

**MARCOS GIOVANE PEDROZA DE ABREU**

**ALTERNATIVAS DE CONTROLE DAS PRINCIPAIS DOENÇAS EM MACADÂMIA  
(*Macadamia integrifolia*) E DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Cladosporium* QUE  
INCIDEM NA CULTURA NO BRASIL**

**Botucatu**

**2025**



**MARCOS GIOVANE PEDROZA DE ABREU**

**ALTERNATIVAS DE CONTROLE DAS PRINCIPAIS DOENÇAS EM MACADÂMIA  
(*Macadamia integrifolia*) E DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Cladosporium* QUE  
INCIDEM NA CULTURA NO BRASIL**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientador: Dr. Bernardo A. Halfeld Vieira

**Botucatu**

**2025**

A162a

Abreu, Marcos Giovane Pedroza de

Alternativas de controle das principais doenças em macadâmia (*Macadamia integrifolia*) e diversidade de espécies de *Cladosporium* que incidem na cultura no Brasil / Marcos Giovane Pedroza de Abreu. -- Botucatu, 2025  
114 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu

Orientador: Bernardo de Almeida Halfeld Vieira

1. bactérias antagonistas. 2. *Botryosphaeriaceae*. 3. green mould. 4. resistência. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: ALTERNATIVAS DE CONTROLE DAS PRINCIPAIS DOENÇAS EM MACADÂMIA (*Macadamia integrifolia*) E DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Cladosporium* QUE INCIDEM NA CULTURA NO BRASIL

**AUTOR: MARCOS GIOVANE PEDROZA DE ABREU**

**ORIENTADOR: BERNARDO DE ALMEIDA HALFELD VIEIRA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas), pela Comissão Examinadora:

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

Documento assinado digitalmente  
 **BERNARDO DE ALMEIDA HALFELD VIEIRA**  
Data: 17/06/2025 12:12:24-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisadora Dr.<sup>a</sup> ALESSANDRA KEIKO NAKASONE (Participação Virtual)  
área de Fitopatologia / Embrapa Florestas – Colombo

Documento assinado digitalmente  
 **ALESSANDRA KEIKO NAKASONE**  
Data: 17/06/2025 11:44:49-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> SONIA CLAUDIA DO NASCIMENTO DE QUEIROZ (Participação Virtual)  
área de Química / Embrapa Meio Ambiente - Jaguariúna

Documento assinado digitalmente  
 **SONIA CLAUDIA DO NASCIMENTO DE QUEIROZ**  
Data: 17/06/2025 11:49:33-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO (Participação Virtual)  
Departamento de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu UNESP

Documento assinado digitalmente  
 **EDSON LUIZ FURTADO**  
Data: 17/06/2025 11:54:13-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> MARIA CÂNDIDA DE GODOY GASPAROTO (Participação Virtual)  
Departamento de Agronomia e Recursos Naturais / Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira - UNESP

Documento assinado digitalmente  
 **MARIA CÂNDIDA DE GODOY GASPAROTO**  
Data: 17/06/2025 11:59:22-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Botucatu, 17 de junho de 2025



A minha mãe Maria Jocimar, a minha esposa  
Jussara Lima, meus irmãos Estéfane e Júnior e  
sobrinhos,

dedico



## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pela vida, pela saúde, pela força nos momentos difíceis e por iluminar meu caminho ao longo desta trajetória.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira, pela orientação, paciência, incentivo e ensinamentos que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório e amigos que caminharam ao meu lado, deixo minha gratidão pelas trocas de conhecimento, pelo apoio e pela amizade que tornaram essa jornada mais leve.

Aos professores e funcionários do departamento de proteção vegetal, pelo suporte acadêmico, técnico e administrativo durante todo o curso.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Meio Ambiente pela infraestrutura disponibilizada.

À minha família, meu porto seguro, que sempre acreditou em mim, oferecendo amor, compreensão e apoio incondicional, mesmo nos momentos mais desafiadores.

Ao CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudos concedida.

A empresa QueenNut Macadâmia por todo o suporte e materiais disponibilizados para a realização deste trabalho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para esta conquista, o meu mais sincero muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – CAPES – Código de financiamento 001.



## RESUMO

A macadâmia (*Macadamia integrifolia*) é uma cultura de alto valor agregado e sua noz é muito apreciada tanto no mercado nacional quanto internacional, isto devido ao seu sabor e suas características nutricionais, que a coloca como um alimento altamente saudável e benéfico a saúde. Alguns patógenos têm limitado o desenvolvimento e a produtividade da cultura. Além disso, para o controle destes, não há defensivos registrados no Brasil. Portanto, o uso do controle biológico se torna uma medida potencialmente mais sustentável, sendo uma medida ecologicamente amigável e eficiente. Assim, este trabalho teve como objetivo promover o controle da queima de ramos (*Cladosporium xanthochromaticum*) e cancro do caule (*Lasiodiplodia pseudotheobromae*) em macadâmia (*M. integrifolia*) por meio de agentes de controle biológico. Bactérias antagonistas foram isoladas a partir de ramos de macadâmia. Isolados obtidos foram testados contra *C. xanthochromaticum* e *L. pseudotheobromae* *in vitro* e *in vivo*. Os melhores antagonistas obtidos a partir de testes *in vitro*, foram utilizados em experimentos a campo (*C. xanthochromaticum*) e em mudas sobre condições de casa de vegetação (*L. pseudotheobromae*), este, utilizando variedades de combinações porta-enxerto/cultivares. Nos ensaios com mudas, inicialmente foi realizado experimentos para determinar a virulência de isolados de *L. pseudotheobromae* sobre três variedades (HAES 741, HAES 333 e IAC 4-12B). Foi realizado também para os antagonistas testes a fim de se determinar os mecanismos de ação pelo quais exercem atividade de biocontrole e alguns foram submetidos a testes de compatibilidade com ingredientes ativos registrados para a cultura. Para a queima dos ramos (*C. xanthochromaticum*), estirpes de *Serratia ureilytica* e *Bacillus subtilis* destacaram-se no controle do fitopatógeno, reduzindo sua incidência e esporulação. *S. ureilytica* reduziu tanto a incidência quanto a esporulação de *C. xanthochromaticum*, enquanto *B. subtilis* reduziu a esporulação nos experimentos realizados. Ambas demonstraram ação inibitória por compostos voláteis e não voláteis, além de competir por nutrientes. As estirpes foram compatíveis com os pesticidas testados, exceto *S. ureilytica*, sensível somente ao hidróxido de cobre. Para o cancro do caule (*L. pseudotheobromae*), a severidade da doença variou dependendo da combinação porta-enxerto/cultivar e do isolado de *L. pseudotheobromae*. *Bacillus velezensis* e *Bacillus subtilis* reduziram a severidade da doença, mas sua eficácia dependeu da variedade da copa. Nossos resultados indicam

que a resistência ao cancro do caule em mudas enxertadas varia conforme o isolado de *L. pseudotheobromae* e o genótipo da copa, influenciando também a severidade da doença no porta-enxerto. Os resultados indicam que as estirpes selecionadas podem ser incorporadas ao manejo integrado de doenças na macadâmia, reduzindo o uso de defensivos químicos. Por fim, dois novos isolados de *Cladosporium* spp. foram submetidos a testes de patogenicidade em racemos de macadâmia e estes demonstraram ser patogênicos a cultura. Os isolados foram identificados por técnicas moleculares e caracterizados morfolologicamente sendo identificados como *Cladosporium tenuissimum* e *Cladosporium* sp.

**Palavras-chave:** bactérias antagonistas; Botryosphaeriaceae; green mould; resistência.

## ABSTRACT

The macadamia (*Macadamia integrifolia*) is a high-value crop, and its nut is highly appreciated both in domestic and international markets due to its flavor and nutritional characteristics, which classify it as a highly healthy and beneficial food. However, certain pathogens have limited the crop's development and productivity. Furthermore, there are currently no registered chemical control products for macadamia diseases in Brazil. Therefore, biological control emerges as a potentially more sustainable alternative, offering an environmentally friendly and efficient disease management strategy. This study aimed to promote the control of raceme blight (*Cladosporium xanthochromaticum*) and stem canker (*Lasiodiplodia pseudotheobromae*) in macadamia (*M. integrifolia*) through the use of biological control agents. Antagonistic bacteria were isolated from macadamia racemes. The isolates obtained were tested against *C. xanthochromaticum* and *L. pseudotheobromae* under both *in vitro* and *in vivo* conditions. The most promising antagonists from the *in vitro* assays were selected for field experiments (targeting *C. xanthochromaticum*) and greenhouse experiments using grafted seedlings (targeting *L. pseudotheobromae*), the latter involving different rootstock/scion combinations. In the greenhouse trials, initial experiments were conducted to assess the virulence of *L. pseudotheobromae* isolates on three macadamia varieties (HAES 741, HAES 333, and IAC 4-12B). Additional assays were performed to elucidate the biocontrol mechanisms employed by the antagonists, and selected strains were subjected to compatibility tests with active ingredients registered for use in macadamia cultivation. Regarding raceme blight (*C. xanthochromaticum*), strains of *Serratia ureilytica* and *Bacillus subtilis* demonstrated effective control, significantly reducing pathogen incidence and sporulation. *S. ureilytica* was able to reduce both the incidence and sporulation of *C. xanthochromaticum*, whereas *B. subtilis* effectively suppressed sporulation in the conducted experiments. Both strains exhibited inhibitory activity through the production of volatile and non-volatile compounds and through nutrient competition. Moreover, the strains were compatible with the tested pesticides, except for *S. ureilytica*, which was sensitive only to copper hydroxide. For stem canker (*L. pseudotheobromae*), disease severity varied depending on the rootstock/scion combination and the *L. pseudotheobromae* isolate. *Bacillus velezensis* and *Bacillus subtilis* effectively reduced disease severity; however, their efficacy was dependent on the scion genotype. Our findings indicate that

resistance to stem canker in grafted macadamia seedlings varies according to the *L. pseudotheobromae* isolate and the scion genotype, which also influences disease severity in the rootstock. The results suggest that the selected bacterial strains can be integrated into macadamia disease management programs, contributing to the reduction of chemical pesticide use. Finally, two novel *Cladosporium* spp. isolates were subjected to pathogenicity tests on macadamia racemes and were confirmed to be pathogenic to the crop. These isolates were identified using molecular techniques and morphologically characterized, being classified as *Cladosporium tenuissimum* and *Cladosporium* sp.

**Keywords:** antagonistic bacteria; Botryosphaeriaceae; green mould; resistance.

## SUMÁRIO

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....                                                                     | 17 |
| <b>CAPÍTULO 1 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ANTAGONISTAS PARA</b>                                          | 19 |
| <b>CONTROLE DA QUEIMA DE RÁCEMOS (<i>Cladosporium</i></b>                                         |    |
| <b><i>xanthochromaticum</i>) EM MACADÂMIA (<i>Macadamia</i></b>                                   |    |
| <b><i>integrifolia</i>)</b> .....                                                                 |    |
| 1.1 INTRODUÇÃO.....                                                                               | 19 |
| 1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                       | 21 |
| 1.2.1 Obtenção do fitopatógeno e dos isolados bacterianos.....                                    | 21 |
| 1.2.2 Seleção massal.....                                                                         | 22 |
| 1.2.3 Identificação dos antagonistas.....                                                         | 23 |
| 1.2.4 Ensaio a campo.....                                                                         | 25 |
| 1.2.5 Caracterização dos mecanismos de controle de <i>Cladosporium</i>                            | 26 |
| <i>xanthochromaticum</i> por <i>Bacillus</i> sp. e <i>Serratia</i> sp.....                        |    |
| 1.2.5.1 Similaridade nutricional.....                                                             | 26 |
| 1.2.5.2 Produção de quitinase.....                                                                | 27 |
| 1.2.5.3 Produção de $\beta$ -1,3-glucanase.....                                                   | 27 |
| 1.2.5.4 Antibiose por compostos voláteis.....                                                     | 27 |
| 1.2.5.5 Determinação dos compostos voláteis (VOCs).....                                           | 28 |
| 1.2.5.6 Processo de extração por micro extração em fase sólida (SPME).....                        | 28 |
| 1.2.5.7 Análise instrumental.....                                                                 | 29 |
| 1.2.5.8 Inibição da germinação de conídios por filtrado livre de células.....                     | 29 |
| 1.2.6 Compatibilidade de bactérias antagonistas com defensivos agrícolas                          | 30 |
| usados em macadâmia no Brasil.....                                                                |    |
| 1.3 RESULTADOS.....                                                                               | 31 |
| 1.3.1 Isolamento dos antagonistas.....                                                            | 31 |
| 1.3.2 Seleção massal.....                                                                         | 31 |
| 1.3.3 Identificação dos antagonistas.....                                                         | 33 |
| 1.3.4 Ensaio a campo.....                                                                         | 36 |
| 1.3.4.1 Ensaio 1.....                                                                             | 36 |
| 1.3.4.2 Ensaio 2.....                                                                             | 37 |
| 1.3.5 Identificação e caracterização dos mecanismos de controle de                                | 39 |
| <i>Cladosporium xanthochromaticum</i> por <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Serratia ureilytica</i> . |    |

|         |                                                                                                                                                                |           |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.3.5.1 | Similaridade nutricional.....                                                                                                                                  | 39        |
| 1.3.5.2 | Antibiose por compostos voláteis.....                                                                                                                          | 42        |
| 1.3.5.3 | Determinação dos compostos voláteis.....                                                                                                                       | 43        |
| 1.3.5.4 | Inibição da germinação de conídios por filtrado livre de células.....                                                                                          | 44        |
| 1.3.6   | Compatibilidade de bactérias antagonistas com defensivos agrícolas usados em macadâmia no Brasil.....                                                          | 45        |
| 1.4     | DISCUSSÃO.....                                                                                                                                                 | 46        |
| 1.5     | CONCLUSÃO.....                                                                                                                                                 | 50        |
|         | REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                               | 51        |
|         | <b>CAPÍTULO 2 BIOCONTROL POTENTIAL OF STEM BLIGHT IN MACADAMIA PLANTLETS BY <i>Bacillus</i> spp. IN PLANTS WITH DIFFERENT SCION-ROOTSTOCK COMBINATION.....</b> | <b>64</b> |
| 2.1     | INTRODUCTION.....                                                                                                                                              | 64        |
| 2.2     | MATERIALS AND METHODS.....                                                                                                                                     | 66        |
| 2.2.1   | Fungal Isolates.....                                                                                                                                           | 66        |
| 2.2.2   | Plant Material.....                                                                                                                                            | 66        |
| 2.2.3   | Virulence of <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> Isolates on Macadamia Varieties.....                                                                        | 67        |
| 2.2.4   | Efficacy of Antagonistic Bacteria against <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> in Macadamia.....                                                              | 67        |
| 2.2.4.1 | Antagonists.....                                                                                                                                               | 67        |
| 2.2.4.2 | Dual Culture Assay.....                                                                                                                                        | 67        |
| 2.2.4.3 | Mycelial Growth Inhibition by Cell-Free Filtrate (CFF).....                                                                                                    | 68        |
| 2.2.4.4 | Identification of Selected Antagonistic Bacteria.....                                                                                                          | 68        |
| 2.2.4.5 | Biocontrol in Plants.....                                                                                                                                      | 69        |
| 2.2.4.6 | Chitinase Production.....                                                                                                                                      | 70        |
| 2.2.4.7 | $\beta$ -1,3-Glucanase Production.....                                                                                                                         | 70        |
| 2.3     | RESULTS.....                                                                                                                                                   | 70        |
| 2.3.1   | Virulence of <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> isolates on macadamia varieties.....                                                                        | 70        |
| 2.3.2   | Efficacy of Antagonistic Bacteria Against <i>L. pseudotheobromae</i> in Macadamia.....                                                                         | 72        |

|         |                                                                                                                                                              |            |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.3.2.1 | Dual Culture Assay and Mycelial Growth Inhibition by Cell-Free Filtrate (FLC).....                                                                           | 72         |
| 2.3.2.2 | Identification of Antagonistic Bacteria.....                                                                                                                 | 73         |
| 2.3.2.3 | Biocontrol in Plants.....                                                                                                                                    | 75         |
| 2.4     | DISCUSSION.....                                                                                                                                              | 77         |
|         | REFERENCES.....                                                                                                                                              | 81         |
|         | <b>CAPÍTULO 3 DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE <i>Cladosporium</i> ASSOCIADAS A QUEIMA DOS RACEMOS EM MACADÂMIA (<i>Macadamia integrifolia</i>) NO BRASIL.....</b> | <b>86</b>  |
| 3.1     | INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                              | 87         |
| 3.2     | MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                                      | 88         |
| 3.2.1   | Obtenção dos Isolados.....                                                                                                                                   | 88         |
| 3.2.2   | Obtenção de culturas monospóricas.....                                                                                                                       | 89         |
| 3.2.3   | Teste de patogenicidade em racemos destacados.....                                                                                                           | 90         |
| 3.2.4   | Caracterização morfológica.....                                                                                                                              | 90         |
| 3.2.5   | Identificação molecular.....                                                                                                                                 | 91         |
| 3.2.6   | Análise filogenética.....                                                                                                                                    | 92         |
| 3.2.7   | Teste de sensibilidade a fungicidas.....                                                                                                                     | 93         |
| 3.3     | RESULTADOS.....                                                                                                                                              | 94         |
| 3.3.1   | Patogenicidade.....                                                                                                                                          | 94         |
| 3.3.2   | Análise Filogenética.....                                                                                                                                    | 95         |
| 3.3.3   | Morfologia e Características Culturais.....                                                                                                                  | 96         |
| 3.3.4   | Sensibilidade a Fungicidas.....                                                                                                                              | 98         |
| 3.4     | DISCUSSÃO.....                                                                                                                                               | 102        |
|         | REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                             | 106        |
|         | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                                                                                                             | <b>111</b> |
|         | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                      | <b>113</b> |



## INTRODUÇÃO GERAL

A noqueira macadâmia (*Macadamia integrifolia*), pertencente à família Proteaceae, é uma planta predominante do hemisfério sul tendo sua origem na Austrália e é adaptada a regiões de clima subtropical. Apesar de ser originária da Austrália, foi no Havaí que a cultura teve um grande salto pelo desenvolvimento de tecnologias que melhoraram a condução da cultura, originando a maioria das variedades que são plantadas até hoje mundialmente. No Brasil, apesar do crescimento dos últimos anos a cultura ainda não é muito conhecida, uma vez que a maioria das nozes produzidas no país é destinada à exportação (Piza; Piza; Almeida Neto, 2019; Toledo Piza; Moriya, 2014).

A produção mundial da noz é centrada basicamente na espécie *M. integrifolia* e em menores casos *M. tetraphylla*, em que esta última tem sido utilizada mais constantemente como porta-enxerto (Pimentel *et al.*, 2007). Além das espécies mencionadas existem as espécies *M. ternifolia* e *M. jansanii* todas de origem australiana e produtoras de nozes, porém *M. tetraphylla*, *M. ternifolia* e *M. jansanii* apresentam nos frutos maduros altos níveis de glicosídeos cianogênicos, o que limita o consumo das nozes produzidas por estas espécies. A espécie *M. integrifolia* também apresenta altos níveis desta substância durante a fase de desenvolvimento do fruto, porém na fase de maturação há um declínio na concentração desta substância, sugere-se que esta seja uma adaptação das plantas contra ataques de herbívoros (Hardner *et al.*, 2009).

Um dos principais fatores que limitam a produtividade na cultura é a ocorrência de pragas e doenças. A cultura é acometida por patógenos que podem impedir o seu desenvolvimento, desde a fase de viveiro até a fase produtiva (Bright, 2024). Dentre as doenças que podem incidir sobre a cultura, a queima dos racemos e o cancro do caule se destacam por seu potencial destrutivo e limitante para a produtividade. A queima dos racemos é causada por um complexo de espécies de fungos pertencentes aos gêneros, *Botrytis* (*B. cinerea* e *B. macadamiae*), *Neopestalotiopsis*/*Pestalotiopsis* (*N. macadamiae*, *N. drenthii*, *N. maddoxii*, *N. olumideae*, *N. vheenae*, *N. zakeelii*, *P. macadamiae* e *P. telopeae*) e *Cladosporium* (*C. cladosporioides*, *C. angulosum*, *C. angustisporum*, *C. devikae*, *C. macadamiae*, *C. proteacearum* e *C. xanthochromaticum*). Estes patógenos incidem sobre as estruturas florais e impedem o desenvolvimento dos frutos (Akinsanmi, 2015; Akinsanmi *et al.*, 2017; Prasannath;

Galea; Akinsanmi, 2023; Silva *et al.*, 2024) . O cancro do caule é causado por fungos principalmente da família Botryosphaeriaceae (*Lasiodiplodia theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *L. iraniensis*, *Neofusicoccum parvum*, *N. luteum*, *N. australe*, *N. kwambonambiense*) e mais recentemente fungos pertencentes a Diaporthaceae (*Diaporthe ilicicola* e *Di. macadamiae*). Estes patógenos incidem sobre o caule ou ramos das plantas, podendo afetar desde mudas a plantas em plena produção, levando-as a morte (Jami; Morey, 2024; Jeff-Ego; Akinsanmi, 2019; Mohankumar; Dann; Akinsanmi, 2022; Silva *et al.*, 2024).

No Brasil, até o momento, a queima dos racemos tem sido atribuída a *C. xanthochromaticum*, enquanto o cancro do caule tem como agente causal *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (Silva *et al.*, 2024). O controle destes patógenos é centrado principalmente em medidas culturais e físicas. A macadâmia é uma cultura de suporte fitossanitário insuficiente o que limita as opções disponíveis para o manejo dessas doenças. Portanto, o uso do controle biológico se torna uma medida potencialmente mais sustentável, por não acarretar efeitos tóxicos ao ambiente. O uso do controle biológico de patógenos tem crescido a cada ano e auxiliado na redução do uso de produtos químicos ao mesmo tempo que contribui para o equilíbrio dos agroecossistemas (Köhl; Kolnaar; Ravensberg, 2019).

Para a seleção de antagonistas, o conhecimento da diversidade de microrganismos que colonizam a planta-alvo pode auxiliar em programas de controle biológico de doenças, uma vez que, ao se isolar antagonistas, deve-se priorizar aqueles que já são residentes do microbioma em estudo. (Köhl *et al.*, 2011). Estes antagonistas podem controlar fitopatógenos por meio de vários mecanismos como, competição, antibiose, parasitismo e indução de resistência, de forma isolada ou pela ação de mais de um mecanismo (Crowley-Gall *et al.*, 2021; Gschwend *et al.*, 2021; Köhl; Kolnaar; Ravensberg, 2019; Temple *et al.*, 2020).

Diante desse contexto, este trabalho teve como objetivo selecionar bactérias antagonistas para o controle da queima dos racemos, causada por *C. xanthochromaticum*, e do cancro do caule, causado por *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, em macadâmia. Além disso, novas espécies de *Cladosporium* são relatadas, pela primeira vez, como agentes causais da queima dos racemos nessa cultura.

## CAPÍTULO 1

### Seleção de bactérias antagonistas para controle da queima de ramos (*Cladosporium xanthochromaticum*) em macadâmia (*Macadamia integrifolia*)<sup>1</sup>

**Resumo:** As doenças florais da macadâmia, como a queima dos ramos, são um dos principais fatores limitantes à produção da cultura. Além disso, a ausência de produtos registrados para o manejo fitossanitário agrava esse desafio. Nesse contexto, agentes de biocontrole surgem como uma alternativa sustentável e eficaz para o manejo integrado de doenças. Este estudo teve como objetivo selecionar bactérias antagonistas para o controle da queima dos ramos da macadâmia, causada por *Cladosporium xanthochromaticum*. Para isso, bactérias foram isoladas de ramos de macadâmia, identificadas e testadas contra o fitopatógeno em experimentos *in vitro* e *in vivo* (ramos e plantas em campo). Além disso, avaliou-se seus mecanismos de ação e compatibilidade com pesticidas registrados para a cultura. Estirpes de *Serratia ureilytica* e *Bacillus subtilis* destacaram-se no controle do fitopatógeno, reduzindo sua incidência e esporulação. *S. ureilytica* reduziu tanto a incidência quanto a esporulação de *C. xanthochromaticum*, enquanto *B. subtilis* reduziu a esporulação somente nos experimentos realizados *in vitro*. Ambas demonstraram ação inibitória por compostos voláteis e não voláteis, além de competir por nutrientes. As estirpes foram compatíveis com os pesticidas testados, exceto *S. ureilytica*, sensível somente ao hidróxido de cobre. Os resultados indicam que essas estirpes podem ser incorporadas ao manejo integrado de doenças na macadâmia, reduzindo o uso de defensivos químicos.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Serratia ureilytica*, *Cladosporium* blight, Green mould, Antosfera

### 1.1 INTRODUÇÃO

A macadâmia (*Macadamia integrifolia*) é uma planta originária da Austrália, cujo cultivo se expandiu para outros países como, África do Sul, EUA, Havai, China, Quênia, Guatemala, Malawi, Vietnã, Colômbia, Nova Zelândia e Brasil. Atualmente, Austrália e África do Sul são os maiores produtores da noz, totalizando 50% da produção mundial. No Brasil, a noz macadâmia configura o nono lugar do mercado de produção de nozes e castanhas (INC, 2022). A demanda pelo produto tem aumentado consideravelmente e os produtores têm buscado estratégias para atender esta demanda, principalmente por meio da expansão das áreas de produção. Dados relacionados à área cultivada da cultura no Brasil são escassos, porém estima-se que o país representa 3% da produção mundial (INC, 2021), sendo a maior parte da produção destinada ao mercado externo. O Brasil é um país que apresenta uma elevada capacidade para a expansão do cultivo de macadâmia, principalmente pelas condições de clima tropical e subtropical (NOGUEIRA, 2008).

---

<sup>1</sup> Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico Crop Protection

Um fator que tem limitado a sua produtividade é principalmente a ocorrência de pragas e doenças que incidem na cultura, principalmente as que afetam o desenvolvimento dos frutos. Na Austrália, na safra 2023/2024, as doenças florais foram limitantes para a produtividade, com impactos menores apenas que às doenças causadas por *Phytophthora* (BRIGHT, 2024). No Brasil, a queima dos ramos (*Cladosporium xanthochromaticum*) é um dos principais problemas fitossanitários da cultura (HALFELD-VIEIRA et al., 2024; SILVA et al., 2024). Por afetar os órgãos reprodutivo, a doença pode levar a uma baixa frutificação e perdas de até 80% na produção (PRASANNATH; GALEA; AKINSANMI, 2021). Isso se deve não somente à morte das flores que poderiam gerar novos frutos, mas também pelo impacto que pode causar na polinização de flores sadias, visto que a formação de frutos é dependente de agentes polinizadores para que haja fecundação, pois as plantas apresentam elevada autoincompatibilidade com o próprio pólen (HOWLETT et al., 2015; TRUEMAN, 2013).

Uma limitação ao seu controle é o fato de que não há defensivos registrados para o controle da queima dos ramos da macadâmia no Brasil, sendo as medidas de manejo da doença são baseados principalmente em práticas culturais como a condução de podas na copa para um melhor arejamento das flores e a eliminação de ramos remanescentes de safras anteriores (BRIGHT, 2024; HALFELD-VIEIRA et al., 2024; PRASANNATH; GALEA; AKINSANMI, 2022). A falta de opções, faz com que os produtores tendam a utilizar produtos com registros para outras culturas que apresentem problemas semelhantes (NOGUEIRA, 2008).

Desta forma, o controle biológico pode ser adotado no manejo da doença, uma vez que tem se demonstrado ser uma prática de menor impacto. Agentes de biocontrole podem controlar fitopatógenos por meio de vários mecanismos de ação, como antibiose por compostos voláteis e não voláteis, competição por espaço ou nutrientes, indução de mecanismos de defesa no hospedeiro e parasitismo (KÖHL; KOLNAAR; RAVENSBERG, 2019). O uso do controle biológico de patógenos tem crescido a cada ano e auxiliado na redução do uso de produtos químicos ao mesmo tempo que contribui para o equilíbrio dos agroecossistemas. Entretanto, embora na literatura haja vários estudos reportando o potencial de antagonistas selecionados no controle de doenças, tanto da parte aérea quanto de patógenos disseminados pelo solo (GSCHWEND et al., 2021; HALFELD-VIEIRA et al., 2015; MATES; PONTES; HALFELD-VIEIRA, 2019; MIKICIŃSKI et al., 2020; PACIFICO; ECKSTEIN; BETTIOL,

2021; TEMPLE et al., 2020), há carência de dados referentes ao controle de biológico de doenças da antosfera, ambiente cujos órgãos estão sob influência das flores (COMPANT et al., 2019; KIM et al., 2023; TEMMERMANS et al., 2025). O presente estudo teve como objetivo selecionar bactérias antagonistas capazes de promover o controle da queima dos racemos da macadâmia e demonstrar por quais mecanismos atuam. Para isso, ensaios foram realizados para (1) Isolar e identificar bactérias antagonistas da antosfera; (2) avaliar a efetividade de controle da doença em racemos destacados e em campo; (3) determinar os mecanismos de ação envolvidos no controle do fitopatógeno pelos antagonistas.

## 1.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.2.1 Obtenção do fitopatógeno e dos isolados bacterianos

A cepa de *Cladosporium xanthochromaticum* CMAA1835 utilizada neste estudo foi obtida a partir da Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo, Brasil.

A coleta de racemos para o isolamento de antagonistas foi realizada no ano de 2021, na área comercial da empresa QueenNut Macadamia, localizada no município de Dois Córregos, São Paulo, Brasil (22°19'08"S 48°22'01"W). Os racemos foram coletados na periferia da copa de 10 árvores, a uma altura média de 1 a 2 metros do chão, sendo acondicionados em sacos de papel e encaminhados ao laboratório.

Para os isolamentos, foram utilizadas de forma individualizada os verticilos vegetativos (ráquis, pedúnculo e pétalas) e verticilos reprodutivos (estames e carpelos) dos racemos coletados. Para obtenção da população total de bactérias, as estruturas foram depositadas em Erlenmeyers de 150 ml de capacidade, contendo 50 ml de solução salina (0,85% NaCl) estéril com 0,3% de Tween 80 e submetidas a agitação de 300 rpm por 20 min (ROMEIRO, 2001; HALFELD-VIEIRA; ROMEIRO; MIZUBUTI, 2004).

A partir do extrato obtido, foi realizada diluição seriada, em fator de diluição variando até 1:10.000, sendo depositados 100 µL das amostras de cada diluição em duas placas de Petri contendo meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970). As alíquotas foram espalhadas com alça de Drigalski

e as placas levadas à incubadora a 25°C. Culturas puras, preferencialmente morfológicamente distintas, obtidas de placas cujo fator de diluição permitiu o crescimento de colônias isoladas (HALFELD-VIEIRA; ROMEIRO; MIZUBUTI, 2004), foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) e armazenadas a 4°C.

### 1.2.2 Seleção massal

A seleção massal foi realizada por meio de ensaio de antibiose por difusão em meio de cultura, e do efeito dos antagonistas na incidência e esporulação de *C. xanthochromaticum* CMAA 1835 (SILVA et al., 2024) em racemos destacados da cultivar IAC4-12B, a fim de selecionar os melhores antagonistas ao patógeno.

Os antagonistas obtidos foram cultivados em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) por até 48 h a 25°C e semeados em meio BDA, em duas linhas cruzadas ortogonais, a partir da extremidade da placa de Petri, interrompidas em 2,0 cm no centro, depositando-se um disco de 0,5 cm de micélio de *C. xanthochromaticum* na região central não semeada. Foram utilizadas 3 repetições, sendo cada uma constituída por uma placa. Após incubação a 23°C por até 5 dias, foi observado se a estirpe produziria uma zona de inibição do crescimento entre a faixa de cultura da bactéria e o fungo. Aqueles isolados bacterianos que demonstraram capacidade de inibição foram pré-selecionados e submetidos a ensaio com racemos destacados de macadâmia em estágio fenológico 3 (antese) (PRASANNATH; GALEA; AKINSANMI, 2022).

Para este ensaio, colônias de *C. xanthochromaticum* CMAA1835 foram cultivadas em BDA por 14 dias a 23°C, e obtida uma suspensão de conídios ( $10^3$  conídios/ml) (ALFENAS et al., 2016). Os isolados pré-selecionados foram cultivados em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 24 h a 25°C, obtendo-se uma suspensão de células preparada em solução salina (NaCl a 0,85%) e 0,03% Tween 80, ajustada a  $A_{540} = 0,3$  (ROMEIRO, 2001).

Os racemos coletados foram colonizados por meio de pulverização com os isolados bacterianos e mantidos a 23°C por 24 h. Completadas as 24 h, os racemos foram pulverizados com a suspensão de inóculo de *C. xanthochromaticum* e levados à câmara úmida, constituída por sacos plásticos umedecidos com água destilada estéril (ADE). Como tratamento controle, foram utilizados racemos pulverizados com água destilada esterilizada (controle -) e racemos pulverizados somente com a suspensão de inóculo

de *C. xanthochromaticum* (controle +). Foram utilizadas o total de 4 repetições para cada tratamento, correspondendo cada racemo como uma repetição.

