

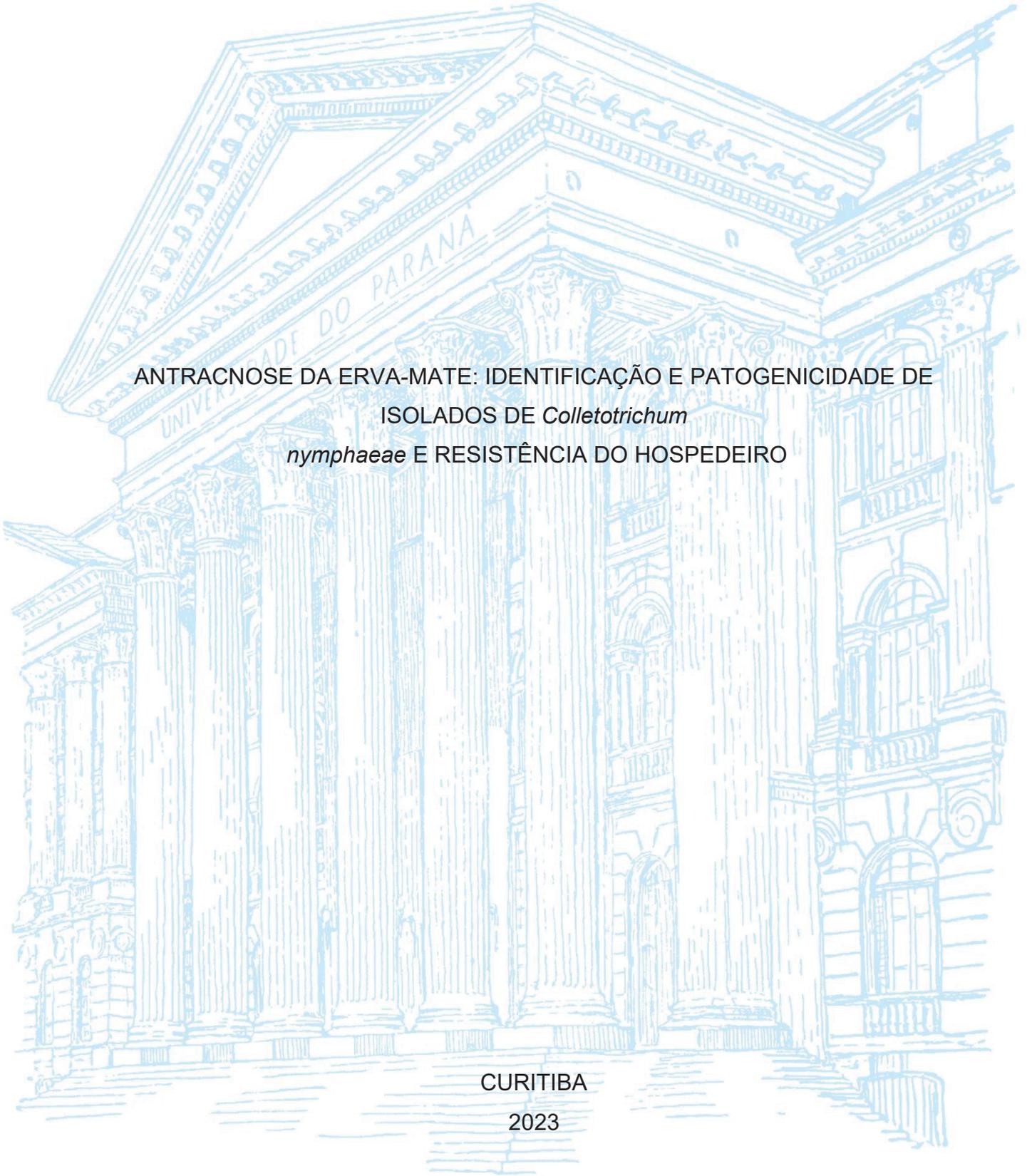
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MIRELI BERGMANN MARTINS

ANTRACNOSE DA ERVA-MATE: IDENTIFICAÇÃO E PATOGENICIDADE DE
ISOLADOS DE *Colletotrichum*
nymphaeae E RESISTÊNCIA DO HOSPEDEIRO

CURITIBA

2023



MIRELI BERGMANN MARTINS

ANTRACNOSE DA ERVA-MATE: IDENTIFICAÇÃO E PATOGENICIDADE DE
ISOLADOS DE *Colletotrichum*
nymphaeae E RESISTÊNCIA DO HOSPEDEIRO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Setor de Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Figueredo Dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

Coorientador: Prof. Dr. Dauri José Tessmann

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Martins, Mireli Bergmann

Antracnose de erva-mate: identificação e patogenicidade de isolados de *Colletotrichum nymphaeae* e resistência do hospedeiro / Mireli Bergmann Martins. – Curitiba, 2023.
1 recurso online: PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal).

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Figueiredo dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

Coorientador: Prof, Dr. Dauri Jose Tessmann

1. Erva-mate. 2. Fungos. 3. Antracnose. I. Santos, Álvaro Figueiredo. II. Auer, Celso Garcia. III. Tessmann, Dauri José. IV Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal). V. Título.

Bibliotecária: Telma Terezinha Stresser de Assis CRB-9/944



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL) - 40001016031P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MIRÉLI BERGMANN MARTINS** intitulada: **ANTRACNOSE DA ERVA-MATE: IDENTIFICAÇÃO E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Colletotrichum nymphaeae* E RESISTÊNCIA DO HOSPEDEIRO**, sob orientação do Prof. Dr. ÁLVARO FIGUEREDO DOS SANTOS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Julho de 2023.

Assinatura Eletrônica

28/07/2023 13:55:41.0

ÁLVARO FIGUEREDO DOS SANTOS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

28/07/2023 14:13:13.0

CELSO GARCIA AUER

Coorientador(a)

Assinatura Eletrônica

28/07/2023 11:54:06.0

DAURI JOSE TESSMANN

Coorientador(a)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor e orientador Dr. Álvaro Figueredo Dos Santos, por sua orientação excelente e dedicação exemplar na condução do estudo. Sou grata pelos valiosos ensinamentos recebidos. Seu apoio e direcionamento foram essenciais para o meu desenvolvimento profissional.

Expresso também meu agradecimento aos professores e coorientadores, Dr. Celso Garcia Auer e Dr. Dauri José Tessmann, por compartilharem generosamente seu conhecimento e por estarem sempre disponíveis para contribuir de forma significativa. Gostaria de estender meu agradecimento à analista Caroline de Bastos Bühner, cuja ajuda na organização e desenvolvimento do estudo foi fundamental.

Agradeço à Embrapa Florestas pela disponibilidade de recursos e laboratórios/instalações para a realização deste trabalho. À UFPR, ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal e seus colaboradores, por proporcionarem o ambiente propício para o desenvolvimento deste estudo.

À CAPES pelo apoio financeiro fornecido por meio da bolsa de pesquisa, que possibilitou a realização deste trabalho.

Por fim, gostaria de expressar minha profunda gratidão a minha família, colegas, amigos e colaboradores que estiveram presentes durante este período, oferecendo suporte, compartilhando ideias e contribuindo com seu conhecimento e apoio inestimável. Sou imensamente grata por toda a ajuda e amizade que recebi de cada um de vocês.

“Sua raridade não está naquilo que você possui
ou que sabe fazer
isso é mistério de Deus com você”
(Anderson Freire, 2013)

RESUMO

A cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) desempenha um papel de destaque na região sul do Brasil, sendo a principal espécie florestal não madeireira com importância socioeconômica. No entanto, doenças fúngicas afetam sua produtividade e qualidade. A antracnose é um problema fitossanitário com danos significativos em mudas de viveiros e em ervais estabelecidos. Em relação à etiologia desta doença, ainda há dúvidas sobre qual a espécie de *Colletotrichum* é causadora da antracnose, assim como faltam informações sobre estratégias de controle da doença. Diante disso, os objetivos do presente estudo foram: identificar a espécie de *Colletotrichum* causadora da antracnose da erva-mate com base na caracterização morfológica, patogênica e molecular, a partir de isolados oriundos de regiões produtoras dos estados do Rio Grande do Sul e do Paraná; desenvolver metodologia de inoculação e avaliar a agressividade de isolados de *C. nymphaeae* na erva-mate; e avaliar a resistência de clones de erva-mate ao patógeno. Para realização do estudo foram obtidos isolados de *C. nymphaeae* de amostras de folhas e caules com sintomas de antracnose, oriundos de viveiros e ervais dos estados do Paraná e Rio Grande do Sul. A patogenicidade foi confirmada seguindo-se os postulados de Koch. A caracterização cultural foi feita com avaliação das colônias no verso e reverso das placas de Petri com meio batata-dextrose-ágar (BDA) e os conídios e apressórios foram avaliados e classificados quanto às suas dimensões e forma. As colônias apresentaram variações de cores de salmão a acinzentado. Os conídios foram classificados como fusiformes (11,95 - 3,12 μm) e os apressórios como levemente lobados e arredondados (7,26 - 4,62 μm). A análise molecular foi realizada com base na região ITS-rDNA e genes GAPDH e TUB2 e as árvores filogenéticas foram inferidas pelo método da análise bayesiana e máxima verossimilhança. A inoculação do patógeno foi realizada em folhas jovens e maduras nas faces adaxial e abaxial, com os seguintes procedimentos: 1) Testemunha, apenas água esterilizada; 2) Inoculação com um disco de meio BDA contendo micélio; 3) Inoculação com suspensão de conídios; e, 4) Inoculação com disco de papel e suspensão de conídios. Os tratamentos foram avaliados com e sem ferimentos das folhas da hospedeira, em temperatura 25 °C e fotoperíodo de 12h. A avaliação da agressividade de isolados e a resistência de clones de erva-mate à antracnose foi realizada por meio da determinação do tamanho da lesão, presença e quantidade de acérvulos formados na

lesão. Conclui-se que, a espécie *Colletotrichum nymphaeae* (Pass) Aa. é patogênica à *Ilex paraguariensis* e está envolvida na etiologia da antracnose da erva-mate no Sul do Brasil. Este estudo mostrou indícios da presença de resistência à *C. nymphaeae* em clones de erva-mate. Pois, em folhas destacadas, dois clones de erva-mate não apresentaram sintomas quando inoculados com o patógeno. O método de inoculação de *C. nymphaeae* com o uso de disco de meio de cultura com micélio na face adaxial de folhas jovens com ferimentos foi adequado para os estudos de patogenicidade e resistência.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*; *Colletotrichum* genoma; patógeno.

ABSTRACT

The culture of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) plays a prominent role in the southern region of Brazil, being the main non-timber forest species with socio-economic importance. However, fungal diseases affect its productivity and quality. Anthracnose is a phytosanitary problem causing significant damage to nursery seedlings and established yerba mate plantations. Regarding the etiology of this disease, there are still doubts about the species of *Colletotrichum* that causes anthracnose. Moreover, information on disease control strategies is lacking. Therefore, the objectives of the present study were to: identify the *Colletotrichum* species causing anthracnose in yerba mate based on morphological, pathogenic, and molecular characterization of isolates from producing regions in the states of Rio Grande do Sul and Paraná; develop an inoculation methodology and assess the aggressiveness of *C. nymphaeae* isolates on yerba mate; and evaluate the resistance of yerba mate clones to the pathogen. For the study, *Colletotrichum* sp. isolates were obtained from samples of leaves and stems with anthracnose symptoms, collected from nurseries and yerba mate plantations in the states of Paraná and Rio Grande do Sul. Pathogenicity was confirmed following Koch's postulates. Cultural characterization was performed by evaluating colonies on the front and back of Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA), and conidia and appressoria were evaluated and classified based on their dimensions and shape. Colonies exhibited variations in color from salmon to gray. Conidia were classified as fusiform (11.95 - 3.12 μm), and appressoria were slightly lobed and rounded (7.26 - 4.62 μm). Molecular analysis was conducted based on the ITS-rDNA region and GAPDH and TUB2 genes, and phylogenetic trees were inferred using Bayesian and maximum likelihood analyses. Pathogen inoculation was performed on young and mature leaves on the adaxial and abaxial surfaces, following these procedures: 1) Control, using only sterilized water; 2) Inoculation with a disk of PDA containing mycelium; 3) Inoculation with conidial suspension; and 4) Inoculation with a paper disk and conidial suspension. Treatments were evaluated with and without host leaf injuries, at a temperature of 25°C and 12 hours of light and darkness. Aggressiveness of isolates and resistance of yerba mate clones to anthracnose were assessed by determining lesion size and the presence and quantity of acervuli formed in the lesion. The study concludes that *Colletotrichum nymphaeae* (Pass) Aa. is pathogenic to *Ilex paraguariensis* and is involved in the

etiology of anthracnose in yerba mate in southern Brazil. Indications of resistance to *C. nymphaeae* were found in yerba mate clones. In detached leaves, two yerba mate clones showed no symptoms when inoculated with *C. nymphaeae*. The method of *C. nymphaeae* inoculation using a culture medium disk with mycelium on the adaxial surface of young leaves with injuries was suitable for the studies on pathogenicity and resistance."

Keywords: *Ilex paraguariensis*; *Colletotrichum* genome; pathogen.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO I

- FIGURA 1 – LOCAIS DE COLETA DAS AMOSTRAS PARA OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum nymphaeae* NOS ESTADOS DO PARANÁ (PR) E RIO GRANDE DO SUL (RS)35
- FIGURA 2 – SINTOMAS DE ANTRACNOSE EM FOLHAS JOVENS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) ORIUNDOS DE INFECÇÃO NATURAL NO CAMPO (A e B) E INOCULAÇÃO (C, D e E) DE *Colletotrichum nymphaeae* EM MUDA E EM CASA DE VEGETAÇÃO44
- FIGURA 3 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DO COMPLEXO *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* INCLUINDO O *OUTGROUP*, CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE INFERÊNCIA BAYESIANA E MAXIMA VEROSSIMILHANÇA COM A REGIÃO GÊNICA ITS46
- FIGURA 4 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DO COMPLEXO *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* INCLUINDO O *OUTGROUP*, CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE INFERÊNCIA BAYESIANA E MAXIMA VEROSSIMILHANÇA COM A REGIÃO GÊNICA GAPH47
- FIGURA 5 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DO COMPLEXO *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* INCLUINDO O *OUTGROUP*, CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE INFERÊNCIA BAYESIANA E MAXIMA VEROSSIMILHANÇA COM A REGIÃO TUB248
- FIGURA 6 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DO COMPLEXO *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* INCLUINDO O *OUTGROUP*, CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE INFERÊNCIA BAYESIANA E MAXIMA VEROSSIMILHANÇA COM A CONCATENAÇÃO DAS REGIÕES ITS, GAPDH E TUB2.....49
- FIGURA 7 – EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICELIAL PARA OS ISOLADOS REPRESENTATIVOS DE *Colletotrichum nymphaeae* DE ERVA-MATE INCUBADOS A 12, 16, 20, 24, 28, E 32°C, COM 12h LUZ POR 9 DIAS54

FIGURA 8- CARACTERÍSTICAS CULTURAIS E MORFOLÓGICAS DO ISOLADO RS7 E RS10 DE <i>Colletotrichum nymphaeae</i>	57
FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO DOS GRUPOS SEPARADOS POR COR DE COLÔNIA. GRUPO 1: COR SALMÃO; 2: CINZA; 3: ESVERDEADO	58
FIGURA 10 – COMPRIMENTO E LARGURA DE CONÍDIOS (µm) PARA OS ISOLADOS REPRESENTATIVOS DE <i>Colletotrichum nymphaeae</i> DE ERVA-MATE	59
FIGURA 11 - COMPRIMENTO E LARGURA DE APRESSÓRIO (µm) PARA OS ISOLADOS REPRESENTATIVOS DE <i>Colletotrichum nymphaeae</i> DE ERVA-MATE	60

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO II

FIGURA 12 – FOLHAS JOVENS (1-A) E FOLHAS MADURAS (1-B) DE ERVA-MATE (<i>Ilex paraguariensis</i>).....	76
FIGURA 13 – FLUXUGRAMA ILUSTRATIVO DAS METODOLOGIAS USADAS PARA INOCULAÇÃO DE <i>Colletotrichum nymphaeae</i>	78
FIGURA 14 – SINTOMAS E SINAIS DE ANTRACNOSE EM FOLHA JOVEM INOCULADO COM O ISOLADOS PR 2 DE <i>Colletotrichum nymphaeae</i>	80
FIGURA 15 – COMPRIMENTO E LARGURA DE LESÕES (mm) EM FOLHAS JOVENS DESTACADAS, INOCULADOS COM <i>Colletotrichum nymphaeae</i> , DISCO DE MICÉLIO (5 mm) COM FERIMENTO, FACE ADAXIAL, AVALIAÇÃO AOS SETE DAI	82
FIGURA 16 – REAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE E RESISTÊNCIA FOLHAS DE CLONES DE ERVA-MATE COM DIFERENTES NÍVEIS DE CAFEÍNA, ALTA (EC53 e EC37) E BAIXA (EC17 e EC47), INOCULADOS COM <i>Colletotrichum nymphaeae</i> AOS SETE DAI.....	83
FIGURA 17 – SINTOMAS E SINAIS DE <i>Colletotrichum nymphaeae</i> FOLHAS JOVENS DESTACADAS INOCULADAS COM DISCO DE MEIO BATATA-DEXTROSE-ÁGAR COM MICÉLIO (5 mm) DE <i>Colletotrichum nymphaeae</i> , AOS SETE DAI.....	84
FIGURA 18 – ESCURECIMENTO DA FOLHA DE ERVA-MATE, INICIANDO NA PORÇÃO INFERIOR DA NERVURA CENTRAL APÓS CONTATO	

DIRETO COM O PAPEL UMEDECIDO DURANTE PERIODO DE INCUBAÇÃO	85
--	----

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO I

TABELA 1 – LISTA DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum nymphaeae</i> DE ERVA-MATE USADOS NESTE ESTUDO	34
TABELA 2 – DESCRIÇÃO DOS PRIMERS UTILIZADOS PARA SEQUENCIAMENTO E SUAS REFERÊNCIAS.....	38
TABELA 3 – ESPÉCIES DO COMPLEXO <i>Colletotrichum acutatum</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> UTILIZADAS NAS ANÁLISES FILOGENÉTICAS, COM OS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO E NÚMERO DO GENBANK.....	45
TABELA 4 – ISOLADOS DE <i>Colletotrichum nymphaeae</i> DE ERVA-MATE CARACTERIZADOS CULTURALMENTE E MORFOLOGICAMENTE	50

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO I

TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS COLÔNIAS (COR DO VERSO E REVERSO, TEXTURA DO MICÉLIO), CONÍDIOS E APRESSÓRIOS (FORMA, LARGURA, COMPRIMENTO) E DADOS DE TEMPERATURA DE CRESCIMENTO MICELIAL DE ISOLADOS REPRESENTATIVOS DE <i>Colletotrichum nymphaeae</i>	55
TABELA 6 – COMPRIMENTO E LARGURA MÉDIA DE LESÕES (mm) EM FOLHAS DESTACADAS, INOCULADOS COM FERIMENTO NA FACE ADAXIAL, COM DISCO DE MICÉLIO (5 mm) <i>Colletotrichum nymphaeae</i> , AVALIAÇÃO AOS 7 DAI.....	81
TABELA 7 – AVALIAÇÃO DE CLONES COM DIFERENTES NÍVEIS DE CAFEÍNA, UTILIZANDO FOLHAS JOVENS DESTACADAS INOCULADAS COM DISCO DE MEIO BATATA-DEXTROSE-ÁGAR COM MICÉLIO (5 mm) DE <i>Colletotrichum nymphaeae</i> , AOS SETE DAI.....	83
TABELA 8 - PERCENTUAL DE FOLHAS COM SINTOMAS: FOLHAS JOVENS DESTACADAS INOCULADAS COM DISCO DE MEIO BATATA-DEXTROSE-ÁGAR COM MICÉLIO (5 mm) DE <i>Colletotrichum nymphaeae</i> , AOS SETE DAI.....	84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 CULTURA DA ERVA-MATE.....	19
2.2 ANTRACNOSE EM ERVA-MATE	20
2.3 O GÊNERO <i>COLLETOTRICHUM</i>	21
REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO I	29
CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGÊNICA DE <i>COLLETOTRICHUM NYMPHAEAE</i>, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DA ERVA-MATE	29
RESUMO	30
ABSTRACT	31
1 INTRODUÇÃO	31
2 MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>COLLETOTRICHUM</i>	35
2.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	37
2.2.1 OBTENÇÃO DO DNA	37
2.2.2 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)	37
2.2.3 ANÁLISE DOS DADOS.....	38
2.3 CARACTERIZAÇÃO CULTURAL E MORFOLÓGICA	39
2.3.1 AVALIAÇÃO DA FORMA E DAS DIMENSÕES DOS CONÍDIOS.....	39
2.3.2 AVALIAÇÃO DA FORMA DOS APRESSÓRIOS	40
2.4 EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICELIAL DE ISOLADOS DE <i>COLLETOTRICHUM NYMPHAEAE</i>	40
2.5 TESTE DE PATOGENICIDADE	41
3 RESULTADOS	43
3.1 CARACTERIZAÇÃO SINTOMATOLÓGICA E PATOGENICIDADE	43
3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	45
3.3 CARACTERIZAÇÃO CULTURAL E MORFOLOGICA DE ESTRUTURAS DE <i>C.</i> <i>NYMPHAEAE</i>	49
3.4 EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICELIAL DE ISOLADOS DE <i>COLLETOTRICHUM NYMPHAEAE</i>	54

4 DISCUSSÃO	61
5 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67
CAPÍTULO II	71
AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS E RESISTÊNCIA DE CLONES DE ERVA-MATE À COLLETOTRICHUM NYMPHAEAE	71
RESUMO	72
ABSTRACT	73
1 INTRODUÇÃO	74
2 MATERIAL E MÉTODOS	76
2.1 MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE <i>COLLETOTRICHUM NYMPHAEAE</i> EM FOLHAS JOVENS E MADURAS DESTACADAS DE ERVA-MATE	76
2.1.1 HOSPEDEIRO	76
2.1.2 PRODUÇÃO DE INÓCULO	77
2.1.3 INOCULAÇÃO	77
2.1.4 INCUBAÇÃO	78
2.2 AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE <i>COLLETOTRICHUM NYMPHAEAE</i>	79
2.3 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE CLONES DE ERVA-MATE COM BAIXO E ALTO NÍVEL DE CAFEÍNA À <i>COLLETOTRICHUM NYMPHAEAE</i>	79
3 RESULTADOS	80
3.1 MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE <i>COLLETOTRICHUM NYMPHAEAE</i> EM FOLHAS JOVENS E MADURAS DESTACADAS DE ERVA-MATE	80
3.2 AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE <i>COLLETOTRICHUM NYMPHAEAE</i>	80
3.3 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE CLONES DE ERVA-MATE COM BAIXO E ALTO NÍVEL DE CAFEÍNA À <i>COLLETOTRICHUM NYMPHAEAE</i>	82
4 DISCUSSÃO	86
5 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	91
REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO GERAL

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.) é uma espécie florestal nativa da Mata Atlântica da América do Sul e considerada o principal produto não madeireiro do agronegócio florestal na região Sul do Brasil (SFB, 2022; EMBRAPA, 2019). A erva-mate tem uma grande importância cultural e econômica, principalmente em decorrência dos hábitos socioculturais. O consumo de erva-mate, na forma de chá, é amplamente difundido entre população no Sul do Brasil e países vizinhos como Argentina, Paraguai e Uruguai (FODRA, 2019). Entre os benefícios, as folhas da erva-mate possuem muitos compostos bioativos, como os polifenóis, especialmente os ácidos clorogênicos, que conferem efeitos protetores cardíaco metabólicos (RUSKOVSKA et al., 2023). No Brasil, a produção de erva-mate em ervais nativos e plantados envolve 19.003 propriedades rurais e uma maioria de agricultores familiares e a economia de diversas cidades onde o cultivo é predominante (IBGE, 2023; EMBRAPA, 2019). Em 2021, a produção de erva-mate no Brasil alcançou um total de 1.064.121 t., tornando-a a principal cultura entre os cultivos florestais não madeireiros (PEREIRA, 2022, SFB, 2022).

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de erva-mate, com destaque de produção para os estados do Rio Grande do Sul e Paraná, sendo predominante o consumo da produção no mercado interno (FAVARETO et al., 2023). Os principais importadores da produção de erva-mate brasileira são Uruguai, Chile, Alemanha e Estados Unidos (FODRA, 2019). No entanto, para atender à demanda interna por diversidade de tipos de erva-mate, o Brasil importa o produto de outros países, como a Argentina (FODRA, 2019). Neste sentido, os hábitos socioculturais de consumo da cultura da erva-mate estão vinculados às suas folhas, como citado, a matéria-prima da cultura, consumida em infusão em forma de chimarrão ou mate, chás quentes ou gelados (CENTENARO et al., 2020). Além disso, a matéria-prima da erva-mate também é utilizada nas indústrias de alimentos e cosméticos (HEGEL et al., 2021, CENTENARO et al., 2020).

Contudo, a cultura da erva-mate é afetada por diversas doenças que ocasionam danos à produtividade e a qualidade da matéria-prima produzida, acarretando perdas monetárias ao produtor rural (EMBRAPA, 2019; AUER; DOS SANTOS, 2016). A antracnose, causada pelo gênero *Colletotrichum*, é uma das

principais doenças da erva-mate (AUER; DOS SANTOS, 2016). A doença é favorecida por condições de alta umidade e sombreamento e ocorre em brotações e ramos jovens, ápices e folhas das plantas jovens e adultas. Nas folhas, os sintomas são lesões necróticas escuras, com formato irregular, que podem ocasionar perfurações em folhas jovens (GRIGOLETTI; AUER, 1996; AUER; DOS SANTOS, 2016).

Há poucos estudos com a antracnose da erva mate e, nos últimos anos, esta doença vem ganhando importância pelas perdas causadas aos viveiros e ervais já estabelecidos (AUER; DOS SANTOS, 2016). Ainda há dúvidas sobre qual é a espécie de *Colletotrichum* causadora da antracnose. Na literatura há poucas informações e alguns autores como Grigoletti e Auer, (1996) e Auer e Dos Santos (2016) relataram o envolvimento das espécies *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. yerbae* com a doença. No entanto, as informações morfológicas dessas espécies disponíveis na literatura são insuficientes e faltam análises moleculares comprobatórias.

A identificação correta do agente causal da antracnose da erva-mate é uma etapa essencial para a definição de estratégias adequadas de controle da doença, especialmente para a busca por genótipos resistentes. Nesse sentido, há necessidade de estudos taxonômicos com base em características morfológicas e moleculares para elucidar a identificação a nível de espécie (RATTANAKREETAKUL et al., 2023; ZHANG et al., 2020; MARIN-FELIX et al., 2017). Há necessidade também de metodologias adequadas para avaliar a patogenicidade de *Colletotrichum* e a resistência do hospedeiro (GOMES et al., 2001).

