.

3.2. Obtenção dos isolados de *Neopestalotiopsis clavispora*

Os isolados de *Neopestalotiopsis sp.* foram obtidos de amostras de plantas de *Macadamia integrifolia* com sintomas de mancha foliar, provenientes de árvores cultivadas no *campus* da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, em Vitória da Conquista. As amostras de folhas com sintomas foram coletadas e encaminhadas ao Laboratório de Fitopatologia e Virologia da UESB para a devida identificação e isolamento do fungo.

O isolamento consistiu na lavagem das folhas em água corrente e desinfestação em solução de hipoclorito de sódio 1% durante um minuto, álcool 70% por um minuto e água destilada e autoclavada por mais um minuto. Este material foi mantido em câmara úmida até o surgimento das estruturas fúngicas que possibilitassem a identificação do mesmo. O isolamento foi feito em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) e incubação por dez dias a 25° C e fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro), para que ocorresse o crescimento e esporulação.

3.3. Teste de patogenicidade

Folhas sadias destacadas de *Macadamia Integrifolia* foram utilizadas no teste de patogenicidade. As folhas destacadas passaram por uma desinfestação superficial com 1% de hipoclorito de sódio durante 2 minutos. Depois disso, as folhas foram lavadas três vezes com água esterilizada. Em seguida, a umidade superficial dos tecidos foi removida com papel-filtro esterilizado antes da inoculação. Culturas puras de *Neopestalotiopsis* sp. crescidas em meio de cultura BDA e mantidas em câmara tipo BOD a 25° C, com fotoperíodo de 12 h por 10 dias, foram utilizadas no teste de patogenicidade. As folhas desinfestadas superficialmente foram ligeiramente feridas com uma agulha estéril e, em seguida, inoculadas com um disco de 5 mm de diâmetro contendo estruturas fúngicas do patógeno. Como testemunha, folhas sadias destacadas foram feridas e inoculadas com discos de igual tamanho contendo apenas o meio puro de BDA. Utilizaram-se 30 folhas sadias destacadas, 25 inoculadas com o patógeno e 5 com apenas discos de BDA. As folhas inoculadas foram colocadas em placas de Petri (15 cm de diâmetro) forrada com papel-filtro molhado. As placas foram colocadas em BOD a 25 °C com um fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de ciclo escuro. Os sintomas nas folhas inoculadas foram observados visualmente a cada 24 h durante 10 dias. Ao final foi realizado um novo isolamento em meio de cultura BDA.

3.4. Caracterização morfológica

Isolados monospóricos do *Neopestalotiopsis* sp. da macadâmia foram estabelecidos e utilizados para a caracterização morfológica dos mesmos.

Novas culturas puras foram estabelecidas em placas com meio BDA e mantidas a 25 °C no escuro durante um período de 14 dias para o aparecimento dos acérvulos do fungo. As lâminas para observação em microscopia foram montadas utilizando-se fucsina ácida como corante, sendo depositadas sobre ela estruturas fúngicas do *Neopestalotiopsis*. Cem conídios foram examinados quanto a forma, tamanho,

número de células, cor e apêndices, sob um microscópio estereoscópico de luz Axiostar Plus (Carl Zeiss®, Alemanha).

3.5. Identificação molecular do patógeno

Micélio e esporos foram coletados a partir de cultura monospórica crescida em BDA por 20 dias. Em seguida, o DNA foi extraído e purificado usando Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As amostras de DNA genômico obtidas do isolado de *Neopestalotiopsis clavispora* foram submetidas à PCR para a amplificação do gene nuclear 5.8S com os dois espaçadores transcritos internos flanqueadores ITS 1 e ITS2 (ITS) e sequências parciais dos genes β -tubulina (TUB2) e fator de alongação 1- α (TEF1), utilizando os pares de *primers* ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990); Bt2a e Bt2b (GLASS e DONALDSON, 1995) e EF-F (SOUZA et al., 2012) e tef997R (SHOUKOUHI e BISSETT, 2008), respectivamente.

Cada reação de PCR conteve 2 μ L de DNA (25 ng μ L⁻¹), 8,5 μ L de Nuclease-Free Water, 1 μ L de cada primer e 12,5 μ L GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, EUA) em um volume total de 25 μ L. O programa para amplificação da região ITS e TUB2 consistiu em desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min; e então uma extensão final a 72 °C por 10 min. Para TEF1, o ciclo de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 min; seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 10 s, anelamento a 58 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min; e então uma extensão final a 72 °C por 4 min. As reações de PCR foram realizadas em termociclador TC-512 (Techne®, EUA).

Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Safe™ (Invitrogen, EUA), em tampão 0,5X Tris-ácido bórico-EDTA (TBE) e visualizados em aparelho transluminador com luz UV. Os produtos obtidos na PCR foram purificados com auxílio do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O

sequenciamento foi realizado em sequenciador 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA).

As sequências obtidas com os *primers forward* e *reverse* foram analisadas e utilizadas para obter sequências em consenso com o programa Sequencher 5.4.1 (GENE CODES CORPORATION, 2016) e posteriormente comparadas com as sequências existentes no GenBank por meio do Basic Local Alignment Sequence Tool (BLAST) (BORATYN et al., 2013). As sequências do GenBank que apresentaram os maiores “escores” foram selecionadas e alinhadas juntamente pelo algoritmo ClustalW com o programa BioEdit (HALL, 1999). Para concatenar os amplicons foi utilizado o programa Mesquite (MADDISON e MADDISON, 2011). As sequências geradas foram depositadas no GenBank com os seguintes números de acesso: ITS: KX721071; TEF1: KX721072 e TUB2: KX721073.

Para cada *loco* analisado, foi determinado o melhor modelo de substituição de nucleotídeos com base no critério de informação Akaiki (AIC) com auxílio do programa MrModeltest v.2.3 (NYLANDER, 2004). Com as sequências concatenadas foi construída a análise filogenética por meio da inferência Bayesiana usando o algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para gerar as probabilidades posteriores. Um isolado de *Pseudopezalotiopsis cocos* (CBS 27229) foi utilizado como *outgroup*. Quatro cadeias MCMC foram executadas simultaneamente com 1×10^7 gerações e amostradas a cada 1000 gerações, sendo descartadas 25% das árvores iniciais. Para a análise filogenética, a inferência Bayesiana foi conduzida três vezes no programa MrBayes v.3.1.1 (RONQUIST e HUELSENBECK, 2003). As árvores foram editadas no programa TreeView (PAGE, 1996).

3.6. Efeito *in vitro* do fosfito de potássio no crescimento micelial do *Neopestalotiopsis clavispora* da *Macadamia integrifolia*

Para o teste de inibição, utilizou-se o produto comercial Phytogard Potássio, cujo nome técnico é fosfito de potássio, que contém em sua composição P_2O_5 e K_2O , nas concentrações de 596 e 298 g.L⁻¹ de ingrediente ativo, respectivamente.