Quatro dias após a inoculação, foi definida a incidência da doença a partir de observações de sintomas e colonização superficial por *C. xanthochromaticum* em 25 flores por racemo em cada repetição. Para determinação da capacidade do antagonista em interferir na esporulação, 5 inflorescências de cada repetição foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 5 mL de água destilada esterilizada, agitadas em vórtex, realizando-se posteriormente determinação da concentração de esporos com auxílio de câmara de Neubauer.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Dados de incidência foram transformados em  $\arcsin(x)$  e os de esporulação em  $\log(x)$  para ajuste de normalidade e homogeneidade das variâncias. Foi realizado análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0.05$ ). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R versão 4.3.2.

### 1.2.3 Identificação dos antagonistas

A identificação dos antagonistas foi realizada por meio do sequenciamento da região 16S rRNA e análise de sequência de multilocos (MLSA). O DNA genômico das bactérias foi extraído com solução extratora Q-Extract DNA (Neobio) em combinação com enzima proteinase K (20 mg/ml) submetidos a 95°C por 20 minutos. A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada usando os primers 16S08F (GYCCADACWCCTACGG) and 16S08R (CACGAGCTGACGAC) (ARRUDA et al., 2017). Uma mistura de PCR contendo 12,5 µL de Taq DNA Polimerase (NeoBio), 7,5 µL de água milliQ, 1,0 µL de cada primer e 3,0 µL de DNA, totalizando um volume de 25 µL, foi usada. A PCR consistiu em desnaturação inicial a 94°C por 7 min; 30 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 45 s, anelamento a 50°C por 30 s e extensão a 72°C por 60 s e uma extensão final a 72°C por 10 min (ARRUDA et al., 2017). Os produtos da PCR foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta (Major Science) usando um gel de agarose a 1% e um marcador molecular de 100 pb (Norgen). Os produtos amplificados foram purificados usando esferas magnéticas (AMPure Agencourt) e quantificados usando um espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

Posteriormente, usando primers *gyrB* e *rpoB* para o estirpe CMAA1920 (SCRASCIA et al., 2016), e *tuf2* (SCRASCIA et al., 2016; XU et al., 2023) para o estirpe CMAA1922, foi realizada uma análise de sequência de multilocus (MLST) para confirmar a identidade dos estirpes e construir uma árvore filogenética (SULLEY; BABADOOST; HIND, 2021). Para amplificação de *gyrB*, *rpoB* e *tuf2*, foi utilizada uma mistura de PCR de 25 µl contendo: 12,5 µl de Master Mix, 1,0 µl de cada primer, 7,5 µl de água sem nuclease e 3,0 µl de molde de DNA. Para *gyrB* e *rpoB* o programa de PCR incluiu desnaturação inicial por 5 min a 94 °C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 60 s a 60°C e 1 min a 72°C; e uma extensão final por 5 min a 72 °C (SCRASCIA et al., 2016). Para a amplificação de *tuf2*, desnaturação inicial por 15 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 95°C, 0,30 s a 47°C e 1 min a 72°C; e uma extensão final por 5 min a 72°C (XU et al., 2023). Os produtos amplificados foram purificados usando esferas magnéticas (AMPure Agencourt) e quantificados usando um espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

As amostras foram enviadas ao Laboratório Central do IBTEC, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil, para sequenciamento Sanger. As sequências dos isolados foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados GenBank (National Center for Biotechnology Information - NCBI) por meio da ferramenta BLAST.

Posteriormente, foram alinhadas usando ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). Usando o software MEGA X, o modelo mais bem ajustado foi determinado, construindo-se a árvore filogenética (KUMAR et al., 2018). A confiabilidade das árvores filogenéticas será avaliada por reamostragens bootstrap (FELSENSTEIN, 1985).

Para o isolado CMAA1920, foi realizada a determinação da capacidade de utilização de ureia como fonte exclusiva de carbono, com o objetivo de confirmar os resultados obtidos na análise filogenética. O ensaio foi conduzido utilizando um meio basal composto por (g/L): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5; KCl, 0,1, com pH ajustado para 6,5. O meio foi suplementado com 50 mM de glicose, 0,5 M de ureia e 0,01% de extrato de levedura. Como controle negativo, foi utilizado o mesmo meio, porém sem adição de ureia. O isolado foi inicialmente cultivado em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) e,

após o crescimento, foi realizada uma repicagem para tubos de ensaio estéreis contendo 2 mL do meio basal. O conteúdo foi homogeneizado em vórtex até completa uniformidade da colônia. Em seguida, uma alíquota de 250 µL da suspensão bacteriana foi transferida para frascos Erlenmeyer contendo 20 mL do meio basal. O mesmo procedimento foi realizado para o controle negativo. As culturas foram incubadas a 27 °C, sob agitação, por 48 horas. Ao final do período de incubação, a turbidez do meio foi avaliada como indicativo de crescimento bacteriano (BHADRA; ROY; CHAKRABORTY, 2005).

#### 1.2.4 Ensaio a campo

O experimento foi realizado em um pomar de macadâmia com idade de 15 anos na área comercial da empresa QueenNut Macadamia, localizado no município de Dois Córregos, São Paulo, Brasil (22°19'08"S 48°22'01"W), no período de florescimento da cultura no ano agrícola de 2023. Foram realizados dois ensaios, um no mês de junho e outro no mês de agosto, utilizando-se os dois antagonistas que demonstraram maior capacidade de controle da doença, de acordo com o teste de seleção massal. O preparo de suspensões dos antagonistas e patógeno, bem como da inoculação, foram realizadas como descrito anteriormente no ensaio em racemos destacados.

Os antagonistas CMAA1920 e CMAA1922 foram pulverizados ( $A_{540}=0,3$ ) em árvores de macadâmia, variedade IAC 4-12B, em flores em estágios fenológicos 2 e 3 (pré-antese e antese) com pulverizador manual no início da manhã. Racemos tratados com água destilada esterilizada foram utilizados como controle absoluto. Racemos também foram tratados com o produto comercial, Supera® (hidróxido de cobre), utilizado como padrão para o controle da doença. Cada tratamento foi aplicado a seis árvores, 3 racemos de cada estágio fenológico por árvore, contabilizando um total de 18 racemos por tratamento. A pulverização foi realizada de forma suficiente para causar escorrimento. Inicialmente foram aplicados os antagonistas, sendo os racemos submetidos a câmara úmida (24h), utilizando-se sacos de poliestireno. Em seguida foi realizada a inoculação dos racemos com a suspensão de inóculo de *C. xanthochromaticum* ( $10^5$  conídios/mL), sendo novamente submetidos a câmara úmida (24h). Em seguida, foram removidos os sacos de poliestireno, substituindo-se por sacos de papel. 10 dias após a inoculação, os racemos foram coletados e levados ao laboratório para avaliação da incidência e contagem de esporos, como mencionado anteriormente (tópico 1.3.2).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com 18 repetições. Dados de esporulação do segundo ensaio foram transformados em raiz quadrada (x) para ajuste da homogeneidade das variâncias. Foi realizada análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R versão 4.3.2.

#### 1.2.5 Caracterização dos mecanismos de controle de *Cladosporium xanthochromaticum* por *Bacillus* sp e *Serratia* sp.

##### 1.2.5.1 Similaridade nutricional

Perfis nutricionais baseados na utilização de fontes únicas de Carbono e Nitrogênio foram definidos para os antagonistas CMAA1920 e CMAA1922 e o patógeno *C. xanthochromaticum* CMAA1835. Os perfis nutricionais das bactérias antagonistas foram verificados utilizando placas modelos GN2 e GP2 MicroPlate™ para cada antagonista e *C. xanthochromaticum* por meio de placa FF MicroPlate™ Biolog, Inc. (Hayward, Califórnia), conforme instruções do fabricante. Essas placas são compostas por 95 fontes únicas de carbono e um controle. O desenvolvimento da cor nos poços foi registrado por espectrofotometria a 590 nm de absorbância usando um leitor de microplaca. As avaliações foram realizadas a cada 24 h até 72 h de incubação. O valor de absorbância de cada poço foi comparado com o do poço de controle sem carbono (HALFELD-VIEIRA et al., 2015).

A similaridade nutricional foi estimada usando o índice de sobreposição de nicho (ISN). Este índice foi calculado para estimar a sobreposição de nicho entre bactérias antagonistas sobre *C. xanthochromaticum* e vice-versa, com a fórmula:  $ISN = \frac{\text{o número de fontes de carbono usadas tanto pela bactéria antagonista quanto pelo patógeno}}{\text{o número total de fontes de carbono usadas pelo organismo a ser sobreposto}}$  (HALFELD-VIEIRA et al., 2015).

ISNs foram calculados para as fontes e para grupos específicos comuns às microplacas GN2, GP2 e FF: carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos, álcoois, amidas e aminas e miscelâneas. Foram considerados valores de sobreposição de nicho significativos para  $ISNs > 0,9$ , o que indicará alta capacidade de competição por fontes de C ou N. Portanto, a cepa é potencialmente eficaz na exclusão

prévia de nicho. Sobreposição de nicho não significativa ( $ISN < 0,9$ ) indicará baixa capacidade de competição pelas fontes, consequentemente, a cepa não é potencialmente eficaz na exclusão de nicho (HALFELD-VIEIRA et al., 2015; WILSON; LINDOW, 1994a, 1994b).

#### 1.2.5.2 Produção de quitinase

Para a detecção da produção de quitinase pelos antagonistas, foi utilizado o meio mineral de Renwick et al. (1991), em que quitina (Sigma) coloidal 0,08% foi a única fonte de carbono. As bactérias foram semeadas em pontos distintos da superfície do meio e incubadas a 25°C durante 10 dias, sendo utilizadas três repetições para cada tratamento. Após o período de incubação, foi analisada a capacidade da produção de quitinase, evidenciada pela observação de um halo transparente ao redor da colônia contrastando com o restante do meio com aspecto leitoso (PELZER et al., 2011).

#### 1.2.5.3 Produção de $\beta$ -1,3-glucanase

Para determinar a capacidade de produzir  $\beta$ -1,3-glucanase foi usado o meio mineral Renwick et al. (1991) suplementado com laminarina (Sigma) a 0,5%, como única fonte de carbono. As culturas foram semeadas no meio em distintos pontos da superfície e incubados a 25°C durante dez dias, com três repetições para cada tratamento. Após o período de incubação, a superfície do meio de cultura foi coberta com uma solução de vermelho do Congo 0,5% por 90 min, sendo o excesso eliminado. A constatação da capacidade de produção de  $\beta$ -1,3-glucanase foi evidenciada pela observação de um halo laranja claro ao redor da colônia, contrastando com o restante do meio com aspecto vermelho-alaranjado (PELZER et al., 2011).

#### 1.2.5.4 Antibiose por compostos voláteis

O teste de antibiose por compostos voláteis foi realizado conforme Essa Al-Rubkhi et al. (2024), com modificações. Foram depositados 0,2  $\mu$ L de suspensão de esporos ( $10^5$  conídios/mL) de *C. xanthochromaticum* no centro de placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo BDA. Com auxílio de uma alça de Drigalski, uma alíquota de 100  $\mu$ L da suspensão bacteriana ( $A_{540}=0,1$ ) foi espalhada uniformemente na superfície do meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) contido em uma placa de Petri de

90 mm de diâmetro. As tampas das placas de Petri foram removidas e a parte interna da placa com *C. xanthochromaticum* foi sobreposta à parte interna da placa semeada com isolado da bactéria selecionada. As duas bases de placas foram unidas usando duas camadas de parafilme e então incubadas a 23°C por 10 dias. Como tratamento controle, a parte interna de uma placa com o meio BDA contendo disco de micélio de *C. xanthochromaticum* foi sobreposta à parte interna de uma placa contendo somente o meio 523. A inibição do crescimento micelial (%) foi calculada medindo-se o diâmetro do crescimento micelial de *C. xanthochromaticum*. Para cada tratamento, dez réplicas foram conduzidas.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo os dados submetidos ao teste T ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R versão 4.3.2.

#### 1.2.5.5 Determinação dos compostos voláteis (VOCs)

#### 1.2.5.6 Processo de extração por Micro Extração em Fase Sólida (SPME):

Frascos de vidro autoclavados de  $2280 \pm 7$  mL foram utilizados para a extração em temperatura ambiente. A seguir, foi colocada a cultura em placa de Petri no interior do frasco e o mesmo foi fechado hermeticamente com tampa contendo um septo de borracha para permitir a entrada da agulha, onde permaneceu por uma hora para a liberação dos voláteis no headspace. Após esse período, foi realizada a amostragem dos voláteis, utilizando um conjunto de microextração em fase sólida (SPME) obtido da Supelco (Supelco park, Bellefonte, PA, EUA), expondo a fibra no headspace por 15 min para absorção dos compostos. Após a etapa de adsorção, a fibra foi inserida no injetor do Cromatógrafo Gasoso acoplado à Espectrometria de Massas (GC-MS) para dessorção dos compostos e posterior separação e identificação dos VOCs.

Após cada injeção de amostra foi realizada uma limpeza da fibra, injetando-a novamente no GC-MS e deixando por 10 min e realizando uma corrida completa para certificar que todos os voláteis tenham sido eluídos antes da próxima injeção. Para os ensaios, duas fibras foram utilizadas: Fibra SPME DVB/CAR/PDMS – 50/30µm – Stableflex – 24Ga – Cinza e a Fibra SPME PDMS/DVB – 65µm – Fused Silica – 24Ga – Azul.

#### 1.2.5.7 Análise Instrumental

Os voláteis foram analisados usando um Cromatógrafo Gasoso (modelo 7890B, Agilent Technologies) acoplado a Espectrômetro de Massas (Modelo 5977b, Agilent Technologies). As seguintes condições experimentais foram utilizadas: para a separação dos compostos foi utilizada uma coluna capilar HP-5MSUI (Agilent, 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm); a temperatura do injetor foi mantida a 250 °C e foi utilizado o modo splitless. O forno permaneceu a uma temperatura inicial de 40 °C durante 1 min, aumentando gradativamente até 150 °C a uma taxa de 5 °C/min, mantendo-se nessa temperatura por 1 min. Em seguida, elevou-se novamente a temperatura até 250 °C a uma taxa de 10 °C /min, que foi, por fim, mantida por 1 min. O tempo total da corrida foi de 35 min. A detecção no GC-MS foi feita usando 70 eV de energia de ionização em uma faixa de massa de 50-550 a.m.u. A temperatura da fonte de íon foi de 230 °C e da interface foi de 150 °C. Hélio foi usado como gás de arraste a um fluxo de 1,2 mL/min. A deconvolução do cromatograma foi realizada utilizando o programa MassHunter Workstation for Unknowns Analysis v. 10.0 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA), e os compostos orgânicos voláteis (VOCs) foram identificados por comparação do espectro de massas experimental com os contidos na biblioteca NIST Tandem Mass Spectral Library v. 2.3 (NIST, Washington, DC, USA).

#### 1.2.5.8 Inibição da germinação de conídios por filtrado livre de células

Para obtenção do filtrado livre de células (FLC) a partir dos antagonistas, colônias foram submetidas a crescimento em meio 523 de Kado e Heskett em agitação constante por 24 h a 25°C, tendo sua concentração ajustada em  $A_{540} = 0,1$ . As células foram sedimentadas por centrifugação a 4.000 rpm durante 10 min, e o sobrenadante filtrado assepticamente através de uma membrana de filtro de 0,22 µm para obter FLC livre de células bacterianas. O FLC foi incorporado ao meio ágar-água (17 g L<sup>-1</sup>) mantido a 50°C até a concentração final de 80% (v/v) (PELLICCIARO et al., 2021).

A obtenção de conídios de *C. xanthochromaticum* foi realizada como descrito na seção 2.2, ajustando-se a concentração de esporos para 10<sup>5</sup> conídios/mL (ALFENAS et al., 2016).

Nas placas de Petri, foi adicionada uma camada de meio ágar-água contendo o FLC (2 mm) incorporado, conforme descrito anteriormente. Sobre o meio de cultura foi depositada uma alíquota de 10 µL da suspensão de conídios de *C. xanthochromaticum*. Foram utilizadas oito repetições para cada tratamento e um tratamento controle, cujas placas continham somente o meio água-ágar 80% (v/v), sem incorporação do FLC. Após 16 h de incubação a 23°C, ao menos 100 conídios por placa de Petri foram avaliados por observação direta na parte inferior das placas através de um microscópio com ampliação de 200X. Os conídios foram classificados como germinados quando o comprimento do tubo germinativo excedeu o diâmetro da extremidade menor dos conídios. O percentual de conídios germinados nas placas com o FLC incorporado (Tg) e no controle (Cg) foi calculado considerando-se o número de conídios germinados e o número total de conídios examinados. Finalmente, a inibição da germinação de conídios (IGC) de *C. xanthochromaticum* foi avaliada calculando a redução na germinação (%) observada nas placas tratadas em comparação com placas controle com a equação proposta por Pellicciaro et al. (2021):

$$IGC = 100\% \times Cg - Tg/Cg$$

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com oito repetições, sendo os dados submetidos ao teste T ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R versão 4.3.2.

#### 1.2.6 Compatibilidade de bactérias antagonistas com defensivos agrícolas usados em macadâmia no Brasil

Para o teste, foram utilizados ingredientes ativos registrados para a cultura visando o controle de pragas e doenças e os isolados CMAA1920 e CMAA1922. Os ingredientes ativos utilizados foram: abamectina (84 g/L), acetamiprido (200 g/kg), acibenzolar-S-metílico (500 g/kg), azoxistrobina (200 g/L) + difenoconazol (125 g/L), clorotalonil (500 g/L), enxofre (800 g/kg), fluxapirroxade (167 g/L) + piraclostrobina (333g/L), hidróxido de cobre (537 g/kg), na dose máxima recomendada pelo fabricante.

Foram preparados 300 mL de solução de cada produto em água destilada estéril, em concentrações nas quais em 30 mL do produto contivesse o dobro da concentração máxima recomendada. Os produtos foram mantidos em frascos duran sob agitação para sua total solubilização e

homogeneização. Os isolados bacterianos foram cultivados em meio sólido de 523 de Kado e Heskett (1970) a 25°C. Após 24 h de crescimento foram preparadas suspensões de cada bactéria em solução estéril de NaCl a 0,85%, ajustadas em espectrofotômetro a  $A_{540} = 0,3$ . Para cada isolado, 30 mL da suspensão obtida foram transferidos para frasco duran esterilizado com capacidade de 250 mL e adicionados a 30 mL do produto preparado anteriormente. Deste modo, a alíquota de mesmo volume da suspensão bacteriana ao ser adicionada à calda, a bactéria esteve exposta à concentração máxima do produto, recomendada pelo fabricante. No tratamento controle foi realizada a adição solução estéril de NaCl a 0,85% (HALFELD-VIEIRA; SANTOS, 2018).

Os frascos foram mantidos em agitador rotativo (shaker) a 180 rpm a 25°C. Após 1, 6 e 24 h de exposição de cada bactéria ao produto, alíquotas foram retiradas e submetidas à diluição seriada em fator 1:10. Alíquotas de 100 µL de 3 amostras das diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  foram semeadas em meio 523 de Kado e Heskett (1970) e incubadas a 25°C. Após 24h de incubação, as colônias foram contadas, determinando-se o número de unidades formadoras de colônias por mL (ufc mL<sup>-1</sup>) (HALFELD-VIEIRA; SANTOS, 2018).

Os dados de ufc mL<sup>-1</sup> foram transformados para logaritmo ln (ufc mL<sup>-1</sup>) submetidos a análise de variância e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R versão 4.3.2.

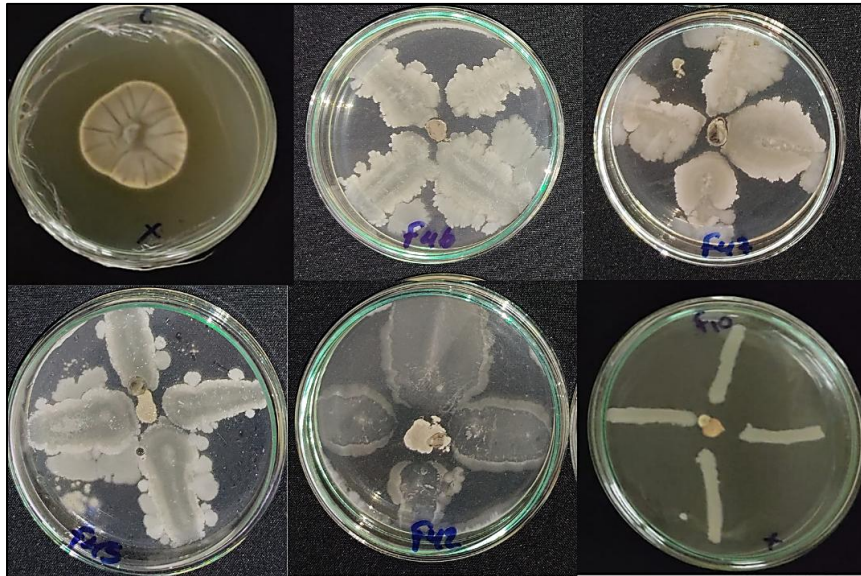
## 1.3 RESULTADOS

### 1.3.1 Isolamento dos antagonistas

Cento e quatro isolados foram obtidos a partir dos racemos de macadâmia. Destes, 57 foram obtidos a partir dos verticilos reprodutivos (carpelos e estames) e 47 a partir dos verticilos vegetativos (raquis, pedúnculo e pétalas).

### 1.3.2 Seleção massal

No teste de antibiose por difusão em meio de cultura, 43 isolados demonstraram efeitos inibitórios a *C. xanthochromaticum* (Figura 1), sendo 18 provenientes do verticilo reprodutivo e 25 dos verticilos vegetativos. Os 43 isolados foram utilizados para o ensaio em racemos destacados.



**Fig. 1** Visualização do efeito inibitório a *C. xanthochromaticum* promovido por cinco estirpes de bactérias antagonistas provenientes de racemos de macadâmia.

No ensaio em racemos destacados, doze isolados foram capazes de reduzir a incidência de *C. xanthochromaticum*, sendo os isolados, F24, F13, F32, F53, R6, F9, F25, F46, F5, R7, CMAA1920 e CMAA1922. Em relação a esporulação de *C. xanthochromaticum*, dez isolados foram capazes de reduzir a esporulação do fitopatógeno, sendo, F45, R6, F9, CMAA1920, R20, R32, R37, R38, R39 e CMAA1922 (Tabela 1). Devido a consistência e maior eficiência dos isolados CMAA1920 e CMAA1922 na redução da incidência e esporulação de *C. xanthochromaticum*, estes isolados foram selecionados para os ensaios futuros.

**Tabela 1**

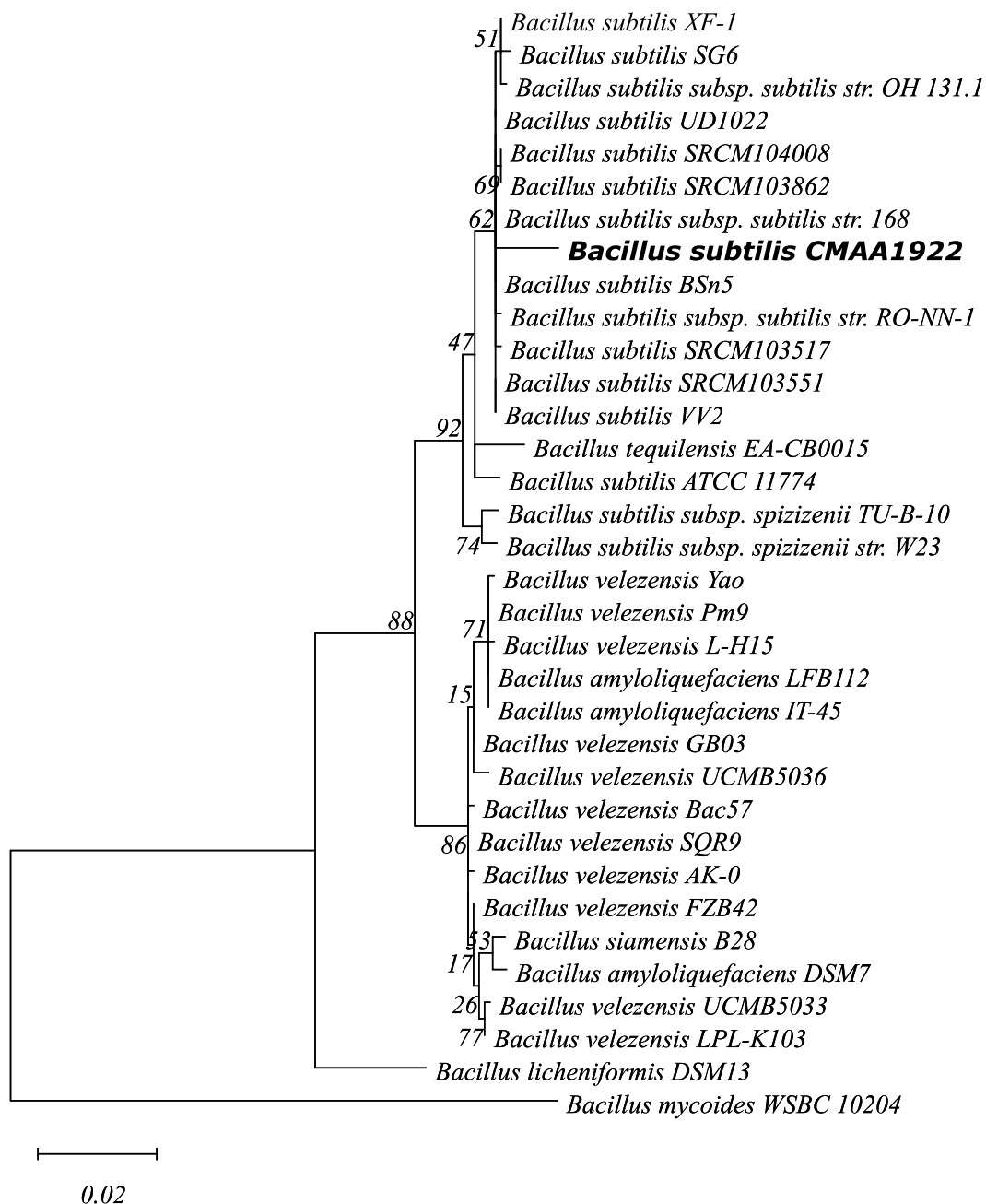
Incidência e esporulação de *C. xanthochromaticum* em racemos destacados expostos aos isolados bacterianos.

| Tratamentos | Incidência %*     | Esporulação<br>(conídios ml <sup>-1</sup> )** | Tratamentos | Incidência %     | Esporulação<br>(conídios ml <sup>-1</sup> )** |
|-------------|-------------------|-----------------------------------------------|-------------|------------------|-----------------------------------------------|
| F40         | 98,5 <sup>a</sup> | 1,34E+06 <sup>a</sup>                         | Controle +  | 100 <sup>a</sup> | 3,18E+06 <sup>a</sup>                         |
| Controle +  | 99 <sup>a</sup>   | 3,11E+06 <sup>a</sup>                         | R12         | 100 <sup>a</sup> | 1,12E+06 <sup>a</sup>                         |
| F6          | 99 <sup>a</sup>   | 1,28E+06 <sup>a</sup>                         | R20         | 100 <sup>a</sup> | 3,08E+05 <sup>b</sup>                         |
| F42         | 98 <sup>a</sup>   | 1,65E+06 <sup>a</sup>                         | R21         | 100 <sup>a</sup> | 1,71E+06 <sup>a</sup>                         |
| R5          | 98 <sup>a</sup>   | 3,29E+06 <sup>a</sup>                         | R22         | 100 <sup>a</sup> | 1,03E+06 <sup>a</sup>                         |
| F27         | 98 <sup>a</sup>   | 1,23E+06 <sup>a</sup>                         | R26         | 100 <sup>a</sup> | 1,99E+06 <sup>a</sup>                         |
| F28         | 96,5 <sup>a</sup> | 1,63E+06 <sup>a</sup>                         | R28         | 100 <sup>a</sup> | 1,25E+06 <sup>a</sup>                         |
| F47         | 95 <sup>a</sup>   | 1,85E+06 <sup>a</sup>                         | R32         | 100 <sup>a</sup> | 4,42E+05 <sup>b</sup>                         |
| F45         | 95 <sup>a</sup>   | 4,67E+05 <sup>b</sup>                         | R33         | 100 <sup>a</sup> | 1,03E+06 <sup>a</sup>                         |
| F26         | 94 <sup>a</sup>   | 3,45E+06 <sup>a</sup>                         | R34         | 100 <sup>a</sup> | 7,83E+05 <sup>a</sup>                         |
| F30         | 94,5 <sup>a</sup> | 2,20E+06 <sup>a</sup>                         | R35         | 100 <sup>a</sup> | 1,59E+06 <sup>a</sup>                         |
| F24         | 93,5 <sup>b</sup> | 4,45E+06 <sup>a</sup>                         | R36         | 100 <sup>a</sup> | 1,23E+06 <sup>a</sup>                         |
| F13         | 93 <sup>b</sup>   | 1,73E+06 <sup>a</sup>                         | R37         | 100 <sup>a</sup> | 1,63E+05 <sup>b</sup>                         |
| F32         | 92,5 <sup>b</sup> | 4,30E+06 <sup>a</sup>                         | R38         | 100 <sup>a</sup> | 1,42E+05 <sup>b</sup>                         |
| F53         | 88,5 <sup>b</sup> | 1,67E+06 <sup>a</sup>                         | R39         | 100 <sup>a</sup> | 2,58E+05 <sup>b</sup>                         |
| R6          | 86 <sup>b</sup>   | 1,33E+06 <sup>b</sup>                         | R43         | 100 <sup>a</sup> | 9,17E+05 <sup>a</sup>                         |
| F9          | 87 <sup>b</sup>   | 3,67E+05 <sup>b</sup>                         | R45         | 100 <sup>a</sup> | 7,83E+05 <sup>a</sup>                         |
| F25         | 85,5 <sup>b</sup> | 1,31E+06 <sup>a</sup>                         | Controle -  | 99 <sup>a</sup>  | 1,33E+06 <sup>a</sup>                         |
| F46         | 83 <sup>b</sup>   | 2,25E+06 <sup>a</sup>                         | R10         | 99 <sup>a</sup>  | 1,13E+06 <sup>a</sup>                         |
| Controle -  | 81 <sup>b</sup>   | 3,99E+06 <sup>a</sup>                         | R30         | 99 <sup>a</sup>  | 6,42E+05 <sup>a</sup>                         |
| F5          | 80,5 <sup>b</sup> | 1,63E+06 <sup>a</sup>                         | R15         | 98 <sup>a</sup>  | 7,00E+05 <sup>a</sup>                         |
| R7          | 80 <sup>b</sup>   | 2,90E+06 <sup>a</sup>                         | R25         | 98 <sup>a</sup>  | 1,08E+06 <sup>a</sup>                         |
| CMAA1920    | 69,5 <sup>b</sup> | 2,33E+05 <sup>b</sup>                         | R41         | 98 <sup>a</sup>  | 7,83E+05 <sup>a</sup>                         |
|             |                   |                                               | CMAA1922    | 90 <sup>b</sup>  | 2,25E+05 <sup>b</sup>                         |
| CV (%)      | 22,29             | 7,32                                          |             | 2,78             | 6,97                                          |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem uma da outra (Scott-Knott  $p < 0.05$ ). Dados transformados em  $\text{*arc sen (x)}$  e em  $\text{**log (x)}$  para análises estatísticas. Controle + (Racemos inoculados com *C. xanthochromaticum*); Controle – (Racemos tratados com água destilada esterilizada).