Diante disso, os objetivos do presente estudo são: identificar a espécie de *Colletotrichum* causadora da antracnose da erva-mate com base na caracterização morfológica, patogênica e molecular, a partir de isolados oriundos de regiões produtoras; desenvolver metodologia de inoculação e avaliar a agressividade de isolados de *Colletotrichum* sp.; e avaliar a resistência de clones de erva-mate ao patógeno. Para isso, organizou-se o estudo em dois capítulos, conforme segue: Capítulo I – Caracterização morfofisiológica, molecular e patogênica de isolados de *Colletotrichum nymphaeae*, agente causal da antracnose na erva-mate; Capítulo II

– Agressividade de isolados e resistência de clones de erva-mate à *Colletotrichum nymphaeae*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DA ERVA-MATE

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), planta nativa da Mata Atlântica, pertence à família Aquifoliaceae é considerada o principal produto florestal não madeireiro na Região Sul do país (EMBRAPA, 2019). A atividade ervateira é complexa, e possui fatores derivados de um amplo espectro ambiental, cultural e econômico. O cultivo da erva-mate, além do retorno financeiro é influenciado pelas demandas culturais e tradições familiares, onde os ervais são cultivados por diferentes gerações da mesma família e predominantemente agricultura familiar (PEREIRA, 2022; PENTEADO JÚNIOR; GOULART, 2019). Entre as possibilidades de cultivo da cultura existe diversidade nos sistemas de cultivo, como sistema agroflorestal, agroflorestais em propriedades agroecológicas; cultivos orgânicos e cultivos convencionais, além de ervais nativos ou plantados, em cultivo adensado ou não (PEREIRA, 2022; WENDLING et al., 2020; LACERDA, 2019).

As informações sobre a produção de erva-mate no Brasil, em condições de exposição direta ao sol, relatam o cultivo realizado em uma área de 72.106 hectares, com produtividade média registrada foi de 8.132 kg ha⁻¹ (IBGE, 2023). Contudo, é importante ressaltar que o cultivo em pleno sol é parte da produção brasileira, que também é composta por erva-mate produzida em meio à vegetação nativa, ou ervais sombreados (PEREIRA, 2022). Os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul totalizam 509 municípios produtores de erva mate. Destes, 306 municípios produzem em ervais nativos e plantados, sendo o Paraná o estado líder em extração da erva-mate de ervais nativos, com 129 municípios produtores (PEREIRA, 2022; CENTENARO et al., 2020).

Nos últimos anos, o estado do Paraná alternou a primeira posição em toneladas produzidas com o estado do Rio Grande do Sul. Em 2021, o estado do Paraná registrou a maior produção com 680.929 t. e em segundo lugar o estado do Rio Grande do Sul com 268.198 t produzidas (PEREIRA, 2022; IBGE, 2023). Do ano de 2012 a 2017, o país apresentou crescimento na produção da cultura de 20% e, posteriormente a este crescimento foi possível analisar que o Brasil exportou no ano de 2018 para 39 diferentes destinos internacionais, como Espanha, Alemanha

e Estados Unidos. O Uruguai, permaneceu nestes anos como maior importador da erva-mate brasileira, correspondente a 86% do total exportado, aproximadamente 31,1 mil t. (CENTENARO et al., 2020).

As tecnologias e inovações do setor ervateiro trouxeram novas projeções para o cultivo da cultura e para a forma de uso, com diversificação de produtos a partir de erva-mate (CENTENARO et al., 2020). Além do consumo tradicional com água quente em cuias no formato de mate ou chimarrão, para os povos dos estados da região Sul do Brasil e fronteiriços a eles em países, como Argentina, Paraguai e Uruguai. O setor ervateiro dispõe de novos produtos que podem utilizar compostos extraídos das folhas como matéria prima na indústria, alavancando o potencial de consumo da cultura. A presença de alcaloides e antioxidantes confere às folhas da erva-mate propriedades bioativas que são consideradas benéficas para a saúde, utilizadas para a produção de chás gelados, bebidas tônicas, formulações energizantes e produção de cosméticos (RUSKOVSKA et al., 2023; HEGEL et al. 2021; CENTENARO et al., 2020; GEBARA et al., 2017). Explorando o potencial de diversificação de produtos derivados da cultura.

2.2 ANTRACNOSE EM ERVA-MATE

A cultura da erva-mate é afetada por diversos fitopatógenos fúngicos, como os gêneros *Fusarium*, *Cylindrocladium*, *Rhizoctonia* e *Colletotrichum* (PAULA et al., 2018). Este fato associado à desinformação sobre métodos de controle pode ocasionar o abandono destas áreas para o cultivo de grandes culturas, o que pode resultar em diminuição da produção do setor ervateiro (PAULA et al., 2018; POLETTO et al., 2015).

A antracnose, uma das doenças fúngicas que afetam a cultura da erva-mate, é particularmente desafiadora devido à rápida disseminação do fungo por meio de chuva, vento e ferramentas agrícolas infectadas (PIASSETTA, 2022; WENDLING et al., 2020; GRIGOLETTI; AUER, 1996; AUER; DOS SANTOS, 2016). Para controlar a antracnose, medidas como a eliminação de tecidos infectados, manejo adequado da irrigação, uso de fungicidas e o plantio de variedades resistentes devem estar interligadas no manejo integrado de pragas (RATTANAKREETAKUL et al., 2023; PENTEADO JÚNIOR; GOULART, 2019; AUER; DOS SANTOS, 2016).

Condições de alta temperatura e umidade favorecem a expressão do patógeno e ocorrência da antracnose, bem como o estresse das plantas causado por fatores como sombreamento, períodos de chuva, geadas e danos causados por insetos (WENDLING et al., 2020; PENTEADO JÚNIOR; GOULART, 2019; AUER; DOS SANTOS, 2016). Fungos do gênero *Colletotrichum* são um dos principais patógenos, afetando diversas culturas no mundo, causando danos econômicos e decréscimos significativos de produção (BENSO et al., 2023; RATTANAKREETAKUL et al., 2023; TAN et al., 2022; ZHANG et al., 2020; TOZZE JÚNIOR et al., 2015) assim como em erva-mate no Brasil (PIASSETTA, 2022; PENTEADO JÚNIOR; GOULART, 2019; AUER; DOS SANTOS 2016). A diversidade genética do gênero e a capacidade do fungo de se adaptar a diferentes ambientes e plantas hospedeiras indica a possibilidade de diferentes espécies estarem presentes em plantas de erva-mate, como relatado em outras culturas de interesse agrícola (GELAIN et al., 2023; RATTANAKREETAKUL et al., 2023; CARRARO et al., 2022; LUONGO et al., 2022; DAMM et al., 2020).

Na cultura da erva-mate, quando a doença ocorre em sementeiras provoca a queima do ápice das plântulas, desestabilizando o crescimento vertical e aumentando o perfilhamento, por ativar as gemas laterais da planta, podendo ser observado a má formação das mudas em viveiros (AUER; DOS SANTOS 2016; GOMES et al., 2001; GRIGOLETTI JÚNIOR; AUER, 1996). Para controlar a antracnose em plantas de erva-mate, são necessários estudos similares ao realizado por Mezzomo et al. (2021), na cultura da erva-mate com identificação do fitopatógeno *Fusarium* sp., e a análise da associação de diferentes espécies desse gênero como causadoras de doenças na cultura da erva-mate. Neste sentido, não existem estudos sobre a identificação ao nível de espécies do gênero *Colletotrichum* em erva-mate, também não existindo manejo recomendado com utilização de fungicidas por não haver registro de produtos para controle da antracnose em erva-mate no país (AGROFIT, 2023).

2.3 O GÊNERO *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* contém um grande número de espécies fitopatogênicas e que afetam uma ampla variedade de culturas de interesse agrícola, incluindo pomares frutíferos, lavouras de grãos, cultivos de plantas

ornamentais e espécies florestais (RATTANAKREETAKUL et al., 2023; LOPEZ et al., 2023; ZHANG et al., 2020; GOMES et al., 2001). O fitopatógeno causa a doença conhecida como antracnose, que quando não controlada pode resultar em perdas significativas nas culturas e impacto econômico (RATTANAKREETAKUL et al., 2023; GELAIN et al., 2023; CARRARO et al., 2022; AUER; SANTOS 2016).

O gênero *Colletotrichum* pertence ao Filo Ascomycota, ordem Glomerellales, família Glomerallaceae e a fase teleomórfica *Glomerella* (MASSOLA JÚNIOR, 2018). A fase teleomórfica produz ascocarpo tipo peritécio, ascos unitunicados, com formato cilíndrico e pouco clavado (BEDENDO, 2018; MASSOLA JÚNIOR, 2018)

Dentro do gênero *Colletotrichum*, existem agrupamentos de várias espécies que possuem características morfológicas similares, denominados cientificamente de complexos de espécies (SUTTON, 1980) e dentro do complexo as espécies podem diferir em níveis moleculares e patogênicos. Entre os complexos do gênero estão *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Alguns relatos científicos informam que o complexo *C. acutatum*, apresenta características culturais e morfológicas específicas, tais como: formação de acérvulos e massa rosa-alaranjada e conídios retos e fusiformes com extremidades finas (CARRARO et al., 2022; DAMM et al., 2009; SUTTON, 1980), também se destaca que o pode ocorrer curvatura do conídio (DAMM et al., 2009).

Desde a década de 1950, Von Arx (1957) utilizou para a identificação específica de *Colletotrichum* apenas as características morfológicas, culturais e de patogenicidade (SUTTON, 1980). Entre as principais características usadas para a caracterização de isolados de *Colletotrichum* sp. destaca-se a morfologia de conídios e apressórios (tamanho, forma), as características culturais das colônias (cor e textura), a taxa de crescimento das colônias e a patogenicidade (HYDE et al., 2009; SUTTON, 1992). Os estudos mais recentes continuam utilizando estas características, mas com o acréscimo da análise molecular para distinguir entre os complexos e espécies do gênero *Colletotrichum* (BENSO et al., 2023; RATTANAKREETAKUL et al., 2023; TAN et al., 2022; MARIN-FELIX et al., 2017).

Marin-Felix et al. (2017), ressaltam a relevância do uso de regiões específicas do DNA em análises moleculares, especialmente regiões altamente conservadas, que contêm informações valiosas sobre a evolução genética da

espécie em estudo. Essas regiões conservadas desempenham um papel fundamental na técnica de DNA barcoding, pois fornecem sequências de DNA que podem ser utilizadas como marcadores confiáveis (MARIN-FELIX et al., 2017). A identificação e a distinção entre espécies são possíveis devido às variações e similaridades observadas nessas sequências de DNA, permitindo uma caracterização genética precisa de espécies de *Colletotrichum*.

Em linhas gerais, a análise molecular pode ser utilizada para comprovar a associação de uma ou mais espécies ou fazer a identificação de novas espécies ainda não relatadas na cultura de interesse (RATTANAKREETAKUL et al., 2023; DIMAYACYAC; BALENDRES, 2022; WANG et al., 2022; ZHANG et al., 2020; MARIN-FELIX et al., 2017), pois, sabe-se que o uso apenas das caracterização clássica, com análise morfofisiológica não é suficiente e apresenta problemas para identificação correta no gênero *Colletotrichum* (RATTANAKREETAKUL et al., 2023; GELAIN et al., 2023; TOZZE JÚNIOR et al., 2015; CASTILHO et al., 2007).

Ao citar estes argumentos, a utilização da análise molecular é relatada em diversos estudos, tais como Kamei et al. (2014), os quais demonstraram que ao menos três espécies de *Colletotrichum* atuam como agentes causadores da antracnose em plantas de pinheira (*Annonaceae squamosa* L.) e gravioleira (*Annonaceae muricata* L.), e destas espécies apenas uma havia sido relatada anteriormente ao estudo molecular. A utilização de análise gênica utilizando a concatenação de genes de interesse para o gênero *Colletotrichum* ainda é referenciada nos estudos de Rattanakreetakul et al. (2023); Gelain et al. (2023); Zhang et al. (2020) e Tozze Júnior et al. (2015).

Utilizando técnicas morfológicas e moleculares, a espécie *C. nymphaeae* (Pass) Aa. é relatada com ocorrência conjunta com várias outras espécies do gênero *Colletotrichum* (LUONGO et al., 2022; CARRARO et al., 2022; DAMM et al., 2020). Em associação com *C. fioriniae* Shivas e Tan., as espécies foram relatadas como agentes causadoras de antracnose em nozes (*Juglans regia* L.) na Itália (LUONGO et al., 2022; WANG et al., 2022). Damm et al. (2020), citam que *C. nymphaeae* também ocorre associado a *C. eriobotryae* Damm e Huang., sendo está a principal espécie causadora da podridão antracnose dos frutos de nêspera (*Eriobotrya japônica* Lindl.). Na cultura do caqui, no Brasil, a associação de *C.*

nymphaeae foi relatada com espécies de *C. horii* Weir e Johnst., *C. fructicola* Prihast. e *C. melonis* Damm e Crous. (CARRARO et al., 2022).

Além da ocorrência de mais de uma espécie na mesma cultura, a alta variabilidade genética desse grupo de patógenos, dificulta a identificação do gênero *Colletotrichum* (LUONGO et al., 2022; CARRARO et al., 2022; DAMM et al., 2020; CASTILHO et al., 2007), o controle da doença também é dificultado por diferenças no potencial agressivo do patógeno, diferentes respostas a testes de sensibilidade aos grupos de fungicidas e diferentes graus de resistência da cultura hospedeira a cada espécie do gênero (ANTONIO et al., 2021; DAMM et al., 2020). Antonio et al. (2021); Kamei et al. (2014) citam que um grupo ou complexo de *Colletotrichum* spp. pode ser patogênico a diversas culturas, bem como uma cultura pode ser suscetível e acometida por mais de uma espécie do patógeno ou um complexo. Infere-se a necessidade de estudos completos deste fitopatógeno na cultura da erva-mate.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Consulta regulamentação agrotóxicos. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 07 abr. 2023.
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo de Relações Patógeno-Hospedeiro. In: AMORIM, L. et al. (ed.). **Manual de Fitopatologia**, v. 1, 5ª ed. 2018. p. 46-68.
- ANTONIO, G. L.; SCALOPPI JUNIOR, E. J.; FISHER, I. H.; FURTADO, E. L.; FIRMINO, A. C. Clonal resistance of rubber tree to *Colletotrichum* spp. **Forest Pathology**, v. 51, p. 1-6, 2021. DOI: 10.1111/efp.12685.
- AUER, C. G.; DOS SANTOS, A. F. dos. Doenças da Erva-Mate. In: Amorim, L. et al. (ed.). **Doenças de Plantas Cultivadas**. 5 ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. p. 343-349.
- BENSO, L.A.; PIERONI, L.P.; MIRA, Y.D; MARQUES, A.; CIRIELLO, V.; ROSSINI, B. C.; FURTADO, E. L. First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing leaf spot in *Khaya* spp.. **Australasian Plant Dis**, v. 18, n. 1, p. 1-5, 2023. DOI: 10.1007/s13314-023-00502-5.
- BEDENDO, I. P. Murchas Vasculares. In: AMORIM, L. et al. (ed.). **Manual de Fitopatologia**, v. 1, 5ª ed. 2018. p. 333-338.
- CARRARO, T. de A.; LICHTENBERG, P. D. S. F.; MICHAILIDES, T. J.; BORGES; M. I. M.; PEREIRA, W. V.; DE MIO, L. L. M. Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on persimmon in Brazil. **Fungal Biology**, v. 126, n. 3, p. 235-249, 2022. DOI: 10.1016/j.funbio.2021.12.003.
- CASTILHO, L. B., REIS, A., HENZ, G. P. Identificação morfológica de isolados de *Colletotrichum* spp. Causadores de antracnose em solanáceas. Embrapa Hortaliças. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 29. 2007.
- CENTENARO, M.; SATTLER, S. A.; SILVEIRA, C. V. DA.; OLIVEIRA, H. C. C. R. DE. Evolução da produção e tecnologias no cultivo de erva-mate: análise entre Brasil e Argentina. **Profanações**, v. 7, p. 90-107, 2020. DOI: 10.24302/prof.v7iEd.
- DAMM, U., SUN, YC.; HUANG, CJ. *Colletotrichum eriobotryae* sp. nov. and *C. nymphaeae*, the anthracnose pathogens of loquat fruit in central Taiwan, and their sensitivity to azoxystrobin. **Mycol Progress** 19, 367–380, 2020. DOI: 10.1007/s11557-020-01565-9.
- DIMAYACYAC, D. A.; BALENDRES, M. A. First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing post-harvest anthracnose of tomato in the Philippines. **New Disease Reports**, v. 46, n. 2, 2022. DOI: 10.1002/ndr2.12125.

EMBRAPA. **Erva-mate. 2019**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/florestas/transferencia-de-tecnologia>. Acesso em: 20 ago. 2021.

FAVARETTO, L.; FAVARETTO, J.; LISBINSKI, F. C.; CORONEL, D. A. DESEMPENHO DOS PRINCIPAIS ESTADOS BRASILEIROS EXPORTADORES DE ERVA-MATE (2000-2020). **Gestão & Regionalidade**, n. 39, 2023.

FODRA, T. C. W. **Dinâmica das relações comerciais de erva-mate entre Brasil e seus principais importadores**. 2019. 36 f. Monografia de especialização (Gestão Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

GEBARA, K. S., GASPAROTTO-JUNIOR, A., SANTIAGO, P. G., CARDOSO, C. A. L., DE SOUZA, L. M., MORAND, C.; CARDOZO-JUNIOR, E. L. Daily intake of chlorogenic acids from consumption of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) traditional beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 46, p. 10093-10100, 2017. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b04093.

GELAIN, J.; LYKINS, S.; ROSA, P. F.; SOARES, A. T.; DOWLING, M. E.; SCHNABEL, G.; MAY DE MIO, L. L. Identification and Fungicide Sensitivity of *Colletotrichum* spp. from Apple Flowers and Fruitlets in Brazil. **Plant Disease**, 2022. DOI: 10.1094/PDIS-01-22-0243-RE.

GOMES, N. S. B.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G.; WIELEWSKI, P.; VALLE, G. M. **PATOGENICIDADE DE *Colletotrichum acutatum* EM FOLHAS DESTACADAS DE ERVA-MATE**. Colombo: Embrapa Florestas. 2001.

GRIGOLETTI-JÚNIOR, A.; AUER, C. G. Doenças da erva-mate: identificação e controle. EMBRAPA-CNPQ, 1996. **Relatório Técnico**.

HEGEL, P.; GRANONE, L. I.; HRNČIČ, M. K.; PEREDA, S.; KOTNIK, P.; KNEZ, Z. Alkaloid-rich vs. antioxidant-rich yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts: Exploiting the selectivity of supercritical CO₂ using hydrated ethanol as co-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 172, p. 105-200, 2021. DOI: 10.1016/j.supflu.2021.105200.

HYDE, K. D.; CAI, L.; MCKENZIE, E. H. C.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z.; PRIHASTUTI, H. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 1-17, 2009. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20198646065>. Acesso em: 11 abr. 2023.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal**. Tabela 1612 - Área plantada, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras temporárias. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613>>. Acesso em: 30 jun. 2023.

KAMEI, S. H.; COSTA, J. F. D. O.; BRITO NETTO, M. D. S.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. D. A Identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de anonáceas no estado de Alagoas. **Revista Brasileira**

de Fruticultura, v. 36, p. 209-216, 2014. DOI: 10.1590/S0100-29452014000500025.

LACERDA, A. E. B. de. Série erva-mate sombreada (2): sistema de restauração produtivo agroflorestal. Colombo: Embrapa Florestas. 2019. **Relatório Técnico**.

LUONGO, L.; GALLI, M.; GARAGUSO, I.; PETRUCCI, M.; VITALE, S. First Report of *Colletotrichum fioriniae* and *C. nymphaeae* as Causal Agents of Anthracnose on Walnut in Italy. **Plant Disease**, v. 106, n. 1, p. 327, 2022. DOI: 10.1094/PDIS-05-21-1062-PDN.

LOPEZ, M. T. G.; SERRANO, M. S.; CAMILETTI, B. X.; GORDON, A.; ESTUDILLO, C.; TRAPERO, A.; MORAL, J. Study of the competition between *Colletotrichum godetiae* and *C. nymphaeae*, two pathogenic species in olive. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-32585-6.

MARIN-FELIX, Y.; GROENEWALD, J. Z.; CAI, L.; CHEN, Q.; MARINCOWITZ, S.; BARNES, I., ... & CROUS, P. W. **Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1**. Studies in mycology, 86, 2017. 99-216.

MASSOLA JUNIOR, N. S. Fungos Fitopatogênicos. In: AMORIM, L. et al. (ed.). **Manual de Fitopatologia**, v. 1, 5ª ed. 2018. p. 107-140.

MEZZOMO, R.; ROLIM, J. M.; POLETTO, T.; WALKER, C.; MILANESI, P. M.; MUNIZ, M. F. B. Caracterização molecular e grupos de compatibilidade vegetativa de *Fusarium* spp. patogênicos à *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Ciência Florestal**, v. 31, n. 2, p. 846–862, 2021. DOI: 10.5902/1980509846843.

PAULA, S.; WOLF, K. R.; MARTÍNI, A. F.; MILANESI, P. M. Fungal disease in "erva-mate". **Scientific Electronic Archives**, v. 11, n. 2, p. 27-34, 2018. DOI: 10.36560/1122018490.

PENTEADO JÚNIOR, J. F.; GOULART, I. C. G dos R. **Erva 20: sistema de produção para erva-mate**. Brasília: Embrapa, 2019.

PEREIRA, J. R. **PROGNOGNÓSTICO AGROPECUÁRIO - ERVA MATE 2022/2023**. Ed. Gisele Barão da Silva, Joabe Rodrigues Pereira. Governo do Estado do Paraná. 2022. Disponível: https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2022-01/erva-mate.pdf. Acesso em: 22 mai. 2023.

PIASSETTA, R. **Doenças em mudas clonais de erva-mate em duas épocas do ano-Guarapuava, Paraná**. 2022. 44 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2022.

POLETTI, I.; MUNIZ, M. F. B.; CECONI, D. E.; POLETTI, T. Aspectos epidemiológicos da podridão-de-raízes da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Ciência Florestal**, v. 25, p. 281-291, 2015. DOI: 10.5902/1980509818445.

RATTANAKREETAKUL, C.; KEAWMANEE, P.; BINCADER, S.; MONGKOLPORN, O.; PHUNTUMART, V.; CHIBA, S.; PONGPISUTTA, R.; CHAINARONG et al. Two Newly Identified *Colletotrichum* Species Associated with Mango Anthracnose in Central Thailand. **Plants**, v. 12, n. 5, p. 1130, 2023. DOI: 10.3390/plants12051130.

RUSKOVSKA, T.; MORAND, C.; BONETTI, C. I.; GEBARA, K. S.; JUNIOR, E. L. C.; MILENKOVIC, D. Multigenomic modifications in human circulating immune cells in response to consumption of polyphenol-rich extract of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) are suggestive of cardiometabolic protective effects. **British Journal of Nutrition**, v. 129, n. 2, p. 185-205, 2023. DOI: 10.1017/S0007114522001027.

SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO (SFB). **Sistema Nacional de Informações Florestais – SNIF**. Disponível em: < <http://snif.florestal.gov.br/pt-br/>>. Acesso em: 02 jul. 2023.

SUTTON, B. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Wallingford, UK: CABI, 1992. p.1-26.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**. Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1980.

TAN, Q.; SCHNABEL, G.; CHAISIRI, C.; YIN L-F.; YIN, W-X.; LUO, C. X. *Colletotrichum* Species Associated with Peaches in China. **Journal of Fungi**. 2022. DOI: 10.3390/jof8030313.

WANG, Y. X.; XU, X. W.; CAI, F.; HUANG, F. X.; CHEN, W. S.; WANG Q. Z. First Report of *Colletotrichum nymphaeae* Causing Walnut Anthracnose in China. **Plant Disease**. DOI: 10.1094/PDIS-02-22-0297-PDN.

WENDLING, I.; SANTAROSA, E.; PENTEADO JUNIOR, J.; AUER, C. G.; PENTEADO, S.; DE QUEIROZ, D. L.; DOS SANTOS, A. F. **Manual de produção de mudas clonais de erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 47 p. 2020.

ZHANG, W.; DAMM, U; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; NIU, X.; LIN, J.; LI, Y. Anthracnose Disease of Carpetgrass (*Axonopus compressus*) Caused by *Colletotrichum hainanense* sp. nov. **Plant disease**, v. 104, n. 6, p. 1744-1750, 2020. DOI: 10.1094/PDIS-10-19-2183-RE.

CAPÍTULO I
CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGÊNICA DE
***Colletotrichum nymphaeae*, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DA**
ERVA-MATE

RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é a principal espécie florestal não madeireira do Sul do Brasil e a sua importância socioeconômica está vinculada ao consumo das suas folhas em chás quentes e gelados, fabricação de energizantes e cosméticos. A antracnose, causada por *Colletotrichum* sp., é um dos principais problemas fitossanitários e ocasiona danos em sementes, plântulas e brotações. Há poucos estudos com a antracnose e, nos últimos anos, esta doença vem ganhando importância pelas perdas causadas em viveiros e nos ervais já estabelecidos. No entanto, ainda há dúvidas sobre qual a espécie de *Colletotrichum* é o agente causal da antracnose e, até o momento, nenhum estudo filogenético foi realizado com este patógeno. O objetivo deste estudo foi caracterizar morfológica e molecularmente isolados patogênicos de *Colletotrichum nymphaeae* oriundos de regiões produtoras brasileiras visando a identificação específica do patógeno. Os isolados foram obtidos de amostras de folhas e caules sintomáticos oriundos de viveiros e ervais dos estados do Paraná e Rio Grande do Sul. A patogenicidade foi confirmada de acordo com os postulados de Koch. A identificação foi feita com análise molecular dos genes ITS, GAPDH e TUB2 e as árvores filogenéticas foram inferidas pelo método da análise bayesiana e máxima verossimilhança. A caracterização cultural e morfofisiológica foi feita com avaliação das colônias de *C. nymphaeae* no verso e reverso das placas de Petri com meio BDA e os conídios e apressórios foram avaliados e classificados quanto às suas dimensões e forma. As colônias apresentaram variações de cores de salmão a acinzentado. As imagens foram feitas com o microscópio ótico. Os conídios foram classificados como fusiformes (11,95 - 3,12 μm) e os apressórios como levemente lobados e arredondados (7,26 - 4,62 μm). Os isolados do estudo agruparam com a espécie *Colletotrichum nymphaeae* (Pass) Aa. Ademais, verificou-se que esta espécie é patogênica à erva-mate e está envolvida na etiologia da antracnose da erva-mate no Sul do Brasil.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*; *Colletotrichum* genome; etiologia.

ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) is the main non-timber forest species in southern Brazil, and its socio-economic significance is linked to the consumption of its leaves in both hot and cold teas, as well as in the production of energizing beverages and cosmetics. Anthracnose, caused by *Colletotrichum* sp., is one of the major phytosanitary problems, leading to damage in seeds, seedlings, and shoots. There have been limited studies on anthracnose, but in recent years, this disease has been gaining importance due to the losses incurred in nurseries and established yerba mate plantations. However, uncertainties still exist regarding the specific *Colletotrichum* species serving as the causal agent of anthracnose, and so far, no phylogenetic study has been conducted on this pathogen. The objective of this study was to morphologically and molecularly characterize pathogenic isolates of *Colletotrichum nymphaeae* originating from Brazilian yerba mate-producing regions with the aim of specific pathogen identification. The isolates were obtained from samples of symptomatic leaves and stems collected from nurseries and yerba mate plantations in the states of Paraná and Rio Grande do Sul. Pathogenicity was confirmed in accordance with Koch's postulates. Identification was conducted through molecular analysis of the ITS, GAPDH, and TUB2 genes, and phylogenetic trees were inferred using Bayesian and maximum likelihood analysis. Cultural and morphophysiological characterization involved assessing the colonies of *C. nymphaeae* on both the obverse and reverse sides of Petri dishes containing PDA medium, and conidia and appressoria were evaluated and classified based on their dimensions and shape. Colonies displayed variations in color ranging from salmon to grayish. Images were captured using an optical microscope. Conidia were classified as fusiform (11.95 - 3.12 μm), while appressoria were slightly lobed and rounded (7.26 - 4.62 μm). The isolates from the study clustered with the species *Colletotrichum nymphaeae* (Pass) Aa. Furthermore, it was observed that this species is pathogenic to yerba mate and is involved in the etiology of yerba mate anthracnose in southern Brazil.

Keywords: *Ilex paraguariensis*; *Colletotrichum* genome; etiology.

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é o principal produto florestal não madeireiro da região Sul do Brasil e possui grande importância econômica, cultural e socioambiental (PEREIRA, 2022; LANDAU, et al., 2020; EMBRAPA, 2019). Além do consumo tradicional com bebida em cuias na forma de chimarrão ou tereré, o setor ervateiro dispõe de novos produtos, que utilizam compostos extraídos das folhas como matéria-prima para a indústria alavancando o potencial de consumo da cultura na produção de chás gelados, bebidas tônicas, formulações energizantes e produção de cosméticos (RUSKOVSKA et al., 2023; HEGEL et al. 2021; CENTENARO et al., 2020; GEBARA et al., 2017).

A erva-mate, ao integrar a economia dos estados sulistas do Brasil, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, desempenha um papel significativo na composição econômica dos produtos florestais, no estado do Paraná representou 18% de participação neste setor no ano de 2021 (PEREIRA, 2022). Além disso, ao se concentrar a análise exclusivamente nos dados referentes aos produtos não madeireiros, a sua contribuição se destaca ainda mais, totalizando 87% do valor gerado pela produção das culturas enquadradas nessa categoria (PEREIRA, 2022).

A antracnose, causada por *Colletotrichum* sp., é um dos principais problemas fitossanitários da erva-mate e ocasiona danos em sementes, plântulas e brotações (AUER; DOS SANTOS, 2016). *Colletotrichum* sp. pode infectar diferentes partes das plantas, incluindo as folhas, caules, flores e frutos, com sintomas variando de manchas escuras a deformações e morte do tecido infectado (AUER; DOS SANTOS, 2016; GOMES et al., 2001).

Há poucos estudos com a antracnose da erva-mate e, nos últimos anos, esta doença vem ganhando importância pelas perdas causadas aos viveiros e ervais já estabelecidos (PENTEADO JÚNIOR; GOULART, 2019; AUER; DOS SANTOS, 2016). Dentre os estudos com o gênero *Colletotrichum*, Marin-Felix et al. (2017), destacam a relevância da utilização de análises moleculares com diferentes regiões genéticas para a identificação em nível de gênero e espécie. Essas abordagens moleculares oferecem informações valiosas sobre a diversidade genética e

filogenia do gênero *Colletotrichum* permitindo uma caracterização mais robusta e acurada (MARIN-FELIX et al., 2017).

Entretanto, apesar dessas informações, ainda há dúvidas sobre qual é a espécie de *Colletotrichum* causadora da antracnose na erva-mate. Na literatura há poucas informações sobre a espécie causadora da antracnose em erva-mate e alguns autores como Auer e Dos Santos (2016); Grigolletti e Auer, (1996) relataram o envolvimento das espécies *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. yerbae* Speg.. No entanto, as informações morfológicas disponíveis na literatura são insuficientes e há uma lacuna na aplicação de análises moleculares confirmatórias para determinar a espécie envolvida nessa interação entre a planta hospedeira e o fitopatógeno. Nesse sentido, há necessidade de estudos taxonômicos com características morfológicas e o uso de técnicas moleculares para elucidar a identificação a nível de espécie (RATTANAKREETAKUL et al., 2023; ZHANG et al., 2020; CARRARO et al., 2022).

O objetivo do presente estudo foi identificar a espécie de *Colletotrichum* causadora da antracnose da erva-mate com base na caracterização morfológica, patogênica e molecular, a partir de isolados oriundos de regiões produtoras.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, Colombo-PR. Foram caracterizados 34 isolados (Tabela 1) de *Colletotrichum nymphaeae* provenientes de regiões produtoras de erva-mate dos estados do Rio Grande do Sul e Paraná (Figura 1). Os isolados foram obtidos a partir de plantas adultas e mudas com lesões típicas de antracnose.

TABELA 1 – LISTA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum nymphaeae* DE ERVA-MATE USADOS NESTE ESTUDO

ISOLADOS DE <i>C. nymphaeae</i>	Local de coleta	ORIGEM
PR 1	Colombo/PR	Muda
PR 2	Guarapuava/PR;	Muda
PR 3	Colombo/PR	Muda
PR 4	Colombo/PR	Muda
PR 5	Colombo/PR	Muda
PR 6	Colombo/PR	Muda
PR 7	Colombo/PR	Muda
PR 8	Cruz Machado/PR	Muda
PR 9	Cruz Machado/PR	Muda
PR 10	União da Vitória/PR	Muda
PR 11	União da Vitória/PR	Muda
PR 12	Guarapuava/PR;	Muda
PR 13	Cruz Machado/PR	Muda
PR 14	Colombo/PR	Jardim Clonal
PR 15	Colombo/PR	Jardim Clonal
PR 16	Colombo/PR	Jardim Clonal
PR 17	Colombo/PR	Jardim Clonal
PR 18	Cruz Machado/PR	Teste de progênies
PR 19	Cruz Machado/PR	Teste de progênies
PR 20	Colombo/PR	Jardim Clonal; Embrapa
PR 21	Colombo/PR	Jardim Clonal; Embrapa
RS 1	Ilópolis/RS	Planta adulta
RS 2	Ilópolis/RS	Planta adulta
RS 3	Ilópolis/RS	Planta adulta
RS 4	Ilópolis/RS	Planta adulta
RS 5	Ilópolis/RS	Planta adulta
RS 6	Ilópolis/RS	Planta adulta
RS 7	Ilópolis/RS	Planta adulta
RS 8	Ilópolis/RS	Muda

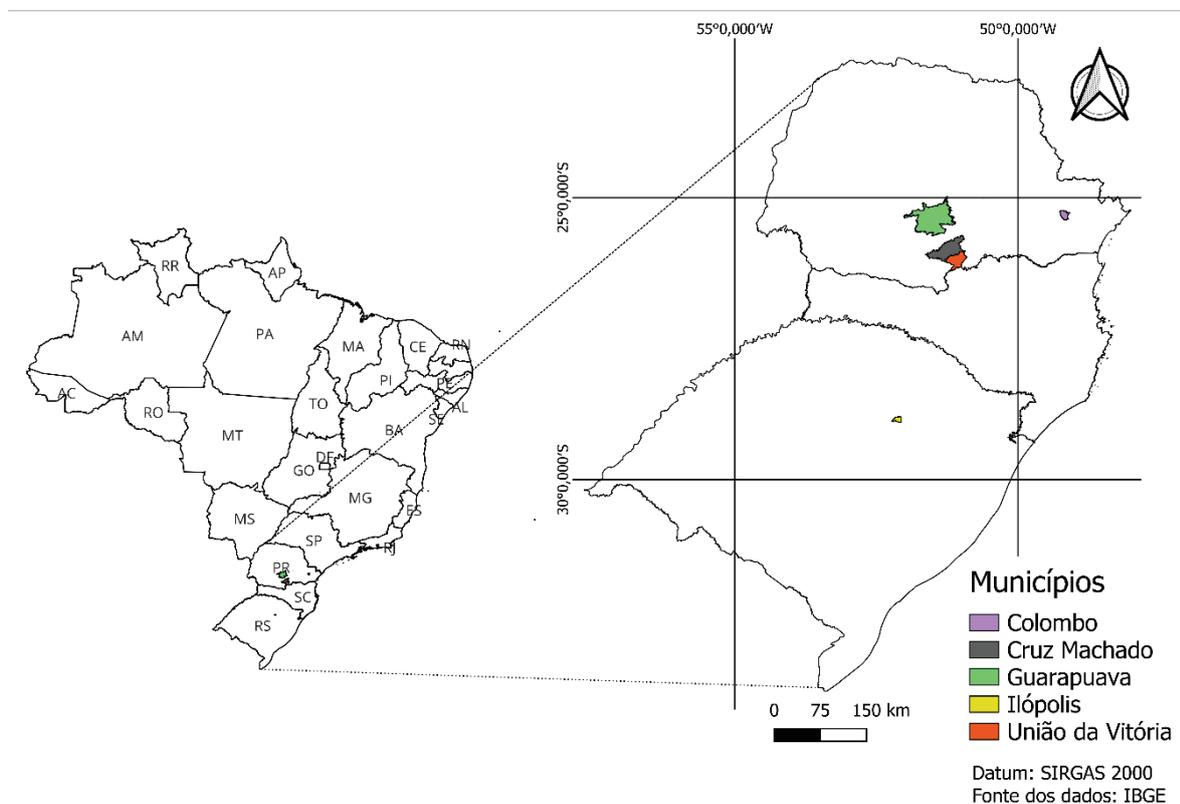
Continua...

Continuação...

RS 9	Ilópolis/RS	Muda
RS 10	Ilópolis/RS	Planta adulta
RS 11	Ilópolis/RS	Planta adulta
RS 12	Ilópolis/RS	Planta adulta
RS 13	Ilópolis/RS	Planta adulta

FONTE: A autora (2023).

FIGURA 1 – LOCAIS DE COLETA DAS AMOSTRAS PARA OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum nymphaeae* NOS ESTADOS DO PARANÁ (PR) E RIO GRANDE DO SUL (RS)



FONTE: A autora (2023)

2.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum*

Para o isolamento de *C. nymphaeae*, foram usadas folhas sintomáticas de erva-mate, com manchas escuras nas folhas, com cor marrom a cinza escuro, com bordas avermelhadas. As folhas foram lavadas com água de torneira e, em seguida, com auxílio de um bisturi, foram obtidos fragmentos dos tecidos da transição entre

as regiões sadia e sintomática. Os fragmentos da folha e do caule foram desinfestados superficialmente com álcool 70% (1 min), solução de hipoclorito de sódio 1,0 % (30 s), seguido de tríplice lavagem com água esterilizada e, ao final, secos em papel mata-borrão esterilizado.

Os fragmentos dos tecidos da folha e caule foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) suplementado com cloranfenicol (40 ppm) e ampicilina (80 ppm). As placas de Petri foram acondicionadas em estufa com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h luz, por cinco dias. Após este período, os isolamentos que apresentaram colônias típicas de *Colletotrichum* foram repicados para placas de Petri contendo meio BDA natural (200 g batata; 20 g ágar; 20 g dextrose; 1 L água) e incubadas em estufa em temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h luz, por sete dias.

2.2 OBTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DE CULTURAS MONOSPÓRICAS

As culturas monospóricas foram obtidas de acordo com a metodologia descrita por Dos Santos et al. (2007). As culturas de *C. nymphaeae* foram crescidas em meio BDA natural, em temperatura de 25 ± 2 °C sob fotoperíodo de 12h luz, por sete dias. Para obtenção de conídios germinados, um disco de meio de cultura BDA (5 mm de diâmetro) com micélio com esporulação foi transferido para tubo de ensaio contendo 9 mL de água esterilizada e, então, o tubo foi agitado por 10 s para homogeneização da suspensão. Após, foram pipetados 100 µL da suspensão de conídios para placa de poliestireno descartável (9 cm de diâmetro) contendo meio ágar-água 2% (AA). A suspensão de conídios foi espalhada com auxílio da alça de Drigalski na superfície do meio AA. As placas foram incubadas em estufa por 18h, à temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12h luz.

Os conídios germinados foram identificados com auxílio de um microscópio ótico, objetiva 10x, e transferidos, individualmente, para placas de Petri com meio AA. Após o crescimento micelial da cultura de *C. nymphaeae*, um representante de cada isolado foi repicado para placa de Petri com meio BDA natural e incubado nas condições descritas anteriormente para crescimento e preservação.

Os 34 isolados de *C. nymphaeae* foram preservados pelo método Castellani (GONÇALVES et al., 2016) e estão mantidos na coleção de Fungos e Oomicetos da Embrapa Florestas, Colombo, PR. Foram retirados cinco discos (5 mm de

diâmetro) de meio BDA com micélio em crescimento ativo da borda da colônia e transferidos para frasco de vidro (10 mL) contendo 5 mL de água esterilizada. Os recipientes foram lacrados com tampa de borracha e, posteriormente, com tampa de metal de vedação. Todo procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar e os frascos foram etiquetados e estão mantidos em sala climatizada com temperatura com variação entre 15 a 20 °C.

2.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

2.2.1 Obtenção do DNA

Nos isolamentos em meio de cultura BDA suplementado com ampicilina (80 ppm) e cloranfenicol (40 ppm) foram obtidos os isolados de *C. nymphaeae* utilizados para caracterização molecular. As colônias utilizadas para extração do DNA foram crescidas em meio BDA sintético, sem suplementação de antibióticos. Neste estudo foram utilizados quatro isolados de *C. nymphaeae* selecionados com o propósito de representar o grupo amostral inicial, priorizando a utilização de isolados representantes de diferentes regiões geográficas e com diferentes características de cor de colônia.

Para obtenção do DNA foi utilizado kit de extração Loccus Extracta Kit Fast e as etapas foram realizadas conforme protocolo do fabricante. Após extração, com auxílio de um espectrofotômetro, foi ajustada com solução tampão TE a concentração final de DNA para o intervalo de 5 e 10 µg ml⁻¹. O DNA foi armazenado em freezer para uso posterior.

2.2.2 Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Conforme metodologia adaptada de Marin-Felix et al. (2017), nos testes de PCR foram amplificadas as regiões 5.8S (ITS) do DNA ribossômico, GAPDH (glicerdeído-3-fosfato desidrogenase) e TUB2 (β-tubulina 2). Para ampliações das regiões ITS, GAPDH e TUB2 foram utilizados os primers descritos (Tabela 2), a reação de PCR foi montada com variações dos seguintes parâmetros de ciclo: 94 °C por 4 min; 35 ciclos de 94 °C por 45 s; 60 °C por 45 s; 72 °C durante 1 min; e extensão final a 72 °C por 10 min. As amostras foram sequenciadas na empresa GoGenetic® (<https://www.gogenetic.com.br>).

TABELA 2 – DESCRIÇÃO DOS PRIMERS UTILIZADOS PARA SEQUENCIAMENTO E SUAS REFERÊNCIAS

GENE*	PRIMER	DIREÇÃO	SEQUÊNCIA (5'-3')	REFERÊNCIA
ITS	ITS1	Forward	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	White et al. (1990)
ITS	ITS4	Reverse	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White et al. (1990)
GAPDH	GDF1	Forward	GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA	Templeton et al. (1992)
GAPDH	GDR1	Reverse	GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT	Templeton et al. (1992)
TUB2	T1	Forward	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT;	O'Donnell e Cigelnik (1997)
TUB2	BT2B	Reverse	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	Glass e Donaldson (1995)

*ITS: DNA ribossômico; GAPDH (glicerdeído-3-fosfato desidrogenase) e TUB2 (β -tubulina 2).

FONTE: A autora (2023).

2.2.3 Análise dos dados

Os dados obtidos com a análise de PCR foram utilizados para comparação com os dados disponíveis do gênero *Colletotrichum* no banco de dados GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Após a inspeção visual das sequências obtidas realizada no software MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>), foi realizado o BLAST para cada isolado analisado. A partir dos dados que retornaram, foram escolhidas sequências confiáveis e representativas. o alinhamento foi feito utilizando o programa MAFF online (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>).

O modelo evolutivo que mais se ajusta de acordo com a substituição dos nucleotídeos foram estimados utilizando o plugin ModelFinder dentro do software PhyloSuite (<https://dongzhang0725.github.io/>). Utilizando o critério Corrected AIC (AICc) os modelos foram estimados separadamente para cada região genômica. A análise filogenética de Máxima Verossimilhança e de Inferência Bayesiana foram feitas e as árvores construídas com a utilização do software PhyloSuite, as árvores filogenéticas foram visualizadas com o programa FigTree v. 1.4.3 (www.tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/) a edição foi realizada no software gráfico

Inkscape (www.inkscape.org/). As sequências derivadas deste estudo serão depositadas no banco de dados do GenBank.

2.3 CARACTERIZAÇÃO CULTURAL E MORFOLÓGICA

A caracterização cultural foi realizada pela avaliação da cor e textura da colônia de *C. nymphaeae*, conforme metodologia de Carraro et al., (2022) e Dos Santos et al. (2007). Neste estudo, foram utilizados 17 isolados de *C. nymphaeae* selecionados com o propósito de representar a diversidade de características, tanto cultural como as características morfológicas observadas no conjunto amostral inicial. Além disso, foi priorizada a utilização de isolados representantes de diferentes regiões geográficas.

A avaliação da cor da colônia foi realizada por meio da análise visual das colônias aos três, cinco e sete dias de incubação, objetivando acompanhar as alterações na cor e textura das colônias. Para isso, um disco de meio BDA natural com micélio em crescimento ativo do isolado de *C. nymphaeae* com sete dias de idade foi colocado no centro de uma placa de Petri de (9 mm de diâmetro) contendo meio BDA natural. As placas foram incubadas em estufa com temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12h luz. O experimento foi composto de três repetições por isolado, cada repetição foi representada por uma placa de Petri.

Para as avaliações, discos de meio BDA natural com micélio em crescimento micelial ativo das culturas de *C. nymphaeae* foram repicadas para placas de Petri contendo meio BDA natural e incubadas em estufa, em temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12h luz, por sete dias.

2.3.1 Avaliação da forma e das dimensões dos conídios

Com auxílio de uma agulha flambada foi coletada uma parte do micélio fúngico esporulante da placa de Petri com meio BDA natural e, em seguida, depositada em lâmina contendo uma gota de lactoglicerol + corante azul de algodão. Foram avaliados, aleatoriamente, 50 conídios por isolado de *C. nymphaeae*, utilizando o microscópio Zeiss Axio Lab.A1, com software ZEN 2.3 lite. A ampliação utilizada no microscópio foi ajustada para 400x. A dimensão do conídio foi determinada por meio da medição do comprimento e da largura. De acordo com sua forma, os conídios foram classificados em: cilíndrico, fusiforme e clavado,

segundo Sutton (1980) e Cox e Irwin (1988). Os resultados dos valores de comprimento e largura foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey com 5% de probabilidade no software R.

2.3.2 Avaliação da forma dos apressórios

Para formação dos apressórios, uma lâmina de microscopia foi colocada no interior de uma placa de Petri esterilizada e sobre a lâmina foram vertidos 1 mL de suspensão de esporos em água (1×10^5 conídios/mL), calibrada com auxílio da câmara de Neubauer. A placa foi fechada e incubada por 24h, no escuro, em temperatura de 25 ± 2 °C. Para avaliação dos apressórios foram preparadas lâminas com corante lactoglicerol + azul de algodão. Para visualização e obtenção das imagens foi utilizado um microscópio Zeiss Axio Lab.A1, com software ZEN 2.3 lite, a ampliação utilizada foi 400x. A dimensão do apressório foi determinada por meio da medição do comprimento e da largura. Os apressórios foram classificados, conforme Sutton (1980), nas seguintes formas: lobado, levemente lobado e arredondado. Foram avaliados, aleatoriamente, 25 apressórios por isolado. Os resultados dos valores de comprimento e largura foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey com 5% de probabilidade no software R.

2.4 EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICELIAL DE ISOLADOS DE *Colletotrichum nymphaeae*

Neste experimento, um disco (5 mm de diâmetro) de meio BDA natural com micélio em crescimento ativo do isolado de *C. nymphaeae* com sete dias de idade, foi depositado no centro de cada placa de Petri contendo meio de cultura BDA natural. Os isolados foram organizados aleatoriamente dentro de cada estufa, em cada temperatura. As temperaturas de incubação foram 12, 16, 20, 24, 28 e 32 °C.

A avaliação do crescimento micelial dos isolados de *C. nymphaeae* foi obtida com a mensuração do diâmetro das colônias, com paquímetro digital em duas medições cruzadas, aos três, cinco, sete e nove dias após a incubação. O experimento foi composto de três repetições por isolado, cada repetição foi constituída por uma placa de Petri. O experimento foi repetido duas vezes.

O índice de velocidade de crescimento da colônia foi calculado seguindo a fórmula proposta por Oliveira (1991):

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

Onde:

IVCM = Índice de Velocidade do Crescimento da Colônia;

D = Diâmetro médio atual;

Da = Diâmetro médio do dia anterior;

N = Número de dias após a inoculação.

Os dados de velocidade de crescimento micelial foram trabalhados no software Excel e as análises gráficas foram criadas no software R.

2.5 TESTE DE PATOGENICIDADE

Para o teste de patogenicidade, utilizou-se folhas jovens saudáveis destacadas de mudas de erva-mate. As folhas saudáveis de erva-mate foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% por 1 min, seguido de solução de hipoclorito de sódio 1,0 % por 30 s e posterior tríplice lavagem com água esterilizada por 3 min e, então, colocadas em caixas 'gerbox' contendo papel 'mata borrão' autoclavado umedecido com água esterilizada.

O inóculo foi obtido retirando-se disco (5 mm de diâmetro) de meio BDA natural com micélio em crescimento ativo da borda da colônia do isolado de *C. nymphaeae*. Esta cultura foi produzida em meio BDA natural, incubada em estufa com temperatura de 25 °C, sob fotoperíodo de 12h luz, por sete dias.

As folhas jovens foram inoculadas na face adaxial e o ferimento foi feito na região central do limbo foliar com um conjunto de agulhas (diâmetro de 5 mm). As caixas 'gerbox' com os tratamentos foram incubadas em sala climatizada com temperatura de 25 °C, fotoperíodo de 12h luz, por sete dias.

A avaliação do teste de patogenicidade foi feita observando-se o aparecimento de lesões nas folhas inoculadas com o patógeno. A confirmação da patogenicidade foi obtida por meio da aplicação dos postulados de Koch.

Os postulados foram estruturados da seguinte maneira: primeiramente, realizou-se o isolamento direto e indireto de folhas de erva-mate que apresentavam lesões características de antracnose. Os isolados foram cultivados em meio de cultura BDA natural, seguindo as mesmas condições anteriormente descritas. Após sete dias, os isolados foram inoculados em folhas jovens e saudáveis de erva-mate. A partir da observação dos sintomas e sinais da doença, procedeu-se ao reisolamento do fitopatógeno. A identificação do fitopatógeno foi realizada por meio de análise de características da cor forma de micélio da colônia e morfologia de conídios e apressórios.

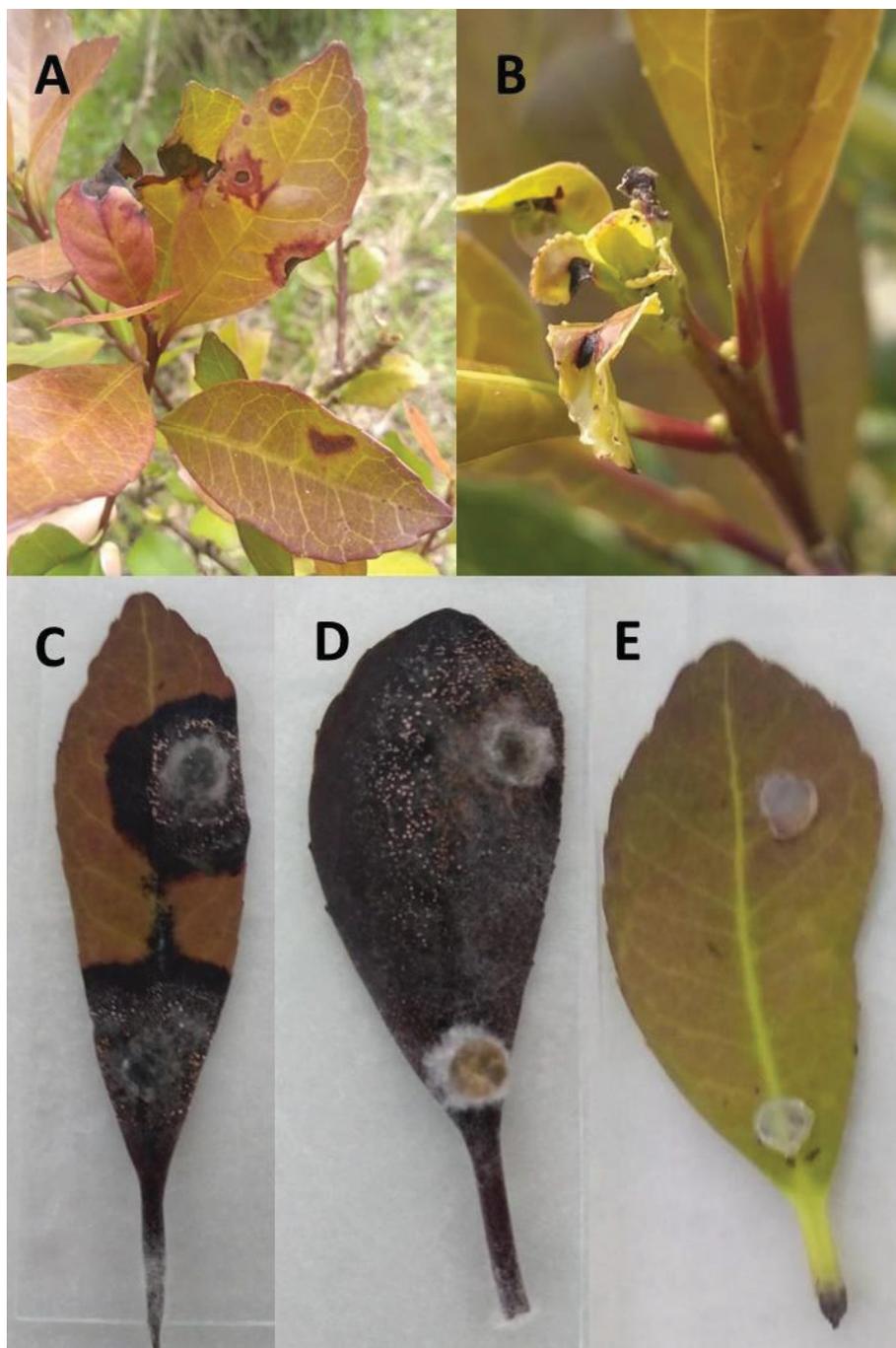
3 RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO SINTOMATOLÓGICA E PATOGENICIDADE

Os sintomas de antracnose caracterizam-se por manchas escuras nas folhas, com cor marrom a cinza escuro, com bordas avermelhadas (Figura 2A e 2B). As lesões são inicialmente ovaladas e posteriormente coalescem em toda extensão do limbo foliar (Figura 2). As lesões apresentam aspecto necrótico após a fase inicial. Os acérvulos, sinais do patógeno, presentes nas lesões foliares esporulantes, possuem cor alaranjada a marrom escuro e aspecto de mucilagem, podendo ser visualizados a olho nu (Figura 2C e 2D).