O fosfito de potássio foi adicionado em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) fundente a 45-50°C, diluídos em série, de modo a se obter as respectivas concentrações do produto comercial: 0, 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 ppm. Após o preparo, 20 mL de meio de cultura foi vertido em cada placa de Petri com nove centímetros de diâmetro. Placas contendo meio BDA, sem adição de fosfito de potássio, foram utilizadas como testemunha (0 ppm).

Discos de meio BDA de 7 mm de diâmetro, colonizados por *Neopestalotiopsis* sp. foram retirados dos bordos de colônias com sete dias de crescimento e inoculados no centro de cada placa de Petri. Após as repicagens, as placas foram incubadas em BOD com fotoperíodo de 12 horas, a 25 °C, por um período de dez dias. O experimento seguiu o delineamento inteiramente ao acaso com 7 tratamentos (T1 = 0, T2 = 10, T3 = 50, T4 = 100, T5 = 250, T6 = 500, T7 = 1000 ppm) com quatro repetições. A testemunha consistiu de placas contendo discos somente com colônias do patógeno em meio BDA.

A avaliação do crescimento micelial do *Neopestalotiopsis* sp. foi realizada a cada dois dias até uma ou mais placas da testemunha preencher toda a placa de Petri (10 dias), por meio da medição do diâmetro das colônias, com o auxílio de uma régua milimétrica, em dois sentidos perpendiculares entre si, tomando-se como valor de crescimento a média das duas medidas. Os resultados obtidos foram submetidos às análises de variância e de regressão, com o auxílio do programa estatístico SASM-Agri, versão 8.2 (CANTERI et al., 2001).

Com a média de diâmetros das colônias foi calculada a percentagem de inibição dos tratamentos em relação à testemunha, pela seguinte fórmula:

$$\%I = (C-T) / C \times 100$$

Em que:

%I = percentagem de inibição;

C = diâmetro médio do crescimento micelial da testemunha;

T = diâmetro médio do crescimento micelial do tratamento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção dos isolados do patógeno

Durante o período de estudo foram realizados, aproximadamente, 180 isolamentos de *Neopestalotiopsis* sp. oriundos de folhas de macadâmia com sintomas de manchas foliares irregulares, de coloração marrom-claro e de tamanhos variados, conforme se observa na Figura 1A. Com o auxílio de um estereomicroscópio foi possível observar os acérvulos do fungo sobre a face adaxial das folhas (Figura 1B), de onde foram retirados os esporos para a obtenção das culturas puras do fungo.



Figura 1 – Sintomas da mancha foliar da macadâmia (A) e acérvulos do *Neopestalotiopsis* sp. presentes na lesão na face adaxial da folha (B).

4.2. Patogenicidade dos isolados de *Neopestalotiopsis* sp.

Todas as 25 folhas sadias destacadas e inoculadas com discos de BDA contendo estruturas fúngicas do patógeno apresentaram sintomas a partir do segundo dia depois da inoculação, ao passo que todas as testemunhas, inoculadas apenas com discos de BDA puro, mantiveram-se livres de sintomas até o término dos testes de patogenicidade aos 10 dias. Lesões provocadas em qualquer parte estrutural das

plantas, seja por um fator biótico ou abiótico, pode servir de porta de entrada para patógenos, e, nesse teste, ferimentos foram provocados nas folhas, o que explica o rápido aparecimento dos sintomas nas folhas inoculadas com o fungo causador da mancha foliar da macadâmia. Azevedo et al. (2009), ao realizar testes de patogenicidade com folhas de macadâmia inoculadas com *Neopestalotiopsis* sp. com e sem a ocorrência de ferimentos nas folhas, relataram que todas as folhas inoculadas apresentaram sintomas, porém naquelas que foram inoculadas com ferimentos os sintomas surgiram mais rapidamente que nas folhas inoculadas sem ferimentos.

A reprodução dos sintomas nas folhas no teste de patogenicidade corresponde aos mesmos sintomas característicos daqueles observados em campo: folhas com manchas de coloração marrom-claro, com formato irregular e de tamanhos variados. Foi possível observar ainda que as folhas inoculadas com 2 discos de meio BDA com estruturas fúngicas do patógeno coalesceram em poucos dias, afetando uma maior área da folha (Figura 2).

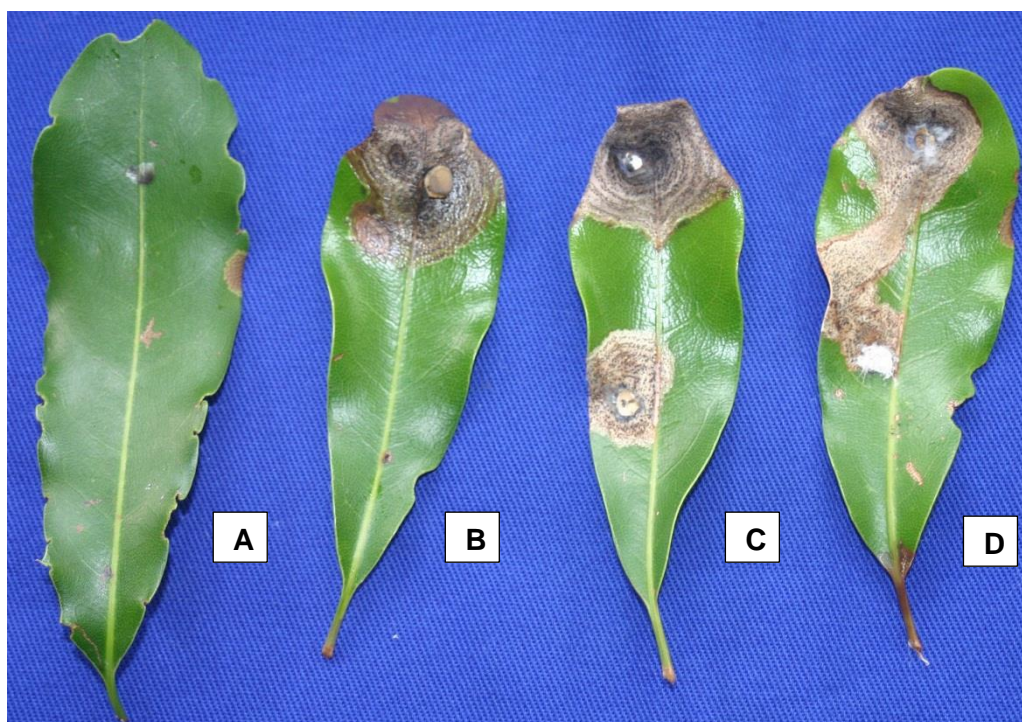


Figura 2 – Lesões necróticas em folhas de macadâmia inoculadas com 1 e 2 discos de BDA com o patógeno. A) Testemunha. B) Folha com 1 disco. C) Folha com 2 discos. D) Folhas com 2 discos e coalescimento da mancha.

Estudos de patogenicidade com *Neopestalotiopsis* sp. em folhas de nogueira-pecã realizados por Lazarotto (2013) mostraram que, nas folhas inoculadas com

suspensões de esporos do patógeno, as manchas coalesceram depois de alguns dias, formando lesões maiores, semelhantes às de uma queima foliar com intensa esporulação do fungo.

