



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

ETIOLOGIA DA PODRIDÃO OLHO DE BOI DA MAÇÃ NO BRASIL

BIANCA SAMAY ANGELINO BONFIM

**BRASÍLIA -DF
2017**

BIANCA SAMAY ANGELINO BONFIM

ETIOLOGIA DA PODRIDÃO OLHO DE BOI DA MAÇÃ NO BRASIL

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa de Pós-graduação em Fitopatologia.

Orientador

Dr. Danilo Batista Pinho, Doutor em Fitopatologia

**BRASÍLIA - DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

Bonfim, Bianca Samay Angelino.

Etiologia da Podridão olho de boi da maçã no Brasil. / Bianca Samay Angelino Bonfim.

Brasília, 2017.

p. 48.

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. Maçã – Podridão olho de boi.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Etiologia da Podridão olho de boi da maçã no Brasil.

*Aos meus pais João Batista e Neuraci, ao meu esposo Flávio, aos meus familiares
e amigos, fontes de força e coragem...*

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Minha maior gratidão nesse momento é a Deus, meu porto seguro...

Agradeço aos meus pais, pela educação e ensinamentos, aos meus irmãos Dione e Lucas, por todo amor. Ao meu esposo Flávio, por estar presente em todas as horas, por toda compreensão e ajuda. Aos meus amigos, sem os quais não seria possível a realização desse trabalho, em especial a Thaís Ramos.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o término desse trabalho, em especial aos amigos: Bruno Souza, Cristiano da Silva Rodrigues, Camila Pereira de Almeida e Débora Cervieri Guterres.

Quero agradecer o professor Danilo Batista Pinho pelo incentivo, apoio e orientação durante todo esse período. Ao Dr. Hugo Agripino de Medeiros pelo incentivo, informações e sugestões para a realização desse trabalho e por disponibilizar isolados fúngicos. Ao professor Robert Neil Gerard Miller por conceder a infraestrutura do Laboratório de Interação Plantas-Praga.

Agradeço as bolsistas de Iniciação Científica do Laboratório de Micologia, Amanda Gomes Moreira e Ana Clara Ribeiro Quitânia, pela ajuda oferecida.

Ao professor Dr. José Carmine Dianese e o Dr. Eudes de Arruda Carvalho por compor a banca examinadora e pelas sugestões durante o exame.

À Universidade de Brasília pela oportunidade de realização do Mestrado em Fitopatologia, um dos meus sonhos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do professor Dr. Danilo Batista Pinho, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

ETIOLOGIA DA PODRIDÃO OLHO DE BOI DA MAÇÃ NO BRASIL

BIANCA SAMAY ANGELINO BONFIM

DISSERTAÇÃO APROVADA em: 21 / 02 / 2017 por:

Dr. Eudes de Arruda Carvalho
Embrapa Quarentena Vegetal (Examinador Externo)

Dr. José Carmine Dianese
Universidade de Brasília (Examinador Interno)

Dr. Danilo Batista Pinho
Universidade de Brasília (Presidente - Orientador)

**BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2017**

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMO GERAL	iv
GENERAL ABSTRACT	v
INTRODUÇÃO	6
1 REVISÃO DE LITERATURA	9
1.1 A cultura da macieira	9
1.2 Produção de maçãs	10
1.3 Principais doenças da macieira	11
1.4 Podridão olho de boi da maçã	12
1.4.1 Sintomatologia	13
1.4.2 Etiologia	14
1.4.3 Taxonomia do gênero <i>Neofabraea</i>	16
2 MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1 Coleta das amostras	17
2.2 Isolamento e armazenamento dos isolados	17
2.3 Extração do DNA genômico	18
2.4 Amplificação e purificação do DNA	18
2.5 Análises Filogenéticas	19
2.6 Caracterização morfológica de <i>Neofabraea</i> spp.	21
2.7 Agressividade de <i>Neofabraea</i> spp.	22
2.8 Crescimento micelial de <i>Neofabraea</i> spp.	23
3 RESULTADOS	24
3.1 Caracterização molecular	24
3.2 Caracterização morfológica da espécie <i>Neofabraea</i> sp. nov. (Provável espécie nova). Figura 4 (A-F)	27
3.3 Caracterização morfológica da espécie <i>Neofabraea actinidiae</i> (P.R. Johnst., M.A. Manning & X. Meier) P.R. Johnst., IMA Fungus 5: 102, 2014. Figura 5 (A–D)	29
3.4 Teste de agressividade das espécies	30
3.5 Estudo do crescimento micelial e IVCN em EMA de <i>Neofabraea</i> spp.	34
4 DISCUSSÃO	38
4.1 Caracterização molecular	38
4.2 Morfologia, crescimento micelial e agressividade das espécies de <i>Neofabraea</i>	38
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos iniciadores utilizados para o sequenciamento dos isolados de <i>Neofabraea</i> spp.	19
Tabela 2. Números de acesso do GenBank das sequências de DNA de <i>Neofabraea</i> utilizadas na análise filogenética.	21
Tabela 3. Análise de variância do teste de agressividade das espécies de <i>Neofabraea</i> spp.....	31
Tabela 4. Médias do diâmetro das lesões (cm) ocasionadas pelos isolados de <i>Neofabraea</i> spp. em diferentes temperaturas testadas.	32
Tabela 5. Quadro geral da análise de variância do crescimento micelial em EMA dos isolados de <i>Neofabraea</i> sp. e <i>N. actinidiae</i>	34
Tabela 6. Médias do crescimento radial (cm) de isolados de <i>Neofabraea</i> spp. em meio EMA.	35
Tabela 7. Médias do crescimento radial (cm) em meio EMA dos isolados de <i>Neofabraea</i> spp. em diferentes temperaturas.....	36
Tabela 8. Médias do IVCN (mm/dia) de <i>Neofabraea</i> spp. em meio de cultivo EMA.....	36
Tabela 9. Médias do IVCN (mm/dia) dos isolados de <i>Neofabraea</i> spp. em diferentes temperaturas.	37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. (A) Sintoma típico da podridão olho de boi em maçã e (B) lesões em vários frutos. 14
- Figura 2. Árvore filogenética obtida por Inferência Bayesiana fundamentada em sequências parciais da região da β -tubulina de 92 espécimes de *Neofabraea* spp. isolados da podridão olho de boi da maçã. Isolados selecionados para análises subsequentes estão destacados em negrito. O símbolo estrela indica isolados coletados em Fraiburgo enquanto que quadrados, círculos e triângulos indicam Campo Belo do Sul, Vacaria e São Joaquim, respectivamente. 25
- Figura 3. Árvore filogenética concatenada com sequências das regiões β -tubulina, ITS, LSU e RPB2 obtida por Inferência Bayesiana. A probabilidade posterior é indicada acima dos nós. A árvore foi enraizada com *Pezizula neosporulosa*. Os espécimes-tipo de cada espécie são indicados com asterisco e os espécimes deste estudo estão destacados em negrito 26
- Figura 4. Provável espécie nova de *Neofabraea* (Isolado 320 – São Joaquim). (A) colônia em meio EMA. (B) conidióforo micronemático. (C) células conidiogênicas com colarete (setas). (D) macro (setas) e microconídios. (E, F) fiálides (setas). Escala = 10 μ m. ... 28
- Figura 5. *Neofabraea actinidiae* (Isolado 276 – Vacaria). (A) cultura em meio EMA. (B, C) conidióforos (setas) e conídios. (D) conídios. Escala = 10 μ m. 30
- Figura 6. Incidência da podridão olho de boi em maçãs ‘Fuji’ por *Neofabraea* spp. pelo método da seringa. Incidência da doença a 5 °C (A), 17 °C (B), e (C) 25 °C. 33
- Figura 7. Incidência da podridão olho de boi em maçãs ‘Fuji’ por *Neofabraea* spp. pelo método por fermento. Incidência da doença a 5 °C (A), 17 °C (B), e 25 °C (C). 34

RESUMO GERAL

BONFIM, Bianca Samay Angelino. **Etiologia da podridão olho de boi da maçã no Brasil.** 2017. 48p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O cultivo comercial da macieira no Brasil iniciou-se na década de 70 e atualmente constitui uma atividade econômica de grande importância para a região Sul, cuja produção corresponde a 99% do total produzido no país. Apesar dos altos índices de produção, a produtividade da cultura é reduzida devido a ocorrência de pragas e doenças. Entre as principais doenças, as podridões pós-colheita destacam-se pelas perdas mais elevadas em relação as ocorridas no campo, pois além dos custos de produção, são adicionadas despesas de colheita, classificação, embalagem, transporte, armazenamento e comercialização. A podridão olho de boi é uma doença pós-colheita causada por um complexo de espécies do gênero *Neofabraea*, sendo que a ocorrência de cada táxon varia de acordo com a região geográfica. Por exemplo, *N. alba* é a única espécie relatada no Chile enquanto que *N. alba*, *N. kienholzii* e *N. perennans* já foram registradas na Polônia. O primeiro relato da podridão olho de boi no Brasil ocorreu em 1995 e até 2016, o agente etiológico da doença foi identificado como *N. perennans*. A identificação foi baseada principalmente nas características morfológicas, no entanto, estudos recentes demonstram a importância da inclusão de dados moleculares para a diferenciação das espécies. Portanto, esse trabalho tem o objetivo de identificar e caracterizar morfomolecularmente as espécies de *Neofabraea* associadas a podridão olho de boi e avaliar a agressividade e o crescimento micelial dos isolados em diferentes temperaturas. Os isolados foram obtidos de frutos sintomáticos coletados em Campo Belo do Sul-SC, Fraiburgo-RS, São Joaquim-SC e Vacaria-RS para extração do DNA genômico e amplificação parcial do gene da β -tubulina. Entre os 92 isolados identificados, 10 espécimes provenientes de Fraiburgo (4) e Vacaria (6) pertencem a *N. actinidiae* e 82 isolados obtidos em Campo Belo do Sul (15), Fraiburgo (36), São Joaquim (12) e Vacaria (19) pertencem a *Neofabraea* sp., indicando que a podridão olho de boi no Brasil é causada por duas espécies do gênero *Neofabraea*. Para a identificação precisa, isolados representativos de cada espécie e localidade foram selecionados para sequenciamento das regiões ITS, LSU, e RPB2 e para a caracterização morfológica. Após a abordagem morfomolecular, conclui-se que *Neofabraea* sp. e *N. actinidiae* ocorrem na proporção 8:1, sendo que *Neofabraea* sp. ocorre em Campo Belo do Sul-SC, Fraiburgo-SC, São Joaquim-SC e Vacaria-RS enquanto *N. actinidiae* foi encontrada somente em Fraiburgo e Vacaria. Adicionalmente, esse é o primeiro relato de *N. actinidiae* causando a podridão olho de boi da maçã. Isolados representativos de cada espécie e localidade foram utilizados para avaliação da agressividade e do crescimento micelial a 5°C, 17°C e 25 °C. A agressividade foi determinada pelo tamanho das lesões em frutos de maçãs ‘Fuji’ ocasionadas pela inoculação de uma suspensão de conídios e o crescimento micelial pelo tamanho do diâmetro das colônias cultivadas em extrato de malte ágar. Após os testes, verifica-se que *Neofabraea* sp. é mais agressiva que *N. actinidiae* e que existe uma variação fisiológica intraespecífica para o crescimento micelial e a agressividade dos isolados sob diferentes temperaturas.

Palavras-chave: Filogenia molecular, fungos, *Neofabraea*, pós-colheita, taxonomia.