Todos os isolados de *C. nymphaeae* foram patogênicos à erva-mate (Figura 2). Os sintomas formados nas folhas inoculadas foram lesões de cor escura e em algumas lesões foi observada a presença de acérvulos. A patogenicidade foi confirmada com os Postulados de Koch. A partir da observação dos sintomas e sinais da doença, procedeu-se ao reisolamento do fitopatógeno e a identificação por meio de análise de características culturais e morfológicas.

FIGURA 2 – SINTOMAS DE ANTRACNOSE EM FOLHAS JOVENS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) ORIUNDOS DE INFECÇÃO NATURAL NO CAMPO (A e B) E INOCULAÇÃO (C, D e E) DE *Colletotrichum nymphaeae* EM MUDA E EM CASA DE VEGETAÇÃO



NOTA: Folha com sintomas em campo (A-B); Folha com sintomas (C-D): Inoculadas com dois discos de micélio de *Colletotrichum nymphaeae* (5 mm). Folha testemunha (E): Inoculadas com dois discos de BDA natural sem o fungo (5 mm).

FONTE: A autora (2023).

3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

O modelo evolutivo que mais se ajustou de acordo com o software ModelFinder, com o critério Corrected AIC (AICc) para a análises de Inferência Bayesiana (IB) e máxima verossimilhança (ML) foram os modelos SYM para ITS, HKY + F + I para GAPDH, K2P para TUB2, e GTR + F + G4 para a concatenação dos genes.

Para a construção das árvores filogenéticas individuais e multigênicas, geradas com os valores de suporte de bootstrap, foram obtidas 21 sequências nucleotídicas para referência de espécies do gênero *Colletotrichum*, utilizadas separadamente e concatenadas para construção do alinhamento multigênico. A sequência de *C. fructicola* serviu como *outgroup* (TABELA 3).

TABELA 3 – ESPÉCIES DO COMPLEXO *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* UTILIZADAS NAS ANÁLISES FILOGENÉTICAS, COM OS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO E NÚMERO DO GENBANK

Espécie	Origem	Coleção	Acesso GenBank			Complexo
			ITS*	TUB2*	GAPDH*	
<i>C. nymphaeae</i>	Rio Grande do Sul	Embrapa Florestas	-	-	-	<i>C. acutatum</i>
<i>C. nymphaeae</i>	Rio Grande do Sul	Embrapa Florestas	-	-	-	<i>C. acutatum</i>
<i>C. nymphaeae</i>	Holanda	CBS 126513	JQ948553	JQ948223	JQ949874	<i>C. acutatum</i>
<i>C. nymphaeae</i>	Lemid UFPR	LEMIDPRDk 18-7	MN958847	MN982443	MN982430	<i>C. acutatum</i>
<i>C. nymphaeae</i>	Lemid UFPR	LEMIDPRDk 18-4	MN956519	MN982442	MN982429	<i>C. acutatum</i>
<i>C. guajavae</i>	India	IMI 350839	JQ948270	JQ949921	JQ948600	<i>C. acutatum</i>
<i>C. melonis</i>	Brasil	CBS 159.84	JQ948194	JQ949845	JQ948524	<i>C. acutatum</i>
<i>C. fructicola</i>	Lemid UFPR	LEMIDPRDk 18-52	MK208463	MK205153	MK208861	<i>C. gloeosporioides</i>

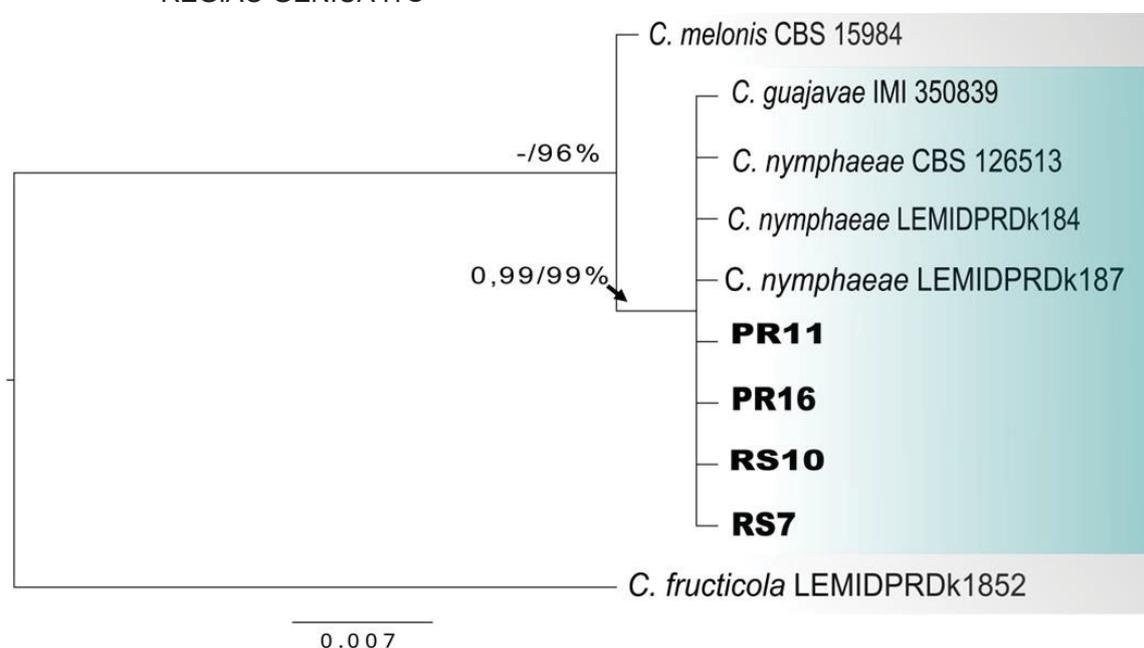
*ITS: DNA ribossômico; GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e TUB2 (β -tubulina 2).

Nota: (-) indica que ainda não foram depositadas as sequências.

FONTE: A autora (2023).

A árvore filogenética inferida com base na região ITS (563, 560, 564 e 560 pb) revelou que os isolados de RS 7, RS 10 e PR 11, PR 16, respectivamente representantes dos estados do Rio Grande do Sul e Paraná agruparam com acessos de *C. nymphaeae* e *C. guajavae*, num clado com suporte de 0,99 de probabilidade posterior (PP) e bootstrap de 99% obtidos com máxima verossimilhança (ML) (Figura 3). Essas espécies pertencem ao complexo *C. acutatum*.

FIGURA 3 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DO COMPLEXO *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* INCLUINDO O OUTGROUP, CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE INFERÊNCIA BAYESIANA E MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA COM A REGIÃO GÊNICA ITS



NOTA: Valores de suporte de probabilidade posterior (PP) e valores de bootstrap (BS) obtidos com máxima verossimilhança (ML) >0,50 são mostrados à esquerda dos nós. Os isolados obtidos neste estudo estão em negrito. O isolado *C. fructicola* LEMIDPRDk1852 está sendo utilizado como o outgroup. A barra de escala de 0,07 indica o número de alterações de nucleotídeos.

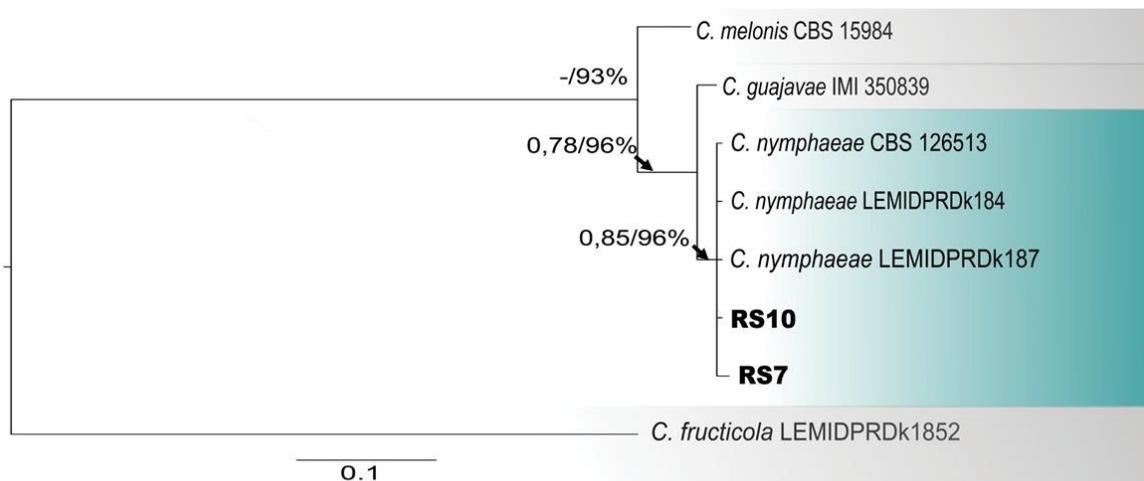
FONTE: A autora (2023).

Como a análise da região ITS não apresentou resolução suficiente para separar as espécies *C. nymphaeae* e *C. guajavae*, inferiu-se também árvores filogenéticas com base na análise dos genes GAPDH e TUB2.

A árvore filogenética inferida com base em GAPDH (186 e 250 pb) revelou que o isolado RS 7 e RS 10 agrupou no clado da espécie *C. nymphaeae* com suporte de 0,85 de probabilidade posterior (PP) e 96% de bootstrap obtidos com

máxima verossimilhança (ML) (Figura 4). Este gene permitiu separar as espécies *C. nymphaeae* de *C. guajavae*.

FIGURA 4 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DO COMPLEXO *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* INCLUINDO O *OUTGROUP*, CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE INFERÊNCIA BAYESIANA E MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA COM A REGIÃO GÊNICA GAPH

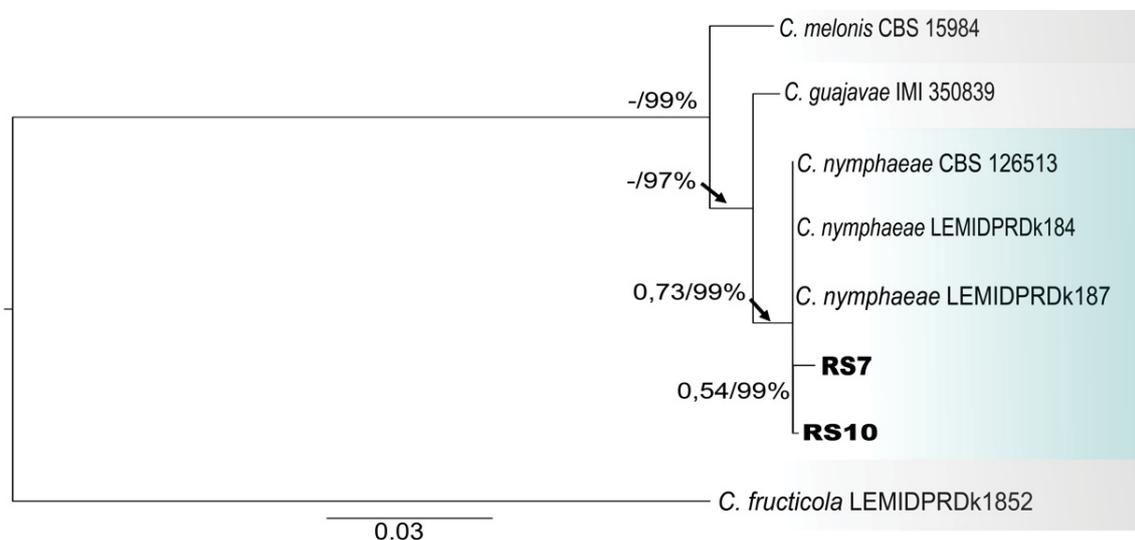


NOTA: Valores de suporte de probabilidade posterior (PP) e valores de bootstrap (BS) obtidos com máxima verossimilhança (ML) >0,50 são mostrados à esquerda dos nós. Os isolados obtidos neste estudo estão em negrito. O isolado *C. fructicola* LEMIDPRDk1852 está sendo utilizado como o outgroup. A barra de escala de 0,1 indica o número de alterações de nucleotídeos.

FONTE: A autora (2023).

A árvore filogenética inferida com base no gene TUB2 (690 e 747 pb) revelou que os isolados de RS7 e RS10 agruparam com acessos de *C. nymphaeae* em um clado com suporte de 0,73 de probabilidade posterior (PP) e 96% de bootstrap obtidos com máxima verossimilhança (ML) (Figura 5). Os dois isolados do estudo formaram um clado dentro do clado *C. nymphaeae* com suporte de 0,54 de probabilidade posterior (PP) e de bootstrap de 99%.

FIGURA 5 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DO COMPLEXO *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* INCLUINDO O OUTGROUP, CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE INFERÊNCIA BAYESIANA E MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA COM A REGIÃO TUB2

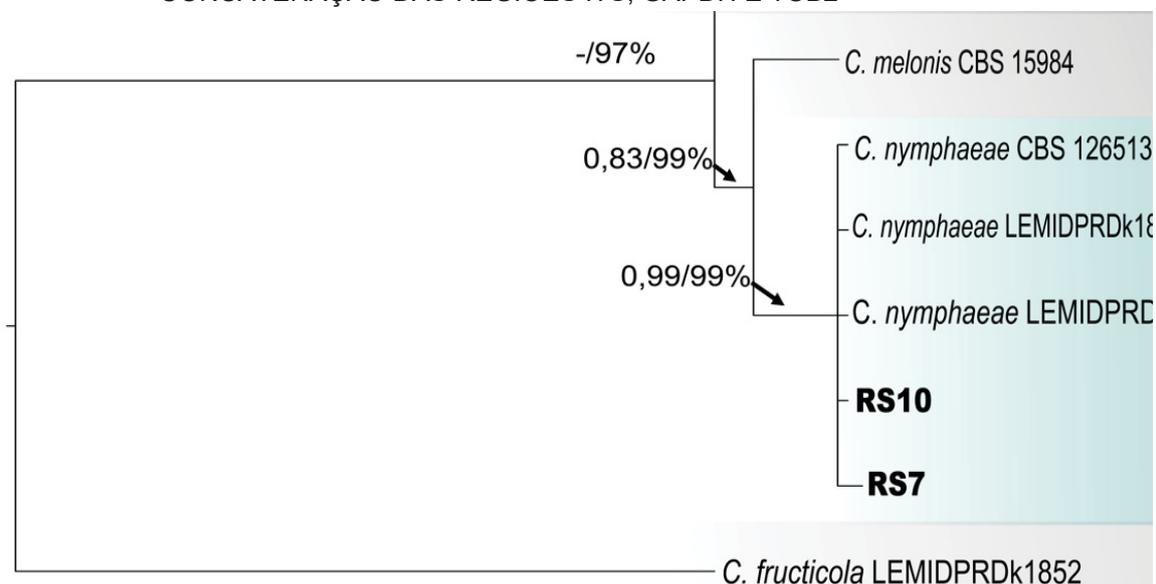


NOTA: Valores de suporte de probabilidade posterior (PP) e valores de bootstrap (BS) obtidos com máxima verossimilhança (ML) >0,50 são mostrados à esquerda dos nós. Os isolados obtidos neste estudo estão em negrito. O isolado *C. fructicola* LEMIDPRDk1852 está sendo utilizado como o outgroup. A barra de escala de 0,03 indica o número de alterações de nucleotídeos.

FONTE: A autora (2023).

A árvore filogenética inferidas com as sequencias de ITS, GAPDH e TUB2 concatenadas revelou que os isolados deste estudo, RS7 e RS10 agruparam com acessos da espécie *Colletotrichum nymphaeae* (Pass) Aa. com suporte de 0,99 de probabilidade posterior (PP) e 99% de bootstrap obtidos com máxima verossimilhança (ML) (Figura 6).

FIGURA 6 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DO COMPLEXO *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* INCLUINDO O OUTGROUP, CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE INFERÊNCIA BAYESIANA E MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA COM A CONCATENAÇÃO DAS REGIÕES ITS, GAPDH E TUB2



NOTA: Valores de suporte de probabilidade posterior (PP) e valores de bootstrap (BS) obtidos com máxima verossimilhança (ML) >0,50 são mostrados à esquerda dos nós. Os isolados obtidos neste estudo estão em negrito. O isolado *C. fructicola* LEMIDPRDk1852 está sendo utilizado como o outgroup. A barra de escala de 0,03 indica o número de alterações de nucleotídeos.

FONTE: A autora (2023).

3.3 CARACTERIZAÇÃO CULTURAL E MORFOLOGICA DE ESTRUTURAS DE *Colletotrichum nymphaeae*

Os resultados dos 17 isolados de *C. nymphaeae* caracterizados culturalmente e morfológicamente estão apresentados a seguir (Tabela 4).

TABELA 4 – ISOLADOS DE *Colletotrichum nymphaeae* DE ERVA-MATE CARACTERIZADOS CULTURALMENTE E MORFOLOGICAMENTE

<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	VERSO DA COLÔNIA	REVERSO DA COLÔNIA	TEXTURA MICELIAL	CONÍDIOS		APRESSÓRIOS			
				Forma	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Forma	Comprimento (µm)	Largura (µm)
PR 2	Salmão rosado com borda clara	Salmão rosado	Cotonoso	Clavado	7	2	Lobado/Arredondado	5	4
					15	6		8	6
PR 4	Salmão rosado com borda clara e centro escuro	Salmão rosado	Cotonoso	Fusiforme	7	2	Levemente lobado/Arredondado	4	3
					15	6		8	6
PR 6	Salmão rosado borda para e escuro no centro	Salmão rosado borda para escuro no centro	Cotonoso	Fusiforme	10	2	Lobado/Arredondado	5	4
					18	6		8	7
PR 7	Branco na borda para cinza e marrom no centro com anéis em cor clara	Branco na borda para cinza cinza (uniforme) no centro	Liso/Cotonoso	Clavado/Cilíndrico	9	3	Levemente lobado/Arredondado	5	4
					15	5		8	6
PR 11	Cinza claro na borda para escuro no centro	Cinza claro (uniforme)	Liso/Cotonoso	Cilíndrico	9	3	Levemente lobado/Arredondado	6	4
					18	6		9	7

Continua...

Continuação...

PR 13	Salmão rosado com borda clara e escuro no centro	Salmão rosado borda para escuro no centro	Cotonoso	Cilíndrico	8 18	2 5	Levemente lobado/Arredondado	4 9	3 6
PR 14	Salmão rosado com borda clara	Salmão rosado borda para escuro no centro	Cotonoso	Cilíndrico	9 17	2 6	Levemente lobado/Arredondado	5 10	4 6
PR 15	Salmão rosado com borda clara	Salmão rosado borda para escuro no centro	Cotonoso	Cilíndrico	9 15	2 6	Levemente lobado/Lobado	5 8	4 6
PR 16	Salmão rosado com borda clara	Salmão rosado para escuro no centro	Cotonoso	Cilíndrico	8 16	2 6	Levemente lobado/Arredondado	4 10	3 7
PR 17	Salmão rosado com borda clara e escuro no centro	Rosado no centro para cinza-esbranquiçado (uniforme)	Cotonoso	Fusiforme	5 16	3 6	Lobado/Arredondado	4 9	4 7

Continua...

Continuação...

PR 20	Salmão rosado com borda clara e escuro no centro	Salmão rosado	Cotonoso	Cilíndrico	7 15	2 6	Levemente lobado/Lobado	4 9	4 7
PR 21	Salmão alaranjado e cinza escuro no centro	Rosado no centro para cinza-esbranquiçado (uniforme)	Cotonoso	Fusiforme	8 13	2 5	Lobado/Arredondado	7,8 4,8	3 5
RS 2	Borda branca delimitada com formato estrelar verde-acinzentado no centro	Branco-acinzentado	Cotonoso	Fusiforme	8 16	2 5	Levemente lobado/Arredondado	7,3 4	3 6
RS 7	Borda clara cinza/rosado, centro verde-acinzentado	Borda branca e centro verde-acinzentado	Cotonoso	Fusiforme	7 21	2 6	Levemente lobado/arredondado	8,5 4,1	3 6
RS 8	Salmão rosado com borda clara e escuro no centro	Rosado no centro para cinza-esbranquiçado (uniforme)	Cotonoso	Fusiforme	9 15	3 6	Levemente lobado/Arredondado	8,4 5,3	3 6

Continua...

Continuação...

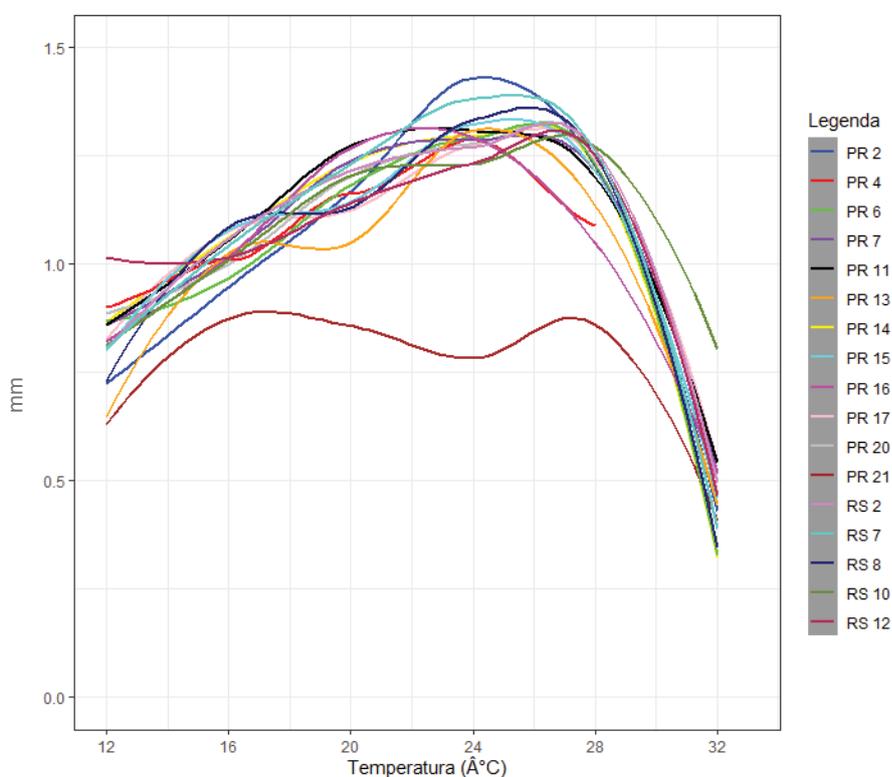
RS 10	Salmão rosado com borda clara e escuro no centro	Salmão rosado	Cotonoso	Fusiforme	9 16	2 5	Levemente lobado/Arredondado	6 9	5 7
RS 12	Salmão rosado com borda clara e levemente escuro no centro	Salmão rosado borda para centro acinzentado	Cotonoso	Cilíndrico	8 15	2 5	Lobado/Arredondado	9,7 4,8	4 7

FONTE: A autora (2023).

3.4 EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICELIAL DE ISOLADOS DE *Colletotrichum nymphaeae*

As maiores taxas de crescimento de colônia ocorreram na faixa entre 24°C e 28°C, ocorrendo variabilidade na temperatura (Figura 7). Todos os isolados de *C. nymphaeae*, exceto o isolado RS 12, apresentaram decréscimos de crescimento micelial em temperaturas superiores a 28 °C e inferiores à 16 °C.

FIGURA 7 – EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICELIAL PARA OS ISOLADOS REPRESENTATIVOS DE *Colletotrichum nymphaeae* DE ERVA-MATE INCUBADOS A 12, 16, 20, 24, 28, E 32°C, COM 12h LUZ POR 9 DIAS



FONTE: A autora (2023).

Com o intuito de uma observação mais detalhada das características culturais morfofisiológicas, os dois isolados (RS7 e RS10) de *C. nymphaeae* identificados neste estudo através de análise filogenética foram comparados com outros isolados de *C. nymphaeae* previamente relatados em diversas culturas de interesse agrícola (Tabela 5).

TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS COLÔNIAS (COR DO VERSO E REVERSO, TEXTURA DO MICÉLIO), CONÍDIOS E APRESSÓRIOS (FORMA, LARGURA, COMPRIMENTO) E DADOS DE TEMPERATURA DE CRESCIMENTO MICELIAL DE ISOLADOS REPRESENTATIVOS DE *Colletotrichum nymphaeae*

C. <i>nymphaeae</i>	VERSO DA COLÔNIA COR	REVERSO DA COLÔNIA COR	TEXTURA MICELIAL	MORFOLOGIA DOS CONÍDIOS (µm)		MORFOLOGIA DOS APRESSÓRIOS (µm)		Temperatura 25°C - mm/dia (✓)	Referência		
				Forma	Comprimento	Forma	Comprimento			Largura	Largura
Isolado RS7 - Erva-mate Brasil	Borda clara cinza/rosado, centro verde-acinzentado	Borda branca e centro verde-acinzentado	Cotonoso	Fusiforme	7 21	2 6	Levemente lobado/arredondado	4 9	3 6	1,4	Este estudo
Isolado RS10 - Erva-mate Brasil	Salmão rosado com borda clara e escuro no centro	Salmão rosado	Cotonoso	Fusiforme	9 16	2 5	Levemente lobado/arredondado	6 9	5 7	1,2	Este estudo
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) China	Vermelho-alaranjado	Cinza escuro a branco	Cotonoso	Cilíndricos com uma extremidade e em forma de funil	11 12	2 3	Ovais/irregulares	8,7 8,5	4 5	Sem dados de crescimento/ temperatura	Liu et al. (2023)
Pêssego (<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch) China	Cinzas com bordas brancas	Cinzas com bordas brancas	Cotonoso	Fusiforme	9 17	3 6	Ovais	4 12	4 7	2,5	TAN et al. (2023)

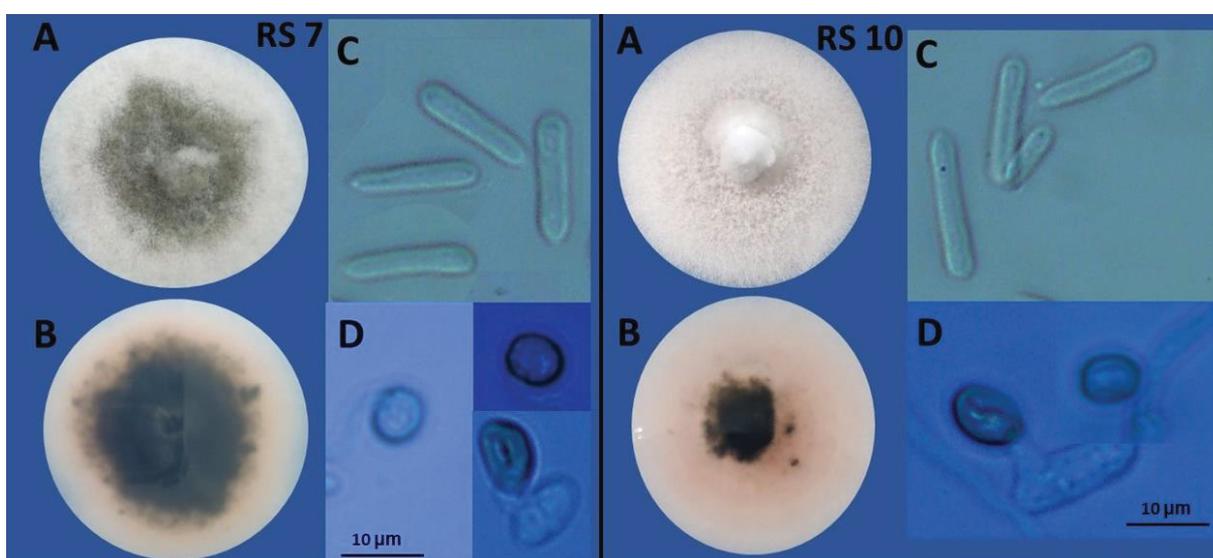
Continua...

Nogueira (<i>Juglans regia</i> L.) China	Rosa com manchas pretas	Branças a cinza	Cotonoso	Cilíndricos com extremidades agudas	12 18	4 5	Ovais/ elipsóides	5 8	5 8	3	WANG et al. (2022)
Maçã (<i>Malus domestica</i> Borkh) Brasil	Cinza oliva	Cor cinza e cor alaranjada ao centro	-	Fusiforme com extremidades ligeiramente agudas	8 16	4 7	-	-	-	Temperatura ótima de crescimento 24,7 a 28,0 °C	HAMADA et al. (2020)
Caqui (<i>Diospyros kaki</i> L.) Brasil	Cinza claro na borda para escuro no centro	Alaranjada a levemente rosada do centro para cinza claro nas bordas	Lisa	Fusiforme com variações	10 12	3 5	Levemente lobado/ arredondado	-	-	2,2	CARRARO et al. (2022)
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) Filipinas	Cinza claro na borda e cinza escuro no centro	Alaranjada com pontos escuros	-	Fusiforme	5	2	-	-	-	Temperatura de crescimento 28,0 °C	DIMAYACYAC; BALENDRES (2022)

Nota: Quando o trabalho não apresentou dados de crescimento mm/dia, foi adicionado a temperatura citada para crescimento dos isolados do trabalho citado. Valores de comprimento e largura estão apresentados com dados de amplitude (mínimo / máximo). (-) indica que não houve dados no trabalho citado.

Os isolados RS7 e RS10, identificados molecularmente como espécie *C. nymphaeae* diferiram no aspecto cultural cor da colônia. A cor do verso e reverso das colônias dos isolados apresentaram características de cores distintas. Enquanto que, a colônia do isolado RS7 apresentou verso cinza/rosado com borda clara e escuro no centro, e reverso com borda branca centro verde acinzentado, o isolado RS10 apresentou reverso com cor salmão rosado e verso salmão rosado com borda clara e escuro no centro (Figuras 8).

FIGURA 8- CARACTERÍSTICAS CULTURAIS E MORFOLÓGICAS DO ISOLADO RS7 E RS10 DE *Colletotrichum nymphaeae*

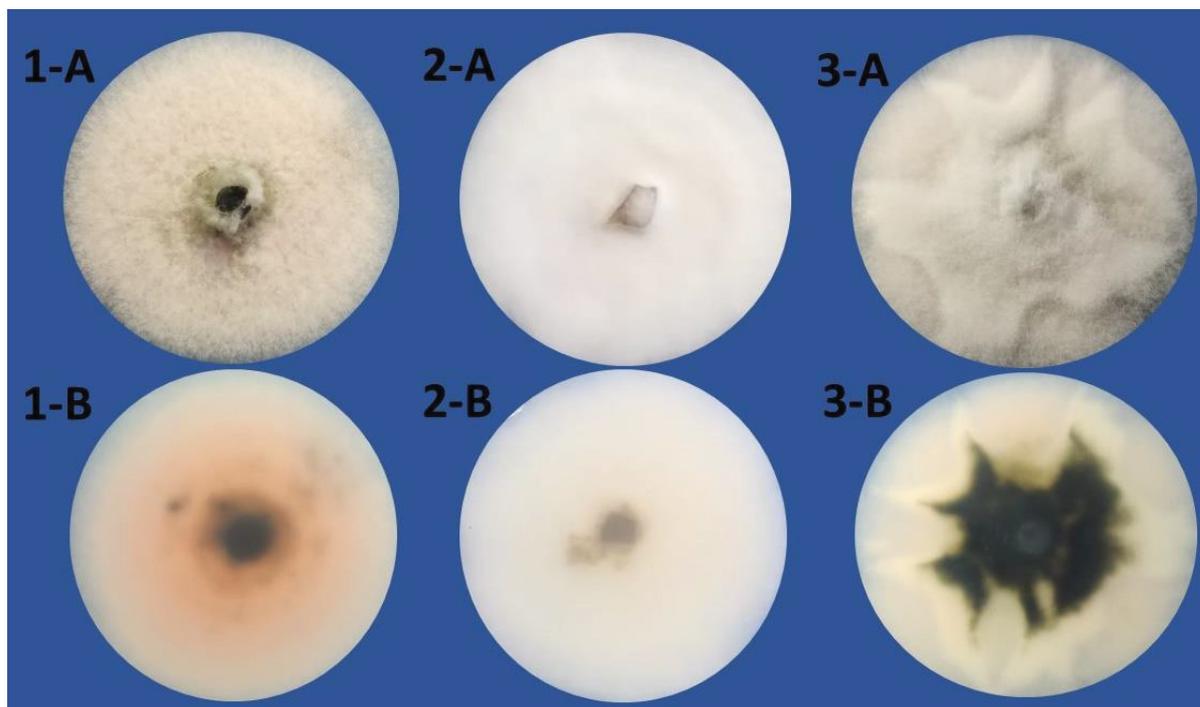


NOTA: Cor reverso e verso da colônia (A-B); Conídios e apressórios (C-D).

FONTE: A autora (2023).

Os isolados RS 7 e RS 10 apresentaram colônias com textura cotonosa, e os conídios foram classificados como fusiformes. O comprimento dos conídios dos isolados RS 7 e 10 variaram entre 21,49 – 7,33 µm e 16,34 – 8,9 µm, respectivamente. As larguras dos conídios variam entre 5,62 – 2,07 µm para o isolado RS 7 e 5,32 – 2,12 µm para o isolado RS 10. Os apressórios foram classificados como levemente lobados e arredondados. Os demais isolados apresentaram cores de verso e reverso das colônias salmão, grupo I: (PR 2, 4, 6, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 21 e RS 10), grupo II: acinzentada (PR 7, 11 e RS 7) e grupo III: esverdeada (RS 2) (Figura 9).

FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO DOS GRUPOS SEPARADOS POR COR DE COLÔNIA. GRUPO 1: COR SALMÃO; 2: CINZA; 3: ESVERDEADO

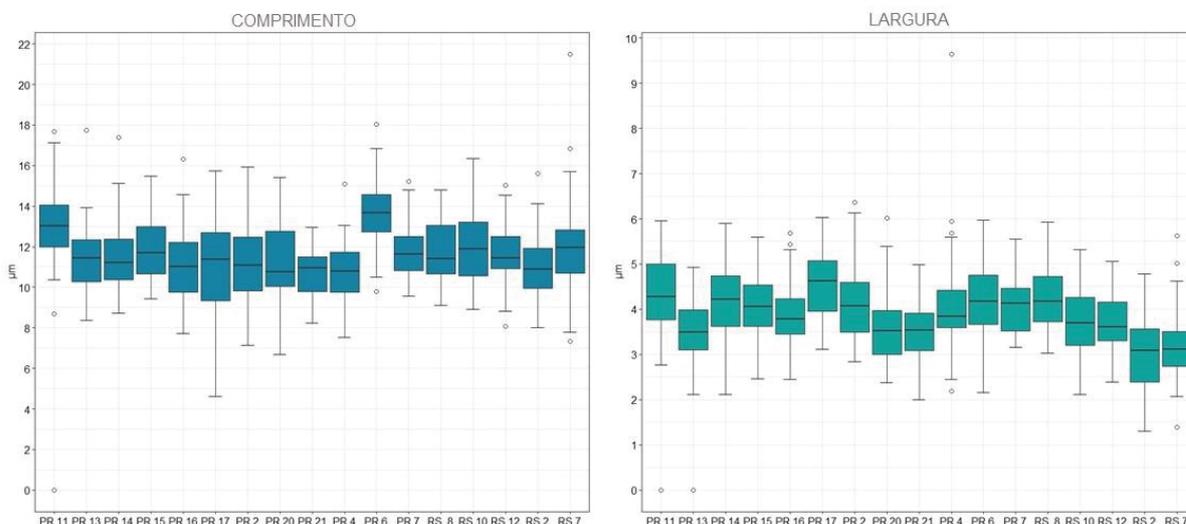


NOTA: Cor verso (B) e reverso (A), da colônia em grupos por cor.

FONTE: A autora (2023).

Os demais 17 isolados de *C. nymphaeae* foram também caracterizados morfológicamente. Diferentes formas e tamanhos de conídios e apressórios foram observados (Tabela 4). A análise de variância (ANOVA) foi realizada para determinar se existiam diferenças significativas entre comprimento e largura dos conídios e apressórios. A análise de comprimento e largura de conídio apresentou valor de p menor que 0,05, indicando que há evidência estatística significativa para rejeitar a hipótese nula de igualdade de médias entre os grupos. Isso sugere que há diferenças significativas entre as médias dos grupos analisados, em relação à variável "t". O valor F é 9,149 $2e^{-16}$ e F é 14,14 $2e^{-16}$, respectivamente, para comprimento e largura de conídio, o que sugere uma diferença entre as médias dos isolados em relação a essa variável. Ao se considerar as informações do gráfico é possível inferir que a medianas do comprimento dos conídios é 12 μm e a largura em 3,5 e 4 μm (Figura 10).

FIGURA 10 – COMPRIMENTO E LARGURA DE CONÍDIOS (μm) PARA OS ISOLADOS REPRESENTATIVOS DE *Colletotrichum nymphaeae* DE ERVA-MATE

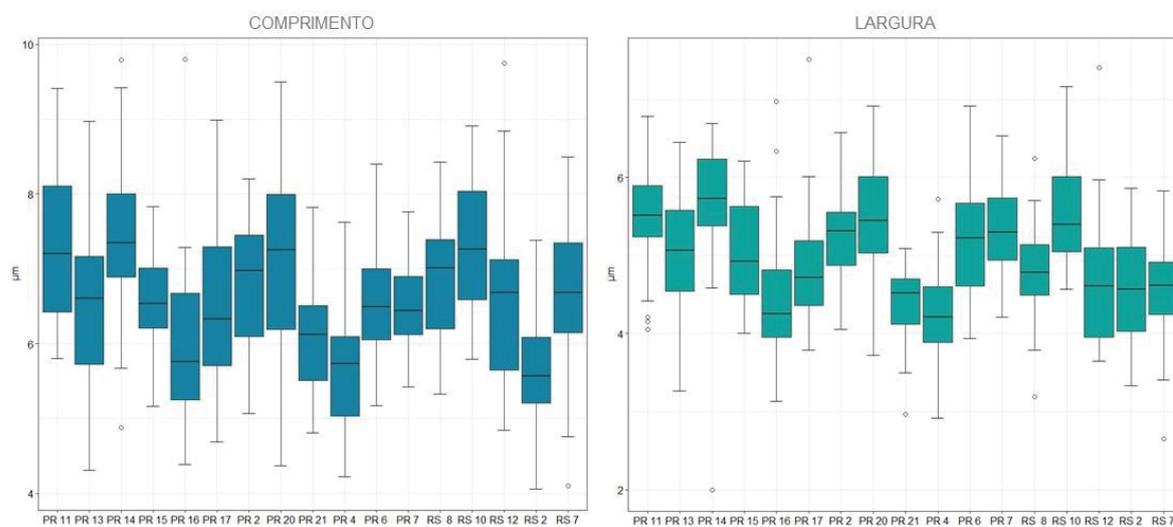


NOTA: Gráfico boxplot: quadrado retangular que representa o intervalo interquartil (IQR) dos dados. A linha vertical dentro do quadrado representa a mediana dos dados. Os valores máximos e mínimos dos dados são representados por linhas verticais que se estendem além do quadrado em cada extremidade. Valor incomum que presente nos dados está representado com círculo acima ou abaixo dos dados.

FONTE: A autora (2023).

A análise de comprimento e largura de apressório apresentou valor de p menor que 0,05, indicando que há evidência estatística significativa para rejeitar a hipótese nula de igualdade de médias entre os grupos. Isso sugere, que assim como para os conídios, há diferenças significativas entre as médias dos grupos analisados, em relação à variável "t". O valor F é $9,393 \cdot 10^{-16}$ e $11,44 \cdot 10^{-16}$, respectivamente para comprimento e largura dos apressórios, o que sugere uma diferença considerável entre as médias dos isolados em relação a essa variável. Ao considerarmos o gráfico é possível inferir que a mediana do comprimento dos apressórios entre 5,9 e 7,2 μm e a largura entre 4,5 e 5,5 μm (Figura 11). É importante considerar que a avaliação do formato dos apressórios e conídios infere mais informações válidas ao agrupamento de amostras iguais.

FIGURA 11 - COMPRIMENTO E LARGURA DE APRESSÓRIO (μm) PARA OS ISOLADOS REPRESENTATIVOS DE *Colletotrichum nymphaeae* DE ERVA-MATE



NOTA: Gráfico boxplot: quadrado retangular que representa o intervalo interquartil (IQR) dos dados. A linha vertical dentro do quadrado representa a mediana dos dados. Os valores máximos e mínimos dos dados são representados por linhas verticais que se estendem além do quadrado em cada extremidade. Valor incomum que presente nos dados está representado com círculo acima ou abaixo dos dados.

FONTE: A autora (2023).

4 DISCUSSÃO

A espécie *Colletotrichum nymphaeae* (Pass) Aa. foi patogênica à erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e causou lesões necróticas em folhas destacadas. Este consiste no primeiro relato dessa espécie causando doença em erva-mate e o seu envolvimento com a antracnose. A espécie *C. nymphaeae* é o agente causal da antracnose em erva-mate com ocorrência predominante em brotações e ramos jovens, ápices e folhas das plantas de erva-mate. Nas folhas, os sintomas são manchas necróticas escuras, com formato irregular, que podem ocasionar perfurações no limbo foliar.

O fitopatógeno *C. nymphaeae* é amplamente disseminado no mundo (TAN et al., 2022; LOPEZ et al., 2023; RIOLO et al., 2023; HAMADA et al., 2020). Dentre as culturas afetadas destaca-se a cultura da oliveira (*Olea europaea* L.) (LOPEZ et al., 2023; RIOLO et al., 2023), pessegueiro (*Prunus persica* L. Batsch) (TAN et al., 2022), noqueira (*Juglans regia* L.) (LUONGO et al., 2022; WANG et al., 2022) e tomateiro (*Solanum lycopersicum*) (DIMAYACYAC; BALENDRES, 2022). No Brasil, Carraro et al. (2022) relataram *C. nymphaeae* como uma das espécies causadoras da antracnose em frutos de caqui (*Diospyros kaki* L.). Além disso, no Brasil, Moreira et al. (2020) também relataram a ocorrência da espécie *C. nymphaeae* causando antracnose em pessegueiro, Benso et al. (2023) em folhas de mudas de viveiros de mogno africano (*Khaya* spp.) e Hamada et al. (2020) relata a espécie *C. nymphaeae* em flores de macieira (*Malus domestica* Borkh).

A caracterização molecular inicial dos isolados de *C. nymphaeae* foi realizada por meio da amplificação de regiões de DNA ITS utilizando primers recomendados na literatura (WHITE et al., 1990). Os resultados deste estudo mostraram que os isolados sequenciados formaram um clado distinto, com similaridade de sequência, o que confirmou a identidade das amostras analisadas como pertencentes ao gênero *Colletotrichum*.

A análise conjunta dos resultados mostrados neste estudo e de outros autores (WANG et al., 2022; ZHANG et al., 2020; TOZZE JÚNIOR et al., 2015) demonstraram que a região gênica ITS desempenha um papel importante como ferramenta inicial na identificação dos complexos de espécies de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Contudo, é importante ressaltar que esse gene isoladamente não é suficiente para identificar espécies do gênero *Colletotrichum*, conforme relatado por vários autores

(WANG et al., 2022; ZHANG et al., 2020; MARIN-FELIX et al. 2017; TOZZE JÚNIOR et al, 2015).

De acordo com Zhang et al. (2020); Marin-Felix et al. (2017); Hyde et al. (2009), é necessário o sequenciamento de outras regiões gênicas, além de ITS, para identificação específica. Neste estudo, a análise filogenética das sequências nucleotídicas concatenadas das regiões ITS, GAPDH e TUB2 revelou que os isolados apresentaram alta similaridade com isolados da espécie *C. nymphaeae*. A espécie *C. nymphaeae* encontra-se no complexo *Colletotrichum acutatum*, um dos grupos mais importantes do gênero e conhecido por agrupar espécies patogênicas causadoras de antracnose em várias plantas cultivadas de interesse agrônomico (LOPEZ et al., 2023; RIOLO et al., 2023; CARRARO et al., 2022; DIMAYACYAC; BALENDRES, 2022; PIASSETTA, 2022; WANG et al., 2022).

Dimayacyac e Balendres (2022) e Wang et al. (2022), relataram que o sequenciamento concatenado empregando as mesmas regiões gênicas utilizadas neste estudo, com a adição da região gênica CHS-1 (WANG et al., 2022), confirmaram *C. nymphaeae* como agente causal da antracnose dos frutos do tomate (DIMAYACYAC; BALENDRES, 2022) e noqueira (WANG et al., 2022).

A caracterização cultural e morfológica foi uma ferramenta importante para o agrupamento inicial dos isolados no gênero *Colletotrichum* e envolveu a análise de vários aspectos, tais como: cor, textura e tamanho das colônias, tamanho e forma de conídios e apressórios, conforme já relatado por vários autores (BENSO et al., 2023; TAN et al., 2022; CARRARO et al., 2022; TOZZE JÚNIOR et al, 2015; HYDE et al., 2009). Entretanto, é essencial a identificação confiável de espécies dentro dos complexos para então possibilitar o desenvolvimento de estratégias eficientes de controle da antracnose em culturas agrícolas (RATTANAKREETAKUL et al., 2023; ZHANG et al., 2020). Dessa forma, a integração dessas diferentes abordagens aumenta a precisão e confiabilidade na identificação de fungos fitopatogênicos, contribuindo para a identificação de novas espécies ou variantes genéticas que possam ser identificadas futuramente (GELAIN et al., 2023; LOPEZ et al., 2023; RATTANAKREETAKUL et al., 2023; ZHANG et al., 2020).

As abordagens de identificação cultural utilizadas neste estudo para o agrupamento inicial dos isolados resultaram em variações de cores das colônias. Os isolados de *C. nymphaeae* apresentaram diferenças de cores no verso e reverso das

culturas em meio de cultura BDA natural. É importante salientar este marcador cultural para o gênero *Colletotrichum* possui ampla plasticidade e deve ser considerado de baixo impacto para a identificação a nível de espécie (TAN et al., 2022; TOZZE JÚNIOR et al., 2015; HYDE et al., 2009). Carraro et al. (2022) e Tozze Júnior et al. (2015) relataram que a caracterização cultural das colônias é uma ferramenta útil para o agrupamento inicial de isolados dos complexos de *Colletotrichum*; no entanto, outras ferramentas, como a análise molecular, devem ser utilizadas para confirmar a identidade da espécie ou do complexo em questão.

De acordo com Carraro et al. (2022), a cor das colônias em meio de cultura BDA pode ser utilizada para diferenciação entre os complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Nestes casos, os isolados de *C. acutatum* apresentam variações de cores que oscilam entre os tons alaranjados e rosados, o que pode auxiliar na diferenciação inicial do complexo. Os resultados deste estudo diferem desse relato e demonstraram que as colônias dos isolados da espécie *C. nymphaeae* podem apresentar cores distintas, não assemelhando-se aos tons alaranjados e rosados, no verso e reverso da placa de Petri.

A variação na cor pode ser influenciada por vários fatores, como a idade do isolado, o meio de cultura utilizado, o fotoperíodo, a temperatura e outros fatores ambientais. Em concordância com este estudo, Tan et al. (2022) descreveram a cor de colônias de *C. nymphaeae* como cinza no verso e no reverso da placa. Liu et al. (2023); Hamada et al. (2020) também observaram a cor de colônia cinza e alaranjado no centro da placa devido a esporulação do fungo. Em outro estudo, Yamagishi et al. (2015) descreveram variações parecidas ao do presente estudo, com colônias cinzentas e brancas no reverso e cinzentas claras a laranjas claras no verso. As colônias de cor cinza a rosado observadas neste estudo também são citadas por Wang et al. (2022).

A análise combinada dos dados relatados por outros autores e avaliados sobre cor de colônia deste estudo revela que as colônias de *C. nymphaeae* apresentam uma variação aceitável de cores (LIU et al., 2023; TAN et al., 2022; WANG et al., 2022; CARRARO et al., 2022; HAMADA et al., 2020; YAMAGISHI et al., 2015), com tonalidades rosadas até alaranjadas (LIU et al., 2023; HAMADA et al., 2020; YAMAGISHI et al., 2015; CARRARO et al., 2022), bem como variações que vão de

colônias inteiramente cinzas e/ou com bordas brancas (LIU et al., 2023; TAN et al., 2022; WANG et al., 2022; HAMADA et al., 2020; YAMAGISHI et al., 2015).

Neste estudo, os conídios apresentaram forma fusiforme, sem as extremidades pontiagudas, transparentes e asseptados. As medidas do comprimento variaram entre 7,33 e 21,49 μm e largura entre 2,07 e 5,62 μm assemelhando-se com as dimensões apresentadas por Liu et al. (2023), Tan et al. (2022), Carraro et al. (2022) e Hamada et al. (2020) para *C. nymphaeae*, em outros hospedeiros. Damm et al. (2009) também relataram conídios com forma e dimensões parecidas com os descritos neste estudo. Outros autores, com diferentes espécies de *Colletotrichum*, comprovaram a plasticidade fenotípica do gênero em características culturais e morfológicas (TOZZE JÚNIOR et al, 2015; DAMM et al. 2009; HYDE et al. 2009). Hyde et al. (2009), ressaltam a importância de avaliar conjuntamente características culturais, morfológicas e moleculares para se criar uma literatura científica consolidada para estudos do gênero.

As características morfológicas, como tamanho, forma e curvatura dos conídios, podem ser utilizadas para estudar a diversidade fenotípica e a relação entre diferentes isolados e sua patogenicidade (RATTANAKREETAKUL et al., 2023; ZHANG et al., 2020; TOZZE JÚNIOR et al, 2015). Além disso, a caracterização morfológica de *C. nymphaeae* é essencial para entender a forma das suas estruturas reprodutivas. Entretanto, a observação das estruturas morfológicas, como conídios e apressórios, pode ser utilizada, mas não é o suficiente para identificação e diferenciação de espécies dentro do gênero *Colletotrichum* (RATTANAKREETAKUL et al., 2023; ZHANG et al., 2020; TOZZE JÚNIOR et al, 2015; CASTILHO et al., 2007).

Segundo Simmonds (1965), Benso et al. (2023) e Tozze Júnior et al. (2015), o agrupamento inicial dos isolados dos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* pode ser feito por meio do formato dos conídios. Os conídios do complexo *C. acutatum* apresentam extremidades pontiagudas, o que os diferenciam dos conídios do complexo *C. gloeosporioides*, que apresentam extremidades arredondadas (SIMMONDS, 1965). No presente estudo, os conídios dos isolados de *C. nymphaeae*, complexo *C. acutatum*, não apresentaram as extremidades pontiagudas como mostrados nas ilustrações de Simmonds (1965). Isto se deve, possivelmente, ao amplo número de espécies dentro do complexo e diferenças existentes entre elas.

Os apressórios, descritos neste estudo, foram classificados como levemente lobados e/ou arredondados, com comprimentos variando entre 4,1 a 8,91 μm e largura entre 2,65 a 7,16 μm . Essas dimensões se assemelham aos resultados apresentados por Liu et al. (2023) e Tan et al. (2022). A análise morfológica, embora forneça informações iniciais importantes, não é suficiente para a identificação precisa das espécies de *Colletotrichum*, como no presente estudo de identificação de *C. nymphaeae*.

Ademais, a correta identificação do patógeno, por sua vez, abre novas oportunidades de pesquisa e desenvolvimento de medidas de controle mais eficazes (BENSO et al., 2023; RATTANAKREETAKUL et al., 2023; VITALE et al., 2020; ZHANG et al., 2020). Sem a identificação correta ao nível de espécie, as avaliações de suscetibilidade e os métodos de controle empregados não irão considerar a espécie de *Colletotrichum* responsável pela infecção, o que dificulta a utilização consistente de genótipos resistentes como estratégia para o controle efetivo da antracnose. Ademais, a incubação dos testes de patogenicidade e resistência na temperatura de 25 °C de *C. nymphaeae* possibilitou resultados satisfatórios. Nessa temperatura *C. nymphaeae* apresentou o maior crescimento micelial. Outros autores (RATTANAKREETAKUL et al., 2023; ZHANG et al., 2020; HYDE et al., 2009). também verificaram que essa temperatura é adequada para o gênero *Colletotrichum*.

5 CONCLUSÃO

A espécie *Colletotrichum nymphaeae* (Pass) Aa. é patogênica à *Ilex paraguariensis* e está envolvida na etiologia da antracnose da erva-mate no Sul do Brasil.