O gênero *Neopestalotiopsis* é considerado como um importante fungo causador de manchas foliares em diversas espécies florestais. Manchas foliares causadas por *Neopestalotiopsis* sp. foram descritas por Labarca et al. (2006) como uma doença bastante grave que leva a grandes perdas na América do Sul e Central pelo fato de infectar diversos hospedeiros.

Ao final dos testes de patogenicidade em folha, o *Neopestalotiopsis clavispora* foi reisolado, comprovando a ação patogênica do patógeno na macadâmia. Resultados semelhantes aos obtidos por Coelho et al. (2011) em estudos de patogenicidade de isolados de *Neopestalotiopsis* sp. em plantas de palma de óleo permitiram concluir que os testes realizados foram suficientes para obter todos os isolados do fungo com reisolamento.

4.3. Caracterização morfológica do *Neopestalotiopsis clavispora*

A espécie de *Neopestalotiopsis* caracterizada morfológicamente neste estudo apresentava conídios de formato fusiforme a clavado, com 4 septos, em linhas retas ou ligeiramente curvadas. A célula basal longa apresenta formato cônico e coloração hialina; com 3 células medianas com septos e paredes periclinais mais escuras do que o resto das células, versicolor, de coloração marrom-escura para olivácea; a segunda célula, a partir da base, apresenta uma coloração castanho-claro; a terceira célula tem cor marrom mais escura; sendo a quarta célula mais escura; com uma célula apical curta, de formato cônico largo, subcilíndrica e de coloração hialina (Figura 3).

As estruturas de 100 conídios foram medidas em microscópio de luz com um aumento de 1000 vezes, os quais apresentaram os seguintes tamanhos: 17,9-27,5 µm de comprimento, 5,1-6,8 µm de largura, apêndices basais com 3,5-7,4 µm de comprimento; as 3 células medianas com 11-17,3 µm de comprimento, sendo a segunda célula com 3,1-6,2 µm, a terceira célula com 3,2-6,1 µm e a quarta célula

com 3,1-5,9 μm . Os apêndices apicais apresentaram 16,3-29,3 μm de comprimento. Estas características morfológicas são semelhantes àquelas descritas por Maharachchikumbura et al. (2012) para a espécie *Neopestalotiopsis clavispora*. Esses autores relataram essa mesma espécie infectando *Quercus rubra* nos EUA e *Magnolia* sp. na China.

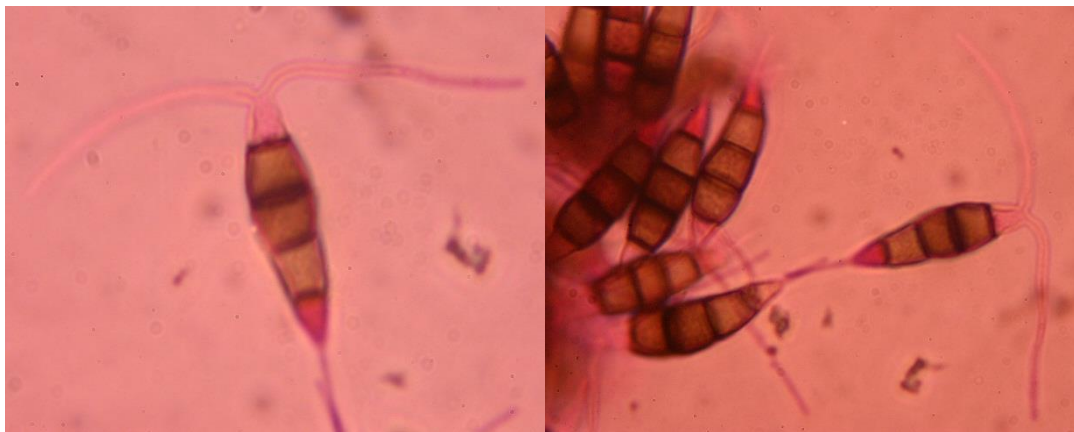


Figura 3 – Conídios de *Neopestalotiopsis clavispora*, em meio BDA (Aumento 1000 x).

Lu et al. (2015), em estudos para identificar o agente causal da mancha foliar marrom em *Myrica rubra* Siebold e Zucc. na China, também identificou a espécie *Neopestalotiopsis clavispora* como sendo causadora daquela doença e apresentando morfolologicamente as seguintes características: conídios com tamanhos de 17,6-25,5 x 6,1-7,4 μm ; células basais cônicas e hialinas com uma base de apêndice de 3,2-6,5 μm de comprimento; 3 células medianas com 11,5-16,1 μm de comprimento, sendo a segunda célula com 3,6-5,3 μm , a terceira célula com 4,1-5,6 μm e a quarta célula com 3,8-5,4 μm . Os apêndices apicais apresentavam 17,5-31,3 μm de comprimento. Essas informações corroboram os dados encontrados neste estudo.

Nas pesquisas realizadas por Maharachchikumbura et al. (2012), as medidas das estruturas dos conídios de *N. clavispora* encontradas foram: conídios com 18-26 x 6,5-8,5 μm ; célula basal com 4-5 μm de comprimento; com três células medianas de 13,7-15,3 μm de comprimento; segunda célula com 4,3-5,3 μm de comprimento; terceira célula com 5-6,4 μm de comprimento; quarta célula, 4,5-5,8 μm de comprimento; célula apical, 3,3-4,2 μm de comprimento; apêndices apicais, 19-30 μm de comprimento. Medidas semelhantes para conídios de *N. clavispora* foram descritas por Kruschewsky (2010) quando realizou um estudo sobre a taxonomia e ecologia do gênero *Neopestalotiopsis* no Brasil, na região da Mata Atlântica do sul da Bahia. Na

região de Ilhéus, na Bahia, a autora descreveu as seguintes características morfológicas do *N. clavispora*: comprimento dos conídios de 22-27 µm; largura do conídio de 5-7 µm; comprimento do apêndice apical de 20-31 (33) µm; comprimento do apêndice basal de 5-8 (10) µm; número de apêndices de 2 a 3 e coloração mediana concolor. Já na região de Una (BA) o comprimento dos conídios foi de 20-28 (30) µm; largura dos conídios de 6-7 µm; comprimento do apêndice apical de (8) 10-23 µm; comprimento do apêndice basal de 5-12 µm; número de apêndice de 2-3 e coloração mediana concolor. Esses resultados evidenciam que as características morfológicas de uma mesma espécie podem ter uma pequena variação de uma região para outra.

4.4. Caracterização molecular do *Neopestalotiopsis clavispora*

Após o sequenciamento foram gerados fragmentos de 525 (ITS), 453 (TUB2) e 595 (TEF1) pares de bases e depositados no GenBank-NCBI, sob os números de acesso KX721071, KX721073 e KX721072, respectivamente.