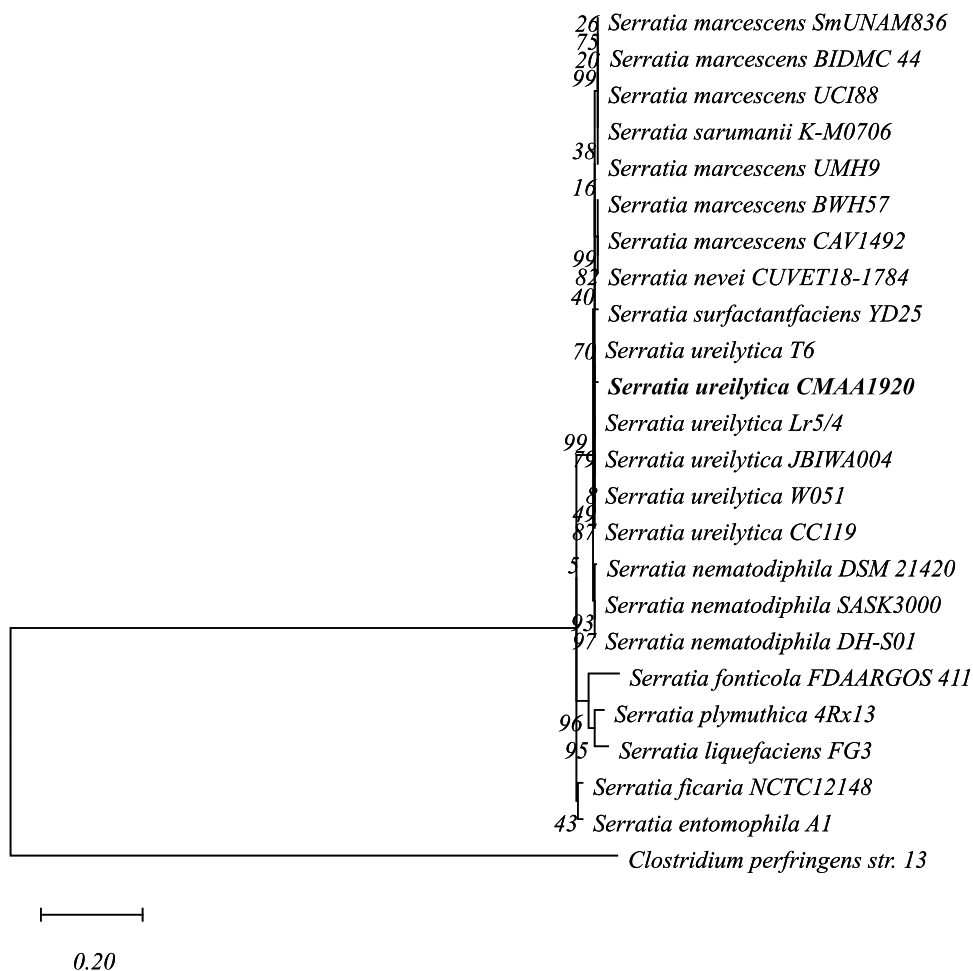
### 1.3.3 Identificação dos antagonistas

A análise filogenética, baseada nos genes 16S rDNA e *tuf* concatenados, mostrou que o isolado CMAA1922 foi filogeneticamente próximo a *Bacillus subtilis*. (Fig. 2). As sequências relacionadas aos genes 16S rDNA e *tuf* do isolado foram depositadas no GenBank sob os números de identificação (PP128333 e PV392971).



**Fig. 2** Árvore filogenética da estirpe CMAA1922 baseada nas sequências dos genes 16S rDNA e *tuf* concatenados. A árvore foi construída pelo método de Maximum-likelihood. As distâncias genéticas foram calculadas pelo Kimura's two-parameter model+G. *Bacillus mycoides* WSBC 10204 foi incluído como grupo externo. Os valores de bootstrap (1000 réplicas) são mostrados ao lado dos nós. Barra: 0,02 substituições por posição de nucleotídeo.

A análise filogenética, baseada nos genes 16S rDNA, *gyrB* e *rpoB* concatenados, mostrou que a cepa CMAA1920 foi filogeneticamente próximo a *Serratia ureilytica*. (Fig. 3). As sequências relacionadas aos genes 16S rDNA, *gyrB* e *rpoB* foram depositadas no GenBank sob os números de acesso (PP128358, PV537013, PV537014). Além disso, a capacidade da cepa CMAA1920 de metabolizar ureia como fonte exclusiva de carbono foi confirmada, em conformidade com a descrição previamente reportada para a espécie (BHADRA; ROY; CHAKRABORTY, 2005).



**Fig. 3** Árvore filogenética da estirpe CMAA1920 baseada nas sequências dos genes 16S rDNA, *gyrB* e *rpoB* concatenados. A árvore foi construída pelo método de Maximum-likelihood. As distâncias genéticas foram calculadas pelo Kimura's two-parameter model+G+I. *Clostridium perfringens* str. 13

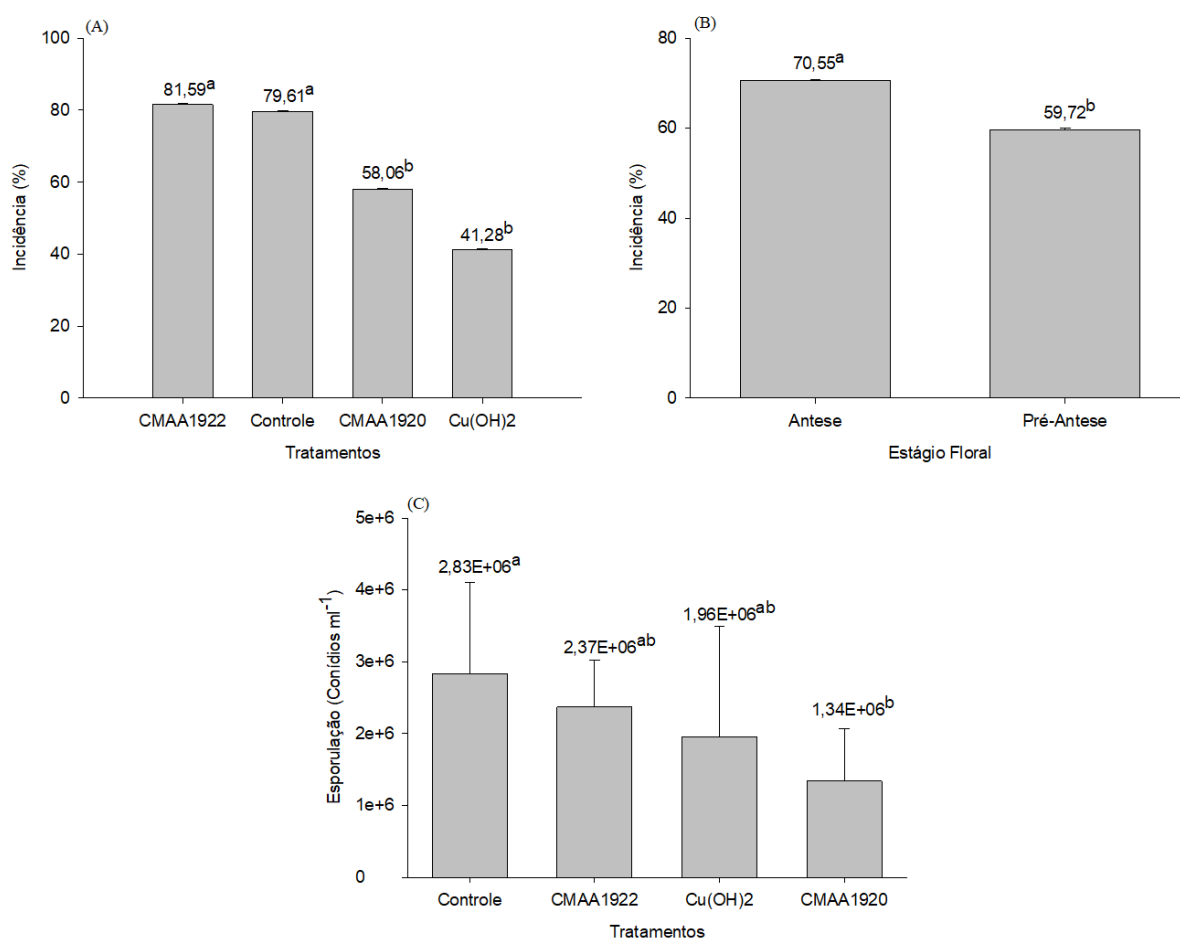
foi incluído como grupo externo. Os valores de bootstrap (1000 réplicas) são mostrados ao lado dos nós. Barra: 0,02 substituições por posição de nucleotídeo.

Todos os isolados foram conservados e armazenados na coleção de microrganismos da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, São Paulo, Brasil) sob as identificações, *Serratia ureilytica* CMAA1920 e *Bacillus subtilis* CMAA1922.

#### 1.3.4 Ensaio a campo

##### 1.3.4.1 Ensaio 1

No primeiro ensaio, não houve interação significativa entre os fatores. A estirpe *Serratia ureilytica* CMAA1920 (daqui em diante CMAA1920) demonstrou capacidade de reduzir a incidência de *C. xanthochromaticum* em condições de campo, igualando-se ao fungicida. Comparados ao tratamento controle, houve uma redução na incidência de 27,04 % e 48,14 % quando aplicada a suspensão do isolado CMAA1920 e o fungicida, respectivamente. O isolado *Bacillus subtilis* CMAA1922 não demonstrou capacidade de redução da incidência de *C. xanthochromaticum* igualando-se ao tratamento controle (Figura 4a). Quanto ao estágio floral, a maior incidência de *C. xanthochromaticum* foi observada na fase de antese, quando as flores se encontram abertas (Figura 4b), na fase de pré-antese, houve uma redução significativa na incidência de *C. xanthochromaticum*. Na esporulação do patógeno sobre os racemos, a estirpe CMAA1920 demonstrou capacidade de reduzir a esporulação de *C. xanthochromaticum* em relação ao controle, igualando-se à estirpe CMAA1922 e o fungicida (Figura 4c). A estirpe CMAA1920 reduziu em 52,65% a esporulação de *C. xanthochromaticum*, o fungicida reduziu 30,74% e a estirpe CMAA1922 16,25%. Dentre as estirpes bacterianas, a estirpe CMAA1920 demonstrou maior eficiência no controle de *C. xanthochromaticum*.



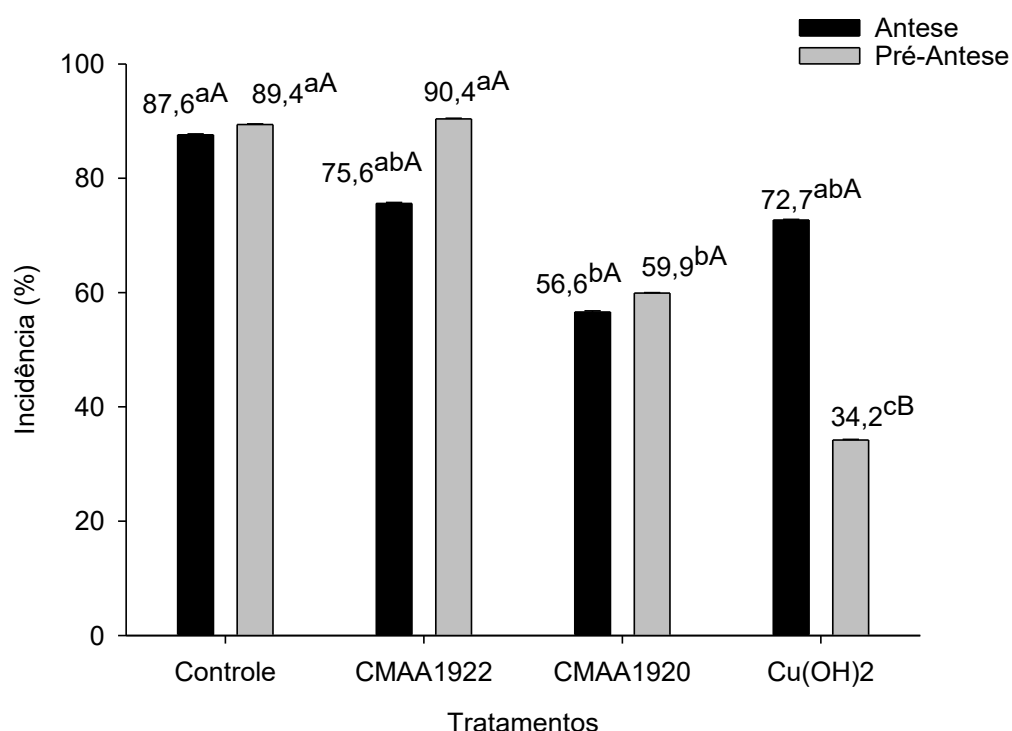
**Fig. 4** Incidência e esporulação de *C. xanthochromaticum* em racemos de macadâmia (*Macadamia integrifolia*). **A.** Incidência em racemos tratados com CMAA1920, CMAA1922 e fungicida. **B.** Incidência em diferentes estágios florais. **C.** Esporulação em racemos tratados com CMAA1920, CMAA1922 e fungicida. Médias seguidas da mesma letra não diferem uma da outra (Tukey  $p < 0.05$ ). Cu(OH)<sub>2</sub> (Produto comercial a base de hidróxido de cobre utilizado como tratamento padrão, seguindo a recomendação do fabricante). Os dados são médias  $\pm$  erro padrão ( $n=18$ ).

#### 1. 3.4.2 Ensaio 2

Houve interação significativa ( $P < 0,001$ ) na incidência de *C. xanthochromaticum* em relação aos tratamentos aplicados em racemos e o estágio floral (Figura 5). A estirpe CMAA1920 demonstrou capacidade de reduzir a incidência de *C. xanthochromaticum* em relação aos demais tratamentos, não importando o estágio floral do racemo tratado, apesar de igualar-se ao tratamento CMAA1922 e fungicida na fase de antese. A maior redução na incidência foi observada em rãcemos expostos ao fungicida na fase de pré-antese. O isolado CMAA1922 demonstrou uma pequena capacidade na redução

da incidência de *C. xanthochromaticum* quando aplicado na antese, igualando-se à estirpe CMAA1920 e o fungicida na fase de antese, porém, não diferiu do tratamento controle.

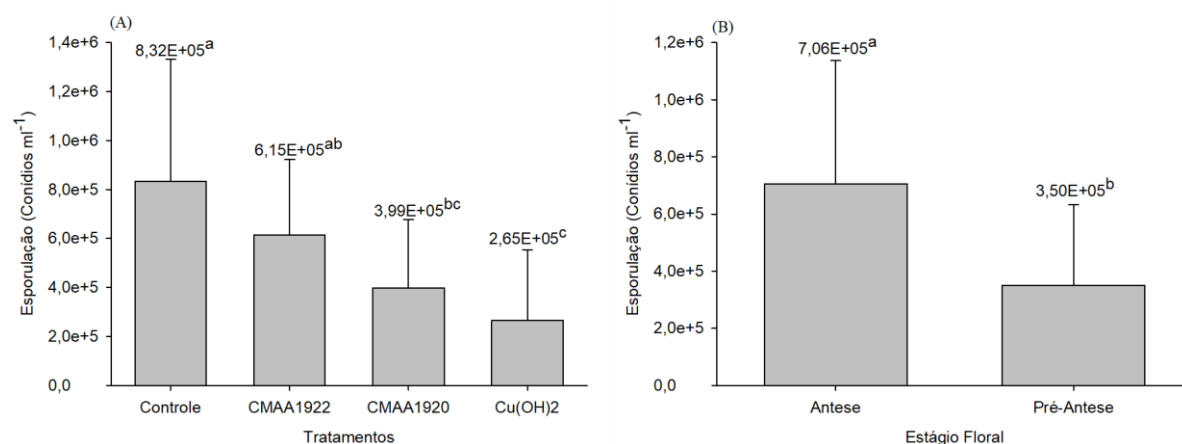
Na flor em antese, a maior redução na incidência de *C. xanthochromaticum* foi observada pela estirpe CMAA1920, com 35,38%, seguido do fungicida, 17 % e o isolado CMAA1922, 13,69%. Nas flores em pré-antese, a maior redução na incidência de *C. xanthochromaticum* foi com a aplicação do fungicida, reduzindo em 61,74% a incidência do patógeno, seguido pelo isolado CMAA1920, 32,9%.



**Fig. 5** Incidência de *C. xanthochromaticum* em racemos de Macadâmia (*Macadamia integrifolia*) tratados com CMAA1920, CMAA1922 e fungicida em diferentes estágios florais. Médias seguidas da mesma letra, minúscula entre tratamentos e maiúscula entre estágios florais, não diferem uma da outra (Tukey  $p < 0.05$ ). Cu(OH)<sub>2</sub> (Produto comercial a base de hidróxido de cobre utilizado como tratamento padrão, seguindo a recomendação do fabricante). Os dados são médias  $\pm$  EP (n=18)

Os dados de esporulação não apresentaram interação significativa. Nos racemos tratados, o menor valor de esporulação de *C. xanthochromaticum* foi observado no tratamento com a aplicação do fungicida que reduziu em 68,15% a esporulação, seguido pelo isolado CMAA1920, 52,04%. A estirpe CMAA1922 demonstrou capacidade de redução da esporulação de *C. xanthochromaticum* (26,08%) igualando-se ao isolado CMAA1920, porém, não diferiu do tratamento controle (Figura 6a). Na

avaliação do estágio floral, houve uma menor esporulação de *C. xanthochromaticum* no estágio de pré-antese (Figura 6b). Dentre os isolados bacterianos, CMAA1920 demonstrou maior eficiência no controle de *C. xanthochromaticum*.



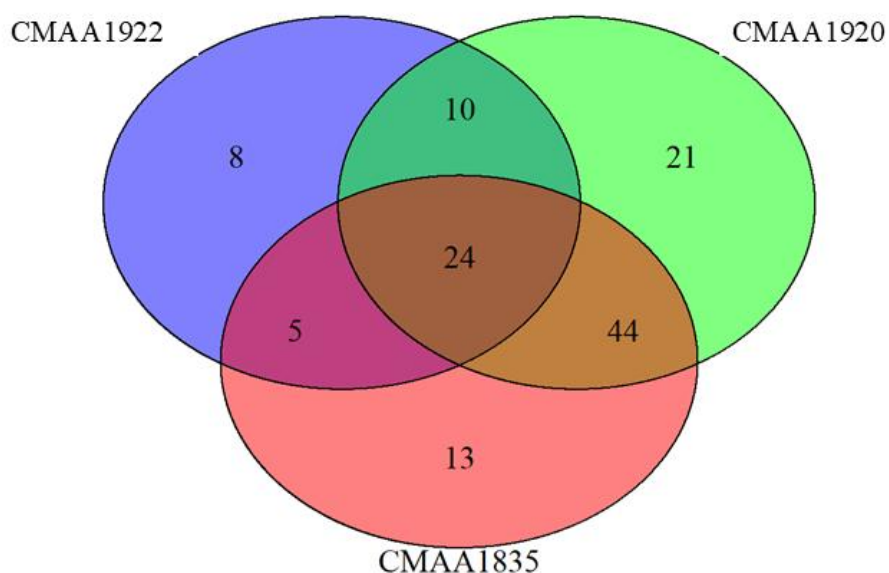
**Fig. 6** Esporulação de *C. xanthochromaticum* em racemos de macadâmia (*Macadamia integrifolia*). **A.** Esporulação em racemos tratados com CMAA1920, CMAA1922 e fungicida. **B.** Esporulação em diferentes estágios florais. Médias seguidas da mesma letra não diferem uma da outra (Tukey  $p < 0.05$ ). Cu(OH)<sub>2</sub> (Produto comercial a base de hidróxido de cobre utilizado como tratamento padrão, seguindo a recomendação do fabricante). Os dados são médias  $\pm$  EP (n=18).

### 1.3.5 Identificação e caracterização dos mecanismos de controle de *Cladosporium xanthochromaticum* por *Bacillus subtilis* e *Serratia ureilytica*

#### 1.3.5.1 Similaridade nutricional

As estirpes CMAA1920 e CMAA1922 e o fitopatógeno CMAA1835 foram hábeis em utilizar 24 fontes em comum (Figura 7), sendo as seguintes fontes de carbono: Dextrin, Glycogen, L-Fucose, Gentiobiose, m-Inositol,  $\alpha$ -D-Lactose, Lactulose, D-Melibiose, D-Raffinose, Turanose, Xylitol, D-Galacturonic Acid,  $\alpha$ -Keto Glutaric Acid, L- Malic Acid, D-Malic Acid, D-Saccharic Acid, Succinic Acid, Glucuronamide, L-Alanyl-Glycine, L-Asparagine, L-Glutamic Acid, Glycyl-L-Glutamic Acid, L-Ornithine, e Glucose-1-Phosphate. CMAA1922 foi hábil em metabolizar 8 fontes individualmente, sendo Mannan, Inulin,  $\alpha$ -Methyl-D-Glucoside,  $\alpha$ -Methyl-D-Mannoside, Sedoheptulose,  $\alpha$ -Hydroxybutyric Acid,  $\gamma$ -Hydroxy Butyric Acid e Lactamide. CMAA1920 foi hábil em metabolizar 21 fontes individualmente, N-Acetyl-D-galactosamine, N-Acetyl-L-Glutamic Acid, Methyl Pyruvate,

Mono-Methyl-Succinate, Cis-Asconitic Acid, Formic Acid, D-Glucosaminic Acid,  $\alpha$ -Keto Butyric Acid, Pyruvic Acid, L-Alaninamide, Glycy-L-Aspartic Acid, Glycyl-L-Glutamic Acid, Hydroxy-L-Proline, D-Serine, D,L-Carnitine, Urocanic Acid, Inosine, 2'-DeoxyAdenosine, Thymidine, Phenyethylamine, e D, L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate. CMAA1835 foi hábil em metabolizar 13 fontes individualmente, Alaninamide, Amygdalin, D-Arabinose, L-Sorbose, Maltitol, Palatinose, Fumaric Acid, D-Glucosamine, 2-Keto-D-Gluconic Acid, D-Lactic Acid Methyl Ester, Succinic Acid Mono-Methyl Ester, Succinamic Acid, e L-Pyroglutamic Acid. No geral, a estirpe CMAA1920 foi hábil em metabolizar 99 fontes. A estirpe CMAA1922 foi hábil em metabolizar 47 fontes e o fitopatígeno CMAA1835 foi hábil em metabolizar 86 fontes (Figura 7).



**Fig. 7** Diagrama de Venn fontes de carbono consumidas pelas estirpes CMAA1922 (*Bacillus subtilis*), CMAA1920 (*Serratia ureilytica*) e CMAA1835 (*Cladosporium xanthochromaticum*).

O isolado CMAA1920 foi hábil em metabolizar 76% de todos os compostos fontes de carbono, enquanto CMAA1922 foi capaz de metabolizar apenas 36% de todos os compostos únicos de fontes de carbono. Considerando as classes de fontes de carbono separadamente, o isolado CMAA1920 foi capaz de utilizar mais aminoácidos, ácidos orgânicos, álcoois, amidas e aminas e outras classes em relação a

CMAA1835. O isolado CMAA1920 também mais fontes quando comparado ao isolado CMAA1922, metabolizando 52,5% mais fontes de carbono (Tabela 2).

**Tabela 2**

Número de compostos utilizados como únicas fontes de carbono, pelos isolados antagonistas selecionados.

| Isolado  | Carb. | Amino. | Ac. Org. | Álcoois | Ami. | Outros |
|----------|-------|--------|----------|---------|------|--------|
| CMAA1920 | 32    | 16     | 27       | 4       | 6    | 14     |
| CMAA1922 | 20    | 6      | 12       | 1       | 2    | 6      |
| CMAA1835 | 38    | 12     | 20       | 2       | 5    | 10     |
| Fontes   | 44    | 18     | 37       | 4       | 9    | 18     |

Total = todas as 130 fontes de carbono únicas, incluindo compostos não classificados, Carb.= carboidratos, Amino.= aminoácidos, Ac. Org.= ácidos orgânicos, Ami.= amidas e aminas, Fontes = número de cada classe de fonte de carbono testada. CMAA1920 (*Serratia ureilytica.*), CMAA1922 (*Bacillus subtilis.*) e CMAA1835 (*C. xanthochromaticum.*).

Considerando todas as fontes de carbono, não houve índice de sobreposição de nicho significativo de CMAA1920 e CMAA1922 sobre CMAA1835 (Tabela 3). Foi observado índice de sobreposição de nicho significativo somente para a estirpe CMAA1920 para aminoácidos e álcoois. CMAA1835 demonstrou NOI contrastante somente para carboidratos em relação ao antagonista CMAA1920.

**Tabela 3**

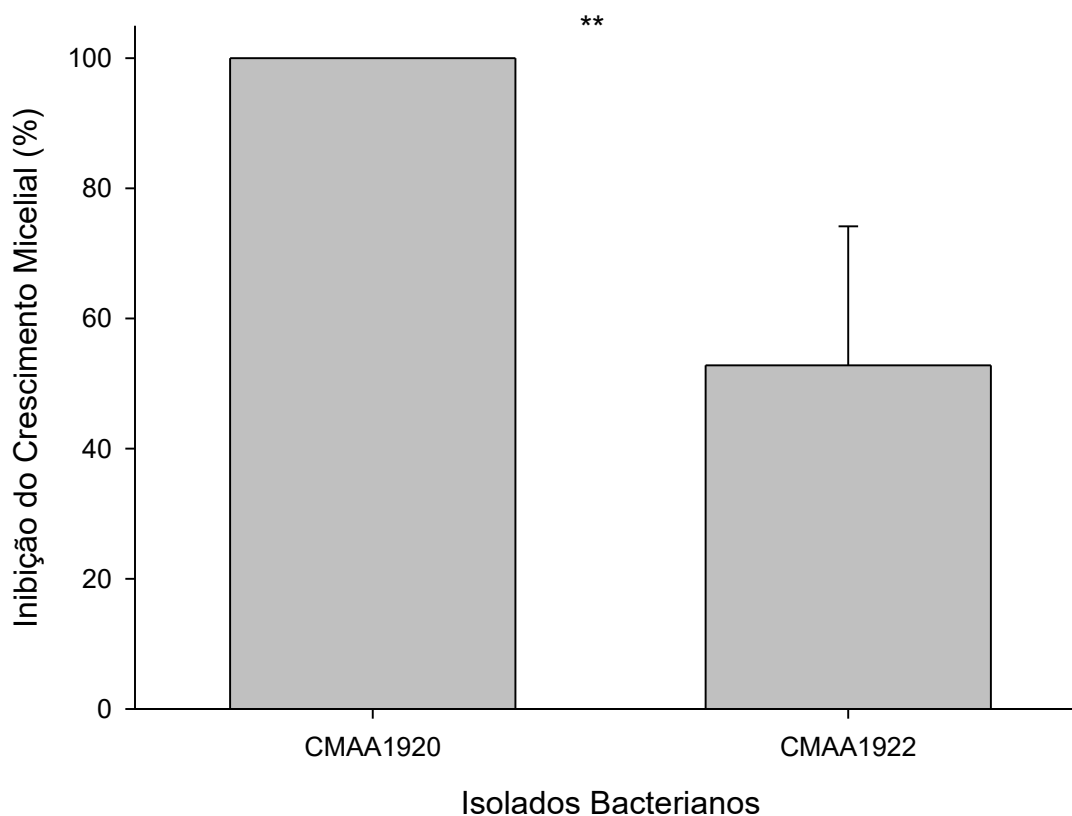
NOIs para bactérias antagônicas pareadas com *C. xanthochromaticum*, derivadas de dados de utilização de compostos.

| Isolado  | Total              |                   | Carb.              |                   | Amino.             |                   | Ac. Org.           |                   | Álcoois            |                   | Ami                |                   | Outros             |                   |
|----------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
|          | NOI <sub>ant</sub> | NOI <sub>cx</sub> | NOI <sub>ant</sub> | NOI <sub>cx</sub> | NOI <sub>ant</sub> | NOI <sub>cx</sub> | NOI <sub>ant</sub> | NOI <sub>cx</sub> | NOI <sub>ant</sub> | NOI <sub>cx</sub> | NOI <sub>ant</sub> | NOI <sub>cx</sub> | NOI <sub>ant</sub> | NOI <sub>cx</sub> |
| CMAA1920 | 0,8                | 0,69              | 0,8                | 0,94              | <b>0,9</b>         | 0,69              | 0,7                | 0,52              | <b>1</b>           | 0,5               | 0,6                | 0,5               | 0,8                | 0,57              |
| CMAA1922 | 0,34               | 0,62              | 0,39               | 0,75              | 0,4                | 0,83              | 0,3                | 0,5               | -                  | -                 | 0,2                | 0,5               | 0,2                | 0,33              |

NOI<sub>ant</sub> representa a sobreposição de nicho de bactérias antagonistas sobre *C. xanthochromaticum*. NOI<sub>cx</sub> representa o índice de sobreposição de nicho de *C. xanthochromaticum* sobre bactérias antagonistas. NOIs foram derivados de dados de utilização de substrato gerados usando as microplacas Biolog GP2 e GN2. Total = todas as 95 fontes de carbono únicas, incluindo compostos não classificados, Carb.= carboidratos, Amino. = aminoácidos, Ac. Org.= ácidos orgânicos, Ami. = amidas e aminas. NOIs > 0,9 indica sobreposição de nicho significativa (em negrito), NOI < 0,9 indica sobreposição de nicho não significativa.

#### 1.3.5.2 Antibiose por compostos voláteis

O ensaio de inibição *in vitro* do crescimento micelial de *C. xanthochromaticum* por compostos voláteis revelou que ambas os isolados bacterianos produziram compostos com potencial inibitório, suprimindo o crescimento de *C. xanthochromaticum*, resultando numa inibição de 100% e 52,79% os isolados CMAA1920 e CMAA1922, respectivamente (Figura 8).



**Fig. 8** Inibição do crescimento micelial de *C. xanthochromaticum* por compostos voláteis de *Serratia ureilytica* e *Bacillus subtilis*. Médias apresentam diferenças significativas ( $p < 0.01$ ) pelo teste T. Os dados são médias  $\pm$  EP (n=10).

#### 1.3.5.3 Determinação dos compostos voláteis

O perfil de compostos voláteis (CV) indicou que houve diversidade de moléculas produzidas pelos isolados. Estirpe CMAA1920 produziu sete compostos voláteis enquanto a estirpe CMAA1922 produziu seis (Tabela 4). Em comum, as estirpes produziram três CVs sendo, acetoin, dimetil disulfide e dimethyl trisulfide. Individualmente, CMAA1920 produziu ethoxyacetylene, methylcyclobutane, 3-(1-methylethyl) oxetane e methyl vinyl ketone. CMAA1922 produziu vinyl acetate, 2,3 butanedione e diisopropil ether.

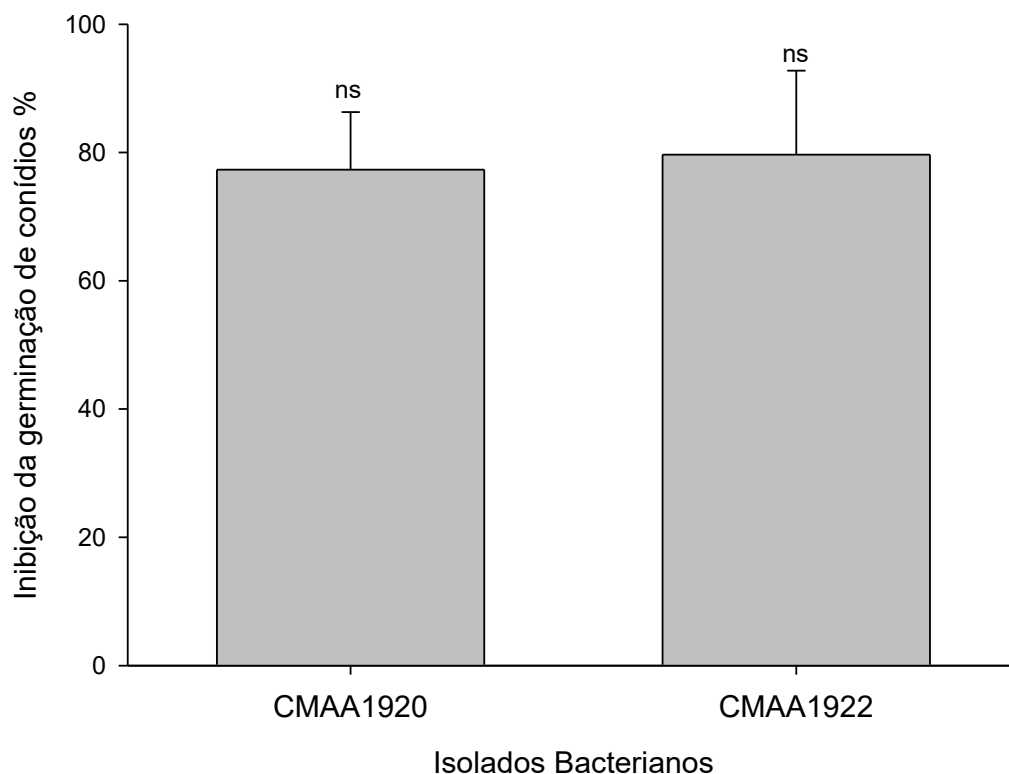
**Tabela 4**

Perfil de compostos orgânicos voláteis (VOCs) produzidos por *Serratia ureilytica* – CMAA1920 e *Bacillus subtilis* – CMAA1922

| VOCs name                  | Retention time (min) | CAS No.    | Match |
|----------------------------|----------------------|------------|-------|
| <i>Serratia ureilytica</i> |                      |            |       |
| Acetoin                    | 5,0772               | 513-86-0   | 92,52 |
| Ethoxyacetylene            | 5,5543               | 927-80-0   | 94,3  |
| Methylcyclobutane          |                      | 598-61-8   | 93,24 |
| 3-(1-methylethyl)oxetane   |                      | 10317-17-6 | 92,6  |
| Methyl vinyl ketone        |                      | 78-94-4    | 92,34 |
| Dimetil disulfide          | 5,8188               | 624-92-0   | 69,52 |
| Dimethyl trisulfide        | 11,7758              | 3658-80-8  | 96,81 |
| <i>Bacillus subtilis</i>   |                      |            |       |
| Vinyl acetate              | 4,2465               | 108-05-4   | 94,75 |
| 2,3 butanedione            |                      | 431-03-8   | 90,36 |
| Acetoin                    | 5,1294               | 513-86-0   | 88,26 |
| Dimetil disulfide          | 5,8238               | 624-92-0   | 85,4  |
| Diisopropil ether          | 8,09                 | 108-20-3   | 75,43 |
| Dimethyl trisulfide        | 11,75                | 3658-80-8  | 92,35 |

#### 1.3.5.4 Inibição da germinação de conídios por filtrado livre de células

O teste T não revelou diferenças significativas entre as médias ( $p > 0.05$ ) na inibição da germinação de conídios de *C. xanthochromaticum* pelo filtrado livre de células das estirpes CMAA1920 e CMAA1922. A estirpe CMAA1920 inibiu  $77,31 \pm 8,97$  % da germinação de esporos do fitopatógeno, enquanto CMAA1922 inibiu  $79,67 \pm 13,09$  % (Fig. 9).