Orientador- Dr. Danilo Batista Pinho- Universidade de Brasília

GENERAL ABSTRACT

BONFIM, Bianca Samay Angelino. **Etiology of the bull's eye rot of apple in Brazil.** 2017. 48p. Dissertation (Master of Science in Plant Pathology) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

The commercial cultivation of apple trees in Brazil began in the 1970's and it is currently an economic activity of great importance in the country's southern region, which accounts for 99% of the total domestic production. Despite the high fruit yields, crop productivity is limited by the occurrence of pests and diseases. Among the main diseases, postharvest rot losses are higher than field losses, due to the associated costs of harvesting, sorting, packaging, transportation, storage and commercialization. The bull's eye rot is a post-harvest disease caused by a complex of species of the genus *Neofabraea*, and the occurrence of each taxon varies according to geographic region. For example *N. alba* is the only species reported in Chile whereas *N. alba*, *N. kienholzii* and *N. perennans* have already been recorded in Poland. The first report of bull's eye rot in Brazil was made in 1995 and, until 2016, the etiological agent of the disease was identified as *N. perennans*. The identification was mainly based on the morphological characters, however, recent studies demonstrate the importance of the inclusion of molecular data for species differentiation. Therefore, this work aimed to identify and characterize morphologically and molecularly the *Neofabraea* species associated with bull's eye rot and to evaluate the aggressiveness and mycelial growth of the isolates at different temperatures. The isolates were obtained from symptomatic fruits collected in Campo Belo do Sul-SC, Fraiburgo-RS, São Joaquim-SC and Vacaria-RS for extraction of genomic DNA and partial amplification of the β -tubulin gene. Among the 92 isolates identified, 10 specimens from Fraiburgo (4) and Vacaria (6) were shown to belong to *N. actinidiae*, while 82 isolates obtained from Campo Belo do Sul (15), Fraiburgo (36), São Joaquim (12) and Vacaria (19) were determined to belong to *Neofabraea* sp., indicating that bull's eye rot in Brazil is caused by two species of the genus *Neofabraea*. For the precise identification, representative isolates of each species and locality were selected for sequencing of the ITS, LSU, and RPB2 regions and for the morphological characterization. After the morphomolecular approach, we concluded that *Neofabraea* sp. and *N. actinidiae* occur in the ratio 8:1, and *Neofabraea* sp. occurs in Campo Belo do Sul-SC, Fraiburgo-SC, São Joaquim-SC and Vacaria-RS whereas *N. actinidiae* was found only in Fraiburgo and Vacaria. Furthermore, this is the first report of *N. actinidiae* causing apple bull's eye rot. Representative isolates of each species and locality were used to evaluate aggressiveness and mycelial growth at 5 ° C, 17 ° C and 25 ° C. Aggressiveness was determined by the size of lesions on 'Fuji' apple fruits following inoculation of a conidial suspension. Mycelial growth rates were determined by the size of the colonies grown in agar malt extract. *Neofabraea* sp. was consistently more aggressive than *N. actinidiae*. Additionally, an intraspecific physiological variation was found for the mycelial growth rate and isolate aggressiveness to fruits under different temperatures.

Keywords: Fungi, molecular phylogeny, *Neofabraea*, post-harvest, taxonomy

Guidance Committee- Dr. Danilo Batista Pinho- Universidade de Brasília (Advisor).

INTRODUÇÃO

O cultivo da macieira (*Malus domestica* Borkh.) iniciou-se na década de 70 no Brasil, e atualmente constitui uma importante atividade econômica na região Sul, cuja produção corresponde a 99% do total produzido no país. Nos últimos anos, a produção de maçã tornou-se autossuficiente, principalmente devido a expansão das áreas cultivadas e a adoção de novas tecnologias. Com isso o país passou de importador para exportador, e atualmente ocupa a 7ª posição entre os produtores mundiais da fruta (AGRIANUAL, 2016; KIST, 2015; 2016).

A maçã constitui uma importante fonte de alimento para a população brasileira, sendo a terceira fruta mais consumida e a oitava produzida no país (KIST, 2016). Somente o agronegócio da macieira movimenta 6 bilhões de reais anualmente e emprega aproximadamente 195 mil trabalhadores (KIST, 2016). No entanto, a ocorrência de doenças reduz drasticamente o retorno econômico da cultura. Além das doenças que ocorrem no campo, existem também as podridões pós-colheita. Entre essas, a podridão olho de boi ocasiona as maiores perdas durante o armazenamento das frutas. A podridão olho de boi é a principal doença pós-colheita em diversas regiões do mundo, sendo relatada na Austrália, Brasil, Chile, Estados Unidos, Itália, Polônia e República Tcheca (SANHUEZA, 2002; CUNNINGTON, 2004; HENRIQUEZ, 2005; SPOTTS *et al.*, 2009; SOTO-ALVEAR *et al.*, 2013; HORTOVA,*et al.*, 2014; MICHALECKA *et al.*, 2015; SANHUEZA & BOGO, 2015; CAMELDI *et al.*, 2016; PEŠICOVÁ *et al.*, 2016; AGUILAR,*et al.*, 2017). Os sintomas desenvolvem-se lentamente quando os frutos são armazenados a baixas temperaturas, e em algumas situações, os mesmos são visíveis somente após alguns meses de armazenamento. Esses sintomas impedem a comercialização do fruto *in natura* e reduzem o lucro do produtor devido às despesas adicionais de colheita, classificação, embalagem, transporte e armazenamento (ARAÚJO *et al.*, 2016).

A doença é causada por um complexo de espécies do gênero *Neofabraea* (MICHALECKA *et al.*, 2015). Entre as nove espécies do gênero, somente cinco (*N.alba*, *N. brasiliensis*, *N. kienholzii*, *N. malicorticis* e *N. perennans*) causam a podridão olho de boi na maçã (KIENHOLZ, 1939; JOHNSTON *et al.*, 2004; HENRIQUEZ, 2005; SPOTTS *et al.*, 2009; SANHUEZA & BOGO, 2015). Além disso, a espécie *N. actinidiae* é comumente associada com a podridão madura da maçã (JOHNSTON *et al.*, 2004).

A ocorrência das espécies de *Neofabraea* associadas a podridão olho de boi varia em cada região produtora. Por exemplo, no Chile a doença é causada somente por *N. alba* (HENRIQUEZ, 2005; SOTO-ALVEAR *et al.*, 2013). Na Itália *N. alba* e *N. malicorticis* foram relatadas enquanto que *N. alba*, *N. perennans* e *N. kienholzii* foram encontradas na Polônia (MICHALECKA *et al.*, 2015; CAMELDI *et al.*, 2016). No Brasil, somente *N. perennans* (= *C. perennans*) é historicamente associada com a podridão olho de boi. No entanto, após a caracterização molecular dos isolados, descobriu-se que os espécimes pertencem a uma nova espécie denominada *N. brasiliensis* (SANHUEZA & BOGO, 2015).

A identificação das espécies do gênero foi baseada principalmente nas características morfológicas dos espécimes. A forma sexual raramente é encontrada nos campos de produção e até o momento não foi detectada no país. Portanto, a identificação das espécies é baseada principalmente nas características morfológicas da forma assexual. Nessa fase, as espécies são reconhecidas pela presença de conidioma do tipo acérvulo e conídios unicelulares, hialinos e elipsoides (VERKLEY, 1999). Devido às várias espécies associadas com o sintoma e a sobreposição de características morfológicas, atualmente a identificação precisa das espécies de *Neofabraea* é feita usando um conjunto de características morfológicas em combinação com dados moleculares (CHEN *et al.*, 2016). Essa nova abordagem foi fundamental para diferenciação de *N. perennans* e *N. malicorticis*, anteriormente consideradas como a mesma espécie na Europa (DE JONG *et al.*, 2001).

Dada a ausência de estudos abrangentes sobre a agressividade e caracterização molecular do agente causal da podridão olho de boi, este estudo teve o objetivo geral de identificar e caracterizar morfomolecularmente as espécies de *Neofabraea* associadas a podridão olho de boi em maçãs no Brasil. Quanto aos objetivos específicos esse trabalho visa: (i) obter uma coleção abrangente de isolados coletados nos municípios de Campo Belo do Sul – SC, Fraiburgo – SC, São Joaquim – SC e Vacaria – RS; (ii) caracterizar morfologicamente e geneticamente os isolados (iii) analisar os níveis de agressividade entre os isolados coletados em diferentes regiões; e (iv) avaliar a agressividade e o crescimento micelial dos isolados em diferentes temperaturas.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 A cultura da macieira

A maçã é um pseudofruto de clima temperado conhecido por suas propriedades nutricionais e medicinais. Devido ao alto teor de pectina encontrada na casca, vitaminas e sais minerais, traz benefícios à saúde. Possui sabor doce-ácido, propriedades refrescantes e adstringentes. É tão antiga quanto a história da humanidade sendo mencionada em muitas tradições religiosas como um fruto místico ou proibido enquanto a planta é considerada a árvore da ciência e do saber (KNIGHT, 1990; SALGADO, 2005).

As plantas possuem folhas simples com bordos dentados, alternadas e caducas, flores hermafroditas, brancas ou rosadas em inflorescência do tipo umbela. O fruto é um pseudofruto denominado pomo, formado a partir do receptáculo floral (FIORAVANÇO & SANTOS, 2013), composto de mesocarpo carnudo que envolve os ovários, com endocarpo coriáceo e uma única semente (IUCHI, 2006).

A macieira surgiu há 25 mil anos, tendo como centro de origem a região do Cáucaso, uma cadeia de montanhas da Ásia entre o mar Negro e Cáspio, a leste da China. Acredita-se que o surgimento das espécies cultivadas tenha acontecido após o final da última era glacial. A espécie cultivada, *Malus domestica* Borkh., pertence à família Rosaceae, ordem Rosales, subfamília Pomoideae (BLEICHER, 2002).

Atualmente são conhecidas aproximadamente 7.000 cultivares de maçãs, no entanto, somente algumas são de interesse comercial. As cultivares ‘Golden Delicious’, ‘Red Delicious’, ‘Granny’, ‘Braeburn’, ‘Smith’, ‘Fuji’, ‘Gala’, ‘Pink Lady’ e ‘Elstar’, ‘Jonagold’ são as mais plantadas mundialmente, enquanto os grupos ‘Gala’ e ‘Fuji’ representam 60% e 30%, respectivamente do total da produção nacional (PETRI *et al.*, 2011). Essas cultivares

possuem propriedades organolépticas agradáveis ao paladar dos consumidores brasileiros, sendo por isso, as principais opções de cultivo (FIORAVANÇO, 2010).

1.2 Produção de maçãs

A China é o principal país produtor de maçã, sendo responsável por metade da produção mundial (53%). A União Européia e os Estados Unidos produzem 19% e 7%, respectivamente, do total. O Brasil ocupa a 7^a posição no ranking mundial com aproximadamente 2% da produção, sendo a Região Sul do país responsável por 99% da produção nacional (AGRIANUAL, 2016).

O cultivo da macieira no Brasil surgiu inicialmente no município de Valinhos-SP, na década de 60, mas devido a problemas fitossanitários e falta de investimentos a cultura não foi explorada comercialmente (KREUZ *et al.*, 1986). O primeiro plantio comercial de maçã no Brasil ocorreu em 1969, em Fraiburgo-SC e devido às leis de incentivo fiscal, a área plantada aumentou no decorrer dos anos, proporcionando uma produção de 1.528 toneladas de frutos em 1974. Inicialmente, a maioria das maçãs comercializadas no país era importada. A partir dos investimentos em pesquisa, tecnologia e comercialização, o cultivo da macieira intensificou-se em regiões de alta altitude nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, possibilitando uma produção autossuficiente de maçãs no Brasil (KIST *et al.*, 2015).

Os principais municípios produtores de maçã no Brasil são Vacaria-RS e São Joaquim-SC, que alternam a liderança, seguidos por Fraiburgo (SC). Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Maçã (ABPM), a produção na safra 2014/15 alcançou 1,14 milhão de toneladas, sendo que os municípios de Vacaria-RS, São Joaquim-SC e Friburgo-SC são responsáveis, respectivamente por 38%, 36% e 18% da produção total. Embora Campo Belo do Sul-SC não esteja entre os maiores produtores de maçã, a base econômica do município é a agricultura, cujo plantio de maçã se destaca (KIST, 2016; GARCIA, 2017).

1.3 Principais doenças da macieira

Apesar do sucesso econômico do cultivo da maçã no Brasil, a produção é drasticamente afetada pelo ataque de pragas e doenças. Entre as principais doenças, as que ocasionam as maiores perdas são: a sarna da macieira, a mancha foliar de *Glomerella*, o cancro europeu, e as podridões pós-colheita (ARAÚJO *et al.*, 2016). As principais doenças foliares e em pré-colheita dos frutos são brevemente discutidas abaixo:

Sarna da macieira: doença foliar causada pelo fungo *Venturia inaequalis*. Tradicionalmente é a principal doença da cultura e conseqüentemente a mais estudada. Essa doença foi descrita pela primeira vez no Brasil no estado de São Paulo, em 1950, e atualmente ocorre em todas regiões produtoras do País (BONETI *et al.*, 2002).

Mancha foliar de *Glomerella* (= mancha Gala): doença fúngica causada por espécies dos complexos *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. acutatum*. Essa doença foi observada pela primeira vez no estado do Paraná em 1983, e anualmente, é o principal problema durante o verão no Brasil (BONETI *et al.*, 2006).

Cancro europeu: O agente causal dessa doença é o fungo *Neonectria ditissima* (= *N. galligena*), relatado pela primeira vez no Brasil em Vacaria (RS) no ano de 2002. Após a incineração de aproximadamente 1 milhão de mudas, em anos subsequentes, a doença não ocorreu nos pomares. Somente em 2010 a doença apareceu novamente causando grandes prejuízos aos pomares localizados em Vacaria-RS e atualmente a doença é considerada como uma praga quarentenária presente no Brasil (BRASIL, 2014; SANHUEZA *et al.*, 2014).

A produção de maçã no Brasil é concentrada em um curto período do ano e por esse motivo, o armazenamento dos frutos é essencial para a continuidade da comercialização durante o ano. Nesse período ocorre uma perda elevada de frutos devido ao avanço do amadurecimento, à ocorrência de desordens fisiológicas, e ao ataque por pragas e fitopatógenos (SANHUEZA, 2002; BRACKMANN *et al.*, 2008).