Comparações das sequências de nucleotídeos do isolado da macadâmia com outras sequências depositadas no GenBank mostraram uma identidade de 98% (TEF1), 99% (TUB2) e 100% (ITS) com isolados padrões representativos de *Neopestalotiopsis clavispora* (JX399044, JX399013 e JX398978). Estes isolados padrões, *N. clavispora* MFLUCC 12-0280 e MFLUCC 12-0281, foram isolados utilizados por Maharachchikumbura et al. (2014) para demarcação (identificação) da espécie e para a nova nomenclatura proposta.

Devido à similaridade genética, sequências de *Neopestalotiopsis* e *Pestalotiopsis* foram utilizadas para a construção da árvore filogenética. Uma sequência de *Pseudopestalotiopsis* foi utilizada como *outgroups*.

A concatenação das sequências obtidas (ITS, TUB2 e TEF1) também apresentou alta similaridade genética com os dois isolados padrões representativos deste gênero, obtidos junto ao GenBank-NCBI (Figura 4).

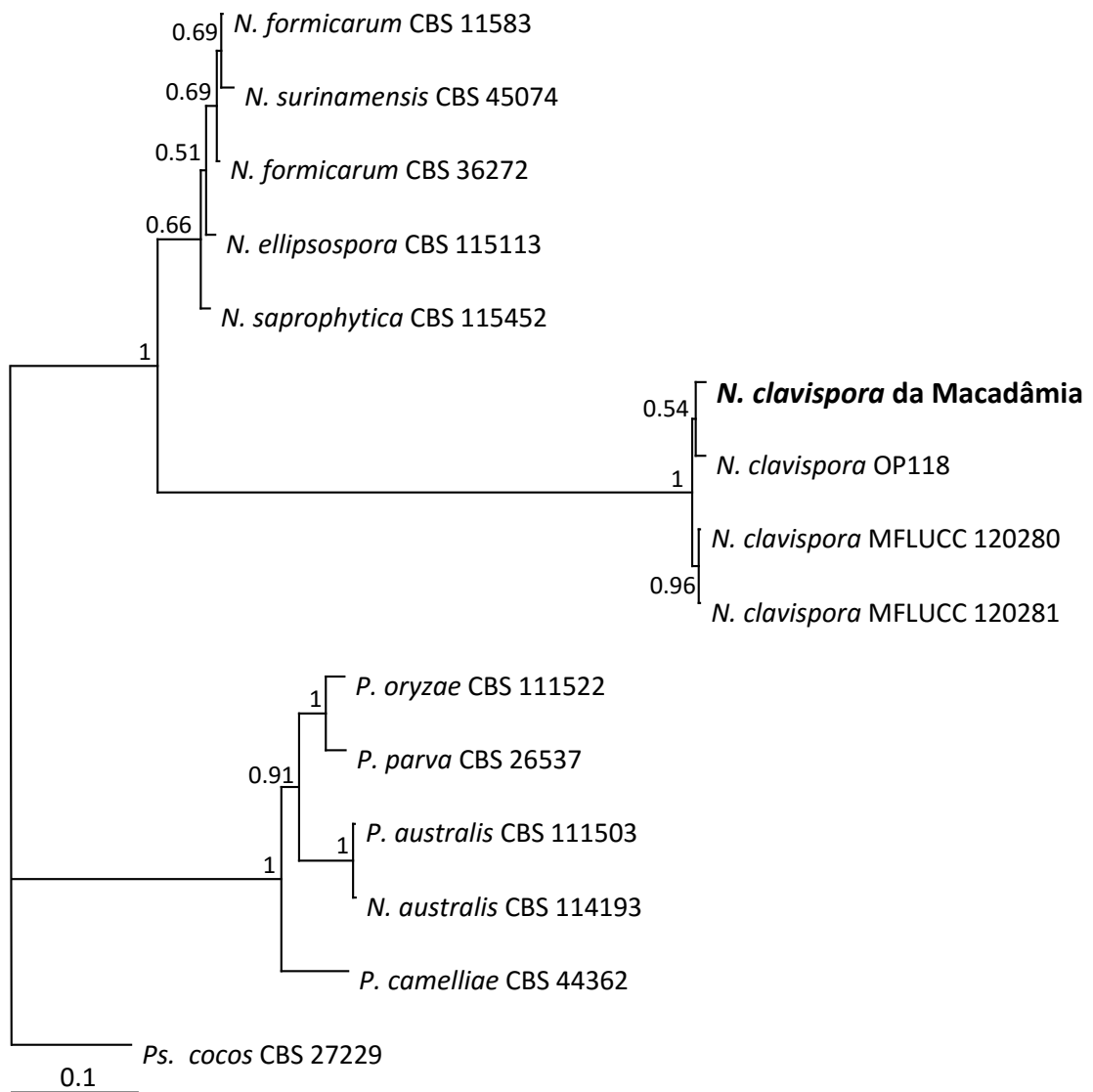


Figura 4 – Árvore filogenética construída por Inferência Bayesiana baseada na concatenação de sequências ITS, TUB2 e TEF1 de isolados de *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*. Os números nos nós são valores de probabilidade posterior bayesiana. O isolado destacado em negrito é referente a este estudo.

4.5. Efeito *in vitro* do fosfito de potássio no crescimento micelial do *Neopestalotiopsis clavispora* da *Macadamia integrifolia*

Na primeira avaliação, dois dias após o isolamento, já foi possível observar o efeito do fosfito de potássio inibindo o crescimento micelial do *N. clavispora*, a partir da concentração de 100 ppm, tendendo a aumentar a inibição com acréscimo de concentração do fosfito de potássio, mas começando a estabilizar a partir da concentração de 500 ppm (Figura 5). No entanto, foi observado ainda que nessa primeira avaliação houve uma pressão seletiva do microrganismo quando se aumentou a concentração do fosfito de potássio, com elevação da curva do gráfico.

O modelo que apresentou ajuste satisfatório aos dados da inibição de diâmetro médio das colônias de *N. clavispora* crescidas em diferentes concentrações do fosfito de potássio em meio BDA foi o de regressão polinomial quadrática (Figura 5, 6 e 7).