**Fig. 9** Inibição da germinação de conídios de *C. xanthochromaticum* por filtrado livre de células de *Serratia ureilytica*. e *Bacillus subtilis*. Os dados são médias  $\pm$  erro padrão (n=08).

#### 1.3.6 Compatibilidade de bactérias antagonistas com defensivos agrícolas usados em macadâmia no Brasil

Os isolados CMAA1920 e CMAA1922 demonstraram compatibilidade com quase todos os ingredientes ativos testados, embora tenha sido observada variação nas unidades formadoras de colônia (UFCs) ao longo do tempo de contato (Tabela 5). Após 24 horas, a população manteve-se estável e semelhante ao controle, exceto no tratamento com hidróxido de cobre, que reduziu significativamente as UFCs do isolado CMAA1920, indicando incompatibilidade com este.

**Tabela 5**

Contagem de UFC ( $\text{mL}^{-1}$ ) de *Serratia ureilytica* e *Bacillus subtilis* em testes de compatibilidade com ingredientes ativos utilizados na macadâmia

| Ingrediente ativo                                     | <i>Serratia ureilytica</i> |         |          | <i>Bacillus subtilis</i> |         |        |
|-------------------------------------------------------|----------------------------|---------|----------|--------------------------|---------|--------|
|                                                       | Tempo (h)                  |         |          | Tempo (h)                |         |        |
|                                                       | 1                          | 6       | 24       | 1                        | 6       | 24     |
| Abamectina (84 g/L)                                   | 19,76aA                    | 19,30aB | 19,21aB  | 15,8abcA                 | 15,9aA  | 15,1bB |
| Acetamiprido (200 g/kg)                               | 19,02bA                    | 19,25aA | 19,20aA  | 15,2bcB                  | 15,3abB | 16,7aA |
| Acibenzolar-S-metílico (500 g/kg)                     | 18,94bA                    | 18,97aA | 19,12aA  | 16,2aAB                  | 15,7abB | 16,4aA |
| Azoxistrobina (200 g/L) +<br>Difenoconazol (125 g/L)  | 19,58aA                    | 19,12aB | 19,25aAB | 15,0cB                   | 14,8bcB | 16,5aA |
| Clorotalonil (500 g/L)                                | 19,59aA                    | 19,18aB | 19,32aAB | 15,2cB                   | 14,2cC  | 16,9aA |
| Controle                                              | 19,61aA                    | 19,14aB | 19,27aAB | 16,2abA                  | 15,7abA | 16,3aA |
| Enxofre (800 g/kg)                                    | 18,86bA                    | 17,66bC | 18,12bB  | 15,1cB                   | 15,4abB | 16,5aA |
| Fluxapiroxade (167 g/L) +<br>Piraclostrobina (333g/L) | 19,27abA                   | 19,28aA | 19,30aA  | 15,8abcA                 | 15,8aA  | 16,1aA |
| Hidróxido de cobre (537 g/kg)                         | 13,14cA                    | 9,58cB  | 3,27cC   | 14,9cB                   | 15,8aA  | 14,8bB |

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem uma da outra (Tukey  $p < 0.05$ ). Controle= água destilada esterilizada.

#### 1.4 DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que bactérias obtidas da antosfera de macadâmia têm potencial de exercer o biocontrole da queima de racemos, causados por *Cladosporium xanthochromaticum* (CMAA1835). Os bioensaios com racemos destacados mostraram que alguns isolados bacterianos são capazes de inibir o desenvolvimento do fitopatógeno. Nosso estudo levou a seleção de duas estirpes com potencial para serem utilizados no controle da doença em campo, sendo um isolado de *Serratia ureilytica* (CMAA1920) e outro de *Bacillus subtilis* (CMAA1922). Este estudo é o primeiro envolvendo a seleção

de antagonistas para o controle da queima dos racemos da macadâmia. Alguns estudos já foram feitos no controle biológico de doenças em macadâmia, porém envolvendo o controle de patógenos caulinares ou podridões radiculares (LI et al., 2022; VELÁZQUEZ; OCAMPOS, 2016). *Bacillus subtilis* é um antagonistas reportado como eficaz no controle de várias doenças e na promoção de crescimento vegetal, podendo agir por meio de vários mecanismos, como antibiose, competição por espaço ou nutrientes e indução de mecanismos de defesa nos hospedeiros (BELETE et al., 2021; ETESAMI; JEONG; GLICK, 2023; VAN TOOR et al., 2005; ZITTER et al., 2005). A espécie *Serratia ureilytica* tem poucos relatos de atuar no controle biológico de doenças, havendo somente menção de estirpes com atividade nematicida (WONG-VILLARREAL et al., 2021) e no controle de damping-off no tomateiro causado por *Pythium cryptoirregulare* (ABREO et al., 2021).

Os isolados de *Serratia ureilytica* (CMAA1920) e *Bacillus subtilis* (CMAA1922) apresentam capacidade para serem utilizados no controle de *C. xanthochromaticum* em condições de campo. CMAA1920 apresentou eficiência similar ao produto Supera<sup>®</sup>, demonstrando que pode ser um substituto ao controle químico, enquanto CMAA1922 apresentou potencial principalmente na redução de esporulação do fitopatógeno. Com relação ao estágio floral, observamos que em pré-antese, houve menores incidências e esporulação do fitopatógeno no geral. *Cladosporium* spp. pode colonizar e infectar racemos de macadâmia em qualquer estágio de desenvolvimento, além de ser considerado um patógeno latente, pois colonizam os tecidos da planta e podem permanecer endofiticamente até que as condições para o progresso da doença sejam favorável (PRASANNATH; GALEA; AKINSANMI, 2021, 2022, 2023; SILVA et al., 2024; SOSSO; ZAKEEL; AKINSANMI, 2021). Desta forma, o tratamento preventivo durante a fase de pré-antese pode ser importante para impedir o desenvolvimento da doença no campo, associado à observação das condições de ambiente favoráveis ao desenvolvimento do fitopatógeno. Para a queima dos racemos, causada por *Cladosporium* spp., a redução na esporulação do fitopatógeno é fator importante, uma vez que a principal característica dos agentes causais é a colonização das estruturas florais e a profusa produção de esporos que servirão como fonte de inóculo para novas infecções (PRASANNATH; GALEA; AKINSANMI, 2022). *Serratia ureilytica* (CMAA1920) e *Bacillus subtilis* (CMAA1922) foram eficientes na redução da esporulação de *C.*

*xanthochromaticum* desta forma, podem auxiliar na mitigação de danos e interferir na disseminação do fitopatógeno no campo.

*Serratia ureilytica* (CMAA1920) exibiu evidente ação antagônica contra *C. xanthochromaticum*, atuando por múltiplos mecanismos, que foram a produção de moléculas antifúngicas que inibem o crescimento micelial e a germinação de esporos, a produção de compostos voláteis e a competição por nutrientes essenciais, como aminoácidos e álcoois. Da mesma forma, *Bacillus subtilis* (CMAA1922) demonstrou atividade antagônica, suprimindo o desenvolvimento do patógeno por meio da produção de compostos difusíveis e voláteis, atuando também na inibição da germinação de esporos. Entretanto, os dois isolados não demonstraram capacidade em produzir compostos como quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase, demonstrando que a inibição do crescimento micelial e germinação de esporos não está relacionada a enzimas líticas. Wong-Villarreal et al. (2021) demonstrou que a estirpe *Serratia ureilytica* UTS apresentou no seu genoma a capacidade de produzir compostos como a colicina V, cianeto de hidrogênio, hemolisina, serrawettina W2, proteases e quitinases e ainda possui a habilidade de secretar proteases e quitinases extracelulares. Bactérias do gênero *Bacillus* também produzem uma grande diversidade de bacteriocinas (ETESAMI; JEONG; GLICK, 2023; MERCADO; OLMOS, 2022), que são peptídeos antimicrobianos produzidos por diversos procariotos. Estes compostos são liberados no nicho ocupado por esses indivíduos, aumentando a capacidade de competição por espaço e nutrientes (DARBANDI et al., 2022; DOBSON et al., 2012; MERCADO; OLMOS, 2022; WONG-VILLARREAL et al., 2021).

*Serratia ureilytica* (CMAA1920) demonstrou alta versatilidade metabólica, utilizando diversas fontes de carbono, incluindo aminoácidos e álcoois. Sua eficiência em metabolizar diversos aminoácidos, 89% dos substratos testados, contra 67% por *C. xanthochromaticum* e álcoois 100% contra 50%, sugere um mecanismo de exclusão competitiva, limitando recursos ao patógeno. Essa característica alinha-se com a descrição da espécie como utilizadora de ureia e aminoácidos (Bhadra et al., 2005). Nossos resultados também confirmam a capacidade da cepa CMAA1920 em metabolizar ureia como única fonte de carbono, reforçando ainda mais a identidade deste antagonista. Em contraste, *B. subtilis* (CMAA1922) apresentou menor capacidade de utilização de nutrientes, o que pode ter influenciado na sua ineficácia em reduzir a incidência do patógeno em racemos destacados e a campo.

Este aspecto indica que, para este patossistema, a capacidade de exercer mais de um mecanismo de ação pode ser crucial para que o antagonista seja capaz de atuar no controle da doença. A competição por nutrientes pode ser um fator relevante na redução da capacidade infectiva de flores por *Cladosporium* spp.. Podemos citar como exemplo um estudo realizado com *Cladosporium herbarum*, o qual demonstrou ser altamente influenciado pela disponibilidade de grãos de pólen na filosfera de centeio. Na presença de pólen, observou-se 7.700 esporos por cm<sup>2</sup>, enquanto na ausência apenas 960 esporos por cm<sup>2</sup> (FOKKEMA, 1968). Sendo o pólen provedor de fontes de carbono e nitrogênio (ROULSTON; CANE, 2000), a competição por estas fontes pode vir a interferir no potencial de inóculo em pré-penetração. Em racemos de macadâmia, é comum observar alta esporulação de *C. xanthochromaticum*, justamente nas regiões de acúmulo de pólen. Isso sugere que os antagonistas podem estar competindo com o fitopatógeno por esses nutrientes, limitando seu desenvolvimento, conforme proporcionado pelo antagonista CMAA1920.

Os resultados indicam que os VOCs produzidos pelas estirpes atuaram como principais compostos inibitório ao desenvolvimento do fitopatógeno. A atividade antifúngica dos VOCs está associada à sua capacidade de desorganizar a integridade da parede celular, perturbar a estrutura da membrana plasmática, levando ao extravasamento de conteúdo intracelular, e induzir estresse oxidativo nas células fúngicas (ZHAO et al., 2022). Herrington et al. (1987) demonstraram o efeito fungistático do metil vinil cetona (methyl vinyl ketone) na inibição da germinação de esporos de *Cladosporium cladosporioides*. Em nosso estudo, a estirpe *Serratia ureilytica* CMAA1920 também produziu este composto volátil, o que leva a inferir que este composto esteja relacionado à evidente capacidade de inibir o desenvolvimento do patógeno. O composto Dimetil disulfide também já foi relatado sendo produzido pela estirpe *Serratia ureilytica* ILBB 145, que demonstrou ação sobre o crescimento micelial do oomiceto *Pythium cryptoirregulare* (ABREO et al., 2021), além de apresentar ação antifúngica contra *Phyllosticta citricarpa* (TOFFANO; FIALHO; PASCHOLATI, 2017) e *Penicillium italicum* junto ao composto Dimethyl trisulfide (WANG et al., 2021). Já 2,3-butanediol e acetoin são relatados demonstrando ação de promoção de crescimento (RYU et al., 2003) e além disso podem atuar como elicitores na indução de defesa contra fitobactérias, além de ocasionar danos fisiológicos em células bacterianas como de *Ralstonia solanacearum* (SIERRA, 1957; TAHIR et al., 2017). Nossos resultados

corroboram o potencial biotecnológico dos isolados *Serratia ureilytica* (CMAA1920) e *B. subtilis* (CMAA1922) como produtores de compostos voláteis com atividade inibitória à patógenos, abrindo caminho para novas aplicações.

Os resultados demonstram que as estirpes CMAA1922 e CMAA1920 apresentaram compatibilidade com os principais ingredientes ativos testados para macadâmia (tabela 5), exceto pela sensibilidade da CMAA1920 ao hidróxido de cobre. A compatibilidade observada auxilia na adoção e aplicação dos antagonistas como componentes do manejo integrado da doença, permitindo o controle simultâneo de *C. xanthochromaticum* via agentes de biocontrole e pragas florais (pulgões, tripses via inseticidas) e redução de aplicações de fungicidas, auxiliando no manejo de resistência, sem comprometer a eficácia dos agentes de biocontrole. Estas práticas são particularmente relevantes para macadâmia, em que a ocorrência simultânea de patógenos e pragas exige soluções integradas. Vários estudos comprovam a compatibilidade de agentes de biocontrole com pesticidas, principalmente *Bacillus* spp. e ainda relatam sinergismo entre os agentes de biocontrole e os pesticidas, aumentando a eficiência do controle de fitopatógenos (ONS et al., 2020; PENG et al., 2014, 2017; SU et al., 2022). A estirpe CMAA1920, embora sensível ao hidróxido de cobre, apresentou plena compatibilidade com os seguintes grupos de fungicidas: clorotalonil, estrobilurinas, triazóis e carboxamidas. Esta compatibilidade é particularmente relevante considerando os achados de Halfeld-Vieira et al. (2024), que reportaram sensibilidade de *C. xanthochromaticum* (CMAA1835) a esses mesmos grupos químicos. Desta forma, a estirpe CMAA1920 pode ser aplicada em associação com estas moléculas sem interferências no seu desenvolvimento.

## 1.5 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo demonstrou que os agentes de biocontrole *Serratia ureilytica* (CMAA1920) e *Bacillus subtilis* (CMAA1922) são hábeis no controle de *C. xanthochromaticum* (CMAA1835) em macadâmia em condições de campo. As estirpes demonstraram agir por meio de vários mecanismos no controle do fitopatógeno, principalmente pela liberação de compostos voláteis.

Além disso, são compatíveis com os principais pesticidas utilizados em macadâmia no Brasil, permitindo aplicações associadas entre agentes de biocontrole e pesticidas

## REFERÊNCIAS

ABDEL-MOTAAL, F. F.; EL-SAYED, M. A.; EL-ZAYAT, S. A.; NASSAR, M. S. M.; ITO, S. ichi. Leaf spot disease of *Hyoscyamus muticus* (Egyptian henbane) caused by *Cladosporium herbarum*.

**Journal of General Plant Pathology**, [s. l.], v. 75, n. 6, p. 437–439, 2009.

ABREO, E.; VALLE, D.; GONZÁLEZ, A.; ALTIER, N. Control of damping-off in tomato seedlings exerted by *Serratia* spp. strains and identification of inhibitory bacterial volatiles in vitro. **Systematic and Applied Microbiology**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 126177, 2021.

AKINSANMI, O. Diseases affecting macadamia flowers : a significant threat to production.

**Horticulture Innovation Australia**, [s. l.], n. May 2015, p. 67–70, 2015.

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**, [s. l.], v. 101, n. 1, p. 45–53, 2017.

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ALFENAS, R. F. Produção, determinação e calibração da concentração de inóculo em suspensão. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Eds.). **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2016. p. 516.

ALVES, A.; CROUS, P. W.; CORREIA, A.; PHILLIPS, A. J. L. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, [s. l.], v. 28, p. 1–13, 2008.

ARRUDA, A.; FERREIRA, G. S.; LIMA, N. C. da S.; SANTOS JÚNIOR, A. Dos; CUSTÓDIO, M. G. F.; BENEVIDES-MATOS, N.; OZAKI, L. S.; STABELI, R. G.; SILVA, A. A. A simple methodology to collect culturable bacteria from feces of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae).

**Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 141, n. August, p. 115–117, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2017.08.004>>

BELETE, T.; BASTAS, K. K.; FRANCESCONI, S.; BALESTRA, G. M. Biological effectiveness of *Bacillus subtilis* on common bean bacterial blight. **Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 249–258, 2021. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez87.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s42161-020-00727-8>>. Acesso em: 14 maio. 2022.

BENSCH, K.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The genus *cladosporium*. **Studies in Mycology**, [s. l.], v. 72, p. 1–401, 2012.

BENSCH, K.; GROENEWALD, J. Z.; DIJKSTERHUIS, J.; STARINK-WILLEMSE, M.; ANDERSEN, B.; SUMMERELL, B. A.; SHIN, H. D.; DUGAN, F. M.; SCHROERS, H. J.; BRAUN, U.; CROUS, P. W. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*). **Studies in Mycology**, [s. l.], v. 67, p. 1–94, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3114/sim.2010.67.01>>

BENSCH, K.; GROENEWALD, J. Z.; MEIJER, M.; DIJKSTERHUIS, J.; JURJEVIĆ; ANDERSEN, B.; HOUBRAKEN, J.; CROUS, P. W.; SAMSON, R. A. *Cladosporium* species in indoor environments. **Studies in Mycology**, [s. l.], v. 89, p. 177–301, 2018.

BHADRA, B.; ROY, P.; CHAKRABORTY, R. *Serratia ureilytica* sp. nov., a novel urea-utilizing species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 5, p. 2155–2158, 2005. Disponível em: <<http://ijs.sgmjournals.org>>. Acesso em: 4 abr. 2025.

BRIGHT, J. **Macadamia plant protection guide 2024–25**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/horticulture/nuts/growing-guides/%0Amacadamia-protection-guide>>

COMPANT, S.; SAMAD, A.; FAIST, H.; SESSITSCH, A. **A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application**, Elsevier, 2019.

CROWLEY-GALL, A.; TROUILLAS, F.; NINO, E. L.; SCHAEFFER, R. N.; NOURI, M. T.; CRESPO, M.; VANNETTE, R. Floral microbes suppress growth of *Monilinia laxa* with minimal effects on honey bee feeding. **Plant Disease**, [s. l.], p. 1–40, 2021.

DARBANDI, A.; ASADI, A.; MAHDIZADE ARI, M.; OHADI, E.; TALEBI, M.; HALAJ ZADEH, M.; DARB EMAMIE, A.; GHANAVATI, R.; KAKANJ, M. **Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials**, John Wiley & Sons, Ltd, 2022. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcla.24093>>. Acesso em: 4 abr. 2025.

DAVID, J. C. A contribution to the systematics of *Cladosporium*. Revision of the fungi previously referred to *Heterosporium*. **Mycological Papers**, [s. l.], v. 172, p. 1–157, 1997.

DOBSON, A.; COTTER, P. D.; PAUL ROSS, R.; HILL, C. **Bacteriocin production: A probiotic trait?**, American Society for Microbiology, 2012. Disponível em:

<<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.05576-11>>. Acesso em: 4 abr. 2025.

ESSA AL-RUBKHI, A. G.; MOHAMMED AL-SADI, A.; JANKE, R.; HASHIL AL-MAHMOOLI, I.; MOHAMMED ALI AL-HARRASI, M.; VELAZHAHAN, R. Kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) rhizosphere bacteria suppress *Pythium aphanidermatum*-induced damping-off of cabbage, produce biofilm and antimicrobial volatile compounds. **Australasian Plant Pathology**, [s. l.], n. 53, p. 305–312, 2024.

ETESAMI, H.; JEONG, B. R.; GLICK, B. R. Biocontrol of plant diseases by *Bacillus* spp.

**Physiological and Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 126, n. January, p. 102048, 2023.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102048>>

FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. **Evolution**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 783, 1985.

FOKKEMA, N. J., 1968. The influence of pollen on the development of *Cladosporium herbarum* in the phyllosphere of rye. **Netherlands Journal of Plant Pathology** 74, 159–165.

<https://doi.org/10.1007/BF01995927>

FRAC. **FRAC Classification of Fungicides**. 2024. Disponível em: <<https://www.frac-br.org/modo-de-acao>>. Acesso em: 20 abr. 2025.

GOMES, I. R. F.; SILVA, J. L. S.; COSTA, T. E.; PINTO, P. S. L.; DA SILVA, W. L.; AMBRÓSIO,

M. M. Q.; HOLANDA, I. S. A. **First Report of Cladosporium tenuissimum Causing Spot Diseases on Leaves and Fruits of Cucurbits in Brazil**, The American Phytopathological Society, 2023.

Disponível em: <<https://apsjournals-apsnet.ez87.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1094/PDIS-10-22-2388-PDN>>. Acesso em: 19 abr. 2025.

GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Eds.). **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2016. p. 516.

GSCHWEND, F.; BRAUN-KIEWNICK, A.; WIDMER, F.; PELLUDAT, C. Apple blossoms from a swiss orchard with low-input plant protection regime reveal high abundance of potential fire blight antagonists. **Phytobiomes Journal**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 145–155, 2021.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; ROMEIRO, R. S.; MIZUBUTI, E. S. G. Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. **Fitopatologia Brasileira**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 638–643, 2004.

HALFELD-VIEIRA, B. de A.; DA SILVA, W. L. M.; SCHURT, D. A.; ISHIDA, A. K. N.; DE SOUZA, G. R.; NECHET, K. de L. Understanding the mechanism of biological control of passionfruit bacterial blight promoted by autochthonous phylloplane bacteria. **Biological Control**, [s. l.], v. 80, p. 40–49, 2015.

HALFELD-VIEIRA, B. de A.; NECHET, K. de L.; ABREU, M. G. P. De; MORIYA, L. M. **Circular Técnica 33 - Identificação e recomendações de manejo de doenças da macadâmia**. Jaguariúna, SP. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1169232/1/Halfeld-Vieira-Recomendacoes-macadamia-2024.pdf>>.

HALFELD-VIEIRA, B. de A.; SANTOS, M. de S. Dos. **BOLETIM DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO 77 Compatibilidade entre ativos biológicos bacterianos e agroquímicos utilizados na produção de mudas de cana-de-açúcar**. Jaguariúna, SP. Disponível em: <[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)>.

HARDNER, C. M.; PEACE, C.; LOWE, A. J.; NEAL, J.; PISANU, P.; POWELL, M.; SCHMIDT, A.; SPAIN, C.; WILLIAMS, K. Genetic Resources and Domestication of Macadamia. In: **Horticultural Reviews**. [s.l.] : John Wiley & Sons, Ltd, 2009. v. 35p. 1–125.

HERRINGTON, P. R.; CRAIG, J. T.; SHERIDAN, J. E. Methyl vinyl ketone: A volatile fungistatic inhibitor from *Streptomyces griseoruber*. **Soil Biology and Biochemistry**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 509–512, 1987.

HEUCHERT, B.; BRAUN, U.; SCHUBERT, K. Morphotaxonomic revision of fungicolous *Cladosporium* species (hyphomycetes). **Schlechtendalia**, [s. l.], v. 13, p. 1–78, 2005.

HOOG, G. De; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M. **Atlas of clinical fungi**. 2. ed. Washington, DC.: American Society for Microbiology, 2000.

HOWLETT, B. G.; NELSON, W. R.; PATTEMORE, D. E.; GEE, M. Pollination of macadamia: Review and opportunities for improving yields. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 197, p. 411–419, 2015.

INC. Nuts & dried fruits statistical yearbook 2020/2021. **The International Nut and Dried Fruit Council Foundation**, [s. l.], p. 1–78, 2021.

INC, I. N. and D. F. **Macadamia Technical Information**INC International Nut and Dried Fruit Council. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.astbearings.com/bearing-materials.html>>.

JAMI, F.; MOREY, L. Management Strategies for Macadamia Branch Dieback in South Africa. **Journal of Phytopathology**, [s. l.], v. 172, n. 6, 2024.

JEFF-EGO, O. S.; AKINSANMI, O. A. Botryosphaeriaceae causing branch dieback and tree death of macadamia in Australia. **Australasian Plant Pathology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 59–64, 2019.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 969–976, 1970.

KIM, J.; CUI, Y.; LEE, H.; CHUN, S. J. Microbiome dataset of bacterial and fungal communities in

anthosphere of twelve different wild plants in South Korea. **Data in Brief**, [s. l.], v. 50, p. 109470, 2023.

KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W. J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 10, n. July, p. 1–19, 2019.

KÖHL, J.; POSTMA, J.; NICOT, P.; RUOCCO, M.; BLUM, B. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. **Biological Control**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 1–12, 2011.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mbe/article/35/6/1547/4990887>>. Acesso em: 7 nov. 2021.

LEVETIN, E.; DORSEY, K. Contribution of leaf surface fungi to the air spora. In: AEROBIOLOGIA 2006, **Anais...** [s.l: s.n.]

LI, X.; LENG, J.; YU, L.; BAI, H.; LI, X.; WISNIEWSKI, M.; LIU, J.; SUI, Y. Efficacy of the biocontrol agent *Trichoderma hamatum* against *Lasiodiplodia theobromae* on macadamia. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 13, n. August, p. 1–9, 2022.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C. Preparações e observações microscópicas de espécimes fúngicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Eds.). **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2016. p. 516.

MARIN-FELIX, Y.; GROENEWALD, J. Z.; CAI, L.; CHEN, Q.; MARINCOWITZ, S.; BARNES, I.; BENSCH, K.; BRAUN, U.; CAMPORESI, E.; DAMM, U.; DE BEER, Z. W.; DISSANAYAKE, A.; EDWARDS, J.; GIRALDO, A.; HERNÁNDEZ-RESTREPO, M.; HYDE, K. D.; JAYAWARDENA, R. S.; LOMBARD, L.; LUANGSA-ARD, J.; MCTAGGART, A. R.; ROSSMAN, A. Y.; SANDOVAL-DENIS, M.; SHEN, M.; SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P.; VAN DER LINDE, E. J.;

WINGFIELD, M. J.; WOOD, A. R.; ZHANG, J. Q.; ZHANG, Y.; CROUS, P. W. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. **Studies in Mycology**, [s. l.], v. 86, p. 99–216, 2017.

MATES, A. de P. K.; PONTES, N. de C.; HALFELD-VIEIRA, B. de A. *Bacillus velezensis* GF267 as a multi-site antagonist for the control of tomato bacterial spot. **Biological Control**, [s. l.], v. 137, n. June, p. 104013, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104013>>

MERCADO, V.; OLMOS, J. Bacteriocin Production by *Bacillus* Species: Isolation, Characterization, and Application. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 1151–1169, 2022. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez87.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s12602-022-09966-w>>. Acesso em: 4 abr. 2025.

MIKICIŃSKI, A.; PUŁAWSKA, J.; MOLZHIGITOVA, A.; SOBICZEWSKI, P. Bacterial species recognized for the first time for its biocontrol activity against fire blight (*Erwinia amylovora*). **European Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 156, n. 1, p. 257–272, 2020.

MOHANKUMAR, V.; DANN, E. K.; AKINSANMI, O. A. Diversity and Pathogenicity of Botryosphaeriaceae Associated with Macadamia Branch Dieback in Australia. **Plant Disease**, [s. l.], v. 106, n. 10, p. 2576–2582, 2022.

NAGAO, M. A.; HIRAE, H. H. Macadamia: Cultivation and physiology. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 441–470, 1992.

NAM, M. H.; PARK, M. S.; KIM, H. S.; KIM, T. Il; KIM, H. G. *Cladosporium cladosporioides* and *C. tenuissimum* cause blossom blight in strawberry in Korea. **Mycobiology**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 354–359, 2015.

NOGUEIRA, N. R. O AGRONEGÓCIO DA MACADÂMIA: UMA BREVE ANÁLISE DOS ASPECTOS DE PRODUÇÃO, ECONÔMICO E SOCIAL. **INTERFACE TECNOLÓGICA**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 21–28, 2008.

ONS, L.; BYLEMANS, D.; THEVISSSEN, K.; CAMMUE, B. P. A. Combining biocontrol agents with chemical fungicides for integrated plant fungal disease control. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 12, p.

1–19, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/8/12/1930/htm>>. Acesso em: 9 abr. 2025.

PACIFICO, M. G.; ECKSTEIN, B.; BETTIOL, W. Screening of *Bacillus* for the development of bioprotectants for the control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *meloidogyne incognita*. **Biological Control**, [s. l.], v. 164, n. September, 2021.

PELLICCIARO, M.; LIONE, G.; GIORDANO, L.; GONTHIER, P. Biocontrol potential of *Pseudomonas protegens* against *Heterobasidion* species attacking conifers in Europe. **Biological Control**, [s. l.], v. 157, 2021. Disponível em: <<https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104583>>. Acesso em: 4 nov. 2021.

PELZER, G. Q.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. de L.; DE SOUZA, G. R.; ZILLI, J. É.; PERIN, L. Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 95–103, 2011.

PENG, D.; LI, S.; CHEN, C.; ZHOU, M. Combined application of *Bacillus subtilis* NJ-18 with fungicides for control of sharp eyespot of wheat. **Biological Control**, [s. l.], v. 70, p. 28–34, 2014.

PENG, D.; LUO, K.; JIANG, H.; DENG, Y.; BAI, L.; ZHOU, X. Combined use of *Bacillus subtilis* strain B-001 and bactericide for the control of tomato bacterial wilt. **Pest Management Science**, [s. l.], v. 73, n. 6, p. 1253–1257, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ps.4453>>. Acesso em: 9 abr. 2025.

PIMENTEL, L. D.; DOS SANTOS, C. E. M.; WAGNER, A.; SILVA, V. A.; BRUCKNER, C. H. Estudo de viabilidade econômica na cultura da noz-macadâmia no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 500–507, 2007.

PIZA, P. L. B. de T.; PIZA, I. M. de T.; ALMEIDA NETO, J. de T. P. e. A Cultura. In: PIMENTEL, L.; BORÉM, A. (Eds.). **Macadâmia: do plantio a colheita**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2019. p. 160.

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**,

[s. l.], p. 1–16, 2021.

PRASANNATH, K.; GALEA, V. J.; AKINSANMI, O. A. Sources, Detection, and Inoculum Quantification of Flower Blight Pathogens in Macadamia. **Phytopathology**, [s. l.], v. 112, n. 10, p. 2151–2158, 2022.

PRASANNATH, K.; GALEA, V. J.; AKINSANMI, O. A. Diversity and pathogenicity of species of Botrytis , Cladosporium , Neopestalotiopsis and Pestalotiopsis causing flower diseases of macadamia in Australia. [s. l.], n. January, p. 1–19, 2023.

RAGUKULA, K.; MAKANDAR, R. Isolation and identification of Cladosporium tenuissimum causing leaf blight on garden pea (Pisum sativum L.) in Telangana from southern India. **Crop Protection**, [s. l.], v. 185, p. 106891, 2024.

RENWICK., A.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of Gaeumannomyces graminis. **Plant Pathology**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 524–532, 1991.

ROSADO, A. W. C.; CUSTÓDIO, F. A.; PINHO, D. B.; FERREIRA, A. P. S.; PEREIRA, O. L. Cladosporium species associated with disease symptoms on Passiflora edulis and other crops in Brazil, with descriptions of two new species. **Phytotaxa**, [s. l.], v. 409, n. 5, p. 239–260, 2019. Disponível em: <<https://sci-hub.se/10.11646/phytotaxa.409.5.1>>. Acesso em: 13 out. 2021.

ROULSTON, T. H., CANE, J. H., 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. **Plant Systematics and Evolution**. 222, 187-209. <https://doi.org/10.1007/BF00984102>

RYU, C. M.; FARAGT, M. A.; HU, C. H.; REDDY, M. S.; WEI, H. X.; PARÉ, P. W.; KLOEPPER, J. W. Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 100, n. 8, p. 4927–4932, 2003. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0730845100>>. Acesso em: 8 abr. 2025.