Em relação às perdas causadas por fitopatógenos durante o armazenamento e a comercialização de maçãs, os principais patógenos causadores de podridões pós-colheita pertencem aos gêneros *Alternaria*, *Botryosphaeria*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Monilinia*, *Mucor*, *Neofabraea*, *Penicillium* e *Rhizopus*. No Brasil, as doenças pós-colheita que causam as maiores perdas são a podridão olho de boi (*Neofabraea perennans*) e o mofo azul (*Penicillium expansum*) (SANHUEZA, 2002; SANHUEZA & BETTI, 2005; BONETI *et al.*, 2006).

1.4 Podridão olho de boi da maçã

A podridão olho de boi é a principal doença pós-colheita em diversas regiões produtoras de maçã do mundo, sendo relatada na Austrália, Brasil, Chile, Estados Unidos, Itália, Polônia e República Tcheca (SANHUEZA, 2002; CUNNINGTON, 2004; HENRIQUEZ, 2005; SPOTTS *et al.*, 2009; SOTO-ALVEAR *et al.*, 2013; HORTOVA, NOVOTNY & ERBAN, 2014; MICHALECKA *et al.*, 2015; SANHUEZA & BOGO, 2015; CAMELDI *et al.*, 2016; PEŠICOVÁ *et al.*, 2016; AGUILAR *et al.*, 2017).

A primeira constatação da doença no Brasil ocorreu na safra 1995/1996, após o surgimento dos sintomas em maçãs ‘Fuji’ e ‘Golden Delicious’, colhidas em pomares das regiões de Tainhas, Caxias do Sul, Vila Oliva, e Vacaria no estado do Rio Grande do Sul e em Fraiburgo-SC (SANHUEZA, 2002). O agente etiológico foi identificado como *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenw (= *N. perennans*) após a confirmação pelo instituto “Westerdijk Fungal Biodiversity” da Holanda (SANHUEZA, 2001; 2002).

A podridão olho de boi ocorre em todas as áreas produtoras de maçã no Brasil. Embora a incidência da doença seja maior em regiões de temperaturas baixas, como São Joaquim-SC e Vacaria-RS, a incidência da doença tem aumentado em regiões de clima ameno, como Fraiburgo-SC (SANHUEZA, 2002; ARAÚJO *et al.*, 2016).

As empresas de armazenamento de maçãs consideram a podridão olho de boi como o principal problema pós-colheita da maçã devido à incidência elevada da doença durante o armazenamento. Em 2002 as perdas em maçãs ‘Fuji’ afetaram 16% do total armazenado, enquanto que em 2010 atingiram aproximadamente 29 e 19% das maçãs ‘Fuji’ e ‘Gala’, respectivamente (SANHUEZA, 2002; MEDEIROS, H. A., comunicação pessoal).

Os frutos sintomáticos são inviáveis para comercialização in natura e conseqüentemente são destinados para a indústria de sucos. Além do menor preço pago pelo quilo da fruta, ocorre uma redução do lucro em virtude das despesas adicionais de colheita, classificação, embalagem, transporte e armazenamento (ARAÚJO *et al.*, 2016).

1.4.1 Sintomatologia

Geralmente, os frutos infectados no campo permanecem assintomáticos e após longos períodos de armazenamento iniciam-se os sintomas. Os sintomas da podridão olho de boi da maçã desenvolvem-se lentamente, quando os frutos são armazenados a baixas temperaturas, e em algumas situações, os sintomas são visíveis somente após alguns meses de armazenamento. Os sintomas iniciais são lesões circulares e planas de coloração marrom clara com centro amarelo pálido e borda marrom escura ou avermelhada que se tornam necróticas e côncavas com o apodrecimento dos frutos (ARAÚJO *et al.*, 2016). As lesões circulares e escuras com centro marrom claro semelhantes ao “olho de boi” deram origem ao nome da doença (Fig. 1). Em condições de alta umidade relativa, os acérvulos podem ser observados no centro das lesões mais velhas (SANHUEZA, 2001).



Figura 1. (A) Sintoma típico da podridão olho de boi em maçã e (B) lesões em vários frutos.

Algumas espécies de *Neofabraea* também ocasionam cancrios nos troncos e ramos de seus hospedeiros. Esses sintomas são caracterizados por anéis concêntricos de tecidos sobressalentes onde observa-se nas margens o córtex separado da epiderme (SANHUEZA, 2001).

1.4.2 Etiologia

A podridão olho de boi é causada por espécies fúngicas do gênero *Neofabraea*, classificado no filo Ascomycota, classe Leotiomycetes, ordem Helotiales, família Dermataceae (INDEX FUNGORUM, 2017). Entre as nove espécies do gênero, somente cinco (*N. alba*, *N. brasiliensis*, *N. kienholzii*, *N. malicorticis* e *N. perennans*) causam a podridão olho de boi na maçã (KIENHOLZ, 1939; JOHNSTON *et al.*, 2004; HENRIQUEZ, 2005; SPOTTS *et al.*, 2009; SANHUEZA & BOGO, 2015). Adicionalmente, a espécie *N. actinidia* é comumente associada com a podridão madura da maçã (JOHNSTON *et al.*, 2004). Embora tradicionalmente *Neofabraea* seja associada com a forma sexual do fungo, essa fase raramente ocorre nos campos de produção e até o momento não foi encontrada no Brasil (SANHUEZA, 2002; SANHUEZA & BETTI, 2005; SANHUEZA & BOGO, 2015).

A doença é causada por um complexo de espécies, mas a ocorrência de cada táxon varia em cada região produtora. Na Europa continental, *N. alba* é o principal patógeno

causador da podridão olho de boi na maçã. Embora essa espécie tenha pouca relevância na América do Norte, *N. alba* é a única espécie encontrada no Chile (EDNEY, 1983; BOMPEIX e CHOLODOWSKI-FAIVRE, 2000; HENRIQUEZ, 2005; SOTO-ALVEAR *et al.*, 2013). Na Itália, somente *N. alba* e *N. malicorticis* foram relatadas enquanto que *N. alba*, *N. kienholzii* e *N. perennans* foram encontradas na Polônia (MICHALECKA *et al.*, 2015; CAMELDI *et al.*, 2016). Tradicionalmente, *N. perennans* (= *C. perennans*) foi considerado o agente causal da doença no Brasil. No entanto, após a caracterização molecular dos isolados, descobriu-se que os espécimes pertencem a uma nova espécie denominada *N. brasiliensis* (SANHUEZA & BOGO, 2015).

Além da podridão olho de boi da maçã e pera, espécies de *Neofabraea* têm sido associadas a outros sintomas. *N. malicorticis* causa cancro em troncos e ramos da macieira, podendo infectar os tecidos sem ferimentos (KIENHOLZ, 1939), enquanto *N. perennans* também causa cancro, mas precisa de ferimentos para infectar os tecidos do hospedeiro (KIENHOLZ, 1939).

Neofabraea alba (= *Phlyctema vagabunda*) é o agente causal da podridão olho de boi em maçã e pera, e até o momento é encontrada nos Estados Unidos, Austrália e Chile (GARIÉPY *et al.*, 2005; SPOTTS *et al.*, 2009). Essa espécie também causa manchas em azeitonas na América do Norte (ROONEY-LATHAM *et al.*, 2016) e cancro dos ramos de oliveiras na Espanha (ROMERO *et al.*, 2016).

Neofabraea kienholzii é associada com a podridão olho de boi da maçã e pera na Austrália, Canadá e Estados Unidos e também causa cancros nos troncos da macieira, no entanto, os sintomas dos cancros são menores em comparação com *N. perennans* (AGUILAR *et al.*, 2016; CUNNINGTON, 2004; HENRIQUEZ *et al.*, 2004; JONG *et al.*, 2001; SEIFERT, 2013; SPOTTS *et al.*, 2009).

Embora *N. actinidiae* não seja relatada como o agente causal da podridão olho de boi, essa espécie já foi encontrada em frutos de maçã com sintomas da podridão madura (JOHNSTON *et al.*, 2004). *N. actinidiae* causa uma importante podridão pós-colheita em *Actinidia chinensis* e ataca outras espécies de kiwi (*A. arguta*, *A. deliciosa* e *A. indochinensis*), caqui (*Diospyros virginiana*), *Eucalyptus diversicolor* e plantas de floresta nativa (JOHNSTON *et al.*, 2005; FULLERTON *et al.*, 2006; WURMS *et al.*, 2006; DAVISON *et al.*, 2009).

1.4.3 Taxonomia do gênero *Neofabraea*

Várias contradições relacionadas a identificação e diferenciação das espécies de *Neofabraea* são observadas na literatura. Durante muitos anos, as espécies causadoras da podridão olho de boi foram classificadas no gênero *Pezicula*. Recentemente, essas espécies foram classificadas dentro do gênero *Neofabraea* (VERKLEY, 1999; ABELN *et al.*, 2000).

Os gêneros *Neofabraea* e *Pezicula* são morfológicamente e filogeneticamente distintos, no entanto, os dois gêneros possuem uma morfologia semelhante na fase assexual (anteriormente conhecida como *Cryptosporiopsis*). Em 1912, o gênero *Pezicula* foi descrito baseado na forma sexual *P. ocellata* e assexual *Cryptosporiopsis scutellata*. No ano seguinte, *Neofabraea malicorticis*, espécie tipo do gênero, foi descrita a partir de cancos da macieira (CHEN *et al.*, 2016).

Posteriormente, *Neofabraea* e *Pezicula* foram consideradas sinônimos com a transferência de *Neofabraea malicorticis* para o gênero *Pezicula* (NANNFELDT, 1932). Considerando estudos morfológicos e moleculares, os gêneros *Neofabraea* e *Pezicula* foram novamente considerados distintos (VERKLEY, 1999; ABELN, 2000). Com o fim da nomenclatura dupla de fungos, os gêneros *Neofabraea* e *Pezicula* foram considerados distintos e todas as espécies de *Cryptosporiopsis* foram transferidas para o gênero correspondente a sua forma sexual (JOHNSTON *et al.* 2014).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micologia e no Laboratório Interação Planta-Praga da Universidade de Brasília, e no Laboratório de Fitopatologia da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI).

2.1 Coleta das amostras

Em 2015 e 2016, coletas periódicas de frutos sintomáticos foram realizadas durante o processo de seleção para comercialização dos frutos armazenados em câmaras frigoríficas localizadas nos municípios de Campo Belo do Sul-SC, Fraiburgo-SC, São Joaquim-SC e Vacaria-RS. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel e enviadas ao Laboratório de Micologia da Universidade de Brasília ou para o Laboratório de Fitopatologia da EPAGRI.

2.2 Isolamento e armazenamento dos isolados

O isolamento foi realizado pelo método indireto (ALFENAS *et al.*, 2007), removendo os tecidos externos com o auxílio de um escalpelo previamente esterilizado e transferindo os tecidos internos lesionados para uma placa de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). As placas foram incubadas a 17 °C no escuro.

Após três dias, as colônias desenvolvidas foram repicadas e depositadas em placas de Petri contendo o meio de cultura extrato de malte ágar (EMA). Para garantir a identidade genética, uma cultura monohifal de cada isolado foi obtida com a remoção de uma pequena porção de uma hifa individual, e posterior transferência para uma placa de Petri contendo EMA.

Após 15 dias de incubação a 17 °C no escuro, as culturas monohifais foram identificadas por observação das estruturas somáticas e reprodutivas em microscópio de luz. Os isolados morfológicamente identificados como *Neofabraea* foram depositados na Coleção

de Culturas da Universidade de Brasília e armazenados (água esterilizada e glicerol 10 %) à 17 °C (GONÇALVES *et al.*, 2007), conforme a descrição abaixo:

Armazenamento em água esterilizada (Método de Castellani): Os isolados são cultivados em BDA durante 15 dias. Em seguida, cinco discos miceliais de 6 mm de diâmetro são transferidos para frascos de 10 mL contendo 5 mL de água destilada e esterilizada.

Armazenamento em glicerol: Os isolados são cultivados em BDA durante 15 dias. Em seguida, cinco discos miceliais de 6 mm de diâmetro são transferidos para microtubos de 2 mL contendo 1 mL de glicerol a 10 %.

2.3 Extração do DNA genômico

Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo BDA coberto com papel celofane e incubados a 17 °C por 15 dias no escuro. Após o crescimento das colônias, o micélio foi removido com auxílio de um palito de madeira e colocado em microtubos de 1,5 mL contendo 30 µL de tampão Tris-EDTA (TE). A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o Kit de purificação de DNA genômico da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit) conforme Pinho *et al.* (2012). A concentração do DNA total foi determinada no espectrofotômetro Nanovue e ajustada para 25 ng/µL. As amostras foram armazenadas a 20 °C para posterior utilização.