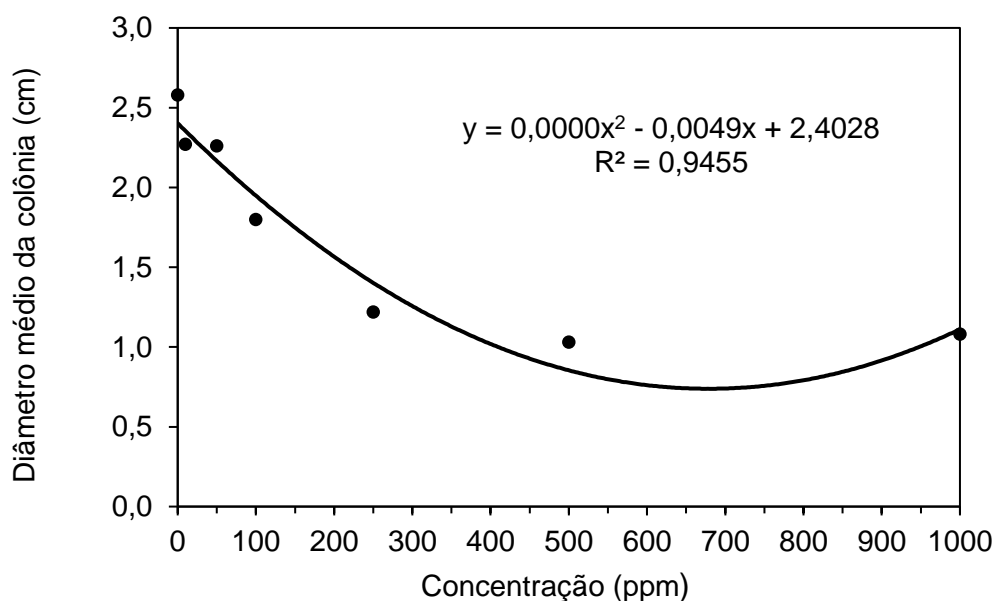


Figura 5 – Crescimento micelial do *N. clavispora* sobre diferentes concentrações de fosfito de potássio no meio BDA na primeira avaliação.

Nota-se que com 4 e 6 dias de incubação, segunda e terceira avaliações, respectivamente, o fosfito de potássio inibiu o crescimento micelial do patógeno já nas dosagens de 10 e 50 ppm (Figura 6). Rocha Sobrinho (2015), testando o efeito *in vitro*

do fosfito de potássio em diferentes concentrações sobre o *Fusarium solani*, relatou inibição do crescimento micelial do fungo a partir da concentração de 10 ppm.

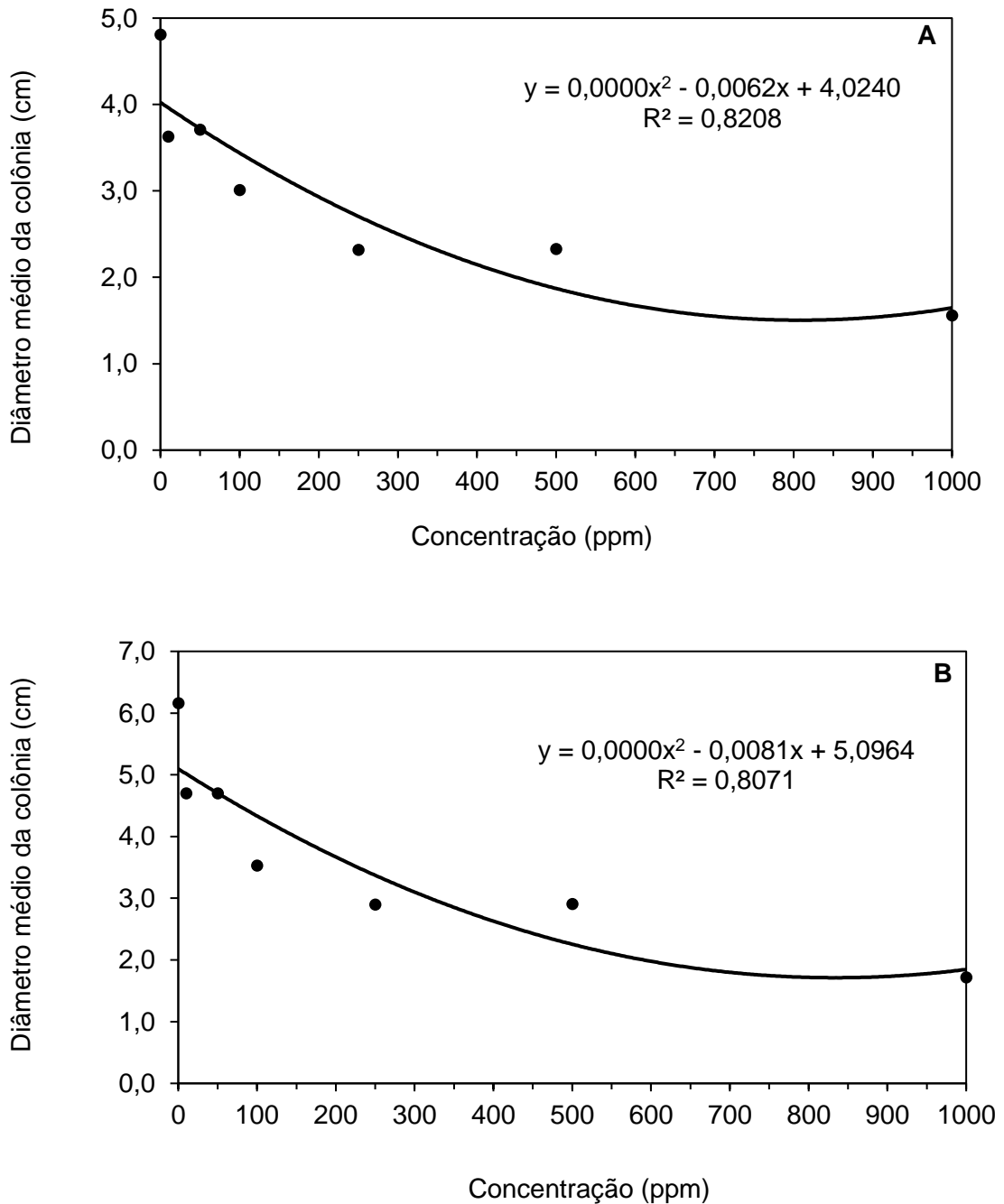


Figura 6 – Crescimento micelial do *N. clavispora* sobre diferentes concentrações de fosfito de potássio no meio BDA. A) Segunda avaliação. B) Terceira avaliação.

O efeito inibitório do fosfito de potássio no crescimento micelial do *Neopestalotiopsis clavispora* mostrou-se mais evidente nas duas últimas avaliações, aos 8 e 10 dias após a inoculação. À medida que a concentração de fosfito de potássio aumentava, intensificava-se a inibição da colônia (Figura 7).