SCRASCIA, M.; PAZZANI, C.; VALENTINI, F.; OLIVA, M.; RUSSO, V.; D’ADDABBO, P.; PORCELLI, F. Identification of pigmented Serratia marcescens symbiotically associated with

*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae). **MicrobiologyOpen**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 883–890, 2016.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 15–22, 1957. Disponível em:

<<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02545855>>. Acesso em: 8 abr. 2025.

SILVA, R.; NECHET, K. L.; MORIYA, L. M.; CARVALHO, V. N.; BIAFORA, M. R.; DE SOUZA, D. E. H.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Etiology and prevalence of macadamia diseases in Brazil.

**Australasian Plant Pathology**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 159–174, 2024. Disponível em:

<<https://link.springer.com/10.1007/s13313-024-00969-5>>

SOSSO, J.; ZAKEEL, M. C. M.; AKINSANMI, O. A. Culturable fungal endophytes in Australian macadamia nursery plants. **Australasian Plant Pathology**, [s. l.], v. 50, n. 6, p. 739–746, 2021.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13313-021-00824-x>>

SU, L.; QIU, P.; FANG, Z.; SUN, J.; MO, X.; LIU, Y.; KURAMAE, E. E.; ZHANG, R.; SHEN, B.; SHEN, Q. Potassium Phosphite Enhances the Antagonistic Capability of *Bacillus amyloliquefaciens* to Manage Tomato Bacterial Wilt. **Plant Disease**, [s. l.], v. 106, n. 2, p. 654–660, 2022.

SULLEY, S.; BABADOOST, M.; HIND, S. R. Biocontrol agents from cucurbit plants infected with *Xanthomonas cucurbitae* for managing bacterial spot of pumpkin. **Biological Control**, [s. l.], v. 163, n. August, p. 104757, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104757>>

TAHIR, H. A. S.; GU, Q.; WU, H.; NIU, Y.; HUO, R.; GAO, X. *Bacillus volatiles* adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–15, 2017. Disponível em:

<<https://www.nature.com/articles/srep40481>>. Acesso em: 8 abr. 2025.

TEMMERMANS, J.; LEGEIN, M.; CHECCHIA, I.; FELIS, G. E.; SMETS, W.; KARISE, R.; LEBEER, S. Agricultural practices and pollinators modulate the anthosphere microbiome. **ISME**

**Communications**, [s. l.], 2025. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/ismeco/ycaf026>>. Acesso em: 17 abr. 2025.

TEMPLE, T. N.; THOMPSON, E. C.; UPPALA, S.; GRANATSTEIN, D.; JOHNSON, K. B. Floral colonization dynamics and specificity of *aureobasidium pullulans* strains used to suppress fire blight of pome fruit. **Plant Disease**, [s. l.], v. 104, n. 1, p. 121–128, 2020.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/22/22/4673/2400290>>. Acesso em: 7 nov. 2021.

TOFFANO, L.; FIALHO, M. B.; PASCHOLATI, S. F. Potential of fumigation of orange fruits with volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* to control citrus black spot disease at postharvest. **Biological Control**, [s. l.], v. 108, p. 77–82, 2017.

TOLEDO PIZA, P. IÚIS B. De; MORIYA, LeonaRdo M. Cultivo da macadâmia no Brasil1. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 39–45, 2014.

TRUEMAN, S. J. The reproductive biology of macadamia. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 150, p. 354–359, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2012.11.032>>

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**, The American Phytopathological Society, 2008. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-92-3-0484C>>. Acesso em: 13 out. 2021.

VAN TOOR, R. F.; PAY, J. M.; JASPERS, M. V; STEWART, A. Evaluation of phylloplane microorganisms for biological control of camellia flower blight. **Australasian Plant Pathology**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 525–531, 2005. Disponível em: <[www.publish.csiro.au/journals/app](http://www.publish.csiro.au/journals/app)>. Acesso em: 20 out. 2021.

VELÁZQUEZ, A. D. S.; OCAMPOS, C. J. G. Control biológico de *Rosellinia* sp. causante de la

muerte súbita en macadamia (*Macadamia integrifolia*) con aislados de *Trichoderma* spp.

**Investigación Agraria**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 77–86, 2016. Disponível em:

<[http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2305-](http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2305-)

06832016000200077&lng=es&nrm=iso&tlng=es>. Acesso em: 18 mar. 2025.

WANG, Z.; ZHONG, T.; CHEN, K.; DU, M.; CHEN, G.; CHEN, X.; WANG, K.; ZALÁN, Z.;

TAKÁCS, K.; KAN, J. Antifungal activity of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* ZX and potential biocontrol of blue mold decay on postharvest citrus. **Food Control**, [s. l.], v. 120, p. 107499, 2021.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. In: INNIS, M.A, GELFAND, D.H, SNINSKY, J.J, WHITE, T. . (Ed.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. [s.l.] : Academic Press, USA, 1990. p. 315–322.

WILSON, M.; LINDOW, S. E. Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 12, p. 4468–4477, 1994. a.

WILSON, M.; LINDOW, S. E. Ecological similarity and coexistence of epiphytic Ice-nucleating (Ice+) *Pseudomonas syringae* strains and a non-Ice-nucleating (Ice-) biological control agent. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 9, p. 3128–3137, 1994. b. Disponível em: </pmc/articles/PMC201780/?report=abstract>. Acesso em: 12 nov. 2021.

WONG-VILLARREAL, A.; MÉNDEZ-SANTIAGO, E. W.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, O.; AGUILAR-MARCELINO, L.; GARCÍA, D. C.; GARCÍA-MALDONADO, J. Q.; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ, V. M.; YAÑEZ-OCAMPO, G.; ESPINOSA-ZARAGOZA, S.; RAMÍREZ-GONZÁLEZ, S. I.; SANZÓN-GÓMEZ, D. Nematicidal activity of the endophyte *Serratia ureilytica* against *Nacobbus aberrans* in chili plants (*Capsicum annuum* L.) and identification of genes related to biological control. **Plants**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 2655, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2223-7747/10/12/2655/htm>>. Acesso em: 31 mar. 2025.

XU, X.; NIELSEN, L. J. D.; SONG, L.; MARÓTI, G.; STRUBE, M. L.; KOVÁCS, Á. T. Enhanced specificity of Bacillus metataxonomics using a tuf -targeted amplicon sequencing approach . **ISME Communications**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1–11, 2023.

YANG, C. L.; XU, X. L.; ZENG, Q.; LV, Y. C.; DENG, Y.; LIU, Y. G. **First report of leaf blight caused by cladosporium perangustum on livistona chinensis in China**, The American Phytopathological Society, 2021. Disponível em: <<https://apsjournals-apsnet.ez87.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1094/PDIS-05-20-1118-PDN>>. Acesso em: 13 out. 2021.

YANG, Y.; LUO, W.; ZHANG, W.; MRIDHA, M. A. U.; WIJESINGHE, S. N.; MCKENZIE, E. H. C.; WANG, Y. Cladosporium Species Associated with Fruit Trees in Guizhou Province, China. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 9, n. 2, 2023.

ZHAO, X.; ZHOU, J.; TIAN, R.; LIU, Y. Microbial volatile organic compounds: Antifungal mechanisms, applications, and challenges. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 13, n. July, p. 1–13, 2022.

ZITTER, T. A.; DRENNAN, J. L.; MUTSCHLER, M. A.; KIM, M. J. Control of early blight of tomato with genetic resistance and conventional and biological sprays. **Acta Horticulturae**, [s. l.], v. 695, p. 181–190, 2005.

## CAPÍTULO 2

### BIOCONTROL POTENTIAL OF STEM BLIGHT IN MACADAMIA PLANTLETS BY *Bacillus* spp. IN PLANTS WITH DIFFERENT SCION-ROOTSTOCK COMBINATIONS<sup>2</sup>

**Abstract:** Fungi from the Botryosphaeriaceae family are causal agents of stem blight and affect macadamia at all developmental stages, being particularly lethal to plantlets. This study evaluated the effectiveness of *Bacillus* spp. isolates in controlling the disease in macadamia plantlets and the susceptibility of macadamia varieties to *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (Botryosphaeriales: Botryosphaeriaceae), considering rootstock-scion combinations. Three macadamia scion varieties (IAC 4-12B, HAES 333, and HAES 741) were inoculated with three *L. pseudotheobromae* isolates. The rootstock (HAES 10-14) remained the same. *Bacillus* spp. isolates were selected for their antagonistic properties and tested for disease control in plantlets. Disease severity varied depending on the rootstock-scion combination and the *L. pseudotheobromae* isolate. *Bacillus velezensis* (Bacillales: Bacillaceae) and *Bacillus subtilis* (Bacillales: Bacillaceae) reduced disease severity, but their efficacy depended on the scion variety. Our findings indicate that resistance to stem blight in grafted plantlets varies with the *L. pseudotheobromae* isolate and the scion genotype, also influencing disease severity in the rootstock. These results suggest that *Bacillus* spp. can be an additional disease management strategy, as genotype resistance is influenced by factors beyond control in production systems.

**Keywords** Bacillales, Bacillaceae, Biological Control, Botryosphaeriales, Botryosphaeriaceae, *L. pseudotheobromae*, Resistance

#### 2.1 INTRODUCTION

Macadamia (*Macadamia integrifolia* Maiden & Betche) is a high-value crop, and its nut is highly appreciated in both domestic and international markets due to its flavor and nutritional properties, making it healthy and beneficial food. It is a rich source of vitamins and antioxidants. It contains not only considerable amounts of natural oil, fiber, proteins, carbohydrates, and minerals, but is also cholesterol-free (Associação Brasileira De Noz Macadâmia - ABM, 2019).

A significant factor limiting productivity is the occurrence of pests and diseases affecting the crop, such as branch dieback. This disease can be caused by various fungal species belonging to the family Botryosphaeriaceae, with species prevalence varying by region. In Australia, it is primarily caused by species from the genera *Lasiodiplodia* (*L. theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *L. iraniensis*) and *Neofusicoccum* (*N. parvum*, *N.*

---

<sup>2</sup> Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico BioControl

*luteum*, *N. mangroviorum*, *N. australe*) (Jeff-Ego; Akinsanmi, 2019; Mohankumar; Dann; Akinsanmi, 2022). In South Africa, *Lasiodiplodia theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *Neofusicoccum kwambonambiense* (Botryosphaeriaceae) and *Diaporthe macadamiae* (Diaporthaceae) have been reported (Jami; Morey, 2024). In Brazil, *Lasiodiplodia theobromae* (Fischer et al., 2017) and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (Silva et al., 2024) are the only species identified to date as causal agents of stem blight in macadamia. The impacts caused by *L. pseudotheobromae* are particularly severe in young plants, since it can lead to plant death and a considerable reduction in stand density (Silva et al., 2024).

In Brazil, macadamia is considered a crop with insufficient phytosanitary support. The control of stem blight and branch dieback caused by *L. pseudotheobromae* is performed predominantly by reducing plant stress, pruning during periods less favorable to the pathogen, applying fungicide-based products to protect wounds, and removing plant debris from the cultivation area (Bright, 2024; Halfeld-Vieira et al., 2024). Despite *in vitro* assays have demonstrated that *L. pseudotheobromae* isolated from macadamia is sensitive to procymidone (Halfeld-Vieira et al., 2024), there is no available data confirming its efficacy under field conditions.

Fungal species belonging to Botryosphaeriaceae family are considered latent pathogens, surviving endophytically within the host and becoming pathogenic under abiotic stress, such as high temperatures and water deficit (Slippers; Wingfield, 2007). *L. pseudotheobromae* can survive as mycelium, pycnidia, or chlamydospores in dead plant tissues and debris left on the soil (Kuswinanti et al., 2019; Michereff; Andrade; Menezes, 2005; Ogundana, 1983). Pycnidiospores are dispersed over short distances by rain splashes and require only 0.2 mm of precipitation to spread, allowing them to infect new plants through wounds, insect damage, or pruning cuts (Mehl et al., 2017; Mohankumar; Dann; Akinsanmi, 2022, 2023; Slippers; Wingfield, 2007). Sporulation varies seasonably, as demonstrated by Mohankumar et al. (2023) in Australia, where it was more intense during summer. The same study showed that Botryosphaeriaceae species sporulate on both symptomatic and asymptomatic tissues, with an average of  $4.8 \times 10^4$  conidia cm<sup>2</sup> on symptomatic tissues and  $1.1 \times 10^4$  conidia cm<sup>2</sup> on asymptomatic tissues.

Endophytic isolates of *Lasiodiplodia* have been recovered from macadamia (Sosso; Zakeel; Akinsanmi, 2021) and a study conducted in South Africa identified *L. pseudotheobromae* as the most commonly isolated species from both symptomatic and asymptomatic tissues (Maduke et al., 2024). Botryosphaeriaceae fungi exhibit a characteristic lifestyle, persisting as endophytes in their hosts before transitioning to a pathogenic mode, triggered by environmental changes or host stress conditions, particularly high temperatures and drought (Batista; Lopes; Alves, 2021; Yan et al., 2018). In macadamia, this behavior poses a risk to plantlet production, as propagation is

conducted through grafting, and latent pathogens may compromise orchards establishment. It is well known that in drought years, symptoms caused by Botryosphaeriaceae species become more severe due to increased host susceptibility under water stress conditions (Marsberg et al., 2017; Moral et al., 2019; Moral; Morgan; Michailides, 2019).

Pathogen-resistant plant materials and the use of antagonistic microorganisms are sustainable alternatives for disease management. Resistant varieties can help reduce the infection rate of opportunistic pathogens such as those from the Botryosphaeriaceae family, thereby facilitating management and mitigating negative impacts on production. In macadamia, variations in genetic susceptibility to fungi from the Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae families have been documented (Jami; Morey, 2024; Jeff-Ego; Akinsanmi, 2019; Liddle; Akinsanmi; Galea, 2019; Mohankumar; Dann; Akinsanmi, 2022).

In addition, antagonistic microorganisms can complementarily enhance the plant protection against pathogens through various mechanisms, including antibiosis, competition for space or nutrients, parasitism, or host defense induction (Köhl; Kolnaar; Ravensberg, 2019). Among these, *Bacillus* species are widely used in biological control due to their diverse mechanisms of pathogen antagonism and their resilience under adverse conditions, making them promising candidates for integrated disease management (Etesami; Jeong; Glick, 2023; Köhl; Kolnaar; Ravensberg, 2019).

The objectives of this study were to evaluate the susceptibility of macadamia varieties to *L. pseudotheobromae* isolates, the causal agent of stem blight, considering different scion-rootstock combinations, and to assess the effectiveness of selected *Bacillus* spp. isolates in controlling the disease in grafted plantlets.

## 2.2 MATERIALS AND METHODS

### 2.2.1 Fungal Isolates

A total of three *L. pseudotheobromae* isolates (CMAA1836, CMAA1834, and CMAA1833) were obtained from the Collection of Microorganisms of Agricultural and Environmental Importance (CMAA) of Embrapa Environment, São Paulo, Brazil. The isolates were cultured on Potato Dextrose Agar (PDA) plates and incubated in the dark at 25°C for 7 days prior to inoculation.

### 2.2.2 Plant Material

For the greenhouse assays, three commercial macadamia varieties among the most widely planted in Brazil (IAC 4-12B, HAES 333, and HAES 741), grafted onto the Aloha variety (HAES 10-14), were used. Plantlets aged 24 months were cultivated in 8-liter bags filled with a substrate composed of pine bark (50%) and organic compost (50%).

### 2.2.3 Virulence of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* Isolates on Macadamia Varieties

The experiment was conducted from December 2022 to March 2023 to identify the most susceptible macadamia variety and the most virulent *Lasiodiplodia pseudotheobromae* isolate through inoculation assays on macadamia plantlets grown in a greenhouse. Three plants from each scion-rootstock combination were used per isolate, totaling three isolates. Mycelial plugs (5 mm) were placed on previously wounded stems at both the scion and rootstock. Control treatment consisted of PDA plugs. Inoculation sites were covered with cotton balls moistened with sterile water and secured with Parafilm™. Plantlets were maintained in greenhouse and monitored for 12 weeks. Manual irrigation was performed daily for the first 4 weeks and every two days thereafter. Disease severity was assessed by measuring the orthogonal length of the lesions (mm) and calculating the elliptical symptomatic area.

The experimental design followed a completely randomized factorial arrangement (isolates x macadamia varieties) with three replications, each consisting of one plantlet. Data were transformed to log (x), subjected to analysis of variance (ANOVA), and means were compared by Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

### 2.2.4 Efficacy of Antagonistic Bacteria against *Lasiodiplodia pseudotheobromae* in Macadamia

#### 2.2.4.1 Antagonists

Forty-four isolates of antagonistic bacteria were obtained from macadamia racemes collected in a commercial orchard in the municipality of Dois Córregos, São Paulo, Brazil. Bacterial strains were isolated from rachis, peduncle, petals, pistils, and style. The structures were placed into 150 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of sterile saline solution (0.85% NaCl) with 0.3% Tween 80 (Romeiro, 2001) and shaken at 300 rpm for 20 minutes. Serial dilutions were then performed up to 1:10,000. Aliquots of 100 µL from each dilution were plated on two Petri dishes containing culture medium 523 (Kado; Heskett, 1970), spread using a Drigalski spatula (Romeiro, 2001), and incubated at 25°C. Pure cultures were transferred to test tubes containing culture medium 523 (KADO; HESKETT, 1970), preferably selecting morphologically distinct colonies (Halfeld-Vieira; Romeiro; Mizubuti, 2004), and stored at 4°C.

#### 2.2.4.2 Dual Culture Assay

A dual culture assay was performed to assess the interaction between the obtained bacterial isolates and *L. pseudotheobromae* CMAA1834 *in vitro*. Bacterial isolates were grown on culture medium 523 (Kado; Heskett, 1970) up to 48 h at 25°C. In each plate containing PDA medium, a bacterial inoculum was streaked in a straight line 0.5 cm from one edge of the plate. On the opposite side, also 0.5 cm from the edge, a 5 mm mycelial disc of *L. pseudotheobromae* was placed. Three repetitions were performed for each isolate, with each repetition

consisting of one plate. The presence of a clear inhibition zone between the bacterial culture and the fungal colony indicated antagonistic activity, which led to the pre-selection of the respective bacterial isolate.

#### 2.2.4.3 Mycelial Growth Inhibition by Cell-Free Filtrate (CFF)

The CFF from five antagonistic bacteria containing extracellular metabolites was tested for their inhibitory activity against the mycelial growth of *L. pseudotheobromae* (CMAA1834). The CFF was prepared by culturing the pre-selected isolates in medium 523 (Kado; Heskett, 1970) under constant shaking for 24 hours at 25°C ( $A_{540} = 0.1$ ). The cells were sedimented by centrifugation at 4,000 rpm for 10 minutes, and the supernatant was aseptically filtered through a 0.22- $\mu$ m membrane filter to obtain a cell-free filtrate. The CFF was incorporated into BDA medium (19.5 g L<sup>-1</sup>) maintained at 50°C until the final concentration reached 80% (v/v). Petri plates filled with BDA medium at 80% (v/v) instead of CFF served as the control. Mycelium discs (5 mm) of *L. pseudotheobromae* CMAA1834 were placed individually at the center of the Petri plates. The Petri plates were then incubated at 30°C under a 12-hour photoperiod and evaluated daily by measuring the diameter of the fungal colonies along two perpendicular axes. Measurements continued until mycelial growth of the control reached the edge of the plate.

The percentage of mycelial growth inhibition was calculated using the formula:  $MGI (\%) = 100 \times (rC - rT/rC)$  (Pellicciaro et al., 2021). The experiment followed a completely randomized design with eight replications. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA), and the means were compared by the Tukey HSD test ( $p < 0.05$ ).

#### 2.2.4.4 Identification of Selected Antagonistic Bacteria

The identification of antagonistic bacteria was performed through sequencing of the 16S rDNA region and the elongation factor thermal unstable Tu (*tuf*). Genomic DNA was extracted from the bacteria using the Q-Extract DNA extraction solution (Neobio) in combination with proteinase K enzyme (20 mg/ml), incubated at 95°C for 20 minutes. Amplification of the 16S rDNA gene was performed using the primers 16S08F (GYCCADACWCCTACGG) and 16S08R (CACGAGCTGACGAC) (Arruda et al., 2017). *Tuf* gene was amplified using primers *tuf*2-F (5'-AVGGHTCTGCHYTDAAGC-3') and *tuf*2-R (5'-GTDAYRTC HGWWGTACGGA-3') (Xu et al., 2023).

PCR reactions were prepared in a final volume of 25  $\mu$ L, containing 12.5  $\mu$ L of Taq DNA Polymerase (NeoBio), 7.5  $\mu$ L of Milli-Q water, 1.0  $\mu$ L of each primer, and 3.0  $\mu$ L of DNA. Thermal cycling conditions for the 16S rDNA amplification were: initial denaturation at 94°C for 7 minutes; 30 cycles of denaturation at 94°C for 45 seconds, annealing at 50°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 60 seconds; followed by a final extension at

72°C for 10 minutes (Arruda et al., 2017). For *tuf* amplification, thermal cycling conditions were: initial denaturation for 15 minutes at 95°C; 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 47°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 1 minute; followed by a final extension at 72°C for 5 minutes (Xu et al., 2023).

PCR products were visualized on 1% agarose gel stained with 100 bp molecular marker (Norgen) under a UV transilluminator (Major Science). Amplified products were purified using magnetic beads (AMPure Agencourt) and quantified with a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

Samples were sent to the Central Laboratory of IBTEC, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil, for Sanger sequencing. The obtained sequences were compared to those in the GenBank database (National Center for Biotechnology Information - NCBI) using the BLAST tool.

Multilocus sequence typing (MLST) analysis was performed based on 16S rDNA and *tuf* regions to confirm the identity of the isolates and construct a phylogenetic tree (Sulley; Babadoost; Hind, 2021). Sequences were aligned using ClustalW (Thompson; Higgins; Gibson, 1994). The best-fitting model was determined using nucleotide substitution models and a phylogenetic tree was built using the Neighbor-Joining algorithm in MEGA X (Kumar et al., 2018). Phylogenetic tree reliability was assessed by bootstrap resampling (Felsenstein, 1985).

#### 2.2.4.5 Biocontrol in Plants

Two biocontrol experiments were conducted using macadamia varieties HAES 333 and IAC 4-12B, under the conditions previously described in section 2.2. The first experiment was conducted from January to February 2024, and the second from September to November 2024. Four bacterial isolates that exhibited *in vitro* antagonistic activity were used, prepared as described earlier in section 2.4.3.

On each plant, a 5-mm wound was made on the stem of the rootstock and scion. A bacterial suspension of each antagonist ( $A_{540}=0.3$ ) was sprayed onto the wound. After 24 hours, a 5-mm-diameter mycelial disc of *L. pseudotheobromae* CMAA1834 was placed onto the wounded area. The inoculation sites were covered with cotton balls moistened with sterile water and sealed with Parafilm™. Control treatments consisted of plants inoculated with *L. pseudotheobromae* alone (positive control) and plants with PDA discs (negative control).

Macadamia plantlets were kept in greenhouse for a monitoring: 7 weeks in the first experiment and 10 weeks in the second. Irrigation was performed manually, daily for the first 4 weeks, then every other day thereafter. Lesion width and length were measured to calculate the elliptical lesion area ( $\text{mm}^2$ ).

The experiment followed a completely randomized factorial design (antagonists x macadamia varieties) with four repetitions per treatment, each consisting of one plantlet. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA), and the means were compared using Tukey's test ( $p<0.05$ ).

#### 2.2.4.6 Chitinase Production

Chitinase production by the antagonists was assessed using the mineral medium described by Renwick et al. (1991), with 0.08% colloidal chitin (Sigma) as the sole carbon source. Bacterial isolates were inoculated at distinct points on the surface of the medium and incubated at 25°C for 10 days, with three repetitions per treatment. Chitinase production was indicated by the presence of a transparent halo around the colonies, contrasting with the milky appearance of the medium (Pelzer et al., 2011).

#### 2.2.4.7 $\beta$ -1,3-Glucanase Production

$\beta$ -1,3-glucanase production was evaluated using the same mineral medium from Renwick et al. (1991), with 0.5% laminarin (Sigma), as the sole carbon source. Isolates were inoculated on surface of the medium at distinct points and incubated at 25°C for 10 days, with three repetitions per treatment. After the incubation, culture medium was stained with a 0.5% Congo red solution for 90 minutes, followed by rinsing to remove excess dye.  $\beta$ -1,3-glucanase production was indicated by the presence of a light orange halo around the colonies, contrasting with the reddish-orange appearance of the medium (Pelzer et al., 2011).

### 2.3 RESULTS

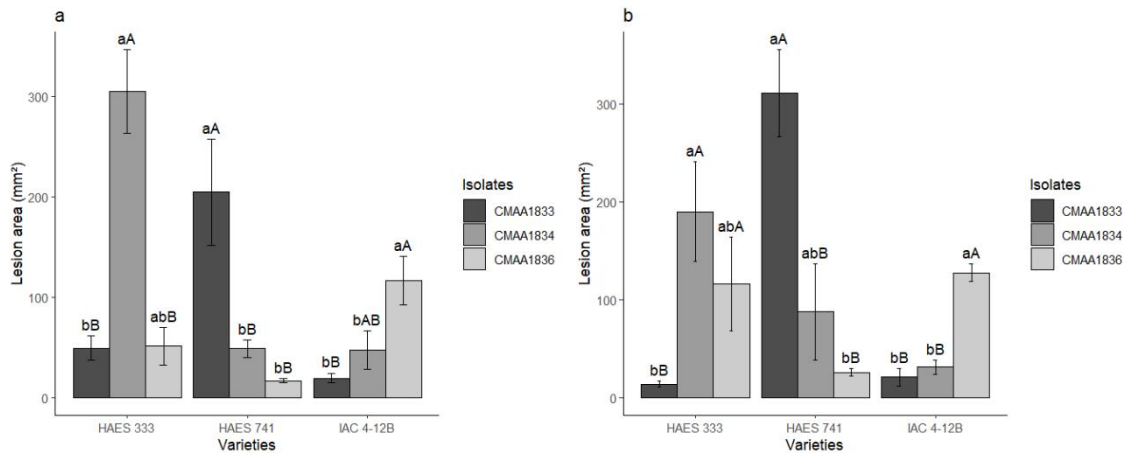
#### 2.3.1 Virulence of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* isolates on macadamia varieties

A significant interaction was observed between varieties and *L. pseudotheobromae* isolates for lesion area on both the rootstock ( $p < 0.001$ ) and the scion ( $p < 0.001$ ). It was also noted that the scion influences disease severity on the rootstock, as the HAES 10-14 variety was used as a common rootstock across all three scions. The varieties HAES 333, IAC 4-12B, and HAES 741 showed the same pattern of response to different isolates, with similar lesion areas on both scion and rootstock (Figs. 1a and b). For each variety, one isolate was identified as the most virulent: CMAA1834 (rootstock:  $305.03 \pm 41.70 \text{ mm}^2$ ; scion:  $189.56 \pm 50.85 \text{ mm}^2$ ) for the HAES 333 variety, CMAA1833 (rootstock:  $204.72 \pm 52.86 \text{ mm}^2$ ; scion:  $310.9 \pm 44.44 \text{ mm}^2$ ) for the HAES 741 variety, CMAA1836 (rootstock:  $116.44 \pm 23.85 \text{ mm}^2$ ; scion:  $127.49 \pm 8.85 \text{ mm}^2$ ) for the IAC 4-12B variety. Furthermore, for HAES 333, isolate CMAA1836 showed lesion areas on the rootstock ( $51.25 \pm 18.84 \text{ mm}^2$ ) and on scion ( $115.92 \pm 47.77 \text{ mm}^2$ ) that were statistically similar to those of the CMAA1834 (Fig. 1b). Similarly, for HAES 741 ( $87.67 \pm 49.08 \text{ mm}^2$ ), CMAA1834 incited lesion areas on the scion comparable to those caused by CMAA1833 (Fig. 1b).

The IAC 4-12B variety showed low severity when inoculated with both CMAA1834 (rootstock:  $47.46 \pm 19.17 \text{ mm}^2$  and scion:  $31.09 \pm 7.46 \text{ mm}^2$ ) and CMAA1833 (rootstock:  $19.39 \pm 4.94 \text{ mm}^2$  and scion:  $20.79 \pm 8.88 \text{ mm}^2$ ) isolates. When compared to the CMAA1836 isolate, lesion areas in this variety were 59.24% and 83.34%

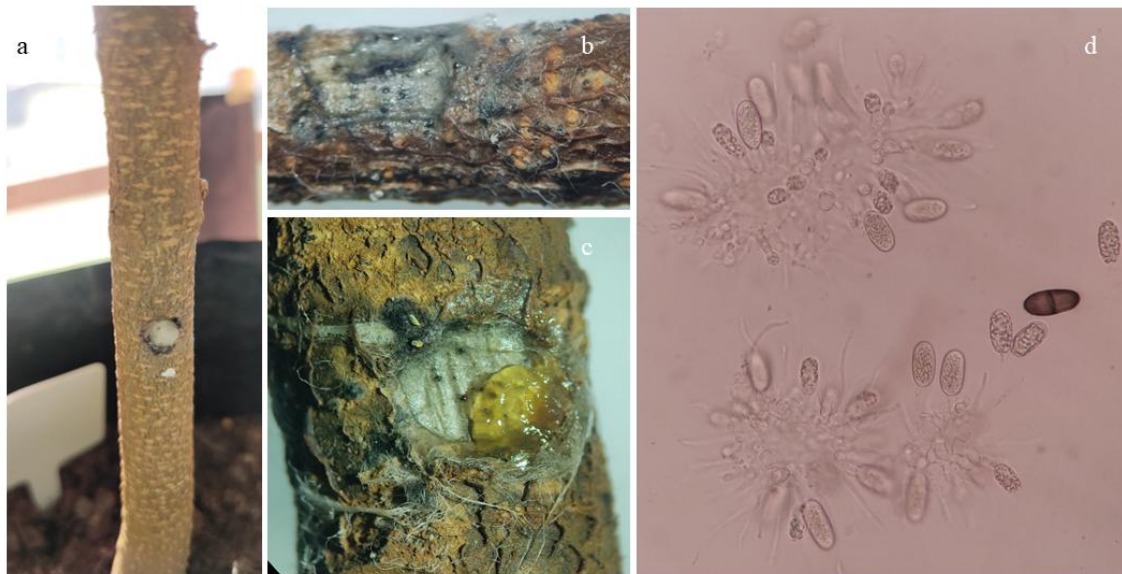
smaller on the rootstocks, and 75.61% and 83.68% smaller on the scions inoculated by isolates CMAA1834 and CMAA1833, respectively (Fig. 1a and b).

The HAES 333 variety showed low severity when inoculated with CMAA1833 isolate (rootstock:  $49.30 \pm 11.8 \text{ mm}^2$ , scion:  $13.76 \pm 2.83 \text{ mm}^2$ ), and HAES 741 showed low severity in response to CMAA1836 (rootstock:  $16.78 \pm 2.22 \text{ mm}^2$ , scion:  $25.59 \pm 3.84 \text{ mm}^2$ ) (Fig. 1a and b), as well as to CMAA1834 on the rootstock ( $48.63 \pm 8.42 \text{ mm}^2$ ) (Fig. 1a).



**Fig. 1** Lesion area in macadamia varieties inoculated with *L. pseudotheobromae* isolates. **a** Rootstock; **b** Scion. Different lowercase and uppercase letters above the grouped bars represent significant differences between isolates and varieties, respectively (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ). Data are means  $\pm$  SE ( $n=3$ )

During the experiment, all varieties inoculated with *L. pseudotheobromae* isolates exhibited gum exudation (Fig. 2c), and two weeks after inoculation, the presence of *L. pseudotheobromae* pycnidia was observed (Fig. 2a and b). *L. pseudotheobromae* isolates were consistently re-isolated from the lesions and identified based on morphology (Fig. 2d). No Botryosphaeriaceae were isolated from the control plants.