2.4 Amplificação e purificação do DNA

Para cada reação de PCR foram utilizados os seguintes reagentes: 6,25 µL de MyTaq, 0,5 µL de cada iniciador (senso e anti-senso), 1 µL de DNA genômico (25 ng/µL) e 4,25 µL de água ultrapura. Para a identificação prévia, os DNAs de todos os isolados foram amplificados e sequenciados com os iniciadores da região β -tubulina (Tabela 1). Isolados

representativos de cada espécie e localidade foram selecionados para amplificação e sequenciamento do rDNA e da região RPB2 (Tabela 1).

Tabela 1. Lista dos iniciadores utilizados para o sequenciamento dos isolados de *Neofabraea* spp.

Iniciador	Região gênica	Sequência do iniciador	Referência
5F2	RPB2	GGG GWG AYC AGA AGA AGG C	(SUNG <i>et al.</i> , 2007)
7Cr	RPB2	CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT	(LIU <i>et al.</i> , 1999)
F- β tub3	β -tubulina	TGGGCYAAGGGTYAYTAYAC	(EINAX & VOIGT, 2003)
F- β tub4r	β -tubulina	GCCTCAGTRAAYTCCATYTCRTCCAT	(EINAX & VOIGT, 2003)
VG9	rDNA	TTACGTCCCTGCCCTTTGTA	(HOOG E GERRITS VAN DEN ENDE, 1998)
LR5	rDNA	TCC TGA GGG AAA CTT CG	(VILGALYS E HESTER, 1990)

Os parâmetros utilizados durante o ciclo da PCR foram: Desnaturação inicial a 95°C por 1,5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 56°C (β -tubulina) ou 54 °C (RPB2 e rDNA) por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em géis com 2 % de agarose corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV para verificar o tamanho e pureza das amplificações. Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados pela Macrogen Inc., Coréia do Sul ([http:// www.Macrogen.com](http://www.Macrogen.com)).

2.5 Análises Filogenéticas

As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software DNAbaser. Todas as sequências foram analisadas e o arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas foram corrigidos por comparação das sequências senso e anti-senso. Os isolados foram previamente

identificados pela análise das sequências β -tubulina em comparação com outros isolados de *Neofabraea* depositados no banco de dados do GenBank.

Após a identificação inicial, um isolado representativo de cada espécie e localidade foi selecionado para inferir a árvore filogenética concatenada com as regiões β -tubulina, ITS, LSU e RPB2. Essas sequências adicionais foram selecionadas a partir de Chen *et al.* (2016) e Crous *et al.* (2015), e posteriormente obtidas do GenBank (Tabela 2). As sequências foram alinhadas utilizando o software MUSCLE (EDGAR, 2004), implementado no programa MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (TAMURA *et al.* 2011).

A análise de Inferência Bayesiana (IB) empregando o método da Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) foi realizada. MrMODELTEST 2.3 (POSADA & BUCKLEY, 2004) foi utilizado para selecionar o modelo de substituição de nucleotídeos para análise de IB. Os modelos foram estimados separadamente para cada região gênica. Os valores de verossimilhança foram calculados e o modelo foi selecionado de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC). A análise de IB foi concluída com MrBayes v. 3.1.2 (RANNALA & YANG, 1996, MAU *et al.* 1999, RONQUIST e HUELSENBECK, 2001). As quatro cadeias MCMC foram conduzidas simultaneamente, iniciando as árvores aleatoriamente até 10.000.000 de gerações. As árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações, resultando em 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas da análise. Os valores de probabilidade posterior (RANNALA & YANG, 1996) foram determinados da árvore consenso através das 7.500 árvores remanescentes. A árvore foi visualizada no software FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) e exportada para programas gráficos. A espécie *Pezicula neosporulosa* foi utilizada como grupo externo (*outgroup*).

Tabela 2. Números de acesso do GenBank das sequências de DNA de *Neofabraea* utilizadas na análise filogenética.

Espécie	Isolado	BT	LSU	ITS	RPB2
<i>N. brasiliensis</i>	CNPUV499*	KR107011	KR107002	KR107002	-
	CNPUV503	KR107012	-	KR107003	-
	CNPUV506	KR107010	-	KR107001	-
<i>Pezicula neosporulosa</i>	CBS101.96*	KF376305	KR859015	KR859223	KF376193
	CBS102.96*	KF376318	KR859016	KR859224	KF376181
<i>Phlyctema vagabunda</i>	CBS 109875	AY064702	KR859069	KR859275	KR859346
	CBS 304.62	KR859310	KR859070	KR859276	KR859347
<i>Phlyctema vincetoxici</i>	CBS 102469	KR859311	KR859071	KR859277	KR859348
	CBS123727*	KR859312	KR859072	KR859278	KR859349
<i>Pseudofabraea citricarpa</i>	CBS130297*	KR859313	KR859073	KR859279	KR859350
	CBS 130532	KR859314	KR859074	KR859280	KR859351
<i>N. actinidiae</i>	CBS121403*	KR859285	KR858870	KR859079	KR859319
	CBS 194.69	KR859286	KR858871	KR859080	KR859320
<i>N. inaequalis</i>	CBS 326.75*	KR859287	KR858872	KR859081	KR859321
<i>N. kienholzii</i>	CBS126461*	KR859288	KR858873	KR859082	KR859322
	CBS 318.77	KR859289	KR858874	KR859083	KR859323
<i>N. krawtzevii</i>	NISK 6665/6	AF281460	-	AF281365	-
	CBS 102867	AF281459	KR858875	KR859084	KR859324
<i>N. malicorticis</i>	CBS 102863	KR859290	KR858876	KR859085	KR859325
	CBS122030*	KR859291	KR858877	KR859086	KR859326
<i>N. perennans</i>	CBS 102869	AF281473	KR858878	KR859087	KR859327
	CBS 275.29	KR859292	KR858879	KR859088	KR859328

* Espécime - tipo

2.6 Caracterização morfológica de *Neofabraea* spp.

Avaliaram-se as dimensões e o formato das células conidiogênicas e conídios de um isolado representativo de cada espécie identificada por análises filogenéticas, *N.actinidiae* (276 – Vacaria) e *Neofabraea* sp. (320 – São Joaquim). Para isso, microculturas foram montadas com a deposição de um fragmento de meio de cultura EMA com cerca de 1 cm² e 2

mm de espessura sobre uma lâmina previamente esterilizada. Em seguida, pequenos fragmentos do micélio foram depositados nas bordas do meio de cultura, posteriormente sobreposto com uma lamínula esterilizada. As microculturas foram armazenadas em placas de Petri contendo papel filtro úmido e incubadas a 17 °C no escuro por 12 dias (MAFIA & ALFENAS, 2007).

As amostras foram fixadas em lactoglicerol entre lâmina e lamínula para observação em microscópio de luz e visualização das estruturas somáticas e reprodutivas de *Neofabraea* spp. As mensurações e imagens de 30 microconídios, 30 macroconídios e 30 células conidiogênicas foram obtidas no microscópio de luz Leica DM 2500, provido de câmara digital Leica DFC 490, acoplada a um computador contendo o programa LeicaQwin – Plus.

2.7 Agressividade de *Neofabraea* spp.

A agressividade dos isolados de *Neofabraea* foram avaliadas em frutos de maçã ‘Fuji’ provenientes de São Joaquim- SC. Para *Neofabraea* sp., quatro isolados provenientes de Campo Belo do Sul (358), Fraiburgo (277), São Joaquim (320) e Vacaria (300) foram selecionados enquanto que os isolados 322 (Fraiburgo) e 276 (Vacaria) de *Neofabraea actinidiae* foram utilizados. Os frutos foram inoculados com suspensão de conídios obtida a partir de um micélio com 15 dias de crescimento.

Os frutos foram lavados com detergente em água corrente e secos a temperatura ambiente. A inoculação foi realizada por dois métodos: (a) orifício de 1 mm obtido com a ponta de uma agulha para a deposição de 20 µL da suspensão de 1×10^6 esporos/mL; (b) aplicação de 20 µL da suspensão de 1×10^6 esporos/mL com o auxílio de uma seringa de 1 mL com agulha. No tratamento controle, 20 µL de água destilada e esterilizada foram depositados sobre frutos com e sem ferimentos. Os frutos foram acondicionados em caixas de plástico contendo papel filtro umedecido com água destilada e esterilizada. As caixas foram mantidas

a 5 °C, 17 °C e 25 °C no escuro por 21 dias, sendo que a incidência e o diâmetro das lesões foram avaliados a cada 2 dias.

O experimento foi montado em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com cinco repetições, sendo que a unidade experimental foi composta por 1 fruto. A análise estatística foi realizada no programa SISVAR 5.6 usando ANOVA e teste de Scott-Knott a 5%.

2.8 Crescimento micelial de *Neofabraea* spp.

Os mesmos isolados utilizados para avaliar a patogenicidade e agressividade foram utilizados para analisar o crescimento micelial de *Neofabraea* sp. e *N. actinidiae*. Um disco de micélio com 5 mm de diâmetro oriundo de cultura com 15 dias de idade, foi transferido para o centro de uma placa de Petri contendo EMA. Foram utilizadas 4 repetições para cada isolado, sendo cada repetição uma placa de Petri. As placas foram incubadas a 5°C, 17°C e 25 °C no escuro por 21 dias.

O diâmetro das colônias foi avaliado a cada 2 dias e o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado pela fórmula abaixo, sendo: IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial; D= diâmetro médio atual; Da= diâmetro médio anterior; N= número de dias após a inoculação.

$$\text{IVCM} = \frac{\sum(D-Da)}{N}$$

Após os 21 dias, anotou-se as características morfológicas das colônias por meio da observação da coloração, produção de pigmentos e tipo de micélio aéreo.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização molecular

Foram obtidos 92 isolados de *Neofabraea* depositados na Coleção de Culturas da Universidade de Brasília. A comparação no GenBank das 92 sequências da região β -tubulina comprovam que todos isolados da podridão olho de boi pertencem ao gênero *Neofabraea*. A árvore filogenética obtida com as sequências da região β -tubulina formou dois clados distintos (Fig.2). O clado 1 contém 10 isolados provenientes de Fraiburgo (4) e Vacaria (6). O clado 2 constitui 82 isolados provenientes de Campo Belo do Sul (15), Fraiburgo (36), São Joaquim (12) e Vacaria (19).

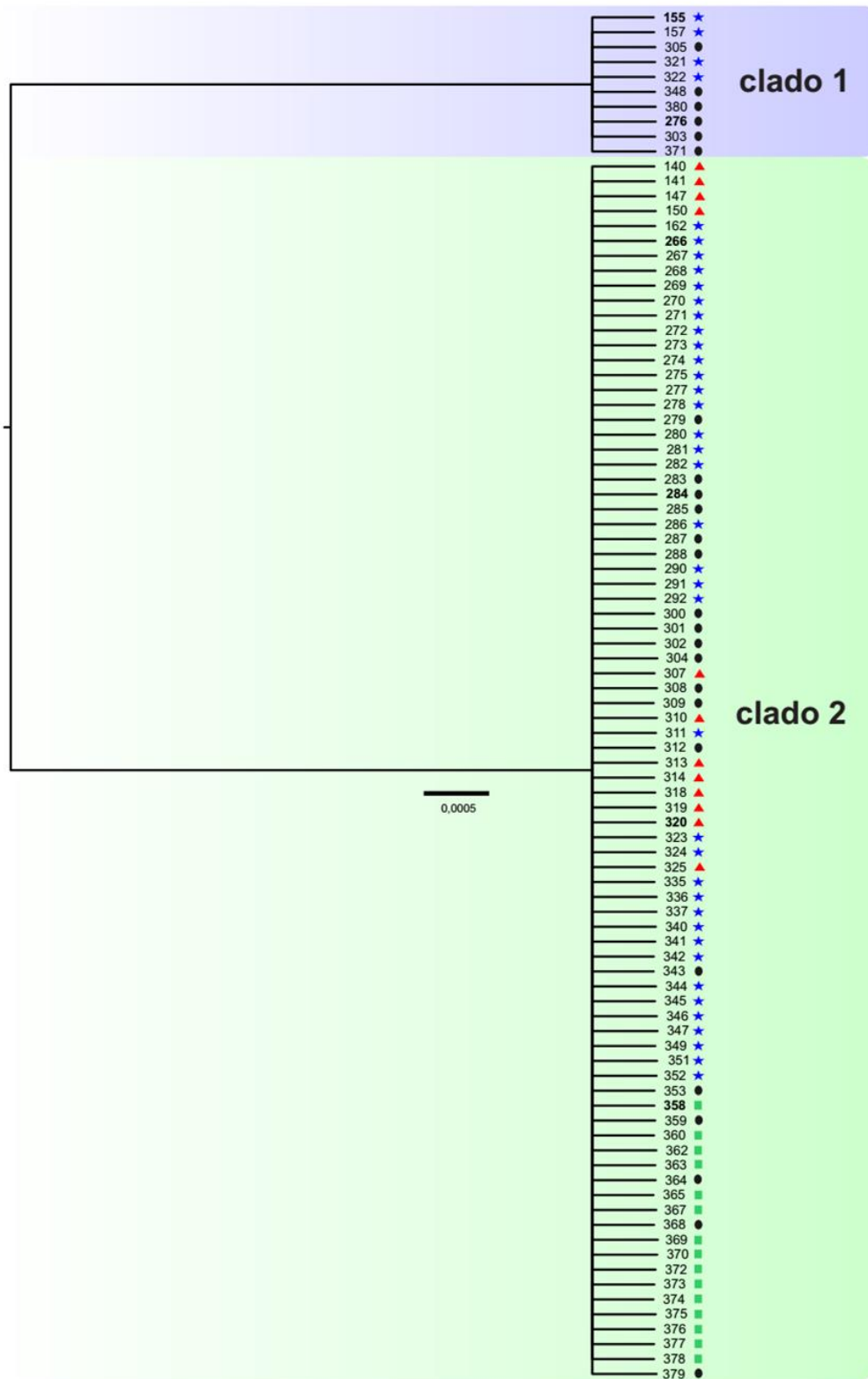


Figura 2. Árvore filogenética obtida por Inferência Bayesiana fundamentada em sequências parciais da região da β -tubulina de 92 espécimes de *Neofabraea* spp. isolados da podridão olho de boi da maçã. Isolados selecionados para análises subsequentes estão destacados em negrito. O símbolo estrela indica isolados coletados em Fraiburgo enquanto que quadrados, círculos e triângulos indicam Campo Belo do Sul, Vacaria e São Joaquim, respectivamente.