REFERÊNCIAS

- AUER, C. G.; DOS SANTOS, A. F. dos. Doenças da Erva-Mate. In: Amorim, L. et al. (ed.). **Doenças de Plantas Cultivadas**. 5 ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. p. 343-349.
- BENSO, L.A.; PIERONI, L.P.; MIRA, Y.D; MARQUES, A.; CIRIELLO, V.; ROSSINI, B. C.; FURTADO, E. L. First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing leaf spot in *Khaya* spp.. **Australasian Plant Dis**. v. 18, n. 1, p. 1-5, 2023. DOI: 10.1007/s13314-023-00502-5.
- CARRARO, T. de A.; LICHTENBERG, P. D. S. F.; MICHAILIDES, T. J.; BORGES; M. I. M.; PEREIRA, W. V.; DE MIO, L. L. M. Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on persimmon in Brazil. **Fungal Biology**, v. 126, n. 3, p. 235-249, 2022. DOI: 10.1016/j.funbio.2021.12.003.
- CASTILHO, L. B., REIS, A., HENZ, G. P. Identificação morfológica de isolados de *Colletotrichum* spp. Causadores de antracnose em solanáceas. **Embrapa Hortaliças. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 29. 2007.
- CENTENARO, M.; SATTLER, S. A.; SILVEIRA, C. V. DA.; OLIVEIRA, H. C. C. R. DE. Evolução da produção e tecnologias no cultivo de erva-mate: análise entre Brasil e Argentina. **Profanações**, v. 7, p. 90-107, 2020. DOI: 10.24302/prof.v7iEd.
- COX, M. L.; IRWIN, A. G. Conidium and apressorium variation in Australian isolates of the *Colletotrichum gloeosporioides* group and closely related species. **Australian Systematic Botany**, v.1, n.2, p.139-149, 1988.
- DAMM, U.; WOUDEBERG, J. H. C.; CANNON, P. F.; CROUS, P. W. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, v.39, p.45-87, 2009.
- DIMAYACYAC, D. A.; BALENDRES, M. A. First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing post-harvest anthracnose of tomato in the Philippines. **New Disease Reports**, v. 46, n. 2, 2022. DOI: 10.1002/ndr2.12125.
- DOS SANTOS, Á. F.; TESSMANN, D. J.; MAFACIOLI, R.; VIDA, J. B. Etiologia e Controle da Antracnose da Pupunheira para Palmito. Embrapa Florestas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 32, 2007.
- EMBRAPA. Erva-mate. 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/florestas/transferencia-de-tecnologia>. Acesso em: 20 ago. 2021.
- GEBARA, K. S., GASPAROTTO-JUNIOR, A., SANTIAGO, P. G., CARDOSO, C. A. L., DE SOUZA, L. M., MORAND, C.; CARDOZO-JUNIOR, E. L. Daily intake of chlorogenic acids from consumption of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) traditional beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 46, p. 10093-10100, 2017. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b04093.

GELAIN, J.; LYKINS, S.; ROSA, P. F.; SOARES, A. T.; DOWLING, M. E.; SCHNABEL, G.; MAY DE MIO, L. L. Identification and Fungicide Sensitivity of *Colletotrichum* spp. from Apple Flowers and Fruitlets in Brazil. **Plant Disease**, 2022. DOI: 10.1094/PDIS-01-22-0243-RE.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.4, p.1323-1330, 1995. DOI: 10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995.

GOMES, N. S. B.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G.; WIELEWSKI, P.; VALLE, G. M. **PATOGENICIDADE DE *Colletotrichum acutatum* EM FOLHAS DESTACADAS DE ERVA-MATE**. Colombo: Embrapa Florestas. 2001.

GONÇALVES, R. C.; ALFENAS., A. C; MAFIA., R. G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In. Alfenas, C. A.; Mafia, R. G. (ed.). **Métodos em Fitopatologia. Doenças de Plantas Cultivadas**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2016. p. 94-105.

GRIGOLETTI-JÚNIOR, A.; AUER, C. G. Doenças da erva-mate: identificação e controle. EMBRAPA-CNPQ, 1996. **Relatório Técnico**.

HAMADA, N. A.; MOREIRA, R. R.; FIGUEIREDO, J. A. G.; MIO, L. L. M. D. *Colletotrichum acutatum* complex isolated from apple flowers can cause bitter rot and Glomerella leaf spot. **Bragantia**, v. 79, p. 399-406, 2020. DOI: 10.1590/1678-4499.20190429.

HEGEL, P.; GRANONE, L. I.; HRNČIČ, M. K.; PEREDA, S.; KOTNIK, P.; KNEZ, Z. Alkaloid-rich vs. antioxidant-rich yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts: Exploiting the selectivity of supercritical CO₂ using hydrated ethanol as co-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 172, p. 105-200, 2021. DOI: 10.1016/j.supflu.2021.105200.

HYDE, K. D.; CAI, L.; MCKENZIE, E. H. C.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z.; PRIHASTUTI, H. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 1-17, 2009. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20198646065>. Acesso em: 11 abr. 2023.

LANDAU, E. C.; SILVA, G. A. DA; TORRES, T. Evolução da produção de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, Aquifoliaceae). In. LANDAU, E. C. et al. (Ed.). **Dinâmica da Produção Agropecuária e da Paisagem Natural no Brasil nas Últimas Décadas**. Brasília: Embrapa, 2020. p. 709-736.

LIU, H.; LI, Y.; LI, X.; LIU, H.; HUANG, J.; ZHENG, L. First report of tobacco anthracnose caused by *Colletotrichum nymphaeae* in China. **Plant Disease**. 2023. DOI: 10.1094/PDIS-09-22-2210-PDN.

LUONGO, L.; GALLI, M.; GARAGUSO, I.; PETRUCCI, M.; VITALE, S. First Report of *Colletotrichum fioriniae* and *C. nymphaeae* as Causal Agents of Anthracnose on

Walnut in Italy. **Plant Disease**, v. 106, n. 1, p. 327, 2022. DOI: 10.1094/PDIS-05-21-1062-PDN.

LOPEZ, M. T. G.; SERRANO, M. S.; CAMILETTI, B. X.; GORDON, A.; ESTUDILLO, C.; TRAPERO, A.; MORAL, J. Study of the competition between *Colletotrichum godetiae* and *C. nymphaeae*, two pathogenic species in olive. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-32585-6.

MARIN-FELIX, Y.; GROENEWALD, J. Z.; CAI, L.; CHEN, Q.; MARINCOWITZ, S.; BARNES, I., ... & CROUS, P. W. **Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1**. *Studies in mycology*, 86, 2017. 99-216.

MOREIRA, R. R.; SILVA, G. A.; DE MIO, L. L. M. *Colletotrichum acutatum* complex causing anthracnose on peach in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, v. 49, p. 179-189, 2020. Doi: 10.1007/s13313-020-00690-z.

PENTEADO JÚNIOR, J. F.; GOULART, I. C. G dos R. **Erva 20: sistema de produção para erva-mate**. Brasília: Embrapa, 2019.

PEREIRA, J. R. PROGROGNÓSTICO AGROPECUÁRIO - **ERVA MATE 2022/2023**. Ed. Gisele Barão da Silva, Joabe Rodrigues Pereira. Governo do Estado do Paraná. 2022. Disponível:
https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2022-01/erva-mate.pdf. Acesso em: 22 mai. 2023.

PIASSETTA, R. **Doenças em mudas clonais de erva-mate em duas épocas do ano-Guarapuava, Paraná**. 2022. 44 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2022.

RATTANAKREETAKUL, C.; KEAWMANEE, P.; BINCADER, S.; MONGKOLPORN, O.; PHUNTUMART, V.; CHIBA, S.; PONGPISUTTA, R; CHAINARONG et al. Two Newly Identified *Colletotrichum* Species Associated with Mango Anthracnose in Central Thailand. **Plants**, v. 12, n. 5, p. 1130, 2023. DOI: 10.3390/plants12051130.

RIOLO, M.; PANE, A.; SANTILLI, E.; MORICCA, S.; CACCIOLA, S. O. Susceptibility of Italian olive cultivars to various *Colletotrichum* species associated with fruit anthracnose. **Plant Pathology**, v. 72, n. 2, p. 255-267, 2023. DOI: 10.1111/ppa.13652.

RUSKOVSKA, T.; MORAND, C.; BONETTI, C. I.; GEBARA, K. S.; JUNIOR, E. L. C.; MILENKOVIC, D. Multigenomic modifications in human circulating immune cells in response to consumption of polyphenol-rich extract of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) are suggestive of cardiometabolic protective effects. **British Journal of Nutrition**, v. 129, n. 2, p. 185-205, 2023. DOI: 10.1017/S0007114522001027.

SIMMONDS, J. H. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Science**, Brisbane, v.22, n.4, p.437-459, 1965.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**. Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1980.

TAN, Q.; SCHNABEL, G.; CHAISIRI, C.; YIN L-F.; YIN, W-X.; LUO, C.
X. *Colletotrichum* Species Associated with Peaches in China. **Journal of Fungi**.
2022. DOI: 10.3390/jof8030313.

TEMPLETON, M. D.; RIKKERINK E. H. A.; SOLON S. L.; CROWHURST R. N.
Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate
dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus
Glomerella cingulata. **Gene**, v.122, n. 1, p. 225-230, 1992.

TOZZE JÚNIOR, H. J.; FIRMINO, A. C.; FISCHER, I. H.; FURTADO, E. L.;
MASSOLA JÚNIOR, N. S. Characterization of *Colletotrichum* spp. isolates
associated with fruit trees in the state of São Paulo. **Summa Phytopathologica**,
2015. DOI: 10.1590/0100-5405/2021.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within
a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular
Phylogenetics and Evolution**, v.7, n.1, p.103-116, 1997.

VITALE, A.; ALFENAS, A. C.; DE SIQUEIRA, D. L.; MAGISTÀ, D.; PERRONE, G.;
POLIZZI, G. Cultivar resistance against *Colletotrichum asianum* in the world
collection of mango germplasm in southeastern Brazil. **Plants**, v. 9, n. 2, p. 182,
2020. DOI: 10.3390/plants9020182.

WANG, Y. X.; XU, X. W.; CAI, F.; HUANG, F. X.; CHEN, W. S.; WANG Q. Z. First
Report of *Colletotrichum nymphaeae* Causing Walnut Anthracnose in China. **Plant
Disease**. DOI: 10.1094/PDIS-02-22-0297-PDN.

WHITE, T. M.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing
of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.;
SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.). **PCR protocols: a guide to methods and
applications**. San Diego: Academic Press, p.315-321. 1990.

YAMAGISHI, N.; FUJINAGA, M.; ISHIYAMA, Y. et al. Life cycle and control of
Colletotrichum nymphaeae, the causal agent of celery stunt anthracnose. **Journal of
General Plant Pathology**. 2015. DOI: 10.1007/s10327-015-0598-7.

ZHANG, W.; DAMM, U; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; NIU, X.; LIN, J.; LI, Y.
Anthracnose Disease of Carpetgrass (*Axonopus compressus*) Caused by
Colletotrichum hainanense sp. nov. **Plant disease**, v. 104, n. 6, p. 1744-1750, 2020.
DOI: 10.1094/PDIS-10-19-2183-RE.

CAPÍTULO II
AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS E RESISTÊNCIA DE CLONES DE ERVA-MATE
À *Colletotrichum nymphaeae*

RESUMO

A cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é afetada por doenças causadas por fungos fitopatogênicos que podem reduzir significativamente a produtividade e a qualidade matéria-prima produzida. A antracnose, causada por *Colletotrichum nymphaeae* é uma das doenças mais importantes da erva-mate e afeta negativamente a produção de mudas e o cultivo da erva-mate. O objetivo deste estudo foi desenvolver metodologia de inoculação de *Colletotrichum nymphaeae*; avaliar a agressividade de isolados de *C. nymphaeae* e a resistência de clones de erva-mate ao patógeno. A inoculação do patógeno foi realizada em folhas jovens e maduras nas faces adaxial e abaxial, com os seguintes procedimentos: 1) Testemunha, apenas água esterilizada 2) Inoculação com um disco de meio BDA contendo micélio; 3) Inoculação com suspensão de conídios e, 4) Inoculação com disco de papel e suspensão de conídios. Os tratamentos foram avaliados com e sem ferimentos das folhas da hospedeira, em temperatura de 25°C e 12h luz e escuro. A avaliação da agressividade de isolados e a resistência de clones de erva-mate à antracnose foi realizada por meio da determinação do tamanho da lesão, presença e quantidade de acérvulos formados na lesão. Conclui-se que, a espécie *C. nymphaeae* (Pass) Aa. é patogênica à *I. paraguariensis* e está envolvida na etiologia da antracnose da erva-mate no Sul do Brasil. O método de inoculação de *C. nymphaeae* com o uso de disco de meio de cultura com micélio na face adaxial de folhas jovens com ferimentos foi adequado para os estudos de patogenicidade e resistência. Foram identificados indícios que sugerem a possível presença de resistência à *C. nymphaeae* em clones de erva-mate.

Palavras-chave: patogenicidade; *Ilex paraguariensis*; doença de planta.

ABSTRACT

The cultivation of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) is affected by diseases caused by phytopathogenic fungi that can significantly reduce productivity and the quality of the produced feedstock. Anthracnose, caused by *Colletotrichum nymphaeae* is one of the most important diseases of yerba mate and negatively affects seedling production and cultivation. The aim of this study was to develop an inoculation methodology for *Colletotrichum nymphaeae*; evaluate the aggressiveness of *C. nymphaeae* isolates and the resistance of yerba mate clones to the pathogen. Pathogen inoculation was performed on young and mature leaves on the adaxial and abaxial surfaces, using the following procedures: 1) Control, using only sterilized water; 2) Inoculation with a disk of PDA medium containing mycelium; 3) Inoculation with a conidial suspension; and 4) Inoculation with a paper disk and conidial suspension. Treatments were evaluated with and without host leaf injuries, at a temperature of 25°C and a 12-hour light and dark cycle. The evaluation of isolate aggressiveness and yerba mate clone resistance to anthracnose was carried out by determining the lesion size, presence, and quantity of acervuli formed in the lesion. It was concluded that the species *C. nymphaeae* (Pass) Aa. is pathogenic to *Ilex paraguariensis* and is involved in the etiology of anthracnose in yerba mate in southern Brazil. The inoculation method of *C. nymphaeae* using a PDA medium disk with mycelium on the adaxial surface of young leaves with injuries was suitable for the studies of pathogenicity and resistance. Indications suggesting the possible presence of resistance to *C. nymphaeae* in yerba mate clones were identified.

Keywords: pathogenicity; *Ilex paraguariensis*; plant disease.

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) possui uma relevância significativa nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul, onde se concentram 509 municípios produtores dessa cultura (CENTENARO et al., 2020). É importante ressaltar que a erva-mate desempenha um papel não apenas econômico, mas também cultural e socioambiental. Além do consumo tradicional em forma de chimarrão ou tererê, a diversificação de produtos derivados da erva-mate como chás gelados, bebidas tônicas, formulações energizantes e cosméticos amplia o potencial de consumo e abre novos mercados (RUSKOVSKA et al., 2023; HEGEL et al., 2021; CENTENARO et al., 2020; GEBARA et al., 2017).

No Brasil, nos últimos anos, têm-se observado avanços significativos nos sistemas de produção de mudas de erva-mate, abrangendo técnicas para cada fase de desenvolvimento no viveiro (WENDLING et al., 2020). A produção de mudas é uma etapa crucial no cultivo da erva-mate, uma vez que o sucesso na implantação e produção dos ervais está diretamente ligado à qualidade e fitossanidade das plantas (WENDLING et al., 2020; GRIGOLETTI JÚNIOR et al., 2000). No entanto, a cultura da erva-mate é atacada por doenças causadas por fungos fitopatogênicos que podem reduzir significativamente a produtividade e a qualidade da matéria-prima produzida (AUER & DOS SANTOS, 2016).

A antracnose, causada por *Colletotrichum nymphaeae* (Cap. I) é uma das doenças mais importantes da erva-mate. E afeta significativamente a produção de mudas e o cultivo da erva-mate (WENDLING et al., 2020; AUER; DOS SANTOS, 2016). A espécie *C. nymphaeae* já foi relatada na cultura da oliveira (*Olea europaea* L.) (LOPEZ et al., 2023; RIOLO et al., 2023). Em aipo (*Apium graveolens* var. *dulce*) (YAMAGISHI et al., 2015). E foi identificado pela primeira vez como agente causador da antracnose pós-colheita na cultura do tomate (*Solanum lycopersicum*) (DIMAYACYAC; BALENDRES, 2022).

Em erva-mate, de acordo com Auer e Dos Santos (2016), quando o patógeno ocorre em sementeiras, a doença pode alterar o desenvolvimento das mudas, causando a morte da gema apical e a ativação das gemas laterais. Nas folhas, os sintomas são manchas necróticas escuras, com formato irregular, que podem ocasionar perfurações em folhas jovens (GRIGOLETTI; AUER, 1996; AUER; DOS SANTOS, 2016) e em condições de alta umidade, ocorre a formação de acérvulos e

conídios sobre as lesões, que apresentam cor branco-alaranjado (GRIGOLETTI; AUER, 1996; AUER; DOS SANTOS, 2016).

O controle da antracnose no campo é difícil, e a ocorrência da doença em viveiro pode levar à perda de qualidade das mudas (WENDLING et al., 2020; AUER; DOS SANTOS, 2016). O controle químico e cultivares resistentes podem ser estratégias de controle da antracnose da erva-mate. No entanto, não existe registro de fungicida para a cultura no Brasil (AGROFIT, 2023), assim como desconhece-se o comportamento da erva-mate quanto a resistência à *Colletotrichum* sp. Assim, a antracnose pode tornar-se limitante para o cultivo de erva-mate e, devido a isto, surge a necessidade de se dispor de informações sobre este patossistema para que se possa desenvolver estratégias de controle. Até o momento, não há relato de cultivares resistentes e, considerando-se as características da cultura e o apelo por um produto ecologicamente sustentável, o uso de genótipos resistentes é a ferramenta que se adequa ao sistema de produção da erva-mate.

Este estudo teve como objetivos: desenvolver metodologia de inoculação de *Colletotrichum nymphaeae*; avaliar a agressividade de isolados de *C. nymphaeae*; e avaliar a resistência de clones de erva-mate ao patógeno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

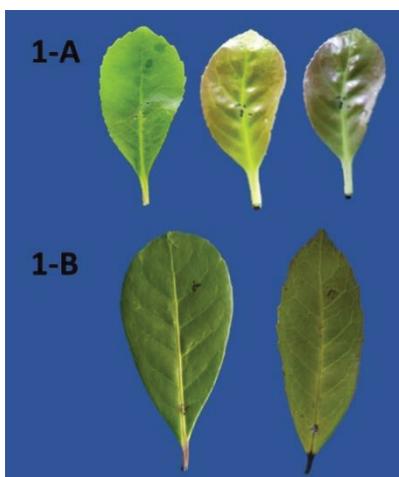
Foram avaliados 17 isolados patogênicos de *C. nymphaeae* pertencentes à coleção de Fungos e Oomicetos da Embrapa Florestas, Colombo, PR. Os isolados foram selecionados com o propósito de representar a diversidade de características, tanto cultural como as características morfológicas observadas no conjunto amostral inicial. Além disso, foi priorizada a utilização de isolados representantes de diferentes regiões geográficas.

2.1 MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Colletotrichum nymphaeae* EM FOLHAS JOVENS E MADURAS DESTACADAS DE ERVA-MATE

2.1.1 Hospedeiro

Foram utilizadas folhas destacadas sadias jovens e maduras de clone suscetível de erva-mate do viveiro da Embrapa Florestas, Colombo-PR. A coleta foi baseada na cor e textura das folhas. Foram consideradas folhas jovens aquelas com até 10 dias de idade, conforme segue: cor avermelhada e pouco espessa e com textura suave (Figura 15). Elas apresentavam uma textura macia e flexível, enquanto que as folhas maduras eram de cor verde-escuro e com textura mais dura e áspera. As folhas maduras eram consideradas aquelas que já alcançaram seu tamanho e formato final comparativamente às demais folhas da planta (Figura 15).

FIGURA 12 – FOLHAS JOVENS (1-A) E FOLHAS MADURAS (1-B) DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*.)



FONTE: A autora (2023).

As folhas foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% por 1 min, seguido de solução de hipoclorito de sódio 1,0 % por 30 s. e, posteriormente, procedeu-se tríplice lavagem com água esterilizada por 3 min. Em seguida, as folhas foram colocadas em caixas tipo 'gerbox' contendo papel 'mata borrão' autoclavado e umedecido com água esterilizada. As folhas foram dispostas sobre lâmina de vidro como suporte para evitar o contato direto com o papel umedecido.

2.1.2 Produção de inóculo

Nos estudos foram usados seis isolados patogênicos de *C. nymphaeae*. Foram testados dois tipos de inóculo: micélio e conídio. Para o tipo micélio, o inóculo foi obtido retirando-se um disco (5 mm de diâmetro) de meio BDA natural com micélio em crescimento ativo da borda das colônias dos isolados de *C. nymphaeae*. Estas culturas foram obtidas em meio BDA natural e incubadas em estufa na temperatura de 25 °C, sob fotoperíodo de 12h luz, por sete dias.

Para o tipo conídio foi usada a mesma metodologia citada anteriormente para produção da massa micelial esporulante e, após o período de incubação, foi adicionado 10 mL de água esterilizada em cada placa de Petri. Foi realizada uma raspagem superficial das colônias dos isolados de *C. nymphaeae* com auxílio de uma alça de Drigalsky e, em seguida, a suspensão foi filtrada em duas camadas de gaze esterilizada e a concentração de conídios foi ajustada em câmara de Neubauer para $3,0 \times 10^5$ conídios/mL. Antes da inoculação, foi acrescentada uma gota de Tween 80 à suspensão de conídios.

2.1.3 Inoculação

As folhas jovens e maduras de erva-mate foram inoculadas nas faces adaxial e abaxial. A inoculação foi realizada, conforme os tratamentos a seguir (Figura 16): 1) Testemunha, somente água esterilizada; 2) Inoculação com disco (5 mm de diâmetro) de meio BDA com micélio; 3) Inoculação com suspensão de conídios; 4) Inoculação com disco de papel com suspensão de conídios. Todos os tratamentos foram analisados com e sem ferimentos. Os ferimentos dos tratamentos foram feitos antes da inoculação com um conjunto de agulhas em forma circular (diâmetro de 5 mm).

FIGURA 13 – FLUXUGRAMA ILUSTRATIVO DAS METODOLOGIAS USADAS PARA INOCULAÇÃO DE *Colletotrichum nymphaeae*



NOTA: Locais de perfuração em azul sobre a imagem da folha.

FONTE: A autora (2023).

Para os tratamentos com ferimentos, foram realizadas cinco perfurações formando um “x” (Figura 16), com equipamento padronizado. Cada tratamento foi realizado em ambas as faces, totalizando 16 folhas (oito folhas face adaxial/oito folhas face abaxial). O disco de micélio e o papel embebido em suspensão foram dispostos no local demarcado em azul na folha (Figura 16). Nos tratamentos com e sem ferimento a suspensão de conídios foi pulverizada em todo limbo foliar.

2.1.4 Incubação

As folhas foram colocadas em caixas tipo ‘gerbox’ sobre lâminas de vidro como suporte. Os tratamentos foram incubados em sala climatizada com temperatura a 25 °C e fotoperíodo de 12h luz, por sete dias.

2.1.5 Avaliação

A avaliação foi feita determinando-se o tamanho da lesão, a presença e quantidade de acérvulos. Para avaliar a quantidade de acérvulos no teste de agressividade, os mesmos foram classificados em: Ausente (S): não formação de acérvulos sobre a lesão; Baixa (B): formação de acérvulos e estes não envolviam toda a borda da lesão; Regular (R): formação de acérvulos em volta de toda a borda da

lesão; e Alta (A): formação espalhada de acérvulos em toda a lesão. Os resultados dos valores de comprimento e largura de lesão foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey com 5% de probabilidade no software R, e a classificação disposta em tabela e gráfico.

2.2 AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Colletotrichum nymphaeae*

A avaliação da agressividade de 17 isolados de *C. nymphaeae* foi realizada em folhas jovens destacadas de plantas de clone de erva-mate (suscetível) e empregou-se a mesma metodologia descrita anteriormente para produção de inóculo, inoculação, incubação e avaliação.

2.3 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE CLONES DE ERVA-MATE COM BAIXO E ALTO NÍVEL DE CAFEÍNA À *Colletotrichum nymphaeae*

Foram avaliados quatro clones de erva-mate do programa de melhoramento da Embrapa Florestas com baixo e alto nível de cafeína. Neste teste foram usados os isolados RS7 e RS10 de *C. nymphaeae*. Foi empregada a mesma metodologia descrita anteriormente para produção de inóculo, inoculação, incubação e avaliação.

3 RESULTADOS

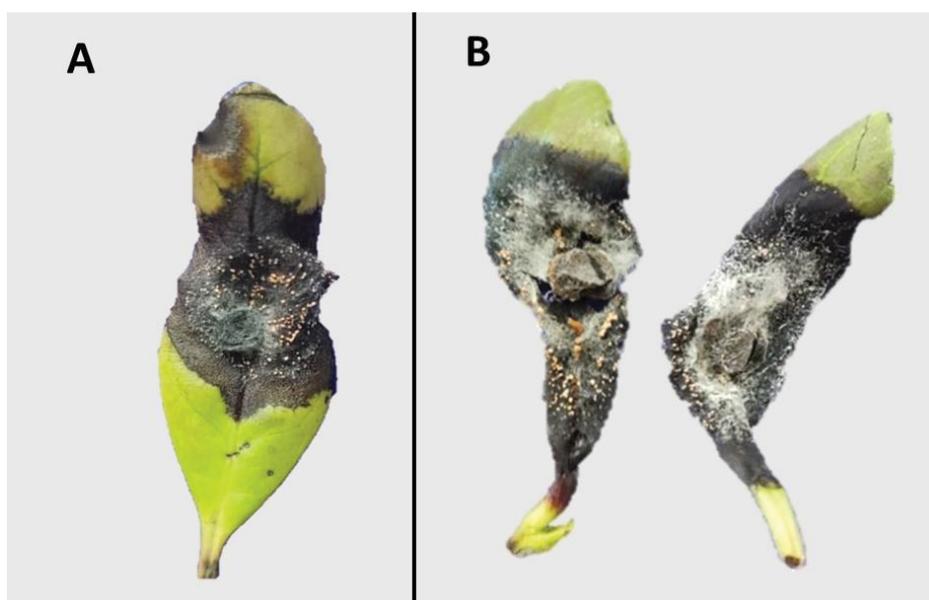
3.1 MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Colletotrichum nymphaeae* EM FOLHAS JOVENS E MADURAS DESTACADAS DE ERVA-MATE

Apenas na inoculação de disco de meio de cultura com micélio de *C. nymphaeae* nas faces adaxial e abaxial das folhas com ferimentos apareceram sintomas aos sete dias após a inoculação. Os sintomas se caracterizaram pelo escurecimento e necrose foliar. Nos demais métodos de inoculação não se verificou a presença de sintomas. As folhas maduras inoculadas com ou sem ferimentos não apresentaram sintomas.