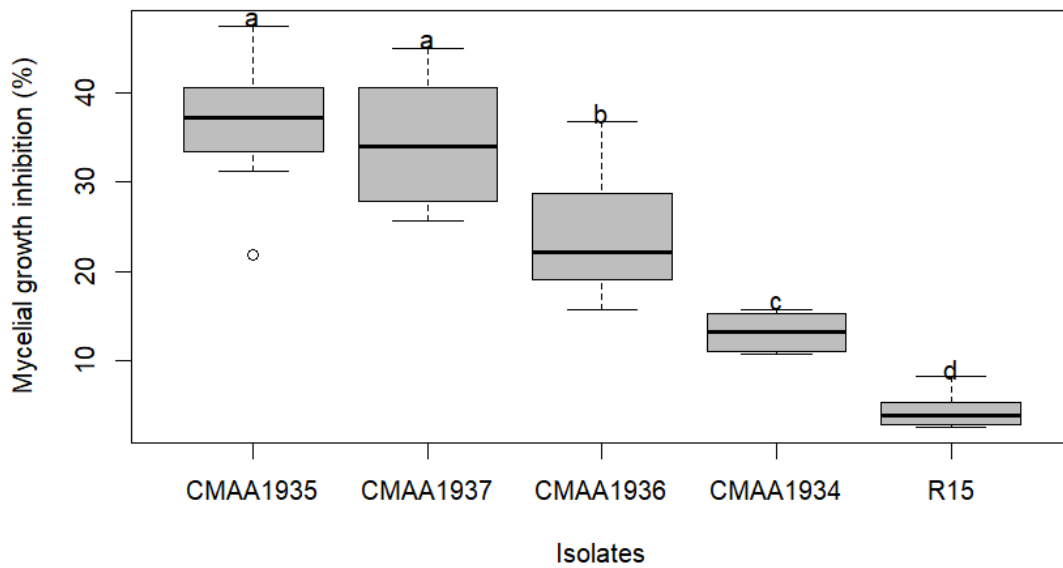


**Fig. 2** *Lasiodiplodia pseudotheobromae* on inoculated macadamia plantlets **a**; pycnidia **b**; gum exudation **c**; and conidiogenous cells of *L. pseudotheobromae*, immature conidia, and mature conidium **d**

### 2.3.2 Efficacy of Antagonistic Bacteria Against *L. pseudotheobromae* in Macadamia

#### 2.3.2.1 Dual Culture Assay and Mycelial Growth Inhibition by Cell-Free Filtrate (FLC)

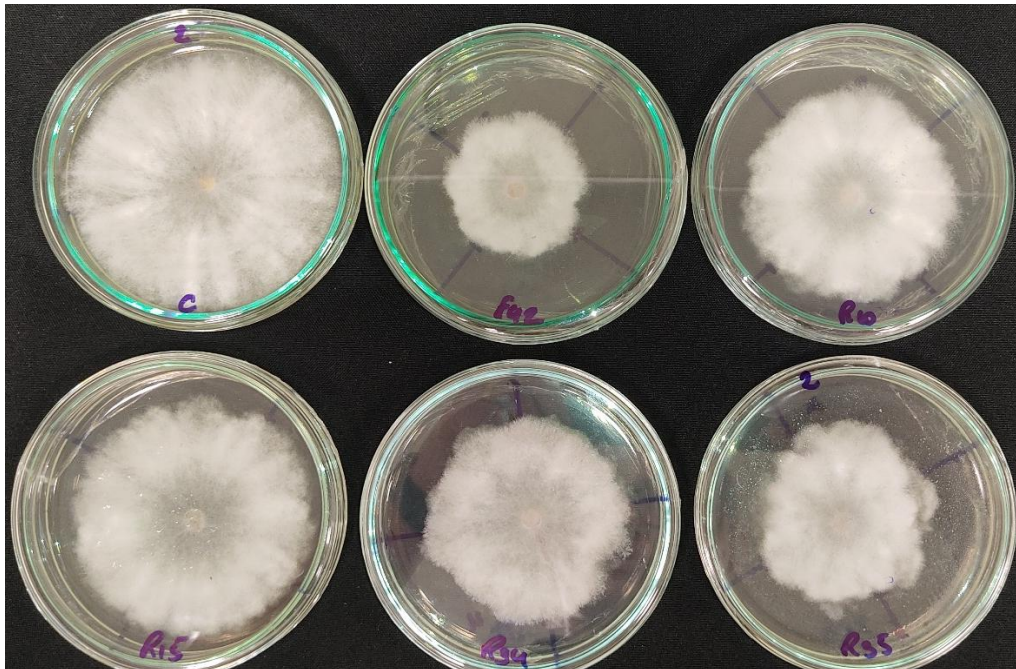
A total of 44 bacterial isolates were tested in the dual culture assay, but only five produced a clear inhibition zone against *L. pseudotheobromae*. The cell-free filtrates (FLCs) derived from these five inhibitory isolates also significantly reduced the mycelial growth of *L. pseudotheobromae*. FLC from isolates CMAA1935 and CMAA1937 were significantly more effective, reducing the growth of *L. pseudotheobromae* by 36.48% and 34.45%, respectively. Isolate CMAA1936 reduced growth by 24.06%, while CMAA1934 and R15 showed a weaker effect, reducing growth by 13.13% and 4.27%, respectively (Fig. 3).



**Fig. 3** Percentage of mycelial growth inhibition of *L. pseudotheobromae* by cell-free filtrate from bacterial isolates.

Different lowercase letters above bars indicate significant differences among treatments (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ).

Data are means  $\pm$  SE (n=8)



**Fig. 4** *In vitro* inhibition of mycelial growth of *L. pseudotheobromae* by bacterial cell-free filtrate.

#### 2.3.2.2 Identification of Antagonistic Bacteria

Phylogenetic analysis based on the concatenated 16S rDNA and *tuf* genes sequences revealed that isolates CMAA1935, CMAA1936, and CMAA1937 are phylogenetically related to *Bacillus velezensis*, while CMAA1934

isolate is related to *Bacillus subtilis* (Fig. 5). All isolates were deposited in the Collection of Microorganisms of Agricultural and Environmental Importance (CMAA) of Embrapa Meio Ambiente, São Paulo, Brazil under the accession number (CMAA1935, CMAA1936, CMAA1937, CMAA1934). Their sequences of the 16S rDNA and *tuf* genes were deposited in GenBank under the accession numbers shown in Table 2.



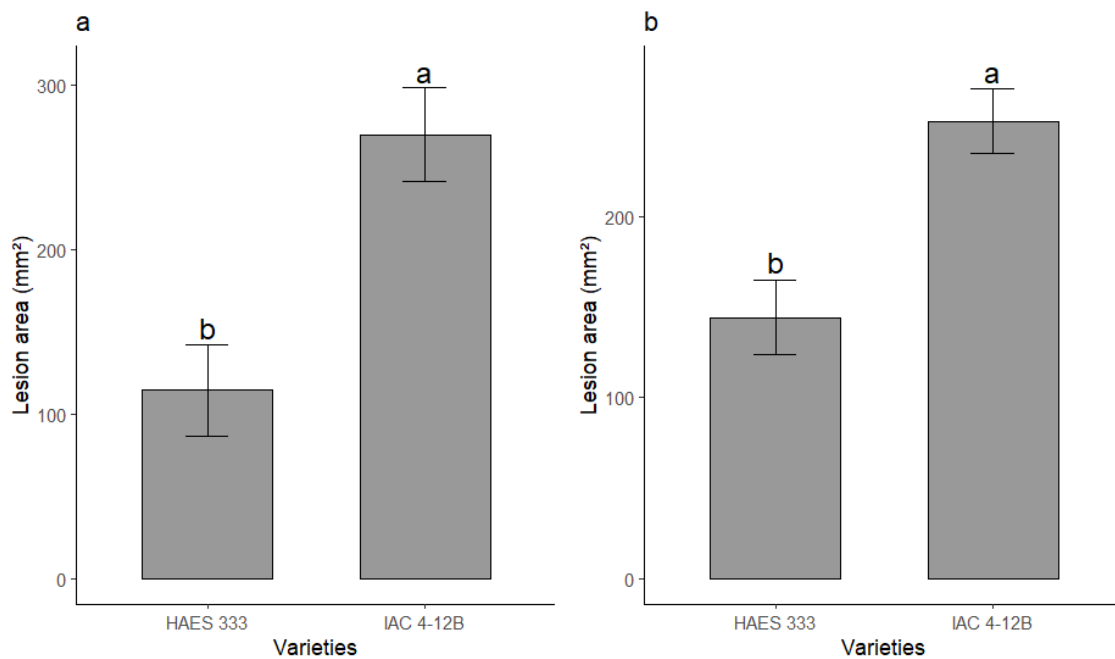
**Fig. 5** Phylogenetic tree of isolates CMAA1935, CMAA1936, CMAA1937 and CMAA1934 based on concatenated 16S rDNA and *tuf* gene sequences, constructed using the Maximum Likelihood method. Genetic distances were calculated using Kimura's two-parameter model+G+I. *Bacillus mycoides* WSBC 10204 was included as the outgroup. Bootstrap values (1000 replications) are shown next to the nodes. Scale bar: 0.050 nucleotide substitutions per site

**Table 2.** GenBank accession numbers for 16S rDNA and *tuf* genes of bacterial isolates

| Isolate  | Gene       | GenBank accession number |
|----------|------------|--------------------------|
| CMAA1934 | 16S rDNA   | PV207854.1               |
|          | <i>tuf</i> | PV537012                 |
| CMAA1935 | 16S rDNA   | PV207853.1               |
|          | <i>tuf</i> | PV537009                 |
| CMAA1937 | 16S rDNA   | PV207626.1               |
|          | <i>tuf</i> | PV537011                 |
| CMAA1936 | 16S rDNA   | PV207626.1               |
|          | <i>tuf</i> | PV537010                 |

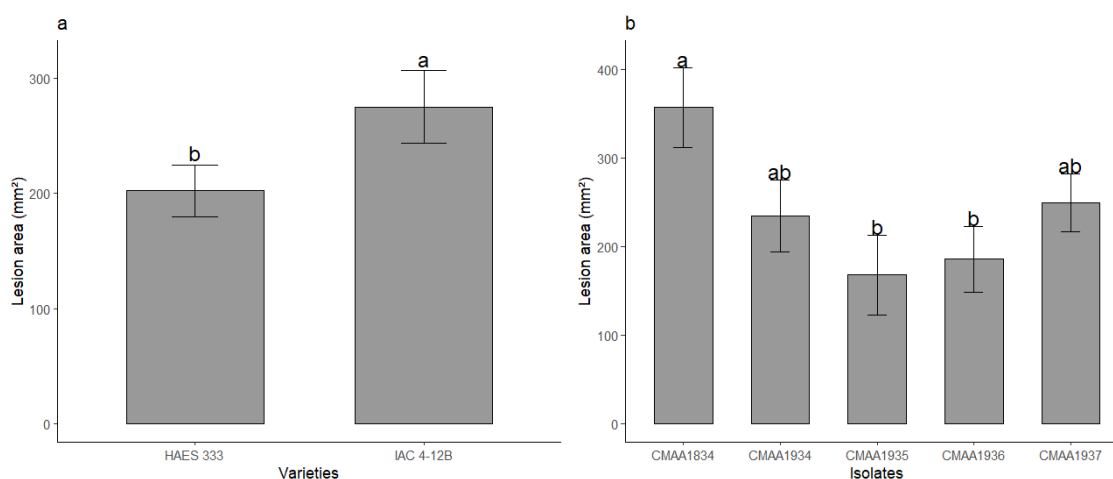
### 2.3.2.3 Biocontrol in Plants

In the first biocontrol experiment with grafted plantlets, significant differences were observed among the varieties with lesion area on the rootstock ( $p < 0.001$ ) or on the scion ( $p < 0.001$ ). In plants with variety IAC 4-12B, isolate CMAA1834 (*L. pseudotheobromae*) induced larger lesions in variety, both on the rootstock ( $\bar{x} = 270.19 \text{ mm}^2$ ) and on the scion ( $\bar{x} = 252.49 \text{ mm}^2$ ) (Fig. 6a and b). In plants with variety HAES 333 scion, isolate CMAA1834 caused smaller lesions on the rootstock ( $\bar{x} = 114.67 \text{ mm}^2$ ) and on scion ( $\bar{x} = 144.13 \text{ mm}^2$ ), compared to IAC 4-12B (Fig. 6a and b). In plants with variety IAC 4-12B, the lesions caused by isolate CMAA1834 were 57.56% and 42.92% larger on the rootstock and scion, respectively, compared to HAES 333.



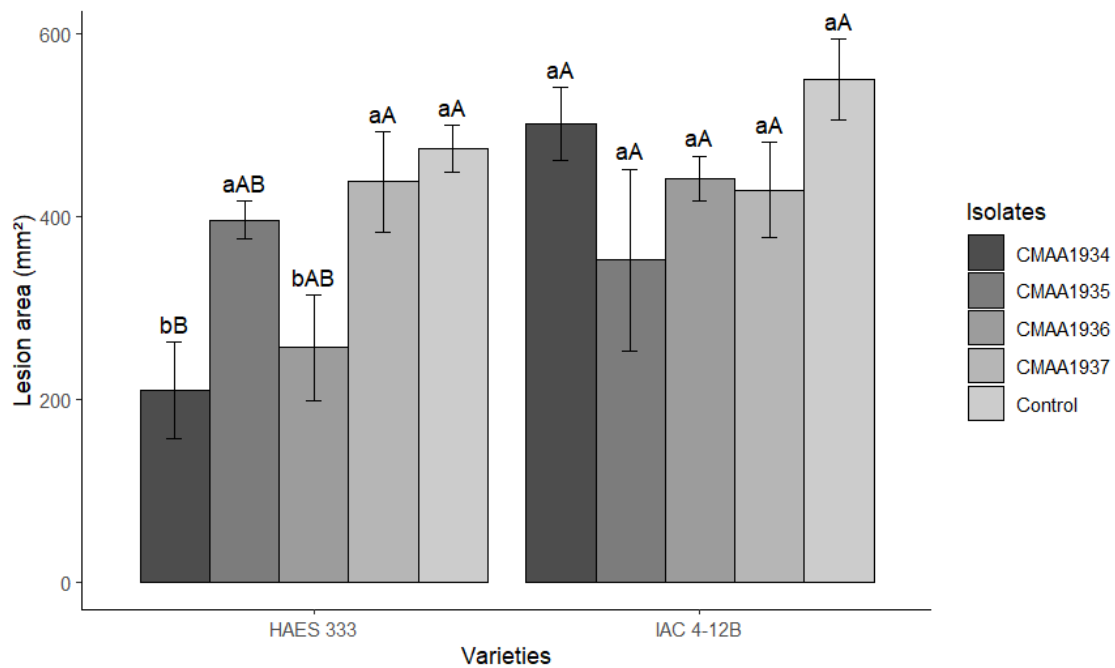
**Fig. 6** Lesion area caused by *L. pseudotheobromae* (CMAA1834) in macadamia varieties. **a** Rootstock, **b** Scion. Different lowercase and uppercase letters on the grouped bars indicate significant differences between isolates and varieties, respectively (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ). The data are means  $\pm$  SE ( $n=4$ )

In the second biocontrol experiment, there were significant differences in the lesion area on the rootstock, depending on scion variety ( $p < 0.05$ ) and on the antagonist applied ( $p < 0.05$ ). CMAA1834 caused the largest lesion area in the variety IAC 4-12B ( $\bar{x} = 275.37 \text{ mm}^2$ ), 26.4% larger than in the variety HAES 333 ( $\bar{x} = 202.48 \text{ mm}^2$ ) (Fig. 7a). Isolates CMAA1935 ( $\bar{x} = 167.73 \text{ mm}^2$ ) and CMAA1936 ( $\bar{x} = 185.73 \text{ mm}^2$ ) substantially reduced the lesion area caused by CMAA1834 isolate ( $\bar{x} = 357.07 \text{ mm}^2$ ) while CMAA1934 ( $\bar{x} = 234.29 \text{ mm}^2$ ) and CMAA1937 ( $\bar{x} = 249.81 \text{ mm}^2$ ) also reduced the lesion area caused by CMAA1834, although to a lesser extent (Fig. 7b). The isolates CMAA1935 and CMAA1936 reduced the lesion area on the rootstock caused by CMAA1834 by 53% and 47.98%, respectively.



**Fig. 7** Lesion area on the rootstock of macadamia varieties inoculated with antagonistic bacteria and *L. pseudotheobromae* (CMAA1834). **a** Varieties; **b** Antagonistic bacteria. Different letters above the bars represent significant differences between treatments (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ). Data are means  $\pm$  SE ( $n=4$ )

A significant interaction between varieties and bacterial isolates for lesion area on the scion was observed ( $p < 0.05$ ). For IAC 4-12B variety, no isolate differed from the control treatment (Fig. 8). For HAES 333 variety, CMAA1934 isolate ( $\bar{x} = 209.97 \text{ mm}^2$ ) significantly reduced the lesion area compared to control ( $\bar{x} = 474.79 \text{ mm}^2$ ), representing a 46% reduction. CMAA1935 and CMAA1936 isolates reduced the lesion area, but not significantly when compared to control (Fig. 8).



**Fig. 8** Lesion area on the scion of macadamia varieties colonized with antagonistic bacteria and inoculated with *L. pseudotheobromae* (CMAA1834). Different lowercase and uppercase letters above the grouped bars indicate significant differences between isolates and varieties, respectively (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ). Data are means  $\pm$  SE (n=4)

In both experiments, *L. pseudotheobromae* isolates were consistently re-isolated from the lesions and identified morphologically. No Botryosphaeriaceae were isolated from the negative controls.

## 2.4 DISCUSSION

*L. pseudotheobromae* is one of the major causal agent of stem blight in macadamia. In Australia, it is the most frequently isolated species recovered from symptomatic trees, although it exhibited lower aggressiveness in pathogenicity tests conducted with the HAES 246 variety (Jeff-Ego; Akinsanmi, 2019). In South Africa, both *L. pseudotheobromae* and *L. theobromae* are the most aggressive species for Beaumont (HAES 695), Nelmark2, and A4 varieties (Jami; Morey, 2024). In Brazil, *L. pseudotheobromae* is prevalent, first reported affecting the A38 variety (Silva et al., 2024).

The IAC 4-12B variety showed lower severity when inoculated with two of the three *L. pseudotheobromae* isolates whereas HAES 333 and HAES 741 varieties exhibited higher severity under the same conditions. Previous studies have reported significant intraspecific variation in virulence among Botryosphaeriaceae across various hosts, including macadamia (Jeff-Ego; Akinsanmi, 2019; Liddle; Akinsanmi;

Galea, 2019; Mohankumar; Dann; Akinsanmi, 2022), eucalyptus (Li et al., 2020), mango (Rodríguez-Gálvez et al., 2017), cashew (Coutinho et al., 2017), and grapevine (Correia et al., 2016; Reis et al., 2022), among others. On the other hand, in a study conducted by Jami and Morey (2024), *L. pseudotheobromae* caused significantly similar damage in Beaumont (HAES 695), Nelmak2, and A4 macadamia varieties.

The virulence of *L. pseudotheobromae* isolates in macadamia varieties can be influenced by several factors. Although all varieties were grafted onto the same rootstock (HAES 10-14), genetic variation is possible since the rootstock is derived from seed propagation which is a result of open pollination (Akinsanmi et al., 2017; Hardner et al., 2009; Nagao; Hirae, 1992). Differences between isolates may also arise within populations. Lu et al. (2024) provided high-quality genomic assemblies for five *L. pseudotheobromae* isolates obtained from eucalyptus, finding heterozygosity between 0.01% and 0.24%. An average of 4,429 genes related to the pathogen-host interaction were identified, with approximately 900 genes encoding enzymes involved in plant cell wall degradation (Belair et al., 2023; YAN et al., 2018). The defense mechanisms against pathogens still demand further studies.

This study shows that none of the rootstock and scion combinations conferred resistance to all *L. pseudotheobromae* isolates. All the varieties tested were grafted onto the Aloha variety (HAES 10-14). Macadamia genotypes belonging to the species *M. integrifolia* have been considered more susceptible to *Phytophthora cinnamomi*, the causal agent of stem canker in macadamia, compared to those of *M. tetraphylla* (Akinsanmi et al., 2017; Zentmeyer; Storey, 1960). However, for Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae, further research is required to identify more resistant rootstock sources within *M. integrifolia* and across other germplasm accessions. The *Macadamia* genus also comprises *M. tetraphylla*, *M. ternifolia*, and *M. jansonii* species (Nagao; Hirae, 1992; Trueman, 2013), which could be explored to find resistance sources to *Lasiodiplodia* spp.. Studies addressing biological control of diseases in macadamia are scarce, and this study is the first to explore the use of antagonistic bacteria for controlling stem blight caused by *L. pseudotheobromae* in this culture, since only few studies using *Trichoderma* as biocontrol agent of other diseases were previously reported (Li et al., 2022; Velázquez; Ocampos, 2016).

The results from dual confrontation and the use of cell-free filtrates demonstrated that among autochthonous bacterial isolates some isolates can produce compounds that inhibit the growth of *L. pseudotheobromae*. Antibiosis is one of the mechanisms by which a biocontrol agent can inhibit a pathogen, since secondary metabolites can interfere with metabolic activities and development of other microorganisms (Köhl; Kolnaar; Ravensberg, 2019). It is important to note that the bacterial isolates used in this study were unable to

produce chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases, indicating that the observed inhibition of growth in the *in vitro* assays is related to other inhibitory compounds.

Bacteria belonging to *Bacillus* genus are widely used as biocontrol agents and growth promoters in agriculture due to their high ability to produce bioactive metabolites and their capacity to form endospores, which makes their formulation and commercialization feasible. Additionally, they can control phytopathogens through multiple mechanisms, such as competition, antibiosis or induction of host resistance (Etesami; Jeong; Glick, 2023; Mates; Pontes; Halfeld-Vieira, 2019). Among the species in this genus, *Bacillus velezensis* has a high potential in producing bioactive metabolites, being more efficient than *B. subtilis* (Fan et al., 2017). In this study, the *B. velezensis* isolates (CMAA1935, CMAA1936, and CMAA1937) were more efficient in inhibiting the growth of *L. pseudotheobromae* *in vitro* than the *B. subtilis* isolate (CMAA1934).

To effectively control stem blight, this study demonstrates that isolates from different *Bacillus* species can contribute to reducing losses caused by the disease in plantlets, a condition where the disease causes greater losses since it can lead to death when it affects young plants. Unlike the study conducted to evaluate the reaction of plants composed of different graft varieties, in the biocontrol assays on plantlets, the variety IAC 4-12B was more susceptible to *L. pseudotheobromae* (CMAA1834) than the HAES 333 variety. Although specific tests for defense induction were not conducted in this study, this difference may be related to a possible activation of defense mechanisms induced which depends on the *Bacillus* isolate, where, depending on the graft variety used, the activation of this response may be more or less effective. *Bacillus* spp. can trigger defense responses in their hosts, enhancing protection and activating plant defenses more effectively (Etesami; Jeong; Glick, 2023). Among the responses triggered by induced systemic resistance, that can be observed the strengthening of the cell wall, deposition of callose, production of phenolic compounds, pathogenesis-related proteins, increased activity of defense enzymes such as peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase, and phytoalexins (Dumanović et al., 2021; Köhl; Kolnaar; Ravensberg, 2019; Mates; Pontes; Halfeld-Vieira, 2019; Mauch-Mani et al., 2017; Vlot et al., 2021).

In the second biocontrol experiment, *Bacillus velezensis* and *Bacillus subtilis* strains reduced the lesion area caused by *L. pseudotheobromae* CMAA1834 on the rootstock. On the scion, significant reductions were observed only for the HAES 333 variety. Among the *Bacillus* spp. strains, we highlight CMAA1935 and CMAA1936 of *Bacillus velezensis* and CMAA1934 of *Bacillus subtilis* as the most efficient. Strains of *Bacillus velezensis* have also been reported as effective in controlling stem blight in avocado trees caused by *L. theobromae* in the field, achieving control efficiency of up to 73.86% (Li et al., 2024). In our study, the CMAA1935 and

CMAA1936 strains reduced the lesion area caused by *L. pseudotheobromae* on the rootstock of the HAES 333 and IAC 4-12B varieties by 53% and 47.98%, respectively. The CMAA1934 strain of *Bacillus subtilis* and CMAA1936 of *Bacillus velezensis* reduced the lesion area caused by the pathogen on the scion of the HAES 333 variety by 46% and 45.9%, respectively.

It is also important to highlight the specific response of the HAES 333 variety depending on the *Bacillus* spp. strain, suggesting a possible defense induction in this variety depending on the used strain. This response becomes clear when we observe that in the virulence assay, the CMAA1834 isolate was more virulent in the HAES 333 variety than in IAC 4-12B. When we inoculated the plantlets with the *Bacillus* spp. isolates, this response was reversed, with HAES 333 showing smaller lesion areas compared to IAC 4-12B. Since the HAES 333, IAC 4-12B, and HAES 741 varieties did not show resistance to *L. pseudotheobromae* isolates, the use of antagonists like *Bacillus* spp. could help mitigate the damage caused by *L. pseudotheobromae*.

Our findings have important implications for managing stem blight in macadamia, caused by *L. pseudotheobromae*. It has been demonstrated that the resistance of macadamia varieties HAES 333, HAES 741, and IAC 4-12B to stem blight in grafted plantlets varies with the *L. pseudotheobromae* isolate and the scion genotype, depending on the isolate used and the origin of the plant material. Similarly, the variety used for grafting influences the disease severity in the rootstock. As mentioned before, the rootstock is derived from seeds, which may promote changes in the resistance levels of the plant material. This inference is based on the fact that, in the first trial conducted from December 2022 to March 2023 (item 2.3), plants with the IAC4-12B graft were more resistant than HAES 333 when inoculated with the CMAA1834 isolate (Figure 1). However, in trials with antagonistic bacteria (experiments from January to February 2024 and the second from September to November 2024), the situation reversed (Figures 6 and 7A). Thus, in each stage, the plantlets were constituted of distinct batches of plants. Even so, propagation by seeds, in a situation where cross-pollination occurs, can lead to genotypic variability within the same batch. This fact creates challenges when considering solely the use of genetic resistance in order to promote disease control, as the non-uniformity of the rootstock genotype, the differential response depending on the graft/rootstock combination, and the shift in resistance phenotype according to the isolate used, strongly influence the disease severity. In this situation, the use of biological control alternatives becomes more relevant as an additional component.

We also demonstrated the possibility of using antagonistic bacteria from the *Bacillus* genus for disease management, particularly *Bacillus velezensis*. Despite our findings, studies searching for more resistant accessions to stem blight are required, as well as studies related to the pathogen-host interaction. Furthermore, our biocontrol

results with *Bacillus* spp. open up possibilities for analyzing the defense induction response in macadamia and its interaction with different varieties in order to improve their potential to control the stem blight. The combination of all these techniques would contribute to a more efficient management of this disease, which has become increasingly important in macadamia orchards.

## REFERENCES

- Akinsanmi, OA. et al (2017) Characterization of accessions and species of Macadamia to stem infection by *Phytophthora cinnamomi*. Plant Pathology 66: 186–193. <https://doi.org/10.1111/ppa.12566>.
- Arruda A. et al (2017) A simple methodology to collect culturable bacteria from feces of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). Journal of Microbiological Methods 141: 115–117. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.08.004>.
- Associação Brasileira de Noz Macadâmia - ABM (2019) Macadâmia Australiana: A noz saudável. Available at: <http://www.abm.agr.br/macadamia-australiana-a-noz-saudavel/>. Accessed 19 November 2021
- Batista E, Lopes A, Alves A (2021) What do we know about botryosphaeriaceae? An overview of a worldwide cured dataset. Forests. <https://doi.org/10.3390/f12030313>.
- Belair M et al (2023) Botryosphaeriaceae gene machinery: Correlation between diversity and virulence. Fungal Biology 127: 1010–1031. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2023.03.004>.
- Bright J (2024) Macadamia plant protection guide 2024–25, NSW Department of Primary Industries and Regional Development. <https://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/horticulture/nuts/growing-guides/%0A%0Amacadamia-protection-guide>. Accessed 24 april 2025
- Correia KC et al (2016) Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. Plant Pathology 65: 92–103. <https://doi.org/10.1111/ppa.12388>.
- Coutinho IBL et al (2017) Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. Plant Pathology 66: 90–104. <https://doi.org/10.1111/ppa.12565>.
- Dumanović J et al (2021) The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. Frontiers in Plant Science. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.552969>.
- Etesami H, Jeong BR and Glick BR (2023) Biocontrol of plant diseases by *Bacillus* spp.. Physiological and Molecular Plant Pathology 126: 102048. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102048>.
- Fan B et al (2017) *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. Frontiers in Microbiology 8: 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022>.

- Felsenstein J (1985) Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39: 783.  
<https://doi.org/10.2307/2408678>.
- Fischer IH et al (2017) First report of *Lasiodiplodia theobromae* on *Macadamia integrifolia* in Brazil. *Summa Phytopathologica* 43: 70. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/169154>.
- Halfeld-Vieira B de A et al (2024) Circular Técnica 33 - Identificação e recomendações de manejo de doenças da macadâmia. Jaguariúna, SP. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1169232/1/Halfeld-Vieira-Recomendacoes-macadamia-2024.pdf>.
- Halfeld-Vieira BA, Romeiro RS, Mizubuti ESG (2004) Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. *Fitopatologia Brasileira* 29: 638–643. <https://doi.org/10.1590/s0100-41582004000600007>.
- Hardner CM et al (2009) Genetic Resources and Domestication of Macadamia. in: Janick J (ed) *Horticultural Reviews* 35: 1–125. <https://doi.org/10.1002/9780470593776.ch1>.
- Jami F, Morey L (2024) Management Strategies for Macadamia Branch Dieback in South Africa. *Journal of Phytopathology* 172. <https://doi.org/10.1111/jph.13443>.
- Jeff-Ego OS, Akinsanmi OA (2019) Botryosphaeriaceae causing branch dieback and tree death of macadamia in Australia. *Australasian Plant Pathology* 48: 59–64. <https://doi.org/10.1007/s13313-018-0604-6>.
- Kado CI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969–976. <https://doi.org/10.1094/Phyto-60-969>.
- Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ (2019) Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science* 10: 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>.
- Kumar S et al (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Kuswinanti T et al (2019) A promising microbial use on cocoa: Decomposing cocoa waste and controlling *Lasiodiplodia theobromae* in-vitro. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 343: p. 012256.  
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/343/1/012256>.
- Li G et al (2020) Variation in Botryosphaeriaceae from Eucalyptus plantations in YunNan Province in southwestern China across a climatic gradient. *IMA Fungus*. 11. <https://doi.org/10.1186/s43008-020-00043-x>.
- Li X et al (2024) Biological Control of Avocado Branch Blight Caused by *Lasiodiplodia theobromae* Using *Bacillus velezensis*. *Plant Disease* 108: 2053–2064. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-23-2216-RE>.
- Li Xiaojiao et al (2022) Efficacy of the biocontrol agent *Trichoderma hamatum* against *Lasiodiplodia theobromae* on

- macadamia. *Frontiers in Microbiology* 13: 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.994422>.
- Liddle RL, Akinsanmi OA, Galea VJ (2019) Non-host specificity of Botryosphaeriaceae on macadamia and blueberry. *Australasian Plant Pathology* 48: 65–73. <https://doi.org/10.1007/s13313-018-0600-x>.
- Lu LQ, Li GQ, Liu FF (2024) High-quality genome resource of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* associated with die-back on Eucalyptus trees. *BMC Genomic Data* 25: 23–26. <https://doi.org/10.1186/s12863-023-01187-6>.
- Maduke AN et al (2024) Botryosphaeriaceae species associated with branch dieback and decline of macadamia trees in South Africa. *Australasian Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s13313-024-00992-6>.
- Marsberg A et al (2017) *Botryosphaeria dothidea*: a latent pathogen of global importance to woody plant health. *Molecular Plant Pathology* 18: 477–488. <https://doi.org/10.1111/mpp.12495>.
- Mates A de PK, Pontes N de C, Halfeld-Vieira B de A (2019) *Bacillus velezensis* GF267 as a multi-site antagonist for the control of tomato bacterial spot. *Biological Control* 137: 104013. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104013>.
- Mauch-Mani B et al (2017) Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annual Review of Plant Biology* 68: 485–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041132>.
- Mehl JWM et al (2017) Overlap of latent pathogens in the Botryosphaeriaceae on a native and agricultural host. *Fungal Biology* 121: 405–419. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.015>.
- Michereff SJ, Andrade DEGT, Menezes M (2005) Manejo Integrado de Doenças Radiculares. In: Michereff SJ, Andrade DEGT, Menezes M (ed) *Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais*. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, pp. 367–388.
- Mohankumar V, Dann EK, Akinsanmi OA (2022) Diversity and Pathogenicity of Botryosphaeriaceae Associated with Macadamia Branch Dieback in Australia. *Plant Disease* 106: 2576–2582. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-21-2125-RE>.
- Mohankumar V, Dann EK, Akinsanmi OA (2023) Seasonal dynamics of inoculum of Botryosphaeriaceae in macadamia orchards in Australia. *Plant Pathology* 72: 1160–1170. <https://doi.org/10.1111/ppa.13730>.
- Moral J et al (2019) Ecology and epidemiology of diseases of nut crops and olives caused by Botryosphaeriaceae fungi in California and Spain. *Plant Disease* 103: 1809–1827. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0622-FE>.
- Moral J, Morgan D, Michailides TJ (2019) Management of Botryosphaeria canker and blight diseases of temperate zone nut crops. *Crop Protection* 126: 104927. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104927>.
- Nagao MA, Hirae HH (1992) Macadamia: Cultivation and physiology. *Critical Reviews in Plant Sciences* 10: 441–470. <https://doi.org/10.1080/07352689209382321>.