A partir da Figura 2, um isolado de cada localidade foi selecionado nos clados 1 e 2 para a identificação precisa da espécie. Os seis isolados juntamente com 22 espécimes selecionados na literatura (Tabela 2) foram utilizados para inferir a árvore com as sequências das regiões β -tubulina (1-596), ITS (597-1088), LSU (1089-1865) e RPB2 (1866-2674), resultando numa matriz contendo 2674 sítios, dos quais 499 foram informativos para parcimônia, 517 foram variáveis e 1658 foram conservados. Os modelos de substituição de nucleotídeos selecionados foram: GTR+G para β -tubulina e ITS, GTR+I+G para LSU, e SYM+I+G para RPB2.

Os isolados do clado 1 agruparam com a espécie tipo de *N. actinidiae* enquanto que os isolados do clado 2 agruparam em um clado distinto das demais espécies de *Neofabraea* (Fig.3).

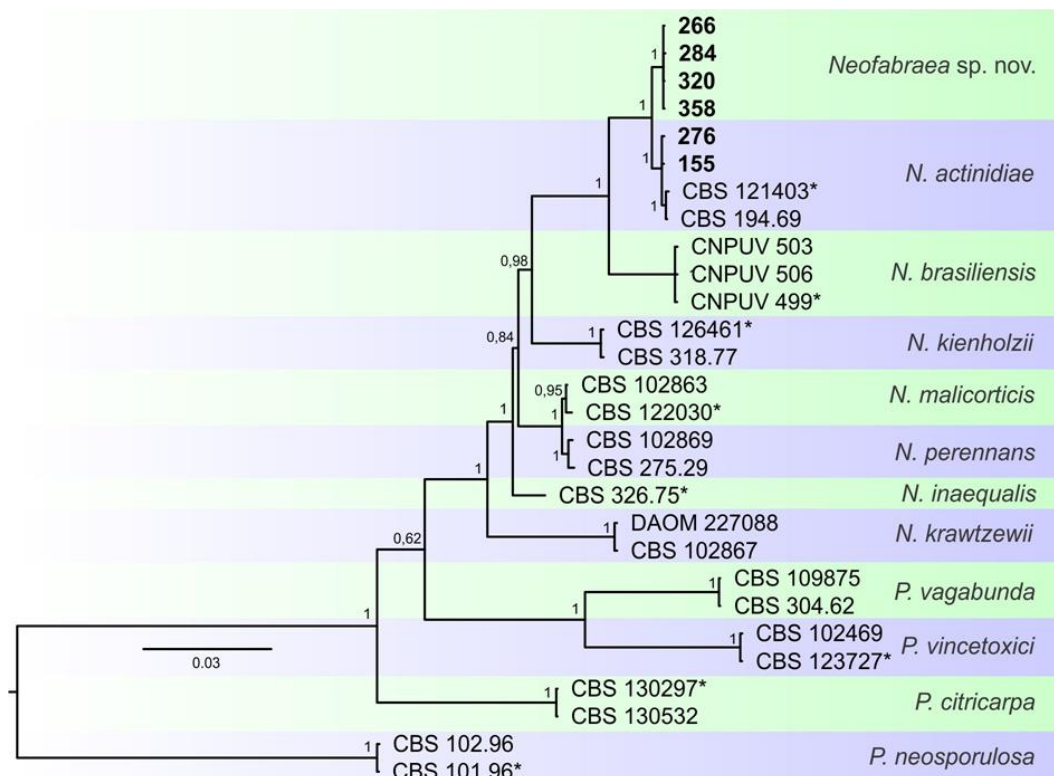


Figura 3. Árvore filogenética concatenada com sequências das regiões β -tubulina, ITS, LSU e RPB2 obtida por Inferência Bayesiana. A probabilidade posterior é indicada acima dos nós. A árvore foi enraizada com *Pezicula neosporulosa*. Os espécimes-tipo de cada espécie são indicados com asterisco e os espécimes deste estudo estão destacados em negrito

3.2 Caracterização morfológica da espécie *Neofabraea* sp. nov. (Provável espécie nova). Figura 4 (A-F)

Características da cultura – colônias 24, 41 e 40 mm de diâmetro a 5°C, 17°C e 25°C, respectivamente após 21 dias de crescimento em meio EMA. O índice de velocidade de crescimento micelial 0,78; 1,63 e 1,63 mm/d nas temperaturas 5°C, 17°C e 25°C, respectivamente. Superfície das colônias com coloração branca a rosa – avermelhada, coberta com camada conidial conspícua, micélio aéreo cotonoso (Fig. 4A). Colônias em meio de cultivo BDA com coloração rosa-avermelhada, reverso da placa com cor vermelha, micélio aéreo cotonoso.

Células conidiogênicas- fialídicas, retas $3,5 - 16 \times 1 - 2,5$ μm , hialinas, cilíndricas ou lageniformes, afinando em direção ao ápice; geralmente surgindo diretamente da hifa ou em conidióforos micronemáticos. *Macroconídios* - $3,5 - 9,5 \times 1,5 - 2,5$ μm , hialinos, unicelulares, oblongos - elipsoidais, ápice arredondado ou afunilado, base côncava. *Microconídios* - $2,0 - 3,5 \times 1,0 - 2,5$ μm , hialinos, unicelulares, elipsoidais a oblongos-elipsoidais, base côncava (Fig. 4B-F).

Material examinado: Brasil, Santa Catarina, São Joaquim, patógeno associado a podridão olho de boi da maçã (*Malus domestica* Borkh.), 10 novembro 2015, Coll. Medeiros H. A.

Outros materiais: Brasil, Santa Catarina, Campo Belo do Sul, patógeno associado a podridão olho de boi da maçã (*Malus domestica* Borkh.), 15 outubro 2016, Coll. Bonfim B. S. A.; Brasil, Santa Catarina, Fraiburgo, patógeno associado a podridão olho de boi da maçã (*Malus domestica* Borkh.), 12 maio 2016, Coll. Bonfim B. S. A.; Brasil, Rio Grande do Sul, Vacaria, patógeno associado a podridão olho de boi da maçã (*Malus domestica* Borkh.), 15 julho 2016, Coll. Bonfim B. S. A.

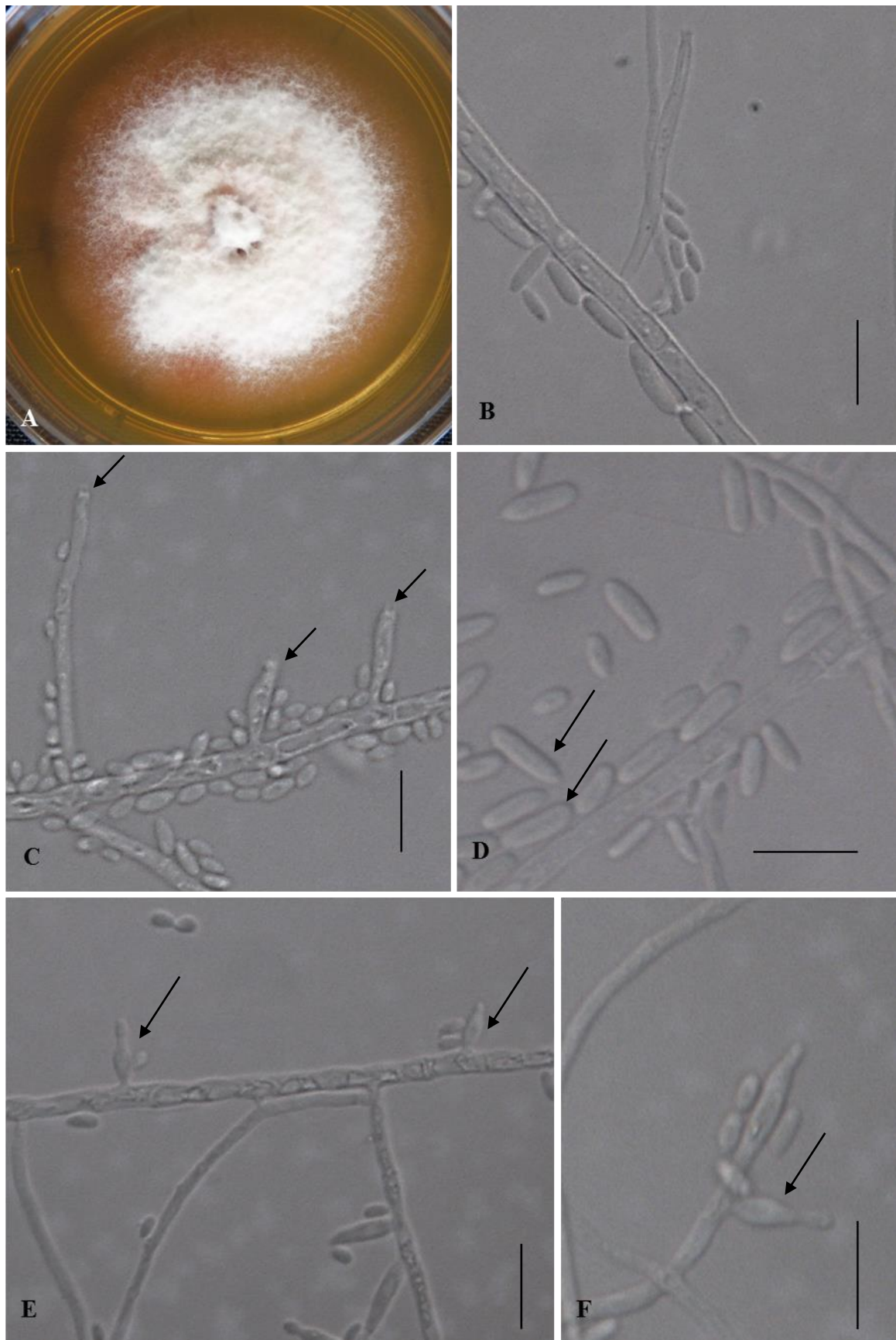


Figura 4. Provável espécie nova de *Neofabraea* (Isolado 320 – São Joaquim). (A) colônia em meio EMA. (B) condióforo micronemático. (C) células conidiogênicas com colarete (setas). (D) macro (setas) e microconídios. (E, F) fiálides (setas). Escala = 10 μ m.

3.3 Caracterização morfológica da espécie *Neofabraea actinidiae* (P.R. Johnst., M.A. Manning & X. Meier) P.R. Johnst., IMA Fungus 5: 102, 2014. Figura 5 (A–D)

Características da cultura – colônias 29, 49 e 39 mm de diâmetro a 5°C, 17°C e 25°C, respectivamente, após 21 dias de crescimento em meio EMA. Índice de velocidade de crescimento micelial 0,95; 1,95 e 1,68 mm/d nas temperaturas 5°C, 17°C e 25°C, respectivamente. Colônias com superfície branca, coberta com camada conidial conspícua, micélio aéreo cotonoso (Fig. 5A). Colônias em meio de cultivo BDA com coloração rosa - avermelhada, reverso da placa vermelho intenso, micélio aéreo cotonoso.

Células conidiogênicas: fialídicas, 7,5 – 17,0 × 1,0 – 3,5 µm, hialinas, cilíndricas, afinando em direção ao ápice; geralmente surgindo diretamente da hifa ou em conidióforos micronemáticos. Conídios- 3,0 – 6,5 × 1,0 – 2,5 µm, hialinos, unicelulares, cilíndricos, retos, ápice arredondado ou afunilado, base côncava (Fig. 5A-D).