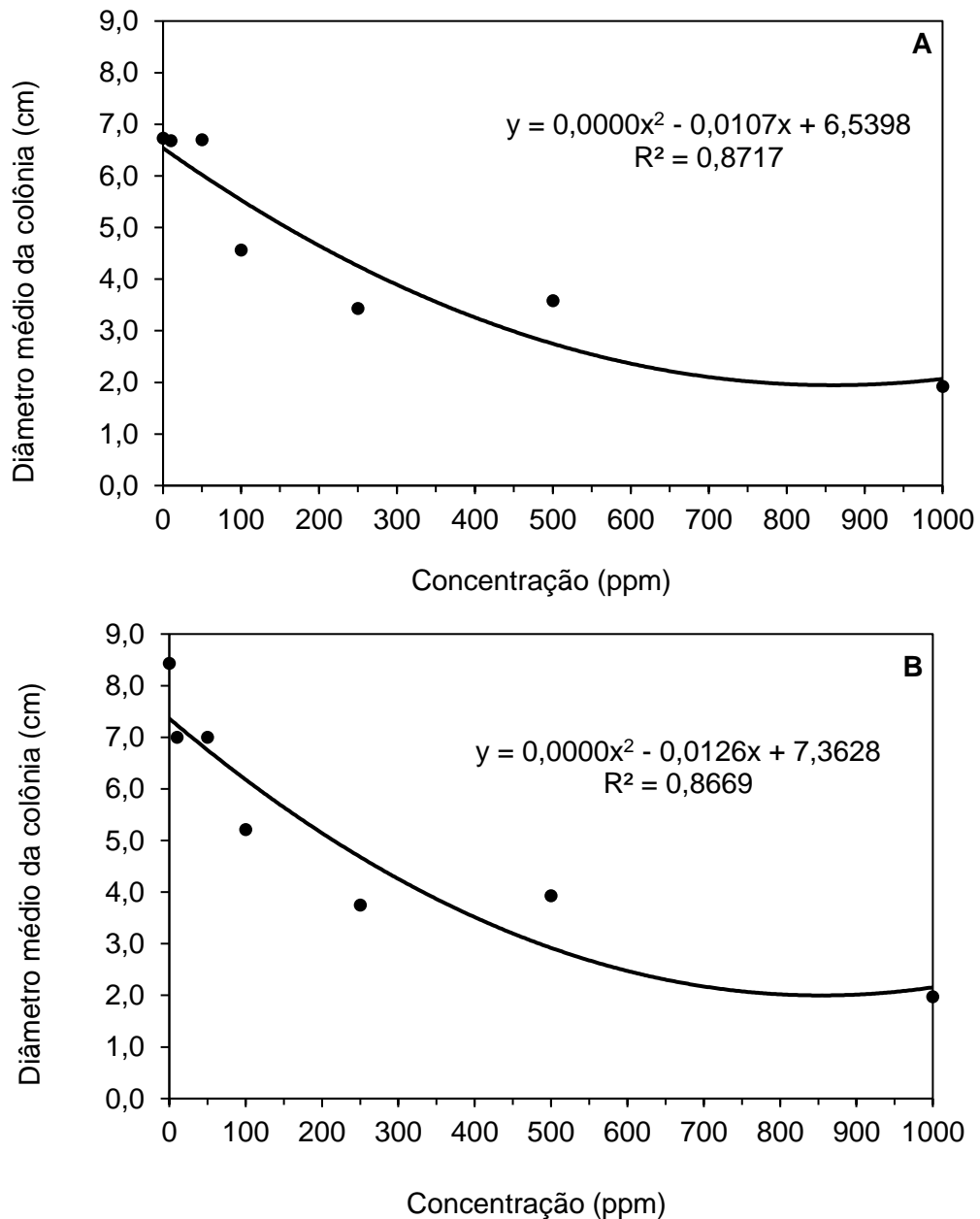


Figura 7 – Crescimento micelial do *N. clavispora* sobre diferentes concentrações de fosfito de potássio no meio BDA. A) Quarta avaliação. B) Quinta avaliação.

Explicita-se, assim, que o produto tem uma ação efetiva sobre o crescimento micelial do patógeno nas concentrações entre 250 a 500 ppm (Figura 8), tendendo a estabilizar a partir desse ponto.

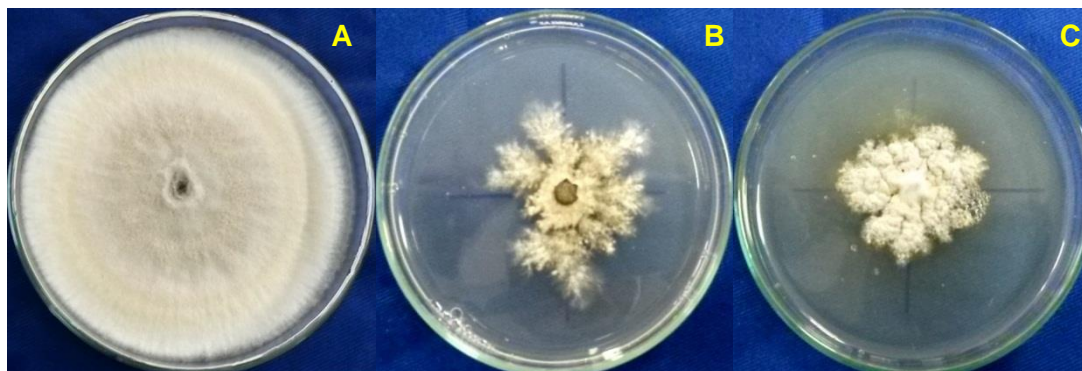


Figura 8 – Crescimento micelial de *Neopestalotiopsis clavispora* em diferentes concentrações de fosfito de potássio aos 10 dias de incubação. A) 0 ppm. B) 250 ppm. C) 500 ppm.

O percentual de inibição no crescimento micelial do *Neopestalotiopsis clavispora* sobre diferentes concentrações de fosfito de potássio foi de mais de 50% a partir da dosagem de 250 ppm em todas as avaliações do segundo ao décimo dia de incubação (Tabela 1), sendo que na concentração de 1000 ppm o percentual de inibição chegou a 76,6 % aos 10 dias depois da incubação.

Tabela 1 – Porcentagem de inibição *in vitro* do *Neopestalotiopsis clavispora* em meio de cultura BDA sobre diferentes concentrações de fosfito de potássio durante 10 dias de incubação.

Doses de Fosfito de potássio (ppm)	% de inibição				
	2º dia	4º dia	6º dia	8º dia	10º dia
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	12,0	24,5	23,7	0,7	17,0
50	12,4	22,9	23,7	0,4	17,0
100	30,2	37,4	42,7	32,2	38,2
250	52,7	51,8	52,9	52,3	55,5
500	60,1	51,6	52,8	53,5	53,4
1000	58,1	67,6	72,1	71,5	76,6

Caixeta et al. (2012), ao realizar pesquisa similar a esse estudo, observou diminuição no crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* quando submetido a doses diferentes de fosfito de potássio. Os autores destacam ainda que as inibições foram mais intensas nas maiores concentrações do produto, observando menor velocidade no crescimento micelial em função do tempo de incubação. Os estudos realizados por Rocha Sobrinho (2015) com *Fusarium solani* em diferentes doses de fosfito de potássio promoveram um percentual de 84,3% de inibição do crescimento micelial na concentração de 500 ppm do produto e 91,5% com a dosagem de 1000 ppm.

Pesquisas realizadas por Lovatt e Mikkelsen (2006) citam trabalhos considerando a ação do fosfito de potássio diretamente sobre o fungo, enquanto outros estudos chamam atenção para a ativação dos mecanismos de defesa da planta acionados pelo produto. Para Fenn e Coffey (1989), o fosfito de potássio age diretamente sobre os patógenos, inibindo o crescimento micelial e esporulação. Eles consideraram em seus estudos que o efeito desse produto seria tão efetivo quanto o do fosetil-Al, pois o modo de ação é similar ao do fungicida.