- Ogundana SK (1983) Life Cycle of *Botryodiplodia theobromae*, a Soft Rot Pathogen of Yam. *Journal of Phytopathology* 106: 204–213. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1983.tb00045.x>.
- Pellicciaro M et al (2021) Biocontrol potential of *Pseudomonas protegens* against *Heterobasidion* species attacking conifers in Europe. *Biological Control* 157. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104583>.
- Pelzer GQ et al (2011) Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. *Tropical Plant Pathology* 36: 95–103. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762011000200005>.
- Reis P et al (2022) Response of Different Grapevine Cultivars to Infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Lasiodiplodia mediterranea*. *Plant Disease* 106: 1350–1357. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-21-0941-RE>.
- Renwick A, Campbell R, Coe S (1991) Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology* 40: 524–532. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1991.tb02415.x>.
- Rodríguez-Gálvez E et al (2017) Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. *Fungal Biology* 121: 452–465. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.06.004>.
- Romeiro R da S (2001) Métodos em Bacteriologia de Plantas. 1st edn. Viçosa: Editora UFV.
- Silva R et al (2024) Etiology and prevalence of macadamia diseases in Brazil. *Australasian Plant Pathology* 53: 159–174. <https://doi.org/10.1007/s13313-024-00969-5>.
- Slippers B, Wingfield MJ (2007) Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21: 90–106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>.
- Sosso J, Zakeel MCM, Akinsanmi OA (2021) Culturable fungal endophytes in Australian macadamia nursery plants. *Australasian Plant Pathology* 50: 739–746. <https://doi.org/10.1007/s13313-021-00824-x>.
- Sulley S, Babadoost M, Hind SR (2021) Biocontrol agents from cucurbit plants infected with *Xanthomonas cucurbitae* for managing bacterial spot of pumpkin. *Biological Control* 163: 104757. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104757>.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/NAR/22.22.4673>.
- Trueman SJ (2013) The reproductive biology of macadamia. *Scientia Horticulturae* 150: 354–359. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.11.032>.
- Velázquez ADS, Ocampos CJG (2016) Control biológico de *Rosellinia* sp. causante de la muerte súbita en macadamia (*Macadamia integrifolia*) con aislados de *Trichoderma* spp.. *Investigación Agraria* 18: 77–86.

<https://doi.org/10.18004/investig.agrar.2016.diciembre.77-86>.

Vlot AC et al (2021) Systemic propagation of immunity in plants. *New Phytologist*. 229: 1234–1250.

<https://doi.org/10.1111/nph.16953>.

Xu X et al (2023) Enhanced specificity of *Bacillus* metataxonomics using a tuf -targeted amplicon sequencing approach.

*ISME Communications* 3: 1–11. <https://doi.org/10.1038/s43705-023-00330-9>.

Yan JY et al (2018) Comparative genome and transcriptome analyses reveal adaptations to opportunistic infections in woody plant degrading pathogens of Botryosphaeriaceae. *DNA Research* 25: 87–102.

<https://doi.org/10.1093/dnares/dsx040>.

Zentmeyer GA, Storey WB (1960) *Phytophthora* canker of Macadamia trees in California. *Plant Disease Reporter* 44: 107–109.

### CAPÍTULO 3

#### DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Cladosporium* ASSOCIADAS A QUEIMA DOS RACEMOS EM MACADÂMIA (*Macadamia integrifolia*) NO BRASIL<sup>33</sup>

**Resumo:** As doenças que acometem os racemos da macadâmia são de grande relevância para a cultura, podendo ocasionar perdas expressivas. No Brasil, *Cladosporium xanthochromaticum* é o principal agente relatado, mas a diversidade de espécies associadas à doença ainda é pouco conhecida. Este estudo teve como objetivo elucidar a diversidade de *Cladosporium* spp. associadas à queima dos racemos de macadâmia e avaliar a sensibilidade dos isolados a ingredientes ativos registrados para a cultura. Foram obtidos isolados de folhas e racemos sintomáticos e realizados testes de patogenicidade em racemos destacados, caracterização morfológica, identificação molecular (ITS, *act*, *tefla*) e análise filogenética. Além disso, foi conduzido teste de sensibilidade a fungicidas in vitro. Ambos os isolados testados (CMAA1932 e CMAA1933) foram patogênicos, provocando sintomas em 100% dos racemos inoculados. A análise filogenética identificou CMAA1932 como *Cladosporium tenuissimum* e CMAA1933 como uma possível nova espécie. Quanto à sensibilidade, *C. tenuissimum* foi mais suscetível às misturas de Azoxistrobina + Difenconazol e Fluxapiroxade + Piraclostrobina, enquanto o isolado CMAA1933 foi mais sensível à mistura Fluxapiroxade + Piraclostrobina. Conclui-se que, além de *C. xanthochromaticum*, outras espécies de *Cladosporium* são agentes etiológicos da queima dos racemos no Brasil, com diferenças de sensibilidade a fungicidas, o que amplia as possibilidades de manejo integrado da doença.

**Palavras-chaves:** Capnodiales; Cladosporiaceae; *Cladosporium tenuissimum*; controle químico; green mould;

---

<sup>3</sup> Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico Mycological Progress

### 3.1 INTRODUÇÃO

As doenças que incidem em racemos estão entre mais impactam a cultura da macadâmia, destacando-se como uma enfermidade de grande relevância devido ao seu potencial de causar perdas significativas na produção (Bright, 2024). São causadas por um complexo de fungos pertencentes a diversos gêneros, incluindo *Botrytis* (*B. cinerea* e *B. macadamiae*), *Neopestalotiopsis* (*N. macadamiae*, *N. drenthii*, *N. maddoxii*, *N. olumideae*, *N. vheenae* e *N. zakeelii*), *Pestalotiopsis* (*P. macadamiae* e *P. telopeae*) e *Cladosporium* (*C. cladosporioides*, *C. angulosum*, *C. angustisporum*, *C. devikae*, *C. macadamiae*, *C. proteacearum* e *C. xanthochromaticum*) (Akinsanmi et al., 2017; Prasannath; Galea; Akinsanmi, 2023; Silva et al., 2024; Van Den Berg et al., 2008). Entretanto, no Brasil, apenas a queima dos racemos, causada por *C. xanthochromaticum*, tem sido reportada como doença que incide nas estruturas florais da macadâmia (Silva et al., 2024).

O gênero *Cladosporium* é considerado cosmopolita e apresenta grande diversidade de espécies distribuídas no mundo todo, que podem ser isoladas de diferentes ambientes como solo, alimentos, produtos sintéticos ou plantas (Marin-Felix et al., 2017), sendo algumas de importância médica (Heuchert; Braun; Schubert, 2005; Hoog et al., 2000; Levetin; Dorsey, 2006). Além de patógenos de plantas, espécies de *Cladosporium* também podem se associar às plantas como endófitas, hiperparasitas de outros fungos ou colonizadores do filoplano.

São hábeis em colonizar diversos nichos ecológicos, sendo algumas espécies como *C. herbarum*, *C. cladosporioides* e *C. oxysporum* saprófitas, plurívoras e amplamente distribuídas, enquanto outras apresentam especificidade a determinados nichos ecológicos (Bensch et al., 2012). Quando em plantas, são capazes de estabelecer associação biotrófica ou necrotrófica em diferentes hospedeiros (Abdel-Motaal et al., 2009).

Quando fitopatogênico, *Cladosporium* spp. podem induzir sintomas de manchas foliares e descolorações (Abdel-Motaal et al., 2009), queima das folhas (YANG et al., 2021), necrose ou

erupções cutâneas em caules, flores e frutos (Marin-Felix et al., 2017; Nam et al., 2015; Prasannath; Galea; Akinsanmi, 2023; Rosado et al., 2019; Silva et al., 2024; Van Den Berg et al., 2008).

Devido às características do gênero *Cladosporium* e aos frequentes relatos de múltiplas espécies associadas à mesma enfermidade em um único hospedeiro, a caracterização precisa dos agentes etiológicos torna-se fundamental. Essa abordagem permite o desenvolvimento de estratégias de manejo mais eficazes. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivos: (1) elucidar se mais de uma espécie de *Cladosporium* de ocorrência em pomares comerciais de macadâmia no Brasil são capazes de incitar a queima dos racemos e (2) determinar a sensibilidade dos isolados patogênicos a ingredientes ativos registrados para a cultura, visando sua possível utilização para o manejo da doença em macadâmia.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Obtenção dos Isolados**

Os isolados foram obtidos a partir de folhas e racemos de macadâmia com sintomas e/ou sinais dos fitopatógenos (Figura 1). Os órgãos, devidamente armazenados e identificados foram encaminhados para o Laboratório de Microbiologia e Patologia de Sementes da Faculdade de Ciências Agronômicas, Unesp, Botucatu, São Paulo. Folhas com sinais de *Cladosporium* foram coletadas de mudas de macadâmia, provenientes do viveiro da empresa QueenNut Macadamia localizada em Dois Córregos, São Paulo (22°19'08"S 48°22'01"W). Racemos com estruturas de *Cladosporium* foram coletados no município de Teixeira de Freitas, Bahia (17° 32' 06" S, 39° 44' 31" W), ambos no ano de 2023.



**Fig. 1** Sintomas e sinais de *Cladosporium* em folhas (A, B e C) e racemos (D) de macadâmia.

### 3.2.2 Obtenção de culturas monospóricas

Para a obtenção de culturas monospóricas, os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA e mantidos em incubadora do tipo BOD ( $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) sob regime alternado de luz/escuro (12/12 h) durante 7 dias para induzir a produção de conídios.

Para cada estirpe, foi preparada uma suspensão de esporos com a adição de 20 ml de água destilada na placa e, com uma alça de Drigalski, realizados movimentos delicados sobre a colônia para a liberação dos conídios na suspensão. Em seguida, foram feitas diluições seriadas ajustando-se à concentração de  $10^5$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ .

Alíquotas de 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$  ou 500  $\mu\text{l}$  da suspensão de inóculo de cada estirpe foram depositadas em placas de Petri contendo meio Agar-Água e espalhadas na superfície com uma alça de Drigalski, seguindo-se à incubação em BOD ( $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) sob regime alternado de luz

(12/12 h). Esporos individualizados e recém-germinados foram transferidos para o meio BDA em placas de Petri e as culturas puras preservadas por meio da técnica de Castellani (Gonçalves; Alfenas; Mafia, 2016).

### 3.2.3 Teste de patogenicidade em racemos destacados

Os testes de patogenicidade foram conduzidos em condições controladas em laboratório. Os isolados foram repicados em meio de cultura BDA e incubados a 23°C sob regime alternado de luz/escuro de 12h/12h. As suspensões de conídios foram preparadas com a adição de 20 ml de água destilada esterilizada às placas de Petri. Os conídios foram extraídos da superfície da cultura por raspagem com auxílio de uma alça de Drigalski e as suspensões de conídios filtradas em camada dupla de gaze, em seguida ajustadas à concentração de  $10^5$  conídios mL<sup>-1</sup> com auxílio de um hemacitômetro.

Para os ensaios de patogenicidade, foram utilizados racemos coletados da variedade IAC 4-12B nos estádios de pré-antese e antese. Os rracemos não foram submetidos à assepsia a fim de evitar o desprendimento das flores da raquis. Racemos foram pulverizados com a suspensão de conídios e mantidas fechadas no recipiente por três dias a 25°C. Como tratamentos controle, racemos em cada estágio foram pulverizados com água destilada estéril. Três dias após a inoculação foi avaliado a incidência do patógeno sobre os racemos. Todos os isolados fúngicos utilizados nos ensaios de patogenicidade foram reisolados a partir dos racemos de macadâmia infectados, para confirmação da identidade, atendendo aos postulados de Koch.

O experimento foi delineado em um esquema fatorial (2 isolados de *Cladosporium* x 2 estágios florais x 4 repetições) e cada repetição consistiu em um racemo depositado em uma caixa gerbox, contendo papel toalha umedecido.

### 3.2.4 Caracterização morfológica

As avaliações de coloração e textura das colônias ocorreu após 14 dias de crescimento das culturas, observando-se a frente e o verso das placas.

Para observações e obtenção de imagens de estruturas fúngicas, foi realizada a metodologia de microcultura segundo Mafia e 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 de meio de cultura, 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 lactoglicerol. Foram realizadas medições das estruturas e capturas de imagens em microscópio óptico LEICA DM500 acoplado a um sistema de câmera digital LEICA ICC50, realizando-se análise de imagens por meio do software LAS EZ 3.4 DVD 272.

### **3.2.5 Identificação molecular**

Para realização da caracterização molecular, o micélio obtido de colônias puras de cada isolado crescidas por oito dias em meio BDA foi coletado por raspagem e macerado em nitrogênio líquido. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o kit EasyPure<sup>®</sup> Plant Genomic DNA (Transgen Biotech), seguindo as instruções do fabricante.

Reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas para amplificar regiões genômicas de interesse para o gênero *Cladosporium* (Bensch et al., 2018) em cada amostra. As regiões espaçadoras internas transcritas (ITS) e o gene 5.8S rRNA do rDNA foram amplificados com o par de primers ITS-5/ITS-4 (White et al., 1990). Também foram amplificadas sequências dos genes da actina (*act*) e do fator de alongamento da tradução 1-alfa (*tef1α*), utilizando-se os pares de primers ACT-512F/ACT-783R (Carbone & Kohn 1999) e EF1-688F/EF1-1251R (Alves et al., 2008), respectivamente.

A mistura utilizada para realização da reação de PCR consistiu de 12,5 µL de Taq DNA Polimerase (NeoBio), 7,5 µL de água milliQ, 1,0 µL de cada primer e 3,0 µL de DNA, totalizando um volume de 25 µL.

Para a região ITS, a mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a 94°C por 4 min; 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 54°C por 45s e extensão a 72°C por 40s; com uma extensão final a 72°C por 5 min.

Para actina e fator de alongamento, foi submetida a uma desnaturação inicial a 95°C por 8 min; 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 95°C por 15s, anelamento a 56°C por 20s e extensão a 72°C por 60s; com uma extensão final a 72°C por 5 min.

Os produtos de PCR foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Major Science) usando um gel de agarose a 1% e um marcador molecular de 100 pb (Norgen). Os produtos amplificados foram purificados usando esferas magnéticas (AMPure Agencourt) e quantificados usando um espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). As amostras foram enviadas ao Laboratório Central do IBTEC, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil, para realização de sequenciamento Sanger.

### **3.2.6 Análise filogenética**

As sequências obtidas foram editadas e montadas utilizando o software Geneious 4.8.5. e as análises e comparações com sequências disponíveis no GenBank foram realizadas por meio do algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Sequências representativas de fungos foram obtidas da base do NCBI (National Center for Biotechnology Information), incluindo isolados de referência provenientes da coleção CBS e sequências de linhagens ex-tipo e de referência disponíveis no GenBank.

As sequências dos genes ITS, *act* e *tefla* foram alinhadas separadamente utilizando o recurso ClustalW do software MEGA X, concatenadas e utilizadas para a construção de árvores filogenéticas pelo método de Máxima Verossimilhança (ML), com 1000 replicatas de bootstrap.

### **3.2.7 Teste de sensibilidade a fungicidas**

Foi realizado ensaio *in vitro* para determinar a sensibilidade dos isolados de *Cladosporium* a ingredientes ativos registrados para a cultura da macadâmia. Para a recuperação dos isolados obtidos das culturas monospóricas, foi transferido um disco de micélio preservado em frascos com água destilada e esterilizada, para as placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). As colônias foram crescidas a 23 °C, por 14 dias, quando discos de micélio medindo 0,5 cm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri contendo BDA com ou sem fungicida, e incubadas por oito dias a 23 °C.

As suspensões aquosas dos fungicidas foram adicionadas ao meio de cultura após autoclavagem e, ao atingir temperatura de 50°C, se adicionou alíquota de um fungicida, na concentração final descrita na tabela 1. Foram utilizadas doses iguais dos ingredientes ativos clorotalonil e hidróxido de cobre para ambos os isolados, enquanto as doses dos demais ingredientes foram definidas individualmente para cada isolado. O tratamento controle foi representado pelo meio BDA, sem adição de fungicida. A avaliação foi realizada após oito dias de incubação a 23 °C, por medição ortogonal do diâmetro das colônias (cm), calculando-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial em relação ao controle.

**Tabela 1.** Ingredientes ativos e suas respectivas doses utilizadas para determinação da sensibilidade dos isolados de *Cladosporium* spp. aos produtos

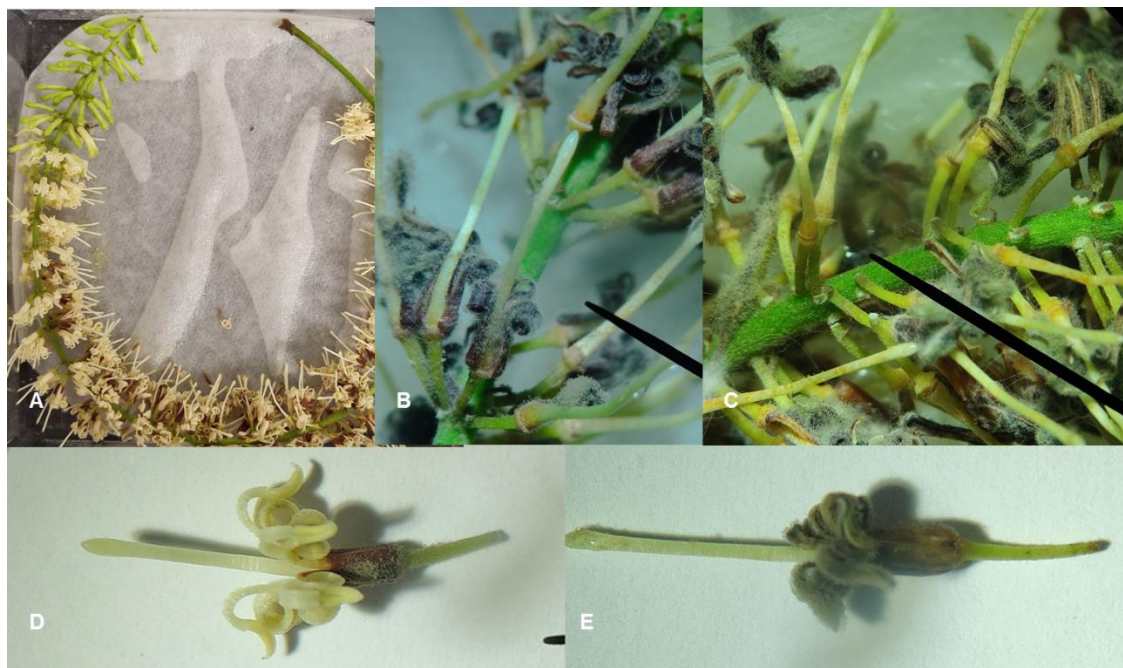
| Ingredientes Ativos      | Doses (µg/ml)              |                            |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                          | CMAA1932                   | CMAA1933                   |
|                          | 62.5, 125, 250, 500, 1000, | 62.5, 125, 250, 500, 1000, |
| Clorotalonil (500g/L)    | 2000                       | 2000                       |
| Azoxistrobina (200g/L) + |                            |                            |
| Difenoconazol (125g/L)   | 0.5, 1, 5, 10, 15, 20      | 5, 10, 20, 40, 80, 160     |
| Fluxapiroxade (167g/L) + |                            |                            |
| Piraclostrobina (660g/L) | 1, 5, 10, 15, 20, 25       | 10, 25, 50, 75, 100, 125   |
| Azoxistrobina (200g/L) + |                            |                            |
| Ciproconazol (80g/L)     | 5, 10, 15, 20, 25, 30      | 20, 40, 80, 160, 315, 630  |
| Hidróxido de Cobre       |                            |                            |
| (537,44g/L)              | 25, 50, 75, 100, 125, 150  | 25, 50, 75, 100, 125, 150  |

O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os dados obtidos foram organizados e submetidos ao cálculo de médias utilizando o software Excel® (Microsoft Corporation).

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Patogenicidade

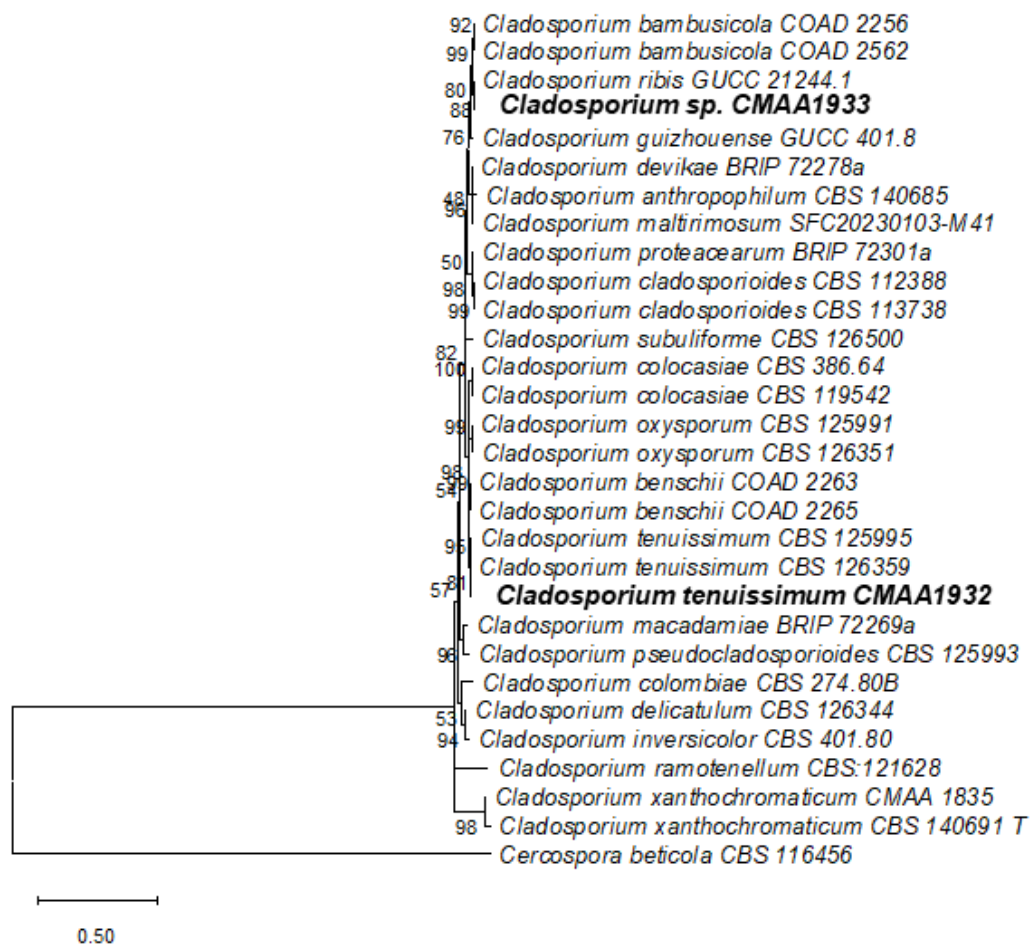
A patogenicidade dos isolados foi confirmada em ensaios com racemos destacados. Os dois isolados de *Cladosporium* spp., CMAA1932, isolado de racemos e CMAA1933 isolado de folha foram capazes de ocasionar sintomas em racemos de macadâmia nos estágios de pré-antese e antese, três dias após a inoculação (Figura 2), com incidência de 100%. O desenvolvimento de estruturas do patógeno no tecido infectado também foi observado.



**Fig. 2.** Racemos com sintomas de *Cladosporium* spp. **A.** Racemo inoculado com água destilada esterilizada. **B.** Racemo inoculado com isolado CMAA1933. **C.** Racemo inoculado com o isolado CMAA1932. **D.** Flor inoculada em estágio de pré-antese. **E.** Flor inoculada em estágio de antese.

### 3.3.2 Análise Filogenética

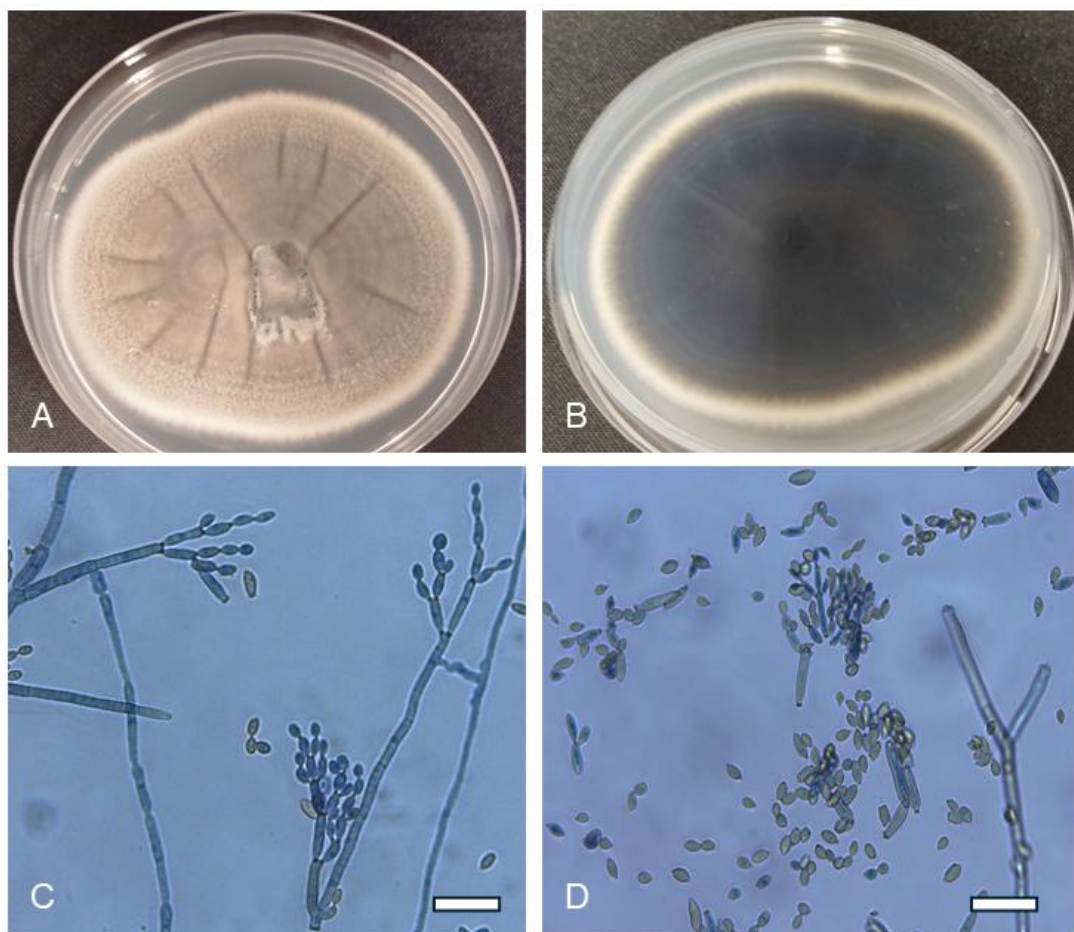
A análise das sequências da região ITS, dos genes *act* e *tefla* concatenadas revelou que o isolado CMAA 1932, isolado de flor, foi filogeneticamente próximo a *Cladosporium tenuissimum* (Fig. 3). Já o isolado CMAA 1933 formou um clado monofilético com alto suporte (bootstrap = 88%), distinto da cepa de referência de *Cladosporium ribis* (GUCC 21244.1). Essa separação filogenética indica que CMAA 1933, obtido de folha, não pode ser considerado um isolado de *C. ribis*, mas pertencente a uma espécie ainda não descrita do gênero *Cladosporium* (Fig. 3). Os isolados foram depositados na Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) da Embrapa Meio Ambiente, São Paulo, Brasil como CMAA 1932 (MAC 145) e CMAA 1933 (MAC 147).



**Fig. 3.** Árvore filogenética dos isolados CMAA 1932 e CMAA 1933, baseada nas sequências da região ITS, dos genes *act* e *tefla* concatenados. A árvore foi construída pelo método de Maximum-likelihood. As distâncias genéticas foram calculadas pelo Kimura's two-parameter model+G+I. *Cercospora beticola* CBS 140691 T foi incluído como grupo externo. Os valores de bootstrap (1000 réplicas) são mostrados ao lado dos nós. Barra: 0.050 substituições por posição de nucleotídeo.

### 3.3.3 Morfologia e Características Culturais

*Cladosporium* sp. CMAA1933 (Fig. 4).



**Fig. 4** *Cladosporium* sp. CMAA1933. Colônia de 14 dias de crescimento em meio BDA, (A) face superior e (B) inferior, (C) conídios, conidióforo e padrão de ramificação dicotômico e (D) conídios oliváceos. Barras= 50  $\mu$ m.

Descrição: Micélio: abundante, superficial e submerso, hifas retas, septadas, verde-oliva a marrom-oliva, lisas e com parede fina. Conidióforos: 13-134 x 2,7-5,7  $\mu$ m ( $\bar{x}$  = 72 x 3,5  $\mu$ m), eretos, cilíndrico-oblongos, frequentemente geniculados, às vezes com crescimento em ângulo de 45-90°, ocasionalmente com célula basal entumecida. Conídios: 3-7 x 2-4,3  $\mu$ m ( $\bar{x}$  = 4,7 x 2,9  $\mu$ m), em cadeias acropetais simples e ramificadas, asseptados, em sua maioria verde-oliva claro, lisos e de parede fina, elipsoides a limoniformes, com hilo conspícuo. Ramoconídios secundários: 7,3-18 x 2,2-4,8  $\mu$ m ( $\bar{x}$  = 10,6 x 3,4  $\mu$ m), verde-oliva claro, lisos e de parede fina,

subcilíndricos a cilíndricos, predominantemente asseptados, ocasionalmente com um septo, hilos conspícuos, subdenticulados ou denticulados. Cadeias de conídios formadas a partir de ramificações dicotômicas de ramoconídios secundários ou de um ramoconídio solitário após ramificação dicotômica.

Características culturais: Colônias em BDA, com taxa de crescimento de 5,08 mm ao dia quando incubado a 23°C sobre fotoperíodo de 12h. Frente acinzentada, com depressões radiais e anéis concêntricos evidentes na região próxima à extremidade da colônia. Bordas da colônia cotonosas, com margem evidente e regular, de coloração cinza esbranquiçada. Reverso marrom-oliva escuro, com anéis concêntricos e borda estreita e esbranquiçada.

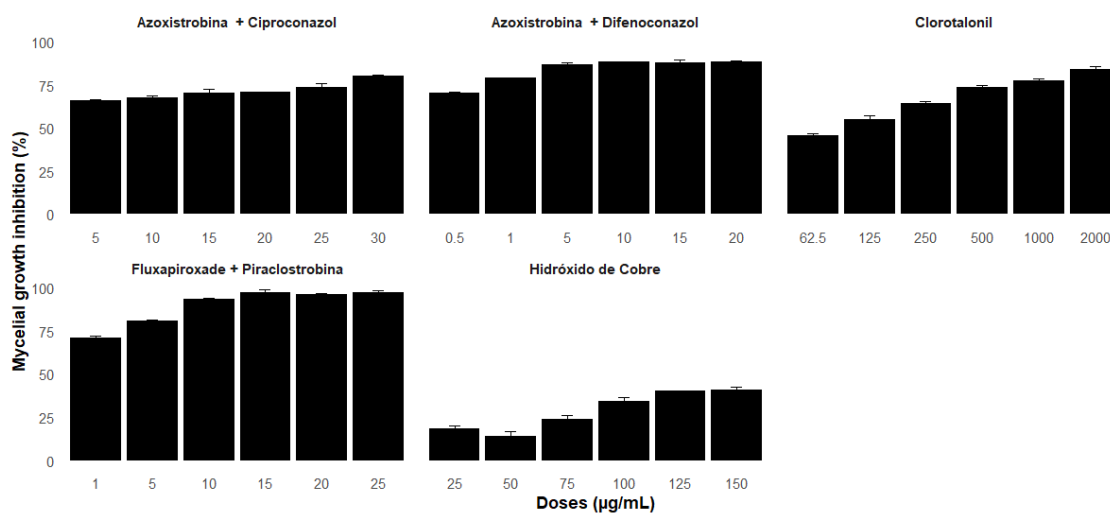
Habitat e distribuição: Folhas de *Macadamia integrifolia* (Proteaceae); Brasil.

Notas: *Cladosporium* sp. CMAA1933 pertence ao complexo *Cladosporium cladosporioides*. Difere morfológicamente da espécie filogeneticamente mais próxima, *Cladosporium ribis*, por ter ramoconídios secundários de maior dimensão e, principalmente, por apresentar padrão dicotômico de formação de conídios a partir da célula conidiogênica.