Distribuição geográfica e gama de hospedeiros: Essa espécie já foi relatada em *Abies beshanzuensis*, *Actinidia arguta*, *A. chinensis*, *A. deliciosa*, *A. indochinensis*, *Dacrycarpus dacrydioides*, *Dacrydium cupressinum*, *Eucalyptus diversicolor*, *Ilex verticillata*, *Kunzea ericoides*, *Malus domestica*, *Podocarpus totara*, e *Prumnopitys ferrugínea* na Austrália, China, Itália e Nova Zelândia (JOHNSTON *et al.*, 2004; JOHNSTON *et al.*, 2005; DAVISON *et al.*, 2009; FARR & ROSSMAN, 2017).

Material examinado: Brasil, Rio Grande do Sul, Vacaria, patógeno associado a podridão olho de boi da maçã (*Malus domestica* Borkh.), 15 julho 2016, Coll. Bonfim B. S. A.

Outro material: Brasil, Santa Catarina, Fraiburgo, patógeno associado a podridão olho de boi damaçã (*Malus domestica* Borkh.), 10 maio 2016, Coll. Bonfim B. S. A.



Figura 5. *Neofabraea actinidiae* (Isolado 276 – Vacaria). (A) cultura em meio EMA. (B, C) conidióforos (setas) e conídios. (D) conídios. Escala = 10 μ m.

3.4 Teste de agressividade das espécies

Todos os isolados foram patogênicos em todas as temperaturas e métodos de inoculação testados, causando sintomas típicos da podridão olho de boi aos 21 dias após a inoculação. Adicionalmente, os frutos da testemunha permaneceram saudáveis.

Na análise de variância observou-se uma diferença significativa entre os isolados, as temperaturas e suas interações, mas não houve diferença significativa entre os métodos de inoculação (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de variância do teste de agressividade das espécies de *Neofabraea* spp.

FV	GL	QM	Pr>Fc
Isolado	6	8.360.257	0.0000
Temperatura	2	5.482.939	0.0000
Mét. Inoculação	1	0.208688	0.2011
Isol × Temp.	12	0.723094	0.0000
Isol × Temp. × Mét. Inoc.	8	-2.26146443E-0001	1.0000
CV (%) = 48,52			

Os espécimes de *Neofabraea* sp. (277- Fraiburgo, 358- Campo Belo do Sul e 320- São Joaquim) causaram lesões significativamente maiores em relação aos isolados de *N. actinidiae* (276-Vacaria e 322-Fraiburgo), com exceção do isolado 300 (Vacaria - RS), que possui tamanho de lesão semelhante aos espécimes de *N. actinidiae* (Tabela 4).

Em geral, nas temperaturas de 17 °C e 25 °C todos os isolados testados foram mais agressivos, ou seja, tiveram os maiores diâmetros de lesão. Na temperatura de 5 °C, todos os isolados foram menos agressivos. (Tabela 4).

Tabela 4. Médias do diâmetro das lesões (cm) ocasionadas pelos isolados de *Neofabraea* spp. em diferentes temperaturas testadas.

ISOLADO	ESPÉCIE	5 °C	17 °C	25 °C
Testemunha		0 A a	0 A a	0 A a
322 (Fraiburgo-SC)	<i>N. actinidiae</i>	0,33 A b	0,53 A b	0,27 A b
276 (Vacaria-RS)	<i>N. actinidiae</i>	0,40 A b	0,54 A b	0,34 A b
300 (Vacaria-RS)	<i>Neofabraea</i> sp	0,37 A b	0,69 A b	0,54 A b
320 (São Joaquim-SC)	<i>Neofabraea</i> sp	0,76 A c	1,52 B c	1,29 B c
277 (Fraiburgo-SC)	<i>Neofabraea</i> sp	0,67 A c	1,88 C d	1,13 B c
358 - Campo Belo do Sul (SC)	<i>Neofabraea</i> sp	0,87 A c	2,09 C d	1,19 B c

*Médias seguidas por mesma letra não se diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Letras maiúsculas para médias na horizontal e minúsculas para médias na vertical.

Na temperatura de 17 °C, os isolados da provável espécie nova (*Neofabraea* sp.) foram os mais agressivos, com os isolados 358 de Campo Belo do Sul-SC e 277 de Fraiburgo -SC alcançando os maiores diâmetros das lesões, respectivamente 2,09 e 1,88 cm. Os isolados de *N. actinidiae* foram menos agressivos do que os isolados de *Neofabraea* sp., exceto o isolado 300 (Vacaria-RS) de *Neofabraea* sp. que foi igualmente agressivo aos isolados de *N. actinidiae* (Tabela 4).

Nas temperaturas de 5 °C e 25 °C os isolados 320 de São Joaquim-SC, 277 de Fraiburgo-SC e 358 de Campo Belo do Sul-SC, ambos identificados como *Neofabraea* sp. foram também mais agressivos do que os isolados de *N. actinidiae*, 322 de Fraiburgo-SC e 276 de Vacaria-RS, que tiveram diâmetro das lesões menores. O isolado 300 (Vacaria -RS) de *Neofabraea* sp. foi semelhante aos isolados de *N. actinidiae*, não havendo diferença significativa no diâmetro das lesões pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) (Tabela 4).

Com o método da seringa, os primeiros sintomas da doença foram observados após 4 dias de incubação na temperatura de 25 °C para os isolados 300 (Vacaria-RS) e 320 (São Joaquim-SC) de *Neofabraea* sp., com incidência média de 20 % (Fig. 6C). A incidência mais tardia foi observada na temperatura de 5 °C, com o isolado 276 (Vacaria-RS) de *N. actinidiae*

sendo mais lento, com incidência média de 20 % somente após 12 dias de incubação (Fig. 6A).

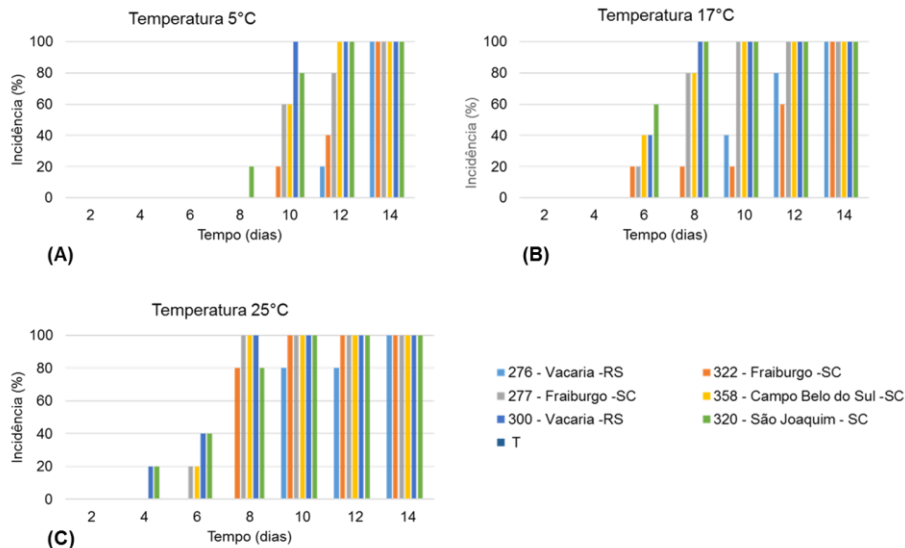


Figura 6. Incidência da podridão olho de boi em maçãs ‘Fuji’ por *Neofabraea* spp. pelo método da seringa. Incidência da doença a 5 °C (A), 17 °C (B), e (C) 25 °C.

Com o método de inoculação por ferimento, os primeiros sintomas da doença foram observados nas temperaturas de 17 °C e 25 °C aos 4 dias de incubação (Fig. 7 B, C), porém houve uma diferença no aparecimento dos sintomas quanto aos isolados. Na temperatura de 25°C todos os isolados possuíam frutos expressando sintomas aos 4 dias, mas em 17 °C apenas 4 dos isolados tinham frutos com sintomas visíveis (Fig. 7 B, C). Na temperatura de 5 °C foram observadas as incidências mais tardias, com observação dos sintomas em frutos inoculados com os isolados 276 (Vacaria-RS) e 322 (Fraiburgo-SC) de *N. actinidiae* somente após 10 dias de incubação. (Fig.7A).

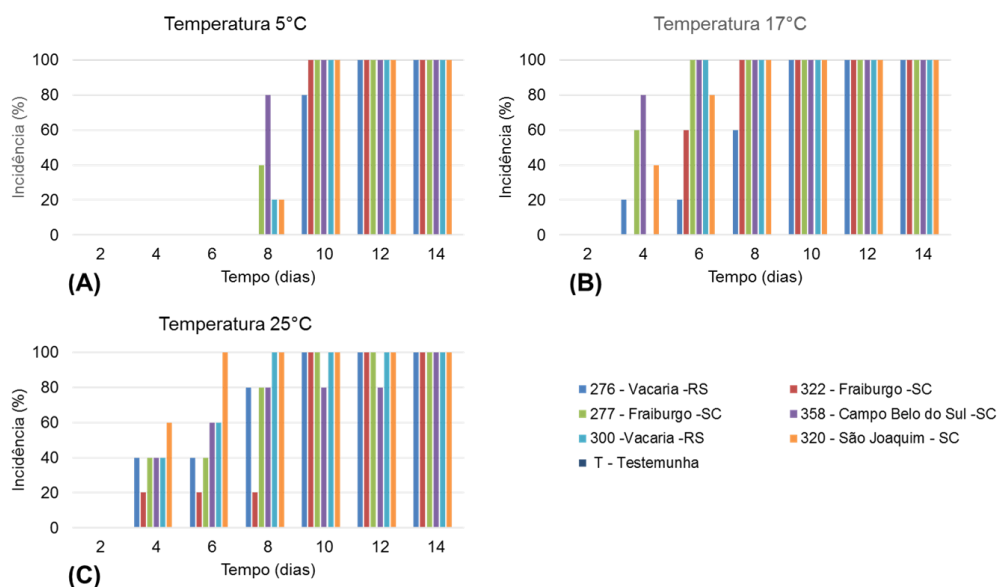


Figura 7. Incidência da podridão olho de boi em maçãs ‘Fuji’ por *Neofabraea* spp. pelo método por fermento. Incidência da doença a 5 °C (A), 17 °C (B), e 25 °C (C).

3.5 Estudo do crescimento micelial e IVCM em meio de cultivo EMA de *Neofabraea* spp.

A análise de variância mostrou diferença significativa tanto para os isolados quanto para temperatura no crescimento micelial das colônias em meio EMA (Tabela 5).

Tabela 5. Quadro geral da análise de variância do crescimento micelial em EMA dos isolados de *Neofabraea* sp. e *N. actinidiae*.

FV	GL	QM	Pr>Fc
Isolado	5	1.091.857	0.0139
Temperatura	2	18.559.079	0.0000
Isol × Temp	10	0.4778591	0.2098
CV (%)= 16,03			

Foi observado que isolados da mesma espécie possuem diferenças quanto ao padrão de crescimento radial nas temperaturas de 5, 17 e 25 °C. Os isolados 277 (Fraiburgo-SC) e 358 (Campo Belo do Sul-SC) de *Neofabraea* sp. e o isolado 276 (Vacaria-RS) de *N. actinidiae* possuem as maiores médias de crescimento radial do micélio em EMA. Contrariamente, os

isolados 300 (Vacaria -RS) e 320 (São Joaquim-SC) de *Neofabraea* sp. e o isolado 322 (Fraiburgo-SC) de *N. actinidiae* possuem as menores médias de crescimento radial do micélio (Tabela 6). Surpreendentemente, o isolado 277 (Fraiburgo-SC) atingiu o maior crescimento radial do micélio enquanto o isolado 300 (Vacaria-RS) possui o menor crescimento, sendo que ambos isolados pertencem a *Neofabraea* sp. (Tabela 6). A mesma variação ocorreu para *N. actinidiae*, sendo que o maior e menor crescimento foram observados para os isolados 276 (Vacaria-RS) e 322 (Fraiburgo-SC), respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Médias do crescimento radial (cm) de isolados de *Neofabraea* spp. em meio EMA.

TRATAMENTOS	MÉDIAS
300 (Vacaria-RS) – <i>Neofabraea</i> sp.	3,32 a
322 (Fraiburgo-SC) – <i>N. actinidiae</i>	3,37 a
320 (São Joaquim-SC) – <i>Neofabraea</i> sp.	3,49 a
358 (Campo Belo do Sul -SC) – <i>Neofabraea</i> sp.	3,85 b
276 (Vacaria-RS) – <i>N. actinidiae</i>	3,90 b
277 (Fraiburgo-SC) – <i>Neofabraea</i> sp.	4,02 b

*Médias seguidas por mesma letra são significativamente iguais pelo teste de Scott- Knott (P<0,05).

Nas temperaturas 5 °C e 25 °C não houve diferença significativa entre o crescimento radial dos isolados, porém na temperatura de 17 °C, os isolados 358 (Campo Belo do Sul-SC), e 277 (Fraiburgo-SC) de *Neofabraea* sp. e 276 (Vacaria-RS) de *N. actinidiae* possuem o maior crescimento radial do micélio (Tabela 7).