3.2 AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Colletotrichum nymphaeae*

O isolado PR2 de *C. nymphaeae* apresentou os maiores comprimentos de lesão (44 mm) (Figuras 14A e 14B). Contudo, os isolados PR4, PR6, PR14, PR15, PR16, PR21, RS2, RS7, RS8 e RS10 apresentaram as maiores médias de comprimentos de lesão e não diferiram pelo teste Tukey, significância $\alpha = 0,05$ (Tabela 8).

FIGURA 14 – SINTOMAS E SINAIS DE ANTRACNOSE EM FOLHA JOVEM INOCULADO COM O ISOLADOS PR 2 DE *Colletotrichum nymphaeae*



FONTE: A autora (2023).

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para determinar se existem diferenças significativas entre o comprimento e entre a largura das lesões dos isolados avaliados. A análise de comprimento e largura das lesões apresentaram valor de p menor que 0,05, indicando que há evidência estatística significativa para rejeitar a hipótese nula de igualdade de médias entre os grupos. Isso sugere que há diferenças significativas entre as médias dos grupos analisados, em relação à variável "t". O valor F é 11.12 $2e-16$ e F é 5.18 $1.37e-18$, respectivamente para comprimento e largura das lesões. As avaliações de dimensão da lesão podem ser observadas na (Tabela 6) e (Figuras 15).

TABELA 6 – COMPRIMENTO E LARGURA MÉDIA DE LESÕES (mm) EM FOLHAS DESTACADAS, INOCULADOS COM FERIMENTO NA FACE ADAXIAL, COM DISCO DE MICÉLIO (5 mm) *Colletotrichum nymphaeae*, AVALIAÇÃO AOS 7 DAI

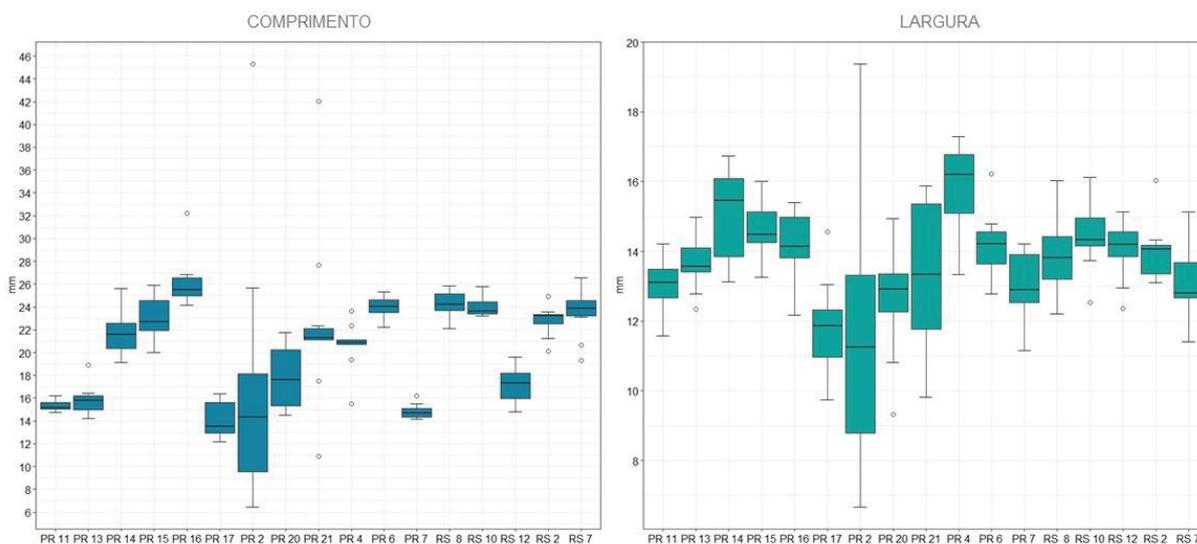
ISOLADO	LESÕES (mm) ¹	
	Comprimento	Largura
Testemunha	0	0
PR 2	17,5 def	11,7 e
PR 4	20,6 abcde	15,8 a
PR 6	24 a	14,8 abc
PR 7	14,8 ef	12,7 bcde
PR 11	15,3 ef	13 bcde
PR 13	15,8 ef	13,6 abcde
PR 14	21,8 abcd	15 ab
PR 15	22,9 abc	14,5 abc
PR 16	26,1 a	14,2 abc
PR 17	14,4 f	11,8 de
PR 20	18,8 bcdef	12,7 cde
PR 21	22,6 abcd	13,2 bcde
RS 2	22,8 abcd	14 abcde
RS 7	23,5 ab	13,1 bcde
RS 8	24,5 a	13,9 abcde
RS 10	24 a	14,1 abc
RS 12	18,2 cdef	14 abcd

¹Valores com mesma letra não diferem na coluna significativamente pelo teste de Tukey, significância $\alpha = 0,05$.

FONTE: A autora (2023).

Todos isolados apresentaram lesões nas folhas, as medianas dos comprimentos e larguras podem ser observadas nos gráficos, bem como pontos de máxima e mínima (Figuras 15).

FIGURA 15 – COMPRIMENTO E LARGURA DE LESÕES (mm) EM FOLHAS JOVENS DESTACADAS, INOCULADOS COM *Colletotrichum nymphaeae*, COM DISCO DE MICÉLIO (5 mm) COM FERIMENTO, FACE ADAXIAL, AVALIAÇÃO AOS SETE DIAS



NOTA: Gráfico boxplot: quadrado retangular que representa o intervalo interquartil (IQR) dos dados. A linha vertical dentro do quadrado representa a mediana dos dados. Os valores máximos e mínimos dos dados são representados por linhas verticais que se estendem além do quadrado em cada extremidade. Valor incomum que presente nos dados está representado com círculo acima ou abaixo dos dados.

FONTE: A autora (2023).

3.3 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE CLONES DE ERVA-MATE COM BAIXO E ALTO NÍVEL DE CAFEÍNA À *Colletotrichum nymphaeae*

Não houve diferença estatística significativa entre os genótipos com diferentes níveis de cafeína (Tabela 9). Contudo, houve diferença significativa entre clones com o mesmo nível de cafeína, para os dois níveis testados (Tabela 7) e (Figura 16). Este experimento foi repetido duas vezes.

TABELA 7 – AVALIAÇÃO DE CLONES COM DIFERENTES NÍVEIS DE CAFEÍNA, UTILIZANDO FOLHAS JOVENS DESTACADAS INOCULADAS COM DISCO DE MEIO BATATA-DEXTROSE-ÁGAR COM MICÉLIO (5 mm) DE *Colletotrichum nymphaeae*, AOS SETE DAI

CLONE	CAFEÍNA	INCIDÊNCIA ³ (%)	LESÃO ¹ (mm)		ACÉRVULO ² (%)			
			Comprimento	Largura	S	B	R	A
Testemunha	-	0	-	-	-	-	-	-
EC53	Alta	100	15,3 a	11,6 a	-	10	40	50
EC37	Alta	50	1,5 b	1,4 b	100	-	-	-
EC17	Baixa	100	11,1 a	8,9 a	20	20	20	40
EC47	Baixa	40	2,2 b	1,8 b	100	-	-	-

¹Valores com mesma letra não diferem na coluna significativamente pelo teste de Tukey, significância $\alpha = 0,05$.

²Formação de acérvulos: Ausente (S): não formação de acérvulos sobre a lesão; Baixa (B), formação de acérvulos e estes não envolviam toda a borda da lesão; Regular (R), formação de acérvulos em volta de toda a borda da lesão; e Alta (A), formação de acérvulos em toda a lesão. Está expresso o percentual de folhas em cada classificação.

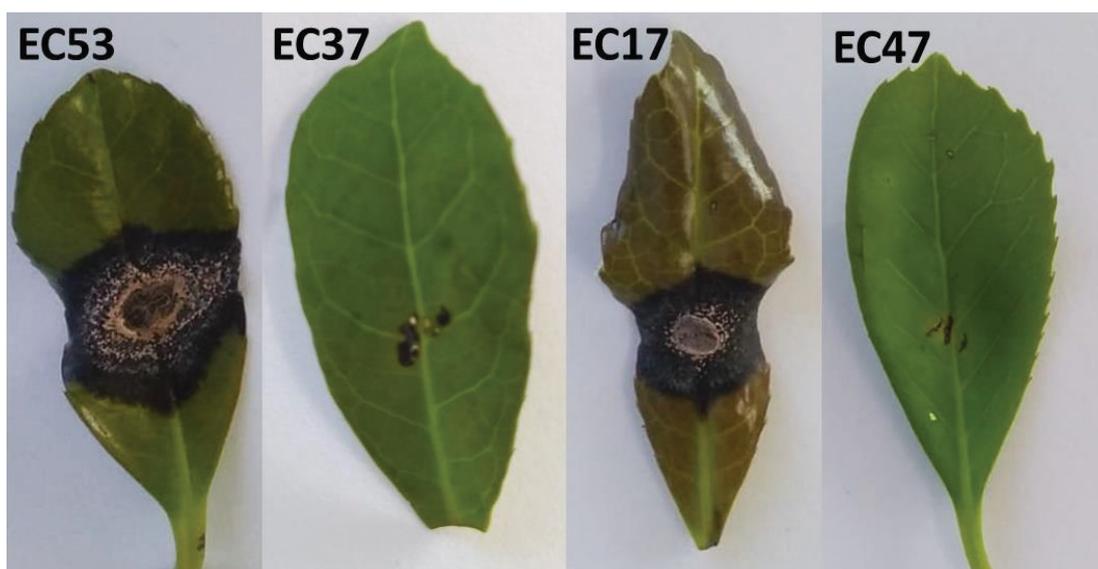
³Incidência: percentual de folhas inoculadas com sintomas.

Nota: (-) indica que não houve dado representativo.

Média dos valores, experimento repetido duas vezes.

FONTE: A autora (2023).

FIGURA 16 – REAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE E RESISTÊNCIA FOLHAS DE CLONES DE ERVAMATE COM DIFERENTES NÍVEIS DE CAFEÍNA, ALTA (EC53 e EC37) E BAIXA (EC17 e EC47), INOCULADOS COM *Colletotrichum nymphaeae* AOS SETE DAI



FONTE: A autora (2023).

Na Tabela 8, encontram-se os resultados da inoculação dos isolados de *C. nymphaeae* na face adaxial e abaxial das folhas jovens, os sintomas e sinais podem ser observados na (Figura 17).

TABELA 8 - PERCENTUAL DE FOLHAS COM SINTOMAS: FOLHAS JOVENS DESTACADAS INOCULADAS COM DISCO DE MEIO BATATA-DEXTROSE-ÁGAR COM MICÉLIO (5 mm) DE *Colletotrichum nymphaeae*, AOS SETE DAI

ISOLADO	FOLHAS SINTOMÁTICAS (%)	
	FACE ADAXIAL	FACE ABAXIAL
Testemunha	0*	0
PR 7	100	100
PR 15	100	82
PR 16	100	100
PR 17	100	100
PR 20	100	75
RS 7	100	100
RS 10	100	100
RS 12	100	87

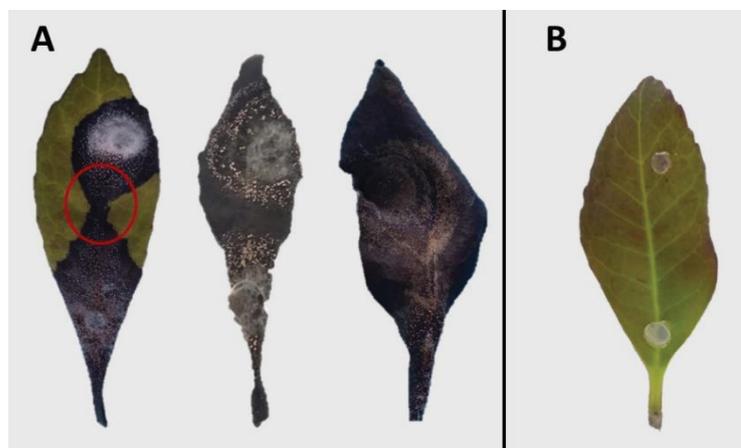
Nota: Os valores representam a porcentagem de folhas sintomáticas nas faces adaxial ou abaxial. Cada folha foi inoculada com dois discos de meio BDA com micélio

*Variando de 0 a 100%.

FONTE: A autora (2023).

Houve formação de lesões coalescentes em folha inoculada com *C. nymphaeae* simultaneamente em dois pontos (Figura 17).

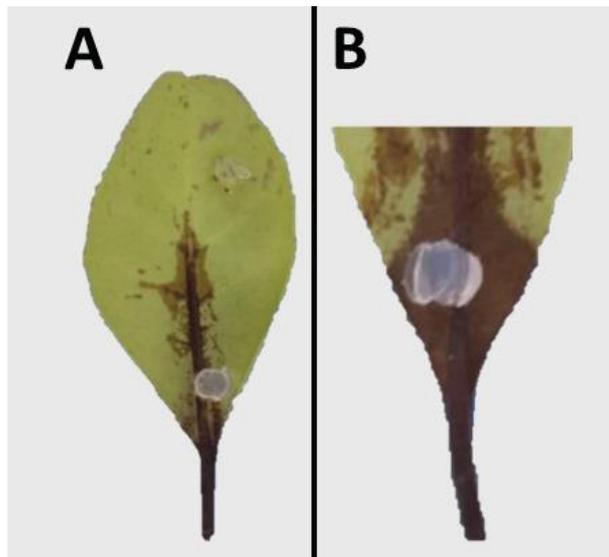
FIGURA 17 – SINTOMAS E SINAIS DE *Colletotrichum nymphaeae* EM FOLHAS JOVENS DESTACADAS E INOCULADAS COM DISCO DE MEIO BATATA-DEXTROSE-ÁGAR COM MICÉLIO (5 mm) DE *Colletotrichum nymphaeae*, AOS SETE DAI



FONTE: A autora (2023).

Os ensaios preliminares também mostraram que o contato direto das folhas com o papel umedecido resultou em escurecimento na região da nervura central (Figura 18). Diante disso, foi definido que, para as etapas subsequentes, as folhas deveriam ser colocadas sobre uma lâmina de vidro para evitar o contato direto do papel umedecido com a superfície foliar.

FIGURA 18 – ESCURECIMENTO DA FOLHA DE ERVA-MATE, INICIANDO NA PORÇÃO INFERIOR DA NERVURA CENTRAL APÓS CONTATO DIRETO COM O PAPEL UMEDECIDO DURANTE PERÍODO DE INCUBAÇÃO



Nota: Folha completa (A); Imagem ampliada (B). Folhas diferentes, folhas testemunhas.

FONTE: A autora (2023).

4 DISCUSSÃO

Este estudo mostrou indícios da presença de resistência à *C. nymphaeae* em clones de erva-mate. Em folhas destacadas, dois clones de erva-mate não apresentaram sintomas quando inoculados com *C. nymphaeae*. Além disso, o método de inoculação de *C. nymphaeae* com o uso de disco de meio de cultura com micélio na face adaxial de folhas jovens com ferimentos foi adequado para os estudos de patogenicidade e resistência.

Neste estudo, a infecção por *C. nymphaeae* nas folhas jovens de erva-mate resultou na formação de lesões necróticas, com cor escura e borda avermelhada, típicas de antracnose em erva-mate. Em períodos úmidos, essas lesões exibiram uma mucilagem com cor alaranjada, identificável a olho nu, sinais da esporulação do fungo. Esses sintomas são típicos de antracnose e já foram relatados em erva-mate por Grigoletti e Auer, (1996); Auer e Dos Santos (2016) e, em outros hospedeiros, como em mogno africano (*Khaya* spp.) por Benso et al. (2023) e, em macieira, por Hamada et al., (2020).

Neste estudo, dois clones de erva-mate com um com alta e outro com baixa cafeína mostraram-se resistentes à *C. nymphaeae*, não havendo, no entanto, evidências de uma possível influência do nível de cafeína do clone na resposta ao patógeno. O marcador cafeína parece que não está diretamente relacionado à capacidade de clones de erva-mate serem resistentes à *C. nymphaeae*. Entretanto, pouco se conhece sobre a variabilidade dos genótipos de erva-mate. Há necessidade de uma investigação mais aprofundada para determinar a composição química e as diferenças existentes entre os clones submetidos aos testes. Além disso, alguns autores, como Lagos et al., (2001) utilizam o termo “variedades” para separação na variabilidade fenotípica observada visualmente em populações de erva-mate, especialmente em relação a características como a cor, tamanho e presença de pilosidade nas folhas. Portanto, é necessário aprofundar a compreensão dessas diferenças fenotípicas e metabólicas por meio de estudos adicionais.

Neste estudo, verificou-se que a idade da folha teve influência na resposta do hospedeiro ao patógeno, pois mesmo com ferimentos a inoculação de folhas maduras não resultaram em infecção. Em erva-mate, Gomes et al. (2001) também observaram a não infecção de *Colletrotrichum* sp. em folhas maduras de erva-mate, havendo a necessidade de ferimentos na superfície foliar de folhas jovens para ocorrer a

infecção. É possível que alguns mecanismos de defesa de plantas pré e pós-formados estejam envolvidos (AMORIM, L.; PASCHOLATI, 2018; PASCCHOLATI; DALIO, 2018). Esses mecanismos envolvem estruturas como a espessura da cutícula, a presença de tricomas, a formação de camadas de lignina e a acumulação de substâncias que podem dificultar a penetração e sobrevivência do patógeno (PASCCHOLATI; DALIO, 2018). Em seringueira, Dos Santos et al. (1999), verificaram que a presença da cutícula nas folhas maduras impedia a penetração de *Phytophthora capsici*, no entanto, estes autores relatam que ao ser rompida esta barreira *P. capsici* conseguia infectar e colonizar o hospedeiro (DOS SANTOS et al., 1999). Não se conhece em erva-mate se há alguma barreira física ou química no hospedeiro ao fungo *Colletotrichum*.

Em noqueira-pecan (*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch) Savian et al. (2021), ao analisarem a patogenicidade de *C. nymphaeae* em folíolos e frutos de espécie produtora de castanhas, verificaram diferenças na suscetibilidade do hospedeiro ao patógeno entre as cultivares analisadas, resultando em diferentes tamanhos de lesões nos folíolos e frutos analisados (SAVIAN, et al., 2021).

O ciclo do patógeno e o inóculo inicial ainda não foram elucidados para a cultura da erva-mate. Contudo, para a cultura do morango (*Fragaria × ananassa*), a espécie *C. nymphaeae* foi encontrada em associação com plantas daninhas (*Amaranthus viridis* L., *Convolvulus arvensis* L., *Fumaria officinalis* L., *Lactuca serriola* L. e *Sonchus oleraceus* L.) como um fungo endofítico, sugerindo que estas plantas podem atuar como hospedeira alternativa de inóculo para culturas de importância econômica (KARIMI et al., 2019). Enquanto que, Yamagishi et al. (2015), estudando a ciclo de *C. nymphaeae* na cultura do aipo, identificaram que o mecanismo de transmissão primária é via sementes. Em aipo, esses autores desenvolveram um sistema de controle físico de *C. nymphaeae* para a cultura (YAMAGISHI et al. 2015).

A partir de informações sobre o patógeno e o hospedeiro, estratégias poderão ser definidas, tais como: melhoramento genético para promover resistência, adoção de práticas agronômicas adequadas até o uso de métodos de controle biológico ou químico (PERALTA-RUIZ et al., 2023) Um entendimento abrangente acerca da dinâmica populacional e das interações e características de interesse entre patógeno e hospedeiro, é de suma importância para a implementação de estratégias de controle

sustentáveis e eficazes da doença (PERALTA-RUIZ et al., 2023; PIASSETTA, 2022; YAMAGISHI et al. 2015).

Em relação à interação entre a erva-mate e o gênero *Colletotrichum*, é possível que existam mecanismos de defesa e expressão de genes de resistência, semelhantes aos elucidados em outras culturas (FINGER, 2022; PADILLA et al., 2022). Estudos em outros hospedeiros, como o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), revelaram a presença de alelos específicos, como o Co-5² e o Co-4², que desempenham um papel na ativação de defesa da planta contra o fungo *C. lindemuthianum* Briosi e Cavara., causador da antracnose (PADILLA et al., 2022; ALZATE-MARIN et al., 2004). Esses alelos foram associados a respostas como a formação de caloses nos locais de ataque do fungo. Na cultura do morango (*Fragaria x ananassa* Duch), Anciro et al. (2018), relataram a identificação do locus denominado FaRCg1, que confere resistência à podridão da copa causada pelo fungo *C. gloeosporioides* em morangos cultivados.

É possível que a erva-mate também possua mecanismos de defesa em resposta à infecção pelo gênero *Colletotrichum*. Estudos futuros poderão investigar a presença de genes específicos, marcadores genéticos e respostas fisiológicas da planta para elucidar a possível ativação desses mecanismos de defesa na interação entre a erva-mate e *C. nymphaeae*. Essas descobertas poderão contribuir para o desenvolvimento de estratégias de manejo e desenvolvimento de produtos para o controle da antracnose. Alguns autores indicam que a espécie *C. nymphaeae*, não é dominante quando analisada a competição interespecífica entre espécies e indicando também a menor resistência ao cobre (LOPEZ et al., 2023).

Outra abordagem, visando estudos da atividade antifúngica contra *C. nymphaeae* foi explorada por Weisany et al. (2019), que investigaram a nanoencapsulação de óleos essenciais de tomilho e endro com nanopartículas de cobre. Essa técnica teve como objetivo aumentar a eficácia dos óleos essenciais no combate a *C. nymphaeae*. Os resultados demonstraram uma melhoria significativa na atividade antifúngica desses materiais quando nanoencapsulados com NPs de cobre, indicando seu potencial como agentes de controle eficazes contra o fungo (WEISANY et al., 2019).

Na cultura da nêspera, Damm et al. (2020) mencionaram a sensibilidade de *C. eriobotryae* e *C. nymphaeae* à azoxistrobina, fungicida utilizado no controle de

doenças fúngicas na cultura. Essa informação é relevante para o desenvolvimento de estratégias de manejo da antracnose, destacando a eficácia potencial desse fungicida. No entanto, é importante ressaltar que a abordagem para o controle da antracnose pode variar dependendo das condições locais, das características da cultura e da sensibilidade do fitopatógeno (PERALTA-RUIZ et al., 2023; RATTANAKREETAKUL et al., 2023; ALIJANI et al., 2019).

Nos últimos anos, diversas pesquisas têm relatado o uso de agentes de biocontrole, como uma abordagem de estratégias combinadas de métodos (PERALTA-RUIZ et al., 2023). A atividade antifúngica de compostos voláteis produzidos por *Staphylococcus sciuri* cepa MarR44 (ALIJANI et al., 2019) e *Bacillus atrophaeus*, cepa DM6120 (ALIJANI et al., 2022) tem sido investigada. Esses compostos voláteis mostraram potencial para o biocontrole de *C. nymphaeae*, agente causador da antracnose em morangueiros (ALIJANI et al., 2019; ALIJANI et al., 2022).

Essas descobertas sugerem a possibilidade de usar bactérias benéficas para controlar o crescimento e a disseminação do fungo, oferecendo uma alternativa promissora para diminuição da ocorrência da doença (ALIJANI et al., 2019). Entretanto, a plasticidade desse gênero de fitopatógenos em conjunto com amplificado número de hospedeiros dificulta a identificação e o desenvolvimento de métodos de controle genético, químico ou cultural (GELAIN et al., 2022; RATTANAKREETAKUL et al., 2023; TOZZE JÚNIOR et al., 2015).

Com isso, é fundamental a adoção de testes adequados para patogenicidade e resistência, indispensáveis para cada patossistema. Neste estudo, a otimização dos procedimentos de inoculação promoveu resultados satisfatórios. A inoculação de *C. nymphaeae* na face adaxial das folhas possibilitou lesões maiores e mais uniformes do que na face abaxial. Provavelmente, a curvatura do limbo foliar na porção da nervura central na face abaxial dificultou o contato do micélio do patógeno com a superfície do hospedeiro. Outro aspecto se refere ao uso de um suporte para a folha no 'gerbox' para minimizar o contato do limbo foliar com o substrato umedecido e, com isso, evitar a perda precoce da sua viabilidade.

5 CONCLUSÕES

O método de inoculação de *C. nymphaeae* com o uso de disco de meio de cultura com micélio na face adaxial de folhas jovens com ferimentos foi adequado para os estudos de patogenicidade e resistência.

Este estudo mostrou indícios da presença de resistência à *C. nymphaeae* em clones de erva-mate. Em folhas destacadas, dois clones de erva-mate não apresentaram sintomas quando inoculados com *C. nymphaeae*.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Consulta regulamentação agrotóxicos. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 07 abr. 2023.
- ALIJANI, Z.; AMINI, J.; ASHENGROPH, M.; BAHRAMNEJAD, B.; MOZAFARI, A. A. Biocontrol of strawberry anthracnose disease caused by *Colletotrichum nymphaeae* using *Bacillus atrophaeus* strain DM6120 with multiple mechanisms. **Tropical Plant Pathology**, p. 1-15, 2022. DOI: 10.1007/s40858-021-00477-7.
- ALIJANI, Z., AMINI, J.; ASHENGROPH, M.; BAHRAMNEJAD, B. Antifungal activity of volatile compounds produced by *Staphylococcus sciuri* strain MarR44 and its potential for the biocontrol of *Colletotrichum nymphaeae*, causal agent strawberry anthracnose. **International Journal of Food Microbiology**. v. 307, 2019. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108276.
- ALZATE-MARIN, A. L.; ARRUDA, K. M.; DE SOUZA, K. A.; DE BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Introgression of Co-42 and Co-5 anthracnose resistance genes into 'Carioca' Common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, n. 4, 2004. DOI:10.12702/1984-7033.v04n04a11.
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo de Relações Patógeno-Hospedeiro. In: AMORIM, L. et al. (ed.). **Manual de Fitopatologia**, v. 1, 5ª ed. 2018. p. 46-68.
- ANCIRO, A.; MANGANDI, J.; VERMA, S.; PERES, N.; WHITAKER, V.M.; LEE, S. FaRCg1: A Quantitative Trait Locus Conferring Resistance to *Colletotrichum* Crown Rot Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Octoploid Strawberry. **Theor. Appl. Genet.** n. 131, p. 2167–2177. 2018. DOI: 10.1007/s00122-018-3145-z.
- AUER, C. G.; DOS SANTOS, A. F. dos. Doenças da Erva-Mate. In: Amorim, L. et al. (ed.). **Doenças de Plantas Cultivadas**. 5 ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. p. 343-349.
- BENSO, L.A.; PIERONI, L.P.; MIRA, Y.D; MARQUES, A.; CIRIELLO, V.; ROSSINI, B. C.; FURTADO, E. L. First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing leaf spot in *Khaya* spp.. **Australasian Plant Dis.** v. 18, n. 1, p. 1-5, 2023. DOI: 10.1007/s13314-023-00502-5.
- CENTENARO, M.; SATTLER, S. A.; SILVEIRA, C. V. DA.; OLIVEIRA, H. C. C. R. DE. Evolução da produção e tecnologias no cultivo de erva-mate: análise entre Brasil e Argentina. **Profanações**, v. 7, p. 90-107, 2020. DOI: 10.24302/prof.v7iEd.
- DAMM, U., SUN, YC.; HUANG, CJ. *Colletotrichum eriobotryae* sp. nov. and *C. nymphaeae*, the anthracnose pathogens of loquat fruit in central Taiwan, and their sensitivity to azoxystrobin. **Mycol Progress** 19, 367–380, 2020.