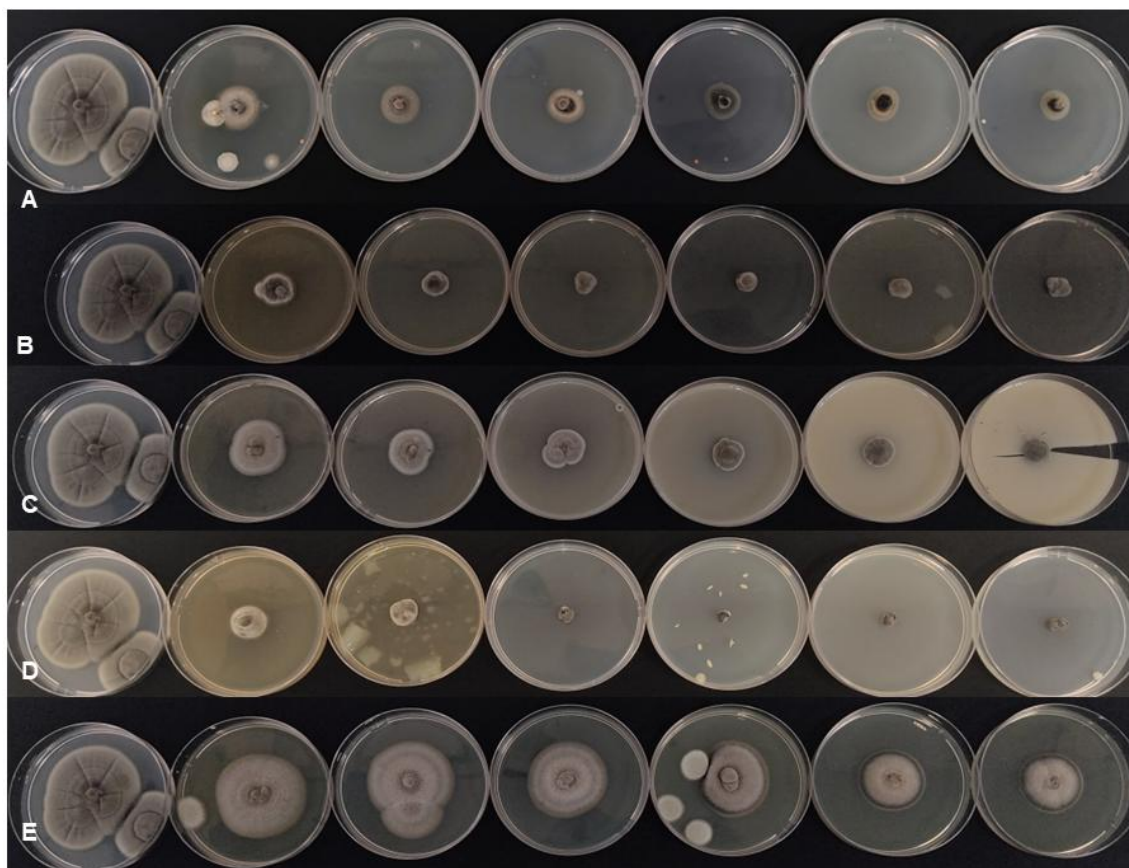
### 3.3.4 Sensibilidade a Fungicidas

*Cladosporium tenuissimum* CMAA 1932 foi sensível a todos os ingredientes ativos testados. Demonstrou maior sensibilidade à Azoxistrobina + Ciproconazol, Azoxistrobina + Difenconazol e Fluxapiroxade + Piraclostrobina. Clorotalonil apresentou efeito inibitório similar somente quando utilizadas as maiores doses do ingrediente ativo. Apesar do hidróxido de cobre ter promovido a redução do desenvolvimento do patógeno, demonstrou baixa capacidade inibitória, mesmo em altas doses do produto (Figura 4). Azoxistrobina + Ciproconazol promoveu máxima inibição na dose de 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $80,47 \pm 0,5931 \%$ ), Azoxistrobina + Difenconazol a partir da dose de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $88,35 \pm 0,3424 \%$ ), Fluxapiroxade + Piraclostrobina a partir da dose de 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $97,6 \pm 1,234 \%$ ), Clorotalonil

na dose de 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $84,24 \pm 1,369 \%$ ) e Hidróxido de Cobre na dose de 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $41,09 \pm 1,234 \%$ ) (Fig. 5 e 6).



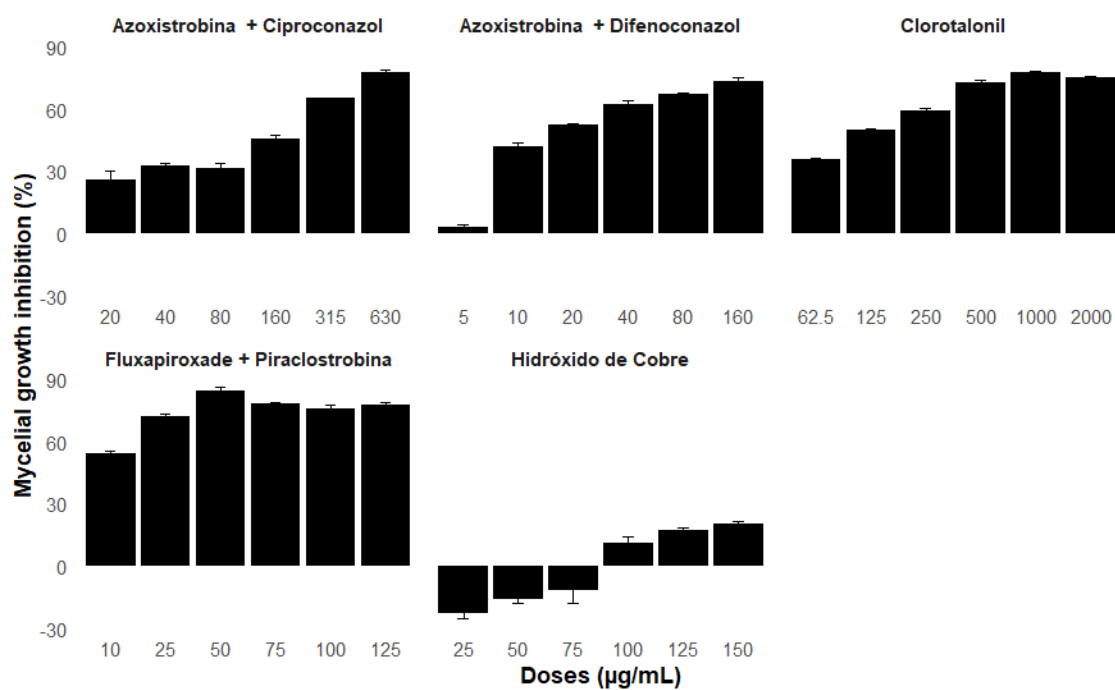
**Fig. 5** Inibição do crescimento micelial *Cladosporium tenuissimum* CMAA 1932 quando exposto a diferentes doses de ingredientes ativos registrados para a cultura da macadâmia no Brasil.



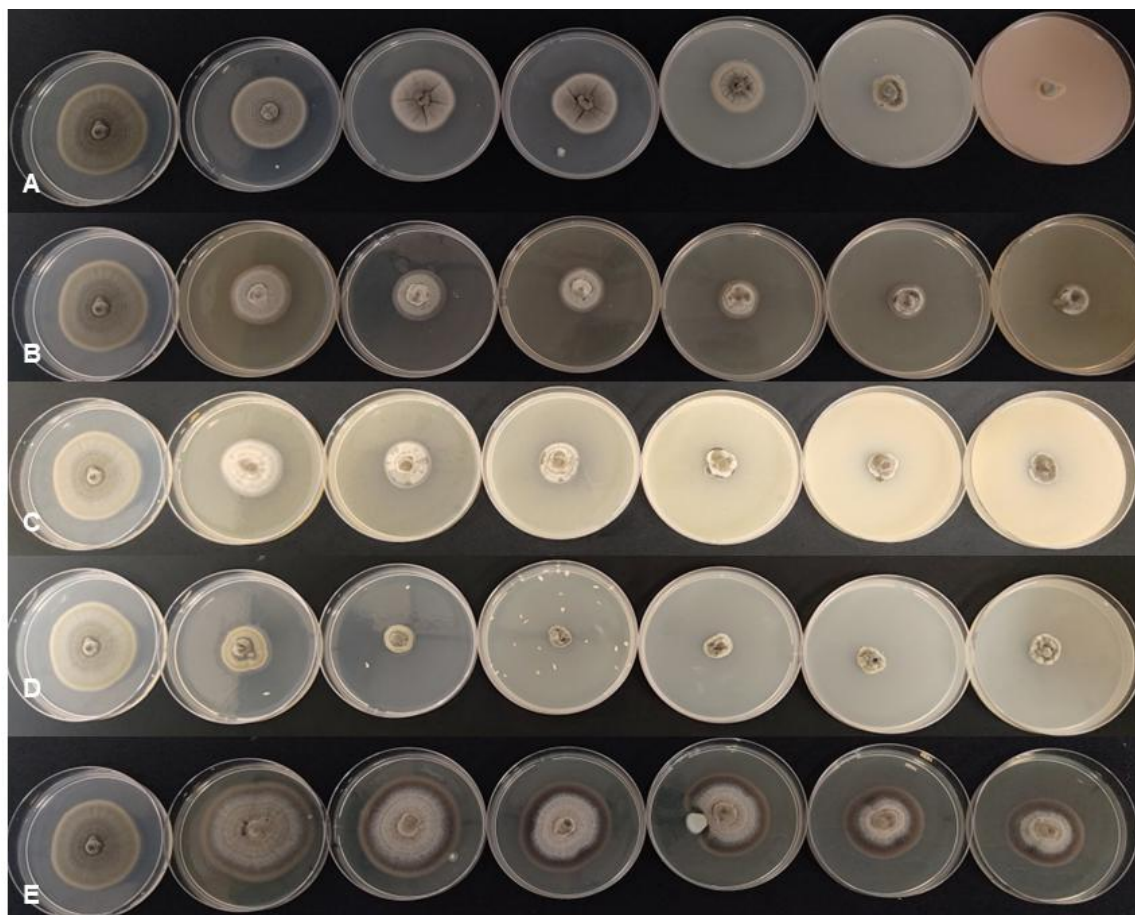
**Fig. 6.** Imagens representativas do efeito de ingredientes ativos sobre *Cladosporium tenuissimum* CMAA 1932. (A). Azoxistrobina + Ciproconazol, (B). Azoxistrobina + Difenconazol, (C). Clorotalonil, (D). Fluxapiroxade + Piraclostrobina, (E). Hidróxido de Cobre. As doses de cada produto foram crescentes no sentido da esquerda para a direita.

*Cladosporium* sp. CMAA 1933 demonstrou maior sensibilidade ao Fluxapiroxade + Piraclostrobina. Azoxistrobina + Ciproconazol, Azoxistrobina + Difenconazol e Clorotalonil apresentaram maior efeito inibitório ao isolado somente nas doses mais elevadas (Fig. 6). Embora o hidróxido de cobre tenha apresentado efeito inibitório ao patógeno nas doses mais elevadas, demonstrou pouca eficiência na inibição do seu crescimento (Figura 6). Fluxapiroxade + Piraclostrobina promoveu máxima inibição quando utilizada a dose de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $84,32 \pm 1,709 \%$ ). Azoxistrobina + Ciproconazol na dose de  $315 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $65,29 \pm 0 \%$ ), Azoxistrobina + Difenconazol na dose de  $160 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $73,13 \pm 1,709 \%$ ), Clorotalonil a partir

da dose de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $77,61 \pm 0,646 \%$ ) e Hidróxido de Cobre na dose de  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $20,14 \pm 1,345 \%$ ) (Fig. 7 e 8).



**Fig 7.** Inibição do crescimento micelial de *Cladosporium* sp. CMAA 1933 quando exposto a diferentes doses de ingredientes ativos registrados para a cultura da macadâmia no Brasil.



**Fig. 8.** Imagens representativas do efeito de ingredientes ativos sobre *Cladosporium* spp. (CMAA 1933). (A). Azoxistrobina + Ciproconazol, (B). Azoxistrobina + Difenconazol, (C). Clorotalonil, (D). Fluxapiroxade + Piraclostrobina, (E). Hidróxido de Cobre. As doses de cada produto foram crescentes no sentido da esquerda para a direita.

### 3.4 DISCUSSÃO

Diversas espécies do gênero *Cladosporium* já foram relatadas como agentes etiológicos da queima dos racemos em macadâmia, incluindo *Cladosporium cladosporioides*, *C. angulosum*, *C. angustisporum*, *C. devikae*, *C. macadamiae*, *C. proteacearum* e *C. xanthochromaticum* (Prasannath; Galea; Akinsanmi, 2023; Silva et al., 2024). Neste estudo, *Cladosporium* sp. e *Cladosporium tenuissimum* são relatados pela primeira vez como patógenos da macadâmia.

Morfológicamente, o gênero *Cladosporium* pode ser facilmente diferenciado e reconhecido pela presença de estruturas consideradas únicas, como os lóci conidiogênicos e os hilos

conidiais, classificados como coronados — formados por uma cúpula central convexa circundada por um anel periclinal elevado (Bensch et al., 2012; David, 1997). No entanto, a diferenciação entre espécies dentro do gênero requer análise molecular baseada em sequências multilocus, incluindo os marcadores ITS, *act* e *tefl* $\alpha$  (Bensch et al., 2012).

O isolado CMAA1933 formou um clado monofilético com suporte consistente (bootstrap = 88%) próximo a *Cladosporium ribis* (GUCC 21244.1), porém posicionando-se em um ramo distinto, indicando não pertencer à esta espécie.

*C. ribis* foi originalmente isolado de folhas de *Ribes burejense*, apresentando colônias em BDA com coloração marrom olivácea pálida, amarelecimento em direção às margens, textura aveludada, margens brancas e regulares, e micélio aéreo ausente ou escasso (Yang et al., 2023). Por outro lado, CMAA1933 apresentou colônias acinzentadas, com depressões radiais, bordas cotonosas de coloração cinza-esbranquiçada, margens amplas e regulares e reverso da colônia de coloração marrom-oliva, com anéis concêntricos e borda final estreita esbranquiçada. Tanto o micélio superficial quanto submerso foi abundante.

Além dessas diferenças, CMAA1933 também se distinguiu de *C. ribis* por apresentar estruturas reprodutivas de maiores dimensões, incluindo conidióforos ( $\bar{x} = 72 \times 3,5 \mu\text{m}$ ), conídios ( $\bar{x} = 4,7 \times 2,9 \mu\text{m}$ ) e ramoconídios secundários ( $\bar{x} = 10,6 \times 3,4 \mu\text{m}$ ). Adicionalmente, CMAA1933 exhibe, ocasionalmente, ramoconídios secundários septados e cadeias de conídios produzidos caracteristicamente em padrão dicotômico de ramificação, características não observadas em *C. ribis*.

Já o isolado CMAA1932, isolado de flor, foi posicionado em um clado bem suportado juntamente com duas cepas de referência de *C. tenuissimum* (CBS 125995 e CBS 126359), evidenciando ser pertencente a essa espécie. Além do agrupamento filogenético consistente, CMAA1932 apresentou características morfológicas compatíveis com a descrição de *C. tenuissimum*, corroborando a identificação molecular (Bensch et al., 2010).

Portanto, de modo similar com o que foi observado em outros países, os resultados aqui encontrados indicam que no Brasil mais de uma espécie de *Cladosporium* é agente causal da queima dos racemos. Além disso, o fato de *Cladosporium* sp. CMAA 1933 ter sido originalmente isolado de folha sintomática, indica que esta espécie é capaz de causar doença não só nos racemos. Este aspecto é um indicativo de que esta espécie pode vir a causar mais danos do que as demais já relatadas, até onde se sabe, capazes de infectarem somente racemos.

Além disso, a ocorrência de diversas espécies como agentes causais da queima de racemos faz com que se deva adotar medidas de exclusão com o fim de mitigar os riscos de introdução de novas espécies provenientes de material vegetal vindos de regiões distantes.

*Cladosporium tenuissimum* é um fungo cosmopolita, embora seja mais frequentemente encontrado em regiões tropicais, colonizando uma ampla variedade de hospedeiros vegetais e outros substratos (Bensch et al., 2010). É capaz de sobreviver em tecidos em decomposição, característica que propicia sua permanência em tecidos em senescência e o aumento da densidade de inóculo, conforme observado nas pétalas de flores de macadâmia (Fig. 1D e Fig. 2C). Como patógeno, *C. tenuissimum* já foi relatado causando queima das flores em morango (Nam et al., 2015), podridão pós-colheita em caju, mamão e maracujá (Rosado et al., 2019), manchas foliares e em frutos de cucurbitáceas (Gomes et al., 2023) e queima das folhas em ervilha (Ragukula; Makandar, 2024), dentre outros.

Os resultados demonstraram que produtos com diferentes ingredientes ativos registrados para a cultura apresentam efeito inibitório às duas espécies. Entretanto, a maioria das doses testadas neste estudo não foi capaz de inibir completamente (100%) o crescimento dos isolados, o que impossibilitou a determinação da  $CI_{50}$  (concentração inibitória de 50%) para cada mistura avaliada.

No entanto, as combinações de Azoxistrobina + Difenconazol e Fluxapiraxade + Piraclostrobina apresentaram alta atividade inibitória contra a cepa CMAA1932. Por sua vez, a

mistura de Fluxapíroxade + Piraclostrobina foi a mais eficaz no controle do isolado CMAA1933. A mistura de carboxamida (Fluxapíroxade) com estrobilurina (Piraclostrobina) demonstrou ser a mais eficiente para os dois isolados.

Fluxapíroxade pertence ao grupo das carboxamidas, conhecidos como SDHIs (Succinate Dehydrogenase Inhibitors), atuando na cadeia respiratória pela inibição da enzima succinato desidrogenase. Já a piraclostrobina é uma estrobilurina, Inibidor extracelular da quinona (QoI), agindo também no processo respiratório (Frac, 2024). Clorotalonil e hidróxido de cobre são fungicidas classificados como multissítio tendo efeito principalmente protetor e de contato (Frac, 2024).

Diferente deste estudo, clorotalonil e hidróxido de cobre foram altamente inibitórios à germinação de esporos de *Cladosporium xanthochromaticum* CMAA1835, indicando que podem ser utilizados principalmente na fase de pré-penetração do patógeno. Já a mistura de Fluxapíroxade + Piraclostrobina também foi eficiente na inibição da germinação de esporos do patógeno (Halfeld-Vieira et al., 2024).

Estes resultados indicam que de estes produtos podem ser utilizados no manejo da queima dos racemos, inibindo o desenvolvimento das espécies aqui relatadas, com a mesma eficiência. Apesar de ambos agirem no processo respiratório, Fluxapíroxade e Piraclostrobina agem em sítios específicos diferentes. Desta forma, a mistura pode ser utilizada em rotação com clorotalonil e hidróxido de cobre, além da mistura Azoxistrobina + Difenconazol, impedindo a seleção de cepas resistentes.

Todos os ingredientes ativos aqui testados são recomendados para o controle da antracnose (*Coletotrichum gloeosporioides*) da macadâmia, sendo comum a realização de aplicações de hidróxido de cobre nos viveiros como medida protetiva e nutrição foliar.

Nesse contexto, é importante monitorar se o uso contínuo desses fungicidas pode estar promovendo a seleção de indivíduos menos sensíveis a esses ingredientes ativos, conforme

observado para *Cladosporium* sp. CMAA1933, obtido de folha e CMAA 1932 obtido de flor e de diferentes regiões, os quais demonstraram pouca sensibilidade a este ingrediente ativo.

Em conclusão, este estudo demonstrou que, além de *C. xanthochromaticum*, outras 2 espécies de *Cladosporium* são capazes de causar queima de racemos em macadâmia, sendo uma delas proposta como nova espécie. Além disso, foram demonstradas diferenças de sensibilidade dos isolados a diferentes ingredientes ativos registrados para a cultura no Brasil, havendo compostos capazes de inibir significativamente o desenvolvimento do patógeno. Portanto, estes ingredientes ativos podem, eventualmente, contribuir para o manejo da doença, ampliando as estratégias de controle disponíveis.

## REFERÊNCIAS

- Abdel-Motaal, Fatma F. et al. 2009. "Leaf Spot Disease of Hyoscyamus Muticus (Egyptian Henbane) Caused by Cladosporium Herbarum." *Journal of General Plant Pathology* 75(6): 437–39.
- Akinsanmi, Olufemi A. et al. 2017. "Dry Flower Disease of Macadamia in Australia Caused by Neopestalotiopsis Macadamiae Sp. Nov. and Pestalotiopsis Macadamiae Sp. Nov." *Plant Disease* 101(1): 45–53.
- Alves, A., P. W. Crous, A. Correia, and A. J.L. Phillips. 2008. "Morphological and Molecular Data Reveal Cryptic Speciation in Lasiodiplodia Theobromae." *Fungal Diversity* 28: 1–13.
- Bensch, K. et al. 2010. "Species and Ecological Diversity within the Cladosporium Cladosporioides Complex (Davidiellaceae, Capnodiales)." *Studies in Mycology* 67: 1–94. <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2010.67.01>.
- Bensch, K.; Groenewald, J. Z.; Meijer, M.; Dijksterhuis, J.; Jurjević; Andersen, B.;

- Houbraken, J.; Crous, P. W.; Samson, R. A. 2018. "Cladosporium Species in Indoor Environments." *Studies in Mycology* 89: 177–301.
- Bensch, K., U. Braun, J. Z. Groenewald, and P. W. Crous. 2012. "The Genus Cladosporium." *Studies in Mycology* 72: 1–401.
- Van Den Berg, N., S. Serfontein, B. Christie, and C. Munro. 2008. "First Report of Raceme Blight Caused by Cladosporium Cladosporioides on Macadamia Nuts in South Africa." *Plant Disease* 92(3): 484. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-92-3-0484C> (October 13, 2021).
- Bright, Jeremy. 2024. NSW Department of Primary Industries and Regional Development *Macadamia Plant Protection Guide 2024–25*.  
<https://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/horticulture/nuts/growing-guides/%0A%0Amacadamia-protection-guide>.
- David, J.C. 1997. "A Contribution to the Systematics of Cladosporium. Revision of the Fungi Previously Referred to Heterosporium." *Mycological Papers* 172: 1–157.
- FRAC. 2024. "FRAC Classification of Fungicides." *Fungal control agents by cross resistance pattern and mode of action 2024*. <https://www.frac-br.org/modo-de-acao> (April 20, 2025).
- Gomes, Izabelle R.F. et al. 2023. "First Report of Cladosporium Tenuissimum Causing Spot Diseases on Leaves and Fruits of Cucurbits in Brazil." *Plant Disease* 107(8): 2540. <https://apsjournals-apsnet.ez87.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1094/PDIS-10-22-2388-PDN> (April 19, 2025).
- Gonçalves, R.C., A.C. Alfenas, and R.G. Mafia. 2016. "Armazenamento de Microrganismos Em Cultura Com Ênfase Em Fungos Fitopatogênicos." In *Métodos Em Fitopatologia*,

eds. A.C. Alfenas and R.G. Mafia. Viçosa, MG: Editora UFV, 516.

Halfeld-Vieira, Bernardo de Almeida, Kátia de Lima Nechet, Marcos Giovane Pedroza de Abreu, and Leonardo Massaharu Moriya. 2024. *Circular Técnica 33 - Identificação e Recomendações de Manejo de Doenças Da Macadâmia*. Jaguariúna, SP.

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1169232/1/Halfeld-Vieira-Recomendacoes-macadamia-2024.pdf>.

Hardner, Craig M. et al. 2009. “Genetic Resources and Domestication of Macadamia.” In *Horticultural Reviews*, John Wiley & Sons, Ltd, 1–125.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9780470593776.ch1> (March 21, 2025).

Heuchert, Bettina, Uwe Braun, and Konstanze Schubert. 2005. “Morphotaxonomic Revision of Fungicolous Cladosporium Species (Hyphomycetes).” *Schlechtendalia* 13: 1–78.

Hoog, GS de, J Guarro, J Gene, and MJ Figueras. 2000. *Atlas of Clinical Fungi*. 2nd ed. Washington, DC.: American Society for Microbiology.

Levetin, Estelle, and Kip Dorsey. 2006. “Contribution of Leaf Surface Fungi to the Air Spora.” In *Aerobiologia*, , 3–12.

Mafia, R.G., and A.C. Alfenas. 2016. “Preparações e Observações Microscópicas de Espécimes Fúngicos.” In *Métodos Em Fitopatologia*, eds. A.C. Alfenas and R.G. Mafia. Viçosa, MG: Editora UFV, 516.

Marin-Felix, Y. et al. 2017. “Genera of Phytopathogenic Fungi: GOPHY 1.” *Studies in Mycology* 86: 99–216.

Nagao, Mike A., and Howard H. Hiraie. 1992. “Macadamia: Cultivation and Physiology.” *Critical Reviews in Plant Sciences* 10(5): 441–70.

- Nam, Myeong Hyeon et al. 2015. “Cladosporium Cladosporioides and C. Tenuissimum Cause Blossom Blight in Strawberry in Korea.” *Mycobiology* 43(3): 354–59.
- Prasannath, Kandeeparoopan, Victor J. Galea, and Olufemi A. Akinsanmi. 2022. “Sources, Detection, and Inoculum Quantification of Flower Blight Pathogens in Macadamia.” *Phytopathology* 112(10): 2151–58.
- Prasannath, Kandeeparoopan, Victor J Galea, and Olufemi A Akinsanmi. 2023. “Diversity and Pathogenicity of Species of Botrytis , Cladosporium , Neopestalotiopsis and Pestalotiopsis Causing Flower Diseases of Macadamia in Australia.” (January): 1–19.
- Ragukula, Keerthi, and Ragiba Makandar. 2024. “Isolation and Identification of Cladosporium Tenuissimum Causing Leaf Blight on Garden Pea (Pisum Sativum L.) in Telangana from Southern India.” *Crop Protection* 185: 106891.
- Rosado, André W.C. et al. 2019. “Cladosporium Species Associated with Disease Symptoms on Passiflora Edulis and Other Crops in Brazil, with Descriptions of Two New Species.” *Phytotaxa* 409(5): 239–60. <https://sci-hub.se/10.11646/phytotaxa.409.5.1> (October 13, 2021).
- Silva, R. et al. 2024. “Etiology and Prevalence of Macadamia Diseases in Brazil.” *Australasian Plant Pathology* 53(2): 159–74. <https://link.springer.com/10.1007/s13313-024-00969-5>.
- Sosso, Julie, Mohamed C.M. Zakeel, and Olufemi A. Akinsanmi. 2021. “Culturable Fungal Endophytes in Australian Macadamia Nursery Plants.” *Australasian Plant Pathology* 50(6): 739–46. <https://doi.org/10.1007/s13313-021-00824-x>.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. “Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics.” In *PCR Protocols: A Guide to*

*Methods and Applications*, ed. T.J Innis, M.A, Gelfand, D.H, Sninsky, J.J, White.  
Academic Press, USA, 315–22.

Yang, Chun Lin et al. 2021. “First Report of Leaf Blight Caused by *Cladosporium*  
*Perangustum* on *Livistona Chinensis* in China.” *Plant Disease* 105(1): 223.  
[https://apsjournals-apsnet.ez87.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1094/PDIS-05-20-](https://apsjournals-apsnet.ez87.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1094/PDIS-05-20-1118-PDN)  
1118-PDN (October 13, 2021).

Yang, Yuanqiao et al. 2023. “*Cladosporium* Species Associated with Fruit Trees in Guizhou  
Province, China.” *Journal of Fungi* 9(2).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesta pesquisa oferecem avanços importantes para o manejo integrado de doenças da macadâmia. Foram selecionados e identificados seis isolados bacterianos antagonistas, pertencentes às espécies *Serratia ureilytica* (um isolado), *Bacillus subtilis* (dois isolados) e *Bacillus velezensis* (três isolados). Esses agentes de biocontrole demonstraram potencial para serem incorporados às práticas de manejo da cultura, proporcionando proteção contra doenças florais, como a queima dos racemos, e caulinares, como o cancro do caule, representando uma alternativa mais sustentável e ecologicamente amigável. Destaca-se que o isolado de *Serratia ureilytica* (CMAA1920) e um isolado de *Bacillus subtilis* (CMAA1922) apresentaram compatibilidade com os principais ingredientes ativos utilizados no controle de pragas e doenças da macadâmia, possibilitando seu uso em associação com defensivos químicos. Adicionalmente, verificou-se que os materiais genéticos atualmente utilizados na propagação da cultura não conferem resistência a *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, agente causal do cancro do caule. No entanto, a inoculação de mudas da variedade HAES 333 com antagonistas bacterianos indicou possível indução de respostas de defesa contra o patógeno. Este estudo também descreveu dois novos isolados de *Cladosporium* como agentes causais da queima dos racemos, incluindo a possível identificação de uma nova espécie. Foram ainda determinados os perfis de sensibilidade desses isolados aos principais ingredientes ativos registrados para a cultura. Esses resultados fornecem bases sólidas para estratégias de controle mais eficientes, promovendo maior proteção e sustentabilidade no cultivo da macadâmia.



## REFERÊNCIAS

- AKINSANMI, O. Diseases affecting macadamia flowers : a significant threat to production. **Horticulture Innovation Australia**, [s. l.], n. May 2015, p. 67–70, 2015.
- 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**, [s. l.], v. 101, n. 1, p. 45–53, 2017.
- BRIGHT, J. **Macadamia plant protection guide 2024–25**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/horticulture/nuts/growing-guides/%0Amacadamia-protection-guide>>
- CROWLEY-GALL, A.; TROUILLAS, F.; NINO, E. L.; SCHAEFFER, R. N.; NOURI, M. T.; CRESPO, M.; VANNETTE, R. Floral microbes suppress growth of *Monilinia laxa* with minimal effects on honey bee feeding. **Plant Disease**, [s. l.], p. 1–40, 2021.
- GSCHWEND, F.; BRAUN-KIEWNICK, A.; WIDMER, F.; PELLUDAT, C. Apple blossoms from a swiss orchard with low-input plant protection regime reveal high abundance of potential fire blight antagonists. **Phytobiomes Journal**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 145–155, 2021.
- HARDNER, C. M.; PEACE, C.; LOWE, A. J.; NEAL, J.; PISANU, P.; POWELL, M.; SCHMIDT, A.; SPAIN, C.; WILLIAMS, K. Genetic Resources and Domestication of Macadamia. In: **Horticultural Reviews**. [s.l.] : John Wiley & Sons, Ltd, 2009. v. 35p. 1–125.
- JAMI, F.; MOREY, L. Management Strategies for Macadamia Branch Dieback in South Africa. **Journal of Phytopathology**, [s. l.], v. 172, n. 6, 2024.
- JEFF-EGO, O. S.; AKINSANMI, O. A. Botryosphaeriaceae causing branch dieback and tree death of macadamia in Australia. **Australasian Plant Pathology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 59–64, 2019.
- KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W. J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 10, n. July, p. 1–19, 2019.
- KÖHL, J.; POSTMA, J.; NICOT, P.; RUOCCO, M.; BLUM, B. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. **Biological Control**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 1–12, 2011.
- MOHANKUMAR, V.; DANN, E. K.; AKINSANMI, O. A. Diversity and Pathogenicity of Botryosphaeriaceae Associated with Macadamia Branch Dieback in Australia. **Plant Disease**, [s. l.], v. 106, n. 10, p. 2576–2582, 2022.
- PIMENTEL, L. D.; DOS SANTOS, C. E. M.; WAGNER, A.; SILVA, V. A.; BRUCKNER, C. H. Estudo de viabilidade econômica na cultura da noz-macadâmia no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 500–507, 2007.
- PIZA, P. L. B. de T.; PIZA, I. M. de T.; ALMEIDA NETO, J. de T. P. e. A Cultura. In:

PIMENTEL, L.; BORÉM, A. (Eds.). **Macadâmia: do plantio a colheita**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2019. p. 160.

PRASANNATH, K.; GALEA, V. J.; AKINSANMI, O. A. Diversity and pathogenicity of species of *Botrytis*, *Cladosporium*, *Neopestalotiopsis* and *Pestalotiopsis* causing flower diseases of macadamia in Australia. [s. l.], n. January, p. 1–19, 2023.

SILVA, R.; NECHET, K. L.; MORIYA, L. M.; CARVALHO, V. N.; BIAFORA, M. R.; DE SOUZA, D. E. H.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Etiology and prevalence of macadamia diseases in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 159–174, 2024. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s13313-024-00969-5>>

TEMPLE, T. N.; THOMPSON, E. C.; UPPALA, S.; GRANATSTEIN, D.; JOHNSON, K. B. Floral colonization dynamics and specificity of *aureobasidium pullulans* strains used to suppress fire blight of pome fruit. **Plant Disease**, [s. l.], v. 104, n. 1, p. 121–128, 2020.

TOLEDO PIZA, P. IUI S B. De; MORIYA, LeonaRdo M. Cultivo da macadâmia no Brasil1. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 39–45, 2014.