Tabela 7. Médias do crescimento radial (cm) em meio EMA dos isolados de *Neofabraea* spp. em diferentes temperaturas.

ISOLADO	5°C	17°C	25°C
322 (Fraiburgo-SC) – <i>N. actinidiae</i>	2,09 A a	3,74 B a	4,29 B a
300 (Vacaria -RS) – <i>Neofabraea</i> sp.	2,81 A a	3,93 B a	3,22 A a
320 (São Joaquim -SC) – <i>Neofabraea</i> sp.	2,39 A a	4,09 B a	3,98 B a
358 (Campo Belo do Sul-SC) – <i>Neofabraea</i> sp.	2,89 A a	4,53 B b	4,12 B a
277 (Fraiburgo -SC) – <i>Neofabraea</i> sp.	2,87 A a	4,73 B b	4,47 B a
276 (Vacaria -RS) - <i>N. actinidiae</i>	2,91 A a	4,87 C b	3,94 B a

*Médias seguidas por mesma letra não se diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott (P<0,05). Letras maiúsculas para médias na horizontal e minúsculas para médias na vertical.

Houve uma relação direta entre o crescimento radial das colônias em EMA e a agressividade observada em frutos de maçã inoculados com os isolados 277 (Fraiburgo), 300 (Vacaria) e 358 (Campo Belo do Sul) de *Neofabraea* sp. e para o isolado 322 (Fraiburgo) de *N. actinidiae*. Para os isolados 320 (São Joaquim) de *Neofabraea* sp. e 276 (Vacaria) de *N. actinidiae* não foi observada essa relação.

As menores médias de IVCM foram observadas a 5 °C para todos os isolados e as maiores médias foram observadas a 17 °C e 25 °C (Tabela 9).

O isolado 276 (Vacaria-RS) de *N. actinidiae*, e os isolados 277 (Fraiburgo-SC) e 358 (Campo Belo do Sul-SC) de *Neofabraea* sp., tiveram os maiores valores de IVCM, enquanto que o isolado 322 (Fraiburgo-SC) de *N. actinidiae* teve a menor média. (Tabela 8).

Tabela 8. Médias do IVCM (mm/dia) de *Neofabraea* spp. em meio de cultivo EMA.

ISOLADO	ESPÉCIE	IVCM (mm/dia)
322 (Fraiburgo -SC)	<i>N. actinidiae</i>	1,12 a
300 (Vacaria -RS)	<i>Neofabraea</i> sp	1,13 b
320 (São Joaquim -SC)	<i>Neofabraea</i> sp.	1,34 b
358 (Campo Belo do Sul-SC)	<i>Neofabraea</i> sp.	1,48 c
277 (Fraiburgo-SC)	<i>Neofabraea</i> sp.	1,50 c
276 (Vacaria-RS)	<i>N. actinidiae</i>	1,53 c

*Médias seguidas por mesma letra não se diferem significativamente pelo teste de Scott- Knott (P<0,005).

Os isolados 276 (Vacaria-RS) e 322 (Fraiburgo-SC) de *N. actinidiae* tiveram os menores valores de IVCN a 5 °C, com um crescimento médio de 0,95 e 0,65 mm/dia, respectivamente. No entanto, não houve diferença significativa nos valores de IVCN desses isolados a 17°C e 25°C (Tabela 9).

Tabela 9. Médias do IVCN (mm/dia) dos isolados de *Neofabraea* spp. em diferentes temperaturas.

ISOLADO	ESPÉCIE	5°C		17°C		25°C	
300 (Vacaria-RS)	<i>Neofabraea</i> sp.	1,03	A a	1,73	B b	1,20	A a
322 (Fraiburgo-SC)	<i>N.actinidiae</i>	0,65	A a	1,23	B a	1,48	B a
320 (São Joaquim-SC)	<i>Neofabraea</i> sp.	0,78	A a	1,63	B b	1,63	B b
358 (Campo Belo do Sul-SC)	<i>Neofabraea</i> sp.	0,90	A a	1,75	B b	1,78	B b
276 (Vacaria-RS)	<i>N.actinidiae</i>	0,95	A a	1,95	B b	1,68	B b
277 (Fraiburgo-SC)	<i>Neofabraea</i> sp.	0,93	A a	1,75	B b	1,83	B b

*Médias seguidas por mesma letra não se diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Letras maiúsculas para médias na horizontal e minúsculas para médias na vertical.

4 DISCUSSÃO

4.1 Caracterização molecular

No Brasil, duas espécies, *Neofabraea* sp. e *N. actinidiae*, foram associadas com a podridão olho de boi da maçã, sendo que *Neofabraea* sp. e *N. actinidiae* ocorreram na proporção 8:1, respectivamente. Além disso, *Neofabraea* sp. foi encontrada nas quatro regiões estudadas (Campo Belo do Sul-SC, Fraiburgo-SC, São Joaquim-SC e Vacaria-RS) enquanto que *N. actinidiae* foi encontrada somente em Fraiburgo-SC e Vacaria-RS.

Neofabraea actinidiae já foi encontrada em frutos de maçã, porém esse é o primeiro relato dessa espécie causando a podridão olho de boi no mundo. Além disso, a maioria dos isolados pertencem a uma espécie ainda desconhecida pela comunidade científica, a qual deve ser proposta como nova seguindo as normas do Código Internacional de Nomenclatura de Algas, Fungos e Plantas. Embora *N. brasiliensis* seja relatada no Brasil, a mesma não foi encontrada nesse estudo. Provavelmente essa espécie seja restrita ao cancro da macieira, sintoma no qual a espécie foi descrita (SANHUEZA & BOGO, 2015). Adicionalmente, observa-se que as principais espécies (*N. malicorticis* e *N. perennans*) causadoras da doença na América do Norte e Europa não foram encontradas no Brasil (GARIÉPY & LÉVESQUE, 2003; GARIPY *et al.*, 2005; WEBER & PALM, 2010; AGUILAR *et al.*, 2017).

4.2 Morfologia, crescimento micelial e agressividade das espécies de *Neofabraea*

A caracterização morfológica de *N. actinidiae* foi variável com relação a descrição original feita por Johnston *et al.* (2004). A forma e tamanho dos conídios foi variável, sendo menores no presente estudo ($3,0 - 6,5 \times 1,0 - 2,5 \mu\text{m}$) do que os encontrados na descrição original ($9,0 - 14 \times 3,0 - 3,5 \mu\text{m}$). A forma desses conídios também foi diferente, sendo cilíndricos e retos no presente estudo e oblongo-elíptico, elíptico ou ovalado, reto ou

ligeiramente curvado na descrição original. Contudo, as características culturais em meio de cultivo BDA (dados não mostrados) foram consistentes com a descrição original (JOHNSTON *et al.* 2004), havendo a produção de uma pigmentação vermelho intenso característica no reverso da placa. Discrepâncias com relação ao tamanho dos conídios e a descrição original também foram relatadas para essa espécie (DAVISON *et al.* 2009).

Diferenças morfológicas dentro de uma mesma espécie de *Neofabraea* também foram observadas em isolados obtidos da podridão olho de boi da maçã na Itália (CAMELDI *et al.*, 2017). Os autores verificaram que a espécie *N. vagabunda* produziu dois padrões morfológicos em cultivo “*in vitro*” e também observaram a produção de formas diferentes de acérvulos nas lesões de frutos inoculados. Essas diferenças morfológicas encontradas dentro de uma mesma espécie, relatadas no presente estudo e por outros autores, confirmam a dificuldade na identificação do agente causal da podridão olho de boi baseando-se somente em características morfológicas.

As espécies do gênero *Neofabraea* possuem crescimento ótimo entre 18-20 °C de temperatura e são capazes de crescer a 0 °C, com inibição do crescimento em 30-40 °C (HORTOVÁ *et al.*, 2014). As espécies estudadas possuem crescimento micelial e taxa de crescimento maiores a 17 °C e 25 °C do que a 5 °C. No entanto, para alguns dos espécimes, as maiores médias de crescimento radial foram alcançadas a 17 °C, uma temperatura próxima ao intervalo de temperatura ótima para as espécies do gênero. Porém, foi observada uma variação dentro das espécies estudadas quanto aos requerimentos de temperatura para os diferentes isolados.

As espécies tiveram menor desenvolvimento na temperatura de 5°C, o que difere dos resultados encontrados para *N. kienholzii* (PESICOVÁ *et al.* 2016). Essa espécie desenvolve-se melhor à temperatura de 5 °C do que a 25 °C.

Neste estudo, observou-se diferenças intraespecíficas no crescimento micelial e IVCM em diferentes temperaturas, o que pode estar associado à origem geográfica dos isolados, evidenciando uma maior ou menor adaptação às temperaturas de sua região. Diferenças entre os requerimentos de temperatura de isolados da mesma espécie também foram observadas em *N. alba* (CAMELDI *et al.*, 2017).

Por exemplo, o isolado 276 (Vacaria-RS) de *N. actinidiae* possui maior crescimento micelial a 17 °C em relação a 25 °C. A região de Vacaria-RS possui temperaturas menores em relação as demais regiões produtoras de maçã e provavelmente o maior crescimento a 17 °C está associado com a adaptação ambiental desse isolado. O isolado 322 da mesma espécie coletado em Fraiburgo-SC possui taxas iguais de crescimento micelial e IVCM a 17 e 25 °C, provavelmente devido a ocorrência de temperaturas mais elevadas em Fraiburgo em relação a Vacaria. Essa variação também foi observada com os isolados 277 (Fraiburgo-SC) e 300 (Vacaria-RS) de *Neofabraea* sp. Um estudo semelhante realizado com isolados de *N. perennans* e *N. malicorticis* supõe que essa variação ocorre devido a distribuição geográfica das espécies (PESICOVÁ *et al.*, 2016).

Para alguns isolados não houve relação direta entre o crescimento micelial “in vitro” e a agressividade “in vivo”. Algumas características fisiológicas como a produção de enzimas podem estar relacionadas com as diferenças entre o crescimento “in vivo” e o crescimento “in vitro” dos isolados (PESICOVÁ *et al.*, 2016). No presente estudo foi observada uma diferença na agressividade entre os isolados das diferentes espécies causadoras da podridão olho de boi da maçã no Brasil. Os isolados de *N. actinidiae* possuem menor agressividade em relação aos isolados da provável espécie nova de *Neofabraea* a 5, 17 e 25 °C, com exceção do isolado 300 (Vacaria-RS) de *Neofabraea* sp. que possui agressividade semelhante aos isolados de *N. actinidiae*. Essa variação na agressividade dos isolados de uma mesma espécie já foi observada para *N. alba* (HORTOVÁ *et al.*, 2014).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- No Brasil, a podridão olho de boi da maçã é causada por duas espécies de *Neofabraea*, *N. actinidiae* e *Neofabraea* sp. Além disso, esse é primeiro relato de *N. actinidiae* causando a podridão olho de boi na maçã;

- *Neofabraea* sp. ocorre em Campo Belo do Sul-SC, Fraiburgo-SC, São Joaquim-SC e Vacaria-RS enquanto *N. actinidiae* foi encontrada somente em Fraiburgo e Vacaria. No geral, as espécies *Neofabraea* sp. e *N. actinidiae* ocorrem na proporção 8:1;

- *Neofabraea* sp. é mais agressiva que *N. actinidiae*;

- Existe uma variação fisiológica intraespecífica para o crescimento micelial e a agressividade dos isolados sob diferentes temperaturas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELN, E. C. A.; DE PAGTER, M. A.; VERKLEY, G. J. M. Phylogeny of *Pezicula*, *Dermea* and *Neofabraea* inferred from partial sequences of the nuclear ribosomal RNA gene cluster. **Mycologia**, v.02, n. 04, p. 685-693, 2000.
- ABPM. Associação Brasileira dos Produtores Maçã. Disponível em < <http://www.abpm.org.br> >. Acesso em: 21/01/2017.
- AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. 21ª Ed. São Paulo. FNP Consultoria & Agroinformativos, 2016.
- AGUILAR, C.; MAZZOLA, M.; XIAO, C. Bull's-eye rot management: Understanding the disease cycle of *Neofabraea* spp. occurring on apples grown in the US Pacific Northwest. **Phytopathology**, v. 106, n. 12, p.195, 2016.
- AGUILAR, C. G.; MAZZOLA, M.; XIAO, C. L. Timing of apple fruit infection by *Neofabraea perennans* and *Neofabraea kienholzii* in relation to bull's-eye rot development in stored apple fruit. **Plant Disease**, n. ja, 2017.
- ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MAFIA, R. G.; GONÇALVES, R. C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. **Métodos em fitopatologia. Viçosa: Ed. UFV**, p. 53-90, 2007.
- ARAÚJO, L; MEDEIROS, H. A.; PASA, M.S.; SILVA, F.N. Doenças da macieira e da pereira. **Informe agropecuário**, v. 37, p. 61-74, 2016.
- BLEICHER, J. História da macieira. In: **A cultura da macieira. Florianópolis: EPAGRI**, p. 29-36, 2002.
- BOMPEIX, G.; CHOLODOWSKI-FAIVRE, D. Thermotheapie et produits naturels, une technologie emergente. **Arboricul Fruit**, v. 542, p. 19-25, 2000.
- BONETI, J. I. S.; CESA, J. D.; PETRI, J. L.; BLEICHER, J. Evolução da cultura da macieira. In: **A cultura da macieira. Florianópolis: EPAGRI**, p. 37-57, 2002.
- BONETI, J. I. S.; KATSURAYAMA, Y.; BLEICHER, J. Doenças da macieira. In: **A cultura da macieira. Florianópolis: EPAGRI**, p. 527-608, 2006.