DIMAYACYAC, D. A.; BALENDRES, M. A. First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing post-harvest anthracnose of tomato in the Philippines. **New Disease Reports**, v. 46, n. 2, 2022. DOI: 10.1002/ndr2.12125.

DOS SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K. ; MAFFIA, L. A. ; ALFENAS, A. C. . Importância da estrutura da superfície foliar na interação *Phytophthora capsici* - *Hevea brasiliensis*. **Boletim de Pesquisa Florestal**. Colombo-PR, Embrapa Florestas. 1999.

FINGER, A. C. **Expressão diferencial de genes de resistência à antracnose do colmo (*Colletotrichum graminicola*) em germoplasma de milho tropical**. 2023. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2023.

GEBARA, K. S., GASPAROTTO-JUNIOR, A., SANTIAGO, P. G., CARDOSO, C. A. L., DE SOUZA, L. M., MORAND, C.; CARDOZO-JUNIOR, E. L. Daily intake of chlorogenic acids from consumption of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) traditional beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 46, p. 10093-10100, 2017. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b04093.

GELAIN, J.; LYKINS, S.; ROSA, P. F.; SOARES, A. T.; DOWLING, M. E.; SCHNABEL, G.; MAY DE MIO, L. L. Identification and Fungicide Sensitivity of *Colletotrichum* spp. from Apple Flowers and Fruitlets in Brazil. **Plant Disease**, 2022. DOI: 10.1094/PDIS-01-22-0243-RE.

GOMES, N. S. B.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G.; WIELEWSKI, P.; VALLE, G. M. **PATOGENICIDADE DE *Colletotrichum acutatum* EM FOLHAS DESTACADAS DE ERVA-MATE***. Colombo: Embrapa Florestas. 2001.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G. **Doenças da erva-mate: identificação e controle**. EMBRAPA-CNPQ, 1996. Relatório Técnico.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G.; IEDE, E. T.; SOARES, C. **Manual de identificação de pragas e doenças da erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Colombo, Embrapa/CNPQ. 2000.

HAMADA, N. A.; MOREIRA, R. R.; FIGUEIREDO, J. A. G.; MIO, L. L. M. D. *Colletotrichum acutatum* complex isolated from apple flowers can cause bitter rot and Glomerella leaf spot. **Bragantia**, v. 79, p. 399-406, 2020. DOI: 10.1590/1678-4499.20190429.

HEGEL, P.; GRANONE, L. I.; HRNČIČ, M. K.; PEREDA, S.; KOTNIK, P.; KNEZ, Z. Alkaloid-rich vs. antioxidant-rich yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts: Exploiting the selectivity of supercritical CO₂ using hydrated ethanol as co-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 172, p. 105-200, 2021. DOI: 10.1016/j.supflu.2021.105200.

KARIMI K.; ARZANLOU M.; PERTOT I. Weeds as Potential Inoculum Reservoir for *Colletotrichum nymphaeae* Causing Strawberry Anthracnose in Iran and Rep-PCR

Fingerprinting as Useful Marker to Differentiate *C. acutatum* Complex on Strawberry. **Front Microbiol.** 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00129.

LAGOS, J. B.; MAZZA, M. C. M.; NAKASHIMA, T.; MEDRADO, M. J.; AMARAL, F. M. R. Determinação do teor de metilxantinas e análise da variabilidade genética de seis variedades populares de erva-mate. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento.** Colombo/PR. Embrapa Florestas. 2001.

LOPEZ, M. T. G.; SERRANO, M. S.; CAMILETTI, B. X.; GORDON, A.; ESTUDILLO, C.; TRAPERO, A.; MORAL, J. Study of the competition between *Colletotrichum godetiae* and *C. nymphaeae*, two pathogenic species in olive. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-32585-6.

PADILLA, M. C. P.; RODRÍGUEZ-ARÉVALO, K. A.; RINCÓN-RIVERA, L. J.; GONZÁLEZ-ALMARIO, A. Alelo de resistência Co-5² contribui para induzir a defesa basal contra *Colletotrichum lindemuthianum* raça 7. **Pesquisa Agropecuária Tropical.** 2022.

PASCCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiopatologia e genômica das interações planta-patógeno. In: AMORIM, L. et al. (ed.). **Manual de Fitopatologia**, v. 1, 5^a ed. 2018. p. 390-419.

PIASSETTA, R. **Doenças em mudas clonais de erva-mate em duas épocas do ano-Guarapuava, Paraná.** 2022. 44 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2022.

PERALTA-RUIZ, Y.; ROSSI, C.; GRANDE-TOVAR, C.D.; CHAVES-LÓPEZ, C. Green Management of Postharvest Anthracnose Caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **J. Fungi.** 2023. DOI: 10.3390/jof9060623.

RATTANAKREETAKUL, C.; KEAWMANEE, P.; BINCADER, S.; MONGKOLPORN, O.; PHUNTUMART, V.; CHIBA, S.; PONGPISUTTA, R; CHAINARONG et al. Two Newly Identified *Colletotrichum* Species Associated with Mango Anthracnose in Central Thailand. **Plants**, v. 12, n. 5, p. 1130, 2023. DOI: 10.3390/plants12051130.

RIOLO, M.; PANE, A.; SANTILLI, E.; MORICCA, S.; CACCIOLA, S. O. Susceptibility of Italian olive cultivars to various *Colletotrichum* species associated with fruit anthracnose. **Plant Pathology**, v. 72, n. 2, p. 255-267, 2023. DOI: 10.1111/ppa.13652.

RUSKOVSKA, T.; MORAND, C.; BONETTI, C. I.; GEBARA, K. S.; JUNIOR, E. L. C.; MILENKOVIC, D. Multigenomic modifications in human circulating immune cells in response to consumption of polyphenol-rich extract of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) are suggestive of cardiometabolic protective effects. **British Journal of Nutrition**, v. 129, n. 2, p. 185-205, 2023. DOI: 10.1017/S0007114522001027.

SAVIAN, L. G.; RABUSKE, J. E.; WALKER, C., SARZI, J. S.; ROLIM, J. M.; QUEVEDO, A. C.; MUNIZ, M. F. B. *Colletotrichum nymphaeae* cross-infection and

reaction of pecan cultivars. **Ciência Florestal**, v. 31, p. 1833-1848, 2022. DOI: 10.5902/1980509848248.

TOZZE JÚNIOR, H. J.; FIRMINO, A. C.; FISCHER, I. H.; FURTADO, E. L.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Characterization of *Colletotrichum* spp. isolates associated with fruit trees in the state of São Paulo. **Summa Phytopathologica**, 2015. DOI: 10.1590/0100-5405/2021.

WEISANY, W.; SAMADI, S.; TAHIR, N. A. R.; AMINI, J.; HOSSAINI, S. Nano-encapsulated with mesoporous silica enhanced the antifungal activity of essential oil against *Botrytis cinerea* (Helotiales; Sclerotiniaceae) and *Colletotrichum nymphaeae* (Glomerellales; Glomerellaceae). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 122, p. 101902, 2022. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.02.031.

WENDLING, I.; SANTAROSA, E.; PENTEADO JUNIOR, J.; AUER, C. G.; PENTEADO, S.; DE QUEIROZ, D. L.; DOS SANTOS, A. F. **Manual de produção de mudas clonais de erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 47 p. 2020.

YAMAGISHI, N.; FUJINAGA, M.; ISHIYAMA, Y. et al. Life cycle and control of *Colletotrichum nymphaeae*, the causal agent of celery stunt anthracnose. **Journal of General Plant Pathology**. 2015. DOI: 10.1007/s10327-015-0598-7.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Consulta regulamentação agrotóxicos. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 07 abr. 2023.
- ALIJANI, Z.; AMINI, J.; ASHENGROPH, M.; BAHRAMNEJAD, B. Antifungal activity of volatile compounds produced by *Staphylococcus sciuri* strain MarR44 and its potential for the biocontrol of *Colletotrichum nymphaeae*, causal agent strawberry anthracnose. **International Journal of Food Microbiology**. v. 307, 2019. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108276.
- ALIJANI, Z.; AMINI, J.; ASHENGROPH, M.; BAHRAMNEJAD, B.; MOZAFARI, A. A. Biocontrol of strawberry anthracnose disease caused by *Colletotrichum nymphaeae* using *Bacillus atrophaeus* strain DM6120 with multiple mechanisms. **Tropical Plant Pathology**, p. 1-15, 2022. DOI: 10.1007/s40858-021-00477-7.
- ALZATE-MARIN, A. L.; ARRUDA, K. M.; DE SOUZA, K. A.; DE BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Introgression of Co-42 and Co-5 anthracnose resistance genes into 'Carioca' Common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, n. 4, 2004. DOI:10.12702/1984-7033.v04n04a11.
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo de Relações Patógeno-Hospedeiro. In: AMORIM, L. et al. (ed.). **Manual de Fitopatologia**, v. 1, 5ª ed. 2018. p. 46-68.
- ANCIRO, A.; MANGANDI, J.; VERMA, S.; PERES, N.; WHITAKER, V.M.; LEE, S. FaRCg1: A Quantitative Trait Locus Conferring Resistance to *Colletotrichum* Crown Rot Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Octoploid Strawberry. **Theor. Appl. Genet.** n. 131, p. 2167–2177. 2018. DOI: 10.1007/s00122-018-3145-z.
- ANTONIO, G. L.; SCALOPPI JUNIOR, E. J.; FISHER, I. H.; FURTADO, E. L.; FIRMINO, A. C. Clonal resistance of rubber tree to *Colletotrichum* spp. **Forest Pathology**. v. 51, p. 1-6, 2021. DOI: 10.1111/efp.12685.
- AUER, C. G.; DOS SANTOS, A. F. dos. Doenças da Erva-Mate. In: Amorim, L. et al. (ed.). **Doenças de Plantas Cultivadas**. 5 ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. p. 343-349.
- BEDENDO, I. P. Murchas Vasculares. In: AMORIM, L. et al. (ed.). **Manual de Fitopatologia**, v. 1, 5ª ed. 2018. p. 333-338.
- BENSO, L.A.; PIERONI, L.P.; MIRA, Y.D; MARQUES, A.; CIRIELLO, V.; ROSSINI, B. C.; FURTADO, E. L. First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing leaf spot in *Khaya* spp.. **Australasian Plant Dis.** v. 18, n. 1, p. 1-5, 2023. DOI: 10.1007/s13314-023-00502-5.
- CARRARO, T. de A.; LICHTENBERG, P. D. S. F.; MICHAELIDES, T. J.; BORGES; M. I. M.; PEREIRA, W. V.; DE MIO, L. L. M. Identification and characterization of

Colletotrichum species associated with anthracnose on persimmon in Brazil. **Fungal Biology**, v. 126, n. 3, p. 235-249, 2022. DOI: 10.1016/j.funbio.2021.12.003.

CASTILHO, L. B., REIS, A., HENZ, G. P. Identificação morfológica de isolados de *Colletotrichum* spp. Causadores de antracnose em solanáceas. Embrapa Hortaliças. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 29. 2007.

CENTENARO, M.; SATTLER, S. A.; SILVEIRA, C. V. DA.; OLIVEIRA, H. C. C. R. DE. Evolução da produção e tecnologias no cultivo de erva-mate: análise entre Brasil e Argentina. **Profanações**, v. 7, p. 90-107, 2020. DOI: 10.24302/prof.v7iEd.

COX, M. L.; IRWIN, A. G. Conidium and apressorium variation in Australian isolates of the *Colletotrichum gloeosporioides* group and closely related species. **Australian Systematic Botany**, v.1, n.2, p.139-149, 1988.

DAMM, U., SUN, YC.; HUANG, CJ. *Colletotrichum eriobotryae* sp. nov. and *C. nymphaeae*, the anthracnose pathogens of loquat fruit in central Taiwan, and their sensitivity to azoxystrobin. **Mycol Progress** 19, 367–380, 2020. DOI: 10.1007/s11557-020-01565-9.

DAMM, U.; WOUDEBERG, J. H. C.; CANNON, P. F.; CROUS, P. W. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, v.39, p.45-87, 2009.

DIMAYACYAC, D. A.; BALENDRES, M. A. First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing post-harvest anthracnose of tomato in the Philippines. **New Disease Reports**, v. 46, n. 2, 2022. DOI: 10.1002/ndr2.12125.

DOS SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K. ; MAFFIA, L. A. ; ALFENAS, A. C. . Importância da estrutura da superfície foliar na interação *Phytophthora capsici* - *Hevea brasiliensis*. **Boletim de Pesquisa Florestal**. Colombo-PR, Embrapa Florestas. 1999.

DOS SANTOS, Á. F.; TESSMANN, D. J.; MAFACIOLI, R.; VIDA, J. B. Etiologia e Controle da Antracnose da Pupunheira para Palmito. Embrapa Florestas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 32, 2007.

EMBRAPA. **Erva-mate. 2019**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/florestas/transferencia-de-tecnologia>. Acesso em: 20 ago. 2021.

FAVARETTO, L.; FAVARETTO, J.; LISBINSKI, F. C.; CORONEL, D. A. DESEMPENHO DOS PRINCIPAIS ESTADOS BRASILEIROS EXPORTADORES DE ERVA-MATE (2000-2020). **Gestão & Regionalidade**, n. 39, 2023.

FINGER, A. C. **Expressão diferencial de genes de resistência à antracnose do colmo (*Colletotrichum graminicola*) em germoplasma de milho tropical**. 2023. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2023.

FODRA, T. C. W. **Dinâmica das relações comerciais de erva-mate entre Brasil e seus principais importadores**. 2019. 36 f. Monografia de especialização (Gestão Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

GEBARA, K. S.; GASPAROTTO-JUNIOR, A.; SANTIAGO, P. G.; CARDOSO, C. A. L.; DE SOUZA, L. M.; MORAND, C.; CARDOZO-JUNIOR, E. L. Daily intake of chlorogenic acids from consumption of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) traditional beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 46, p. 10093-10100, 2017. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b04093.

GELAIN, J.; LYKINS, S.; ROSA, P. F.; SOARES, A. T.; DOWLING, M. E.; SCHNABEL, G.; MAY DE MIO, L. L. Identification and Fungicide Sensitivity of *Colletotrichum* spp. from Apple Flowers and Fruitlets in Brazil. **Plant Disease**, 2022. DOI: 10.1094/PDIS-01-22-0243-RE.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use *Glomerella cingulata*. **Gene**, v.122, n. 1, p. 225-230, 1992.

GOMES, N. S. B.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G.; WIELEWSKI, P.; VALLE, G. M. **PATOGENICIDADE DE *Colletotrichum acutatum* EM FOLHAS DESTACADAS DE ERVA-MATE***. Colombo: Embrapa Florestas. 2001.

GONÇALVES, R. C.; ALFENAS., A. C; MAFIA., R. G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In. Alfenas, C. A.; Mafia, R. G. (ed.). **Métodos em Fitopatologia. Doenças de Plantas Cultivadas**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2016. p. 94-105.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G. **Doenças da erva-mate: identificação e controle**. EMBRAPA-CNPQ, 1996. Relatório Técnico.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G.; IEDE, E. T.; SOARES, C. **Manual de identificação de pragas e doenças da erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Colombo, Embrapa/CNPQ. 2000.

HAMADA, N. A.; MOREIRA, R. R.; FIGUEIREDO, J. A. G.; MIO, L. L. M. D. *Colletotrichum acutatum* complex isolated from apple flowers can cause bitter rot and *Glomerella* leaf spot. **Bragantia**, v. 79, p. 399-406, 2020. DOI: 10.1590/1678-4499.20190429.

HEGEL, P.; GRANONE, L. I.; HRNČIČ, M. K.; PEREDA, S.; KOTNIK, P.; KNEZ, Z. Alkaloid-rich vs. antioxidant-rich yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts: Exploiting the selectivity of supercritical CO₂ using hydrated ethanol as co-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 172, p. 105-200, 2021. DOI: 10.1016/j.supflu.2021.105200.

HYDE, K. D.; CAI, L.; MCKENZIE, E. H. C.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z.; PRIHASTUTI, H *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 1-17, 2009. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20198646065>. Acesso em: 11 abr. 2023.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal**. Tabela 1612 - Área plantada, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras temporárias. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613>>. Acesso em: 30 jun. 2023.

KAMEI, S. H.; COSTA, J. F. D. O.; BRITO NETTO, M. D. S.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. D. A Identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de anonáceas no estado de Alagoas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 209-216, 2014. DOI: 10.1590/S0100-29452014000500025.

KARIMI K.; ARZANLOU M.; PERTOT I. Weeds as Potential Inoculum Reservoir for *Colletotrichum nymphaeae* Causing Strawberry Anthracnose in Iran and Rep-PCR Fingerprinting as Useful Marker to Differentiate *C. acutatum* Complex on Strawberry. **Front Microbiol.** 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00129.

LACERDA, A. E. B. de. Série erva-mate sombreada (2): sistema de restauração produtivo agroflorestal. Colombo: Embrapa Florestas. 2019. **Relatório Técnico**.

LAGOS, J. B.; MAZZA, M. C. M.; NAKASHIMA, T.; MEDRADO, M. J.; AMARAL, F. M. R. Determinação do teor de metilxantinas e análise da variabilidade genética de seis variedades populares de erva-mate. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Colombo/PR. Embrapa Florestas. 2001.

LANDAU, E. C.; SILVA, G. A. DA; TORRES, T. Evolução da produção de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, Aquifoliaceae). In. LANDAU, E. C. et al. (Ed.). **Dinâmica da Produção Agropecuária e da Paisagem Natural no Brasil nas Últimas Décadas**. Brasília: Embrapa, 2020. p. 709-736.

LIU, H.; LI, Y.; LI, X.; LIU, H.; HUANG, J.; ZHENG, L. First report of tobacco anthracnose caused by *Colletotrichum nymphaeae* in China. **Plant Disease**. 2023. DOI: 10.1094/PDIS-09-22-2210-PDN.

LOPEZ, M. T. G.; SERRANO, M. S.; CAMILETTI, B. X.; GORDON, A.; ESTUDILLO, C.; TRAPERO, A.; MORAL, J. Study of the competition between *Colletotrichum godetiae* and *C. nymphaeae*, two pathogenic species in olive. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-32585-6.

LUONGO, L.; GALLI, M.; GARAGUSO, I.; PETRUCCI, M.; VITALE, S. First Report of *Colletotrichum fioriniae* and *C. nymphaeae* as Causal Agents of Anthracnose on Walnut in Italy. **Plant Disease**, v. 106, n. 1, p. 327, 2022. DOI: 10.1094/PDIS-05-21-1062-PDN.

MARIN-FELIX, Y.; GROENEWALD, J. Z.; CAI, L.; CHEN, Q.; MARINCOWITZ, S.; BARNES, I., ... & CROUS, P. W. **Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1**. Studies in mycology, 86, 2017. 99-216.

MEZZOMO, R.; ROLIM, J. M.; POLETTO, T.; WALKER, C.; MILANESI, P. M.; MUNIZ, M. F. B. Caracterização molecular e grupos de compatibilidade vegetativa de *Fusarium* spp. patogênicos à *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Ciência Florestal**, v. 31, n. 2, p. 846–862, 2021. DOI: 10.5902/1980509846843.

MOREIRA, R. R.; SILVA, G. A.; DE MIO, L. L. M. *Colletotrichum acutatum* complex causing anthracnose on peach in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, v. 49, p. 179-189, 2020. Doi: 10.1007/s13313-020-00690-z.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; of the *Colletotrichum gloeosporioides* group and closely related species. **Australian**

PADILLA, M. C. P.; RODRÍGUEZ-ARÉVALO, K. A.; RINCÓN-RIVERA, L. J.; GONZÁLEZ-ALMARIO, A. Alelo de resistência Co-5² contribui para induzir a defesa basal contra *Colletotrichum lindemuthianum* raça 7. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. 2022.

PASCCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiopatologia e genômica das interações planta-patógeno. In: AMORIM, L. et al. (ed.). **Manual de Fitopatologia**, v. 1, 5^a ed. 2018. p. 390-419.

PAULA, S.; WOLF, K. R.; MARTÍNI, A. F.; MILANESI, P. M. Fungal disease in "erva-mate". **Scientific Electronic Archives**, v. 11, n. 2, p. 27-34, 2018. DOI: 10.36560/1122018490.

PENTEADO JÚNIOR, J. F.; GOULART, I. C. G dos R. **Erva 20: sistema de produção para erva-mate**. Brasília: Embrapa, 2019.

PERALTA-RUIZ, Y.; ROSSI, C.; GRANDE-TOVAR, C.D.; CHAVES-LÓPEZ, C. Green Management of Postharvest Anthracnose Caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **J. Fungi**. 2023. DOI: 10.3390/jof9060623.

PEREIRA, J. R. **PROGNOGNÓSTICO AGROPECUÁRIO - ERVA MATE 2022/2023**. Ed. Gisele Barão da Silva, Joabe Rodrigues Pereira. Governo do Estado do Paraná. 2022. Disponível: https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2022-01/erva-mate.pdf. Acesso em: 22 mai. 2023.

PIASSETTA, R. **Doenças em mudas clonais de erva-mate em duas épocas do ano-Guarapuava, Paraná**. 2022. 44 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2022.

POLETTO, I.; MUNIZ, M. F. B.; CECONI, D. E.; POLETTO, T. Aspectos epidemiológicos da podridão-de-raízes da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Ciência Florestal**, v. 25, p. 281-291, 2015. DOI: 10.5902/1980509818445.

RATTANAKREETAKUL, C.; KEAWMANEE, P.; BINCADER, S.; MONGKOLPORN, O.; PHUNTUMART, V.; CHIBA, S.; PONGPISUTTA, R.; CHAINARONG et al. Two Newly Identified *Colletotrichum* Species Associated with Mango Anthracnose in Central Thailand. **Plants**, v. 12, n. 5, p. 1130, 2023. DOI: 10.3390/plants12051130.

RIOLO, M.; PANE, A.; SANTILLI, E.; MORICCA, S.; CACCIOLA, S. O. Susceptibility of Italian olive cultivars to various *Colletotrichum* species associated with fruit

anthracnose. **Plant Pathology**, v. 72, n. 2, p. 255-267, 2023. DOI: 10.1111/ppa.13652.

RUSKOVSKA, T.; MORAND, C.; BONETTI, C. I.; GEBARA, K. S.; JUNIOR, E. L. C.; MILENKOVIC, D. Multigenomic modifications in human circulating immune cells in response to consumption of polyphenol-rich extract of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) are suggestive of cardiometabolic protective effects. **British Journal of Nutrition**, v. 129, n. 2, p. 185-205, 2023. DOI: 10.1017/S0007114522001027.

SAVIAN, L. G.; RABUSKE, J. E.; WALKER, C., SARZI, J. S.; ROLIM, J. M.; QUEVEDO, A. C.; MUNIZ, M. F. B. *Colletotrichum nymphaeae* cross-infection and reaction of pecan cultivars. **Ciência Florestal**, v. 31, p. 1833-1848, 2022. DOI: 10.5902/1980509848248.

SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO (SFB). **Sistema Nacional de Informações Florestais – SNIF**. Disponível em: < <http://snif.florestal.gov.br/pt-br/>>. Acesso em: 02 jul. 2023.

SIMMONDS, J. H. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Science**, Brisbane, v.22, n.4, p.437-459, 1965.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**. Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1980.

SUTTON, B. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Wallingford, UK: CABI, 1992. p.1-26.

TAN, Q.; SCHNABEL, G.; CHAISIRI, C.; YIN L-F.; YIN, W-X.; LUO, C. X. *Colletotrichum* Species Associated with Peaches in China. **Journal of Fungi**. 2022. DOI: 10.3390/jof8030313.

TEMPLETON, M. D.; RIKKERINK E. H. A.; SOLON S. L.; CROWHURST R. N. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. **Gene**, v.122, n. 1, p. 225-230, 1992.

TOZZE JÚNIOR, H. J.; FIRMINO, A. C.; FISCHER, I. H.; FURTADO, E. L.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Characterization of *Colletotrichum* spp. isolates associated with fruit trees in the state of São Paulo. **Summa Phytopathologica**, 2015. DOI: 10.1590/0100-5405/2021.

VITALE, A.; ALFENAS, A. C.; DE SIQUEIRA, D. L.; MAGISTÀ, D.; PERRONE, G.; POLIZZI, G. Cultivar resistance against *Colletotrichum asianum* in the world collection of mango germplasm in southeastern Brazil. **Plants**, v. 9, n. 2, p. 182, 2020. DOI: 10.3390/plants9020182.

WANG, Y. X.; XU, X. W.; CAI, F.; HUANG, F. X.; CHEN, W. S.; WANG Q. Z. First Report of *Colletotrichum nymphaeae* Causing Walnut Anthracnose in China. **Plant Disease**. DOI: 10.1094/PDIS-02-22-0297-PDN.

WEISANY, W.; SAMADI, S.; TAHIR, N. A. R.; AMINI, J.; HOSSAINI, S. Nano-encapsulated with mesoporous silica enhanced the antifungal activity of essential oil against *Botrytis cinerea* (Helotiales; Sclerotiniaceae) and *Colletotrichum nymphaeae* (Glomerellales; Glomerellaceae). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 122, p. 101902, 2022. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.02.031.

WENDLING, I.; SANTAROSA, E.; PENTEADO JUNIOR, J.; AUER, C. G.; PENTEADO, S.; DE QUEIROZ, D. L.; DOS SANTOS, A. F. **Manual de produção de mudas clonais de erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 47 p. 2020.

WHITE, T. M.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, p.315-321. 1990.

YAMAGISHI, N.; FUJINAGA, M.; ISHIYAMA, Y. et al. Life cycle and control of *Colletotrichum nymphaeae*, the causal agent of celery stunt anthracnose. **Journal of General Plant Pathology**. 2015. DOI: 10.1007/s10327-015-0598-7.

ZHANG, W.; DAMM, U; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; NIU, X.; LIN, J.; LI, Y. Anthracnose Disease of Carpetgrass (*Axonopus compressus*) Caused by *Colletotrichum hainanense* sp. nov. **Plant disease**, v. 104, n. 6, p. 1744-1750, 2020. DOI: 10.1094/PDIS-10-19-2183-RE.