5. CONCLUSÕES

A patogenicidade do *Neopestalotiopsis clavispora* foi confirmada com os resultados positivos em todas as folhas sadias de macadâmia inoculadas com o fungo.

Através da caracterização morfológica e molecular foi possível identificar o agente causal da mancha foliar da *Macadamia integrifolia* como sendo a espécie *Neopestalotiopsis clavispora*.

O fosfito de potássio teve ação efetiva sobre a inibição *in vitro* do crescimento micelial do *N. clavispora*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMS - Australian Macadamia Society. **Frequently-asked questions, Macadamias in the Orchard, What growing conditions best suit macadamias?**. Lismore, 2012. Disponível em: <macadamias.org/pages/faqs>. Acesso em: 16 jun. 2016.

AZEVEDO, G. B.; DIAS, P. C.; NOVAES, Q. S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. à *Pestalotiopsis* sp., agente causal de mancha foliar em *Macadamia integrifolia*. In: I Seminário Florestal do Sudoeste da Bahia - Recursos florestais para o Semi-árido, 2009. **Anais...** Vitória da Conquista: Edições UESB, p. 14-18, 2009. Disponível em: <<http://www.uesb.br/eventos/seeflor/publicacoes/I-SEEFOR-BAHIA-2009.pdf>>. Acesso em: 13 out. 2016.

_____; FERREIRA, G. F. P.; SOUSA, G. T. O.; NOVAES, Q.S. Fungos associados a árvores e arbustos em vias públicas de Vitória da Conquista, BA. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, vol.7, n. 12, 2011.

BOCK, C.H.; BRENNEMAN, T.B.; HOTCHKISS, M.W.; WOOD, B.W. Trunk applications of phosphite for the control of foliar and fruit scab on pecan. **Crop Protection**, Guildford, v. 54, p. 213-220, 2013.

BORATYN, G. M.; CAMACHO, C.; COOPER, P. S.; COULOURIS, G.; FONG, A.; MA, N.; MADDEN, T. L.; MATTEN, W. T.; MCGINNIS, S. D.; MEREZHUK, Y.; RAYTSELIS, Y.; SAYERS, E. W.; TAO, T.; YE, J.; ZARETSKAYA, I. BLAST: a more efficient report with usability improvements. **Nucleic Acids Research**, 41, 29–33, 2013.

BRENES, G.C. **El cultivo de la macadamia**. San Jose: Editorial Cafesa, 1983, 75 p.

BRUSCATO, E. C. **Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos na Descoloração de Corantes da Indústria Têxtil**. Curitiba-PR: UFPR, 2011, 118 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná.

CAIXETA, A. O.; VIEIRA, B. S.; CANEDO, E. J. Efeito do fosfito de potássio sobre fungos fitopatogênicos do feijoeiro. **Revista do Centro Universitário de Patos de Minas**. Patos de Minas, UNIPAM, (3):35-43, nov. 2012. ISSN 2178-7662. Disponível em: <<http://revistaagrociencias.unipam.edu.br/documents/57126/58776/efeito-fosfito.pdf>>. Acesso em: 13 out. 2016.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM – Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p. 18-24, 2001.

CEREDA, E.; MARCHI, M. Botânica e caracterização da noqueira macadâmia. In: SÃO JOSÉ, A. R. (Ed.). Macadâmia: tecnologia de produção e comercialização. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, p. 5-28, 1991.

COELHO, I. L.; BOARI, A. de J.; TREMACOLDI, C. R.; SILVA, J. F. Patogenicidade de isolados de *Pestalotiopsis* sp. em plantas de palma de Óleo cultivadas no estado do Pará. In: 15 Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental, 2011, Belém. **Anais...** Belém, 2011.

COHEN, M. D.; COFFEY, M. D. Systemic fungicides and the control of oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 311-338, 1986.

DALIO, R. J. D.; RIBEIRO JUNIOR, P. M.; RESENDE, M. L. V.; SILVA, A. C.; BLUMER, S.; PEREIRA, V. F.; OSSWALD, W.; PASCHOLATI, S. F. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: RAPP, v. 20. p. 206-242, 2012.

DE VILIERIS, E. A.; JOUBERT, P. H. **The cultivation of macadamia**. Nelspruit: ARC, 2003, 200 p.

DIERBERGER, J. E.; MARINO NETTO, L. **Noz Macadâmia, uma nova opção para a fruticultura brasileira**. Piracicaba: ESALQ, 1985, 120 p.

ELLIOTT, M. L.; UCHIDA, J. Y. **Diseases and disorders of ornamental palms**. St. Paul: AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, 2004.

ENTELMANN, F. A. **Produção e desenvolvimento da noqueira macadâmia em clima Cwa**. Piracicaba-SP: ESALQ/USP, 2012, 70 p. Tese (Doutorado em Ciências (Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz").

ESPINOZA, J. G.; BRACEÑO, E. X. Canker and twig dieback of lueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile. **Plant Disease**, St. Paul, v. 92, n. 10, p. 1407-1414, out. 2008.

FENN, M. E.; COFFEY, M. D. Quantification of phosphonate and ethyl phosphate in tobacco and tomato tissues and significance for the mode of action of two phosphonate fungicides. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 1, p. 76-82, Jan. 1989.

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

GEELLEN, J. A. An evaluation of Agri-Fos Supra 400 for the control of black spot and powdery mildew of apple in Hawke's Bay. New York, NY. **Independent Horticultural Consultants**, 1999.

GENE CODES CORPORATION, 2016. Sequencher® version 5.4.1 sequence analysis software. Disponível em: <<http://www.genecodes.com>>. Acesso em: 20 mai. 2016.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323–30, 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167388/pdf/611323.pdf>>. Acesso em: 13 out. 2016.

GUBA, E. F. **Monograph of *Pestalotia* and *Monochaetia***. Cambridge, Massachusetts USA: Harvard University Press, 1961, 342 p.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n. 41, p. 95–8. 1999. Disponível em: <<http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>. Acesso em: 13 out. 2016.

INC. **International nut & dried druit**. Disponível em: <<https://www.nutfruit.org/en>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

JOUBERT, A. J. **The cultivation of macadamias**. Crops: Institute for Tropical and Subtropical, 1994, 66 p. (Bulletin, 426).

KARAKAYA, A. First report of Infection of kiwifruit by *Pestalotiopsis* sp. In: Turkey. **Plant Disease**, v. 85, n. 9, p. 1028, 2001.

KEITH, L. M.; VELASQUEZ, M. E.; ZEE, F. T. Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, n. 1, p. 16-23, jan. 2006.

KOUSIK, C. S.; ADAMS, M. L.; JESTER, W. R.; HASSEL, R.; HARRISON, H. F.; HOLMES, G. J. Effect of cultural practices and fungicides on Phytophthora fruit rot of watermelon in the Carolinas. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, p. 888-894, 2011.