BRACKMANN, A.; WEBER, A.; PINTO, J. A. V.; NEUWALD, D. A.; STEFFENS, C. A. Manutenção da qualidade pós-colheita de maçãs 'Royal Gala' e 'Galaxy' sob armazenamento em atmosfera controlada. **Ciência rural**, v. 38, n. 9, p. 2478-2484, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 12, de 23 de maio de 2014. Exclui da Lista de Pragas Quarentenárias Ausentes (A1), constantes do Anexo I da Instrução Normativa nº 41, de 1º de julho de 2008, a praga FUNGO - *Neonectria galligena* (= *Nectria galligena*). Acrescenta à Lista de Pragas Quarentenárias Presentes, constantes do Anexo II da Instrução Normativa nº 59, de 18 de dezembro de 2013, a praga FUNGO - *Neonectria galligena* (= *Nectria galligena*), conforme Anexo desta Instrução Normativa. **Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil**, Brasília, 27 de maio de 2014.

CAMELDI, I.; PIRONDI, A.; NERI, F.; COLLINA, M.; MARI, M. First report of apple bull's eye rot caused by *Neofabraea malicorticis* in Italy. **Plant Disease**, v.100, n.12, p. 2532, 2016.

CHEN, C.; VERKLEY, G. J.; SUN, G.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Redefining common endophytes and plant pathogens in *Neofabraea*, *Pezicula*, and related genera. **Fungal Biology**, v. 120, n. 11, p. 1291-1322, 2016.

CROUS, P. W.; WINGFIELD, M. J.; LE ROUX, J. J.; RICHARDSON, D. M.; STRASBERG, D.; SHIVAS, R. G.; ... e SONAWANE, M. S. FUNGAL PLANET DESCRIPTION SHEETS: 371–399. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**. v. 35, p. 264-327, 2015.

CUNNINGTON, J. H. Three *Neofabraea* species on pome fruit in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 33, n. 03, p. 453-454, 2004.

DAVISON, E. M.; CUNNINGTON, J. H.; TAY, F. C. S. First record of *Cryptosporiopsis actinidiae* in Australia. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 04, n. 01, p. 66-67, 2009.

DE JONG, S. N.; LÉVESQUE, C. A.; VERKLEY, G. J.; ABELN, E. C.; RAHE, J. E.; BRAUN, P. G. Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the β -tubulin gene. **Mycological Research**, v. 105, n. 06, p. 658-669, 2001.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 05, p. 1792-1797, 2004.

EINAX, E.; VOIGT, K. Oligonucleotide primers for the universal amplification of β -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. **Organisms Diversity & Evolution**, v. 03, n.03, p. 185-194, 2003.

FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Disponível em < <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>>. Acesso em: 28/02/2017.

FIORAVANÇO, J. C.; SANTOS, R. S. **Maçã: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Embrapa Uva e Vinho, 2013.

FIORAVANÇO, J. C. F. **Cultura da macieira no Rio Grande do Sul: análise situacional e descrição varietal**. Embrapa Uva e Vinho, 2010.

FULLERTON, R. A.; RHEINLÄNDER, P. A.; MANNING, M. A.; CASONATO, S. G. Infection and rot expression by *Cryptosporiopsis actinidiae* and *Phomopsis* sp. In: **Kiwifruit, *Actinidia chinensis*'hort16a'**. VI International Symposium on Kiwifruit 753, p.653-661, 2006.

GARCIA, N. Produtos da Serra Catarinense. Disponível em < <http://www.clmais.com.br/informacao/101455/produtos-da-serra-catarinense-em-destaque-no-brasil>>. Acesso em: 13/02/2017.

GARIÉPY, T. D.; LÉVESQUE, C. A. Species specific identification of the *Neofabraea* pathogen complex associated with pome fruits using PCR and multiplex DNA amplification. **Mycological research**, v. 107, n. 05, p. 528-536, 2003.

GARIÉPY, T. D.; RAHE, J. E.; LÉVESQUE, C. A.; SPOTTS, R. A.; SUGAR, D. L.; HENRIQUEZ, J. L. *Neofabraea* species associated with bull's-eye rot and cankers of apple and pear in the Pacific Northwest. **Canadian journal of plant pathology**, v. 27, n. 01, p. 118-124, 2005.

GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. **Métodos em Fitopatologia**, v. 01, p. 92-102, 2007.

HENRIQUEZ, J. L.; SUGAR, D.; SPOTTS, R. A. Etiology of bull's eye rot of pear caused by *Neofabraea* spp. in Oregon, Washington, and California. **Plant disease**, v. 88, n. 10, p. 1134-1138, 2004.

HENRIQUEZ, J. L. First report of apple rot caused by *Neofabraea alba* in Chile. **Plant Disease**, v. 89, n. 12, p. 1360-1360, 2005.

HOOG, G. S.; ENDE, A. H. G. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. **Mycoses**. v. 41, n. 5-6, p. 183-189, 1998.

HORTOVA, B.; NOVOTNY, D.; ERBAN, T. Physiological characteristics and pathogenicity of eight *Neofabraea* isolates from apples in Czechia. **European Journal of Horticultural Science**, v. 79, n.06, p. 327-334, 2014.

INDEX FUNGORUM. Disponível em < <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>>. Acesso em: 24/02/2017.

IUCHI, V. L. Botânica e fisiologia. In: **A cultura da macieira. Florianópolis: EPAGRI**, p. 59-104, 2006.

JOHNSTON, P. R.; MANNING, M. A.; MEIER, X.; PARK, D.; FULLERTON, R. A. *Cryptosporiopsis actinidiae* sp. nov. **Mycotaxon**, v. 89, n. 1, p. 131-136, 2004.

JOHNSTON, P. R.; PENNYCOOK, S. R.; MANNING, M. A. Taxonomy of fruit-rotting fungal pathogens: what's really out there?. **New Zealand Plant Protection**, v. 58, n. 42- 46, p. 42- 46, 2005.

JOHNSTON, P. R.; SEIFERT, K. A.; STONE, J. K.; ROSSMAN, A. Y.; MARVANOVÁ, L. Recommendations on generic names competing for use in Leotiomycetes (Ascomycota). **IMA fungus**, v. 05, n. 01, p. 91-120, 2014.

KIENHOLZ, J. R. Comparative study of the apple anthracnose and perennial canker fungi. **Journal of Agricultural Research**, v. 59, n. 9, p. 635-665, 1939.

KIST, B B. Anuário Brasileiro de maçã 2015. 1ªEd. Santa Cruz do Sul. Gazeta, 2015.

KIST, B B. Anuário Brasileiro de maçã 2016. 1ªEd. Santa Cruz do Sul. Gazeta, 2016.

KNIGHT, D. A. Tree of Knowledge. Disponível em< https://pt.wikipedia.org/wiki/Arvore_da_Ciencia_do_Bem_e_do_Mal>. Acesso em: 13/02/2017.

KREUZ, C. L.; BENDER, R. J.; BLEICHER, J. História e importância econômica da macieira. In: **Manual da cultura da macieira. Florianópolis: EPAGRI**, p. 13-25, 1986.

LIU, Y J.; WHELEN, S.; HALL, B.D. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. **Molecular Biology and Evolution**. v. 16, n. 12, p. 1799-1808, 1999.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C. Preparações e Observações Microscópicas de Espécimes Fúngicos. **Métodos em Fitopatologia**, v. 01, p. 205-219, 2007.

MICHALECKA, M.; BRYK, H.; PONIATOWSKA, A.; PULAWSKA, J. Identification of *Neofabraea* species causing bull's eye rot of apple in Poland and their direct detection in apple fruit using multiplex PCR. **Plant Pathology**, p. 1-12, 2015.

NANNFELDT, J. A. Studien uber die morphologie und systematik der nicht-lichenisierten inoperculaten Discomyceten. 1932.

PEŠICOVÁ, K.; KOLAŘÍK, M.; HORTOVÁ, B.; NOVOTNÝ, D. Diversity and identification of *Neofabraea* species causing bull's eye rot in the Czech Republic. **European Journal of Plant Pathology**, p. 1-11, 2016.

PETRI, J. L.; LEITE, G. B.; COUTO, M.; FRANCESCETTO, P. Avanços na cultura da macieira no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 48-56, 2011.

PINHO, D. B.; FIRMINO, A. L.; FERREIRA-JUNIOR, W. G.; PEREIRA, O. L. An efficient protocol for DNA extraction from Meliolales and the description of *Meliola centellae* sp. nov. **Mycotaxon**, v. 122, n. 1, p. 333-345, 2012.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic biology**, v. 53, n. 5, p. 793-808, 2004.

RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **Journal of molecular evolution**, v. 43, n. 3, p. 304-311, 1996.

ROMERO, J.; RAYA, M. C.; ROCA, L. F.; MORAL, J.; TRAPER, A. First Report of *Neofabraea vagabunda* Causing Branch Cankers on Olives in Spain. **Plant Disease**, v. 100, n. 2, p. 527-527, 2016.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

ROONEY-LATHAM, S.; GALLEGOS, L. L.; VOSSEN, P. M.; GUBLER, W. D. First report of *Neofabraea alba* causing fruit spot on olive in North America. **Plant Disease**, v. 100, n. 5, p. 1011, 2016.

SALGADO, J. M. Alimentos inteligentes. Disponível em <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Ma%C3%A7%C3%A3>>. Acesso em: 13/02/2017.

SANHUEZA, R. M. V. **Podridão de frutos e cancos dos ramos causados por *Cryptosporiopsis perennans* nas macieiras**. Embrapa Uva e Vinho, 2001.

SANHUEZA, R. M. V. Ocorrência de *Cryptosporiopsis perennans* em macieiras' Fuji'no Sul do Brasil. **Summa phytopatológica**, v. 28, n. 2, p. 204-206, 2002.

SANHUEZA, R. M. V.; BETTI, J. A. Doenças da macieira. **In: Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. 4.ed. São Paulo SP: Agronômica Ceres**, p. 421-433, 2005.

SANHUEZA, R. M. V.; SANTOS, M. C.; PAVAN, W. Presença do cancro europeu das pomáceas no Brasil: ameaça à sustentabilidade da pomicultura do país. . **In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 47.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MOFO BRANCO, 2014, Londrina. Anais...Desafios futuros. Londrina: Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, p. 44-45, 2014.

SANHUEZA, R. M. V.; BOGO, A. *Neofabraea brasiliensis*. **Persoonia**, v. 35, p. 421-433, 2015.

SEIFERT, K. A. *Neofabraea kienholzii* (Seifert, Spotts & Lévesque), Nomenclatural novelties. **Index Fungorum**, 2013.

SOTO-ALVEAR, S.; LOLAS, M.; ROSALES, I. M.; CHÁVEZ, E. R.; LATORRE, B. A. Characterization of the bull's eye rot of apple in Chile. **Plant Disease**, v. 97, n. 4, p. 485-490, 2013.

SPOTTS, R. A.; SEIFERT, K. A.; WALLIS, K. M.; SUGAR, D.; XIAO, C. L.; SERDANI, M.; HENRIQUEZ, J. L. Description of *Cryptosporiopsis kienholzii* and species profiles of *Neofabraea* in major pome fruit growing districts in the Pacific Northwest USA. **Mycological research**, v. 113, n. 11, p. 1301-1311, 2009.

SUNG, G. H.; SUNG, J. M.; HYWEL-JONES, N. L.; SPATAFORA, J. W. A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 44, n. 3, p. 1204-1223, 2007.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

VERKLEY, G. J. M. **Monograph of the genus *Pezicula* and its anamorphs**. Cebtraalbureau voor Schimmelcultures, 1999.

VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 8, p. 4238-4246, 1990.

WEBER, R. W. S.; PALM, G. Resistance of storage rot fungi *Neofabraea perennans*, *N. alba*, *Glomerella acutata* and *Neonectria galligena* against thiophanate-methyl in Northern German apple production. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 117, n. 4, p. 185-191, 2010.

WURMS, K. V.; REGLINSKI, T.; FRIEL, E.N.; WANG, M.; CHYNOWETH, R.; TAYLOR, J. T.; CHEE, A. A. Postharvest biochemical changes in 'Hort16a' kiwifruit: effects of fungal inoculation and storage environment. VI INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON KIWIFRUIT 753, p.677-684, 2006.