

