KRUSCHEWSKY, M. C. **Taxonomia e ecologia do gênero *Pestalotiopsis* no Brasil, com ênfase para a Mata Atlântica do Sul da Bahia**. Ilhéus-BA: UESC, 2010, 68 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Santa Cruz.

LABARCA, M.; SANABRIA, N.; ARCIA, A. Patogenicidad de *Pestalotiopsis palmarum* Cooke, sobre plantas de vivero de palma aceitera (*Elaeis guineenses* Jacq.). **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 23, n. 4, Caracas, oct., 2006.

LAZAROTTO, M. **Identificação e caracterização de *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. associados a *Carya illinoensis* no Rio Grande do Sul.** Santa Maria-RS: UFSM, 2013, 156 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria.

SOBIERAJSKI, H.; BACHER, L. B.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas:** (de consumo in natura). Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 672 p.

LOVATT, C. J.; MIKKELSEN, R. L. Phosphite fertilizers: what are they? Can you use them? What can they do? **Better Crops**, Norcross, v. 90, n. 4, p. 11-13, 2006.

LU, L. M.; CHEN, G. Q.; HU, X. R.; DU, D. C.; PU, Z. X.; PENG, A. T.; CHENG, B. P. Identification of *Pestalotiopsis clavispora* causing brown leaf spot on Chinese bayberry in China. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 37, n. 3, p. 397-402, 2015.

MADDISON, W. P.; MADDISON, D. R. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. Disponível em: <<http://mesquiteproject.org>>. Acesso em: 20 mai. 2016.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S.; HYDE, K. D.; GROENEWALD, J. Z.; XU, J.; CROUS, P. W. *Pestalotiopsis* revisited. **Studies in Mycology**, v. 79, p. 121-186, 2014.

_____; GUO, L-D.; CAI, L.; CHUKEATIROTE, E.; WU, W. P.; SUN, X.; CROUS, P. W.; BHAT, D. J.; MCKENZIE, E. H. C.; BAHKALI, A. H.; HYDE, K. D. A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species. **Fungal Diversity**, v. 56, p. 95-129, 2012.

MILLER, J. S.; OLSEN, N.; WOODDELL, L.; PORTER, L. D.; CLAYSON, S. Postharvest applications of zoxamide and phosphate for control of potato tuber rots caused by oomycetes at harvest. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 83, p. 405-411, 2006.

NYLANDER, J. A. A. MrModeltest v2.3. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004.

PAGE, R. D. M. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, v. 12, n. 4, p. 357–358. 1996.

PERDONÁ, M. J.; Nakayama, F. T.; ABRANCHES, J. L. Fatores Ecológicos e o Cultivo da noqueira-macadâmia. **X Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 10, n. 7, 2014, p. 61- 84.

PIMENTEL, L. D. A cultura da macadâmia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 3, p. 414-716, 2007.

_____; SANTOS, C. E. M.; WAGNER JÚNIOR, A.; SILVA, V. A.; BRUCKNER, C. H. Estudo de viabilidade econômica na cultura da noz-macadâmia no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 500-507, 2007.

QUAGGIO, J. A.; RAIJ, B. V.; PIZA JUNIOR, C. T. Frutíferas. In: RAIJ, B. van; QUAGGIO, A. J.; CANTARELLA, H.; FURLANI, A. M. C. (Org.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas, Instituto Agrônomo, 1997. p. 121-153.

RAWAL, R. D.; MUNIYAPPA, N. C. A new disease of macadamia. **Current Science**, Bangalore, v. 50, n. 23, p. 1035, 1981.

ROCHA SOBRINHO, G. G. **Epidemiologia comparativa de viroses e efeito de fosfito de potássio no crescimento do *Fusarium solani* do maracujazeiro**. UESB, 2015, 65 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

ROMA, R. C. C. **Fosfito de potássio no controle de doenças pós-colheita em bagas de uva 'Itália' e possíveis mecanismos de ação à *Rhizopus stolonifer***. Piracicaba-SP: ESALQ/USP, 2013, 94 p. Tese (Doutorado em Ciências (fitopatologia)) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.; MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572–1574, 2003.

SACRAMENTO, C. K.; PEREIRA, F. M.; PERECIN, D.; SABINO, J. C. Capacidade combinatória para frutificação em cultivares de noqueira-macadâmia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n.11, p. 2045-2049, 1999.

SALA, F. C.; DA COSTA, C. F.; ECHER, M. M.; MARTINS, M. C.; BLAT, S. F. Phosphite effect on hot and sweet pepper reaction to *Phytophthora capsici*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, p. 462-495, 2004.

SÃO JOSÉ, A. R. Exigências edafoclimáticas para a cultura da macadâmia. In: SÃO JOSÉ, A. R. (Org.). **Macadâmia: tecnologia de produção e comercialização**. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1991, p. 29-38.

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.

SHOUKOUHI, P.; BISSETT, J. **Preferred primers for sequencing the 5' end of the translation elongation factor 1-alpha gene (eEF1a1)**. ISTH. Disponível em: <<http://www.isth.info/methods>>. Acesso em: 13 out. 2008.

SOBIERAJSKI, G. R. **Desenvolvimento e uso de marcadores SSR e DArT para estudos de diversidade genética em macadâmia (*Macadamia integrifolia*)**. Piracicaba-SP: ESALQ/USP, 2012, 94 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

_____; 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.

_____; FRANCISCO, V. L. F. S.; ROCHA, P.; GHILARDI, A. A.; MAIA, M. L. Noz-macadâmia: produção, mercado e situação no Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 36, n. 5, p. 25-36, 2006.

_____. _____. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 36, n.5, p. 25-36, 2005.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. da R.; BOTTON, M.; SORIA, S. de J.; HICKEL, E. R. **Recomendações para o manejo das doenças fúngicas e das pragas da videira**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2002. 12 p. (Circular técnica, 39).

SOUZA, J. I.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A.; SANTOS, J. F.; COSTA, J. P.; HARAKAVA, R. Isomucor (Mucoromycotina): a new genus from a Cerrado reserve in state of São Paulo, Brazil. **Mycologia**, v. 104, p. 232-241, 2012.

STEPHENSON, R. A.; GALLAGHER, E. C.; DOOGAN, V. J. Macadamia responses to mild water stress at different phenological stages. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 54, p. 67-75, 2003.

STEYAERT, R. L. Contributions a l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. Et Monochaetia Sacc. (*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov.). **Bulletin du Jardin Botanique. Etat Bruxelles**, v. 19, p. 285–354, 1949.

SUTTON, B. C. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Kew: **Commonwealth Mycological Institute**, 1980, 960 p.

TOLEDO PIZA, P. L. B; MORIYA, L. M. Cultivo da macadâmia no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura** [online]. vol. 36, n.1, p. 39-45, 2014. ISSN 0100-2945. DOI: 10.1590/0100-2945-444/13.

WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.; GELFAND, D.;

SNINSKY, J.; WHITE, T. (Ed.). **PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications**. Orlando, Florida: Academic Press, 1990, p. 315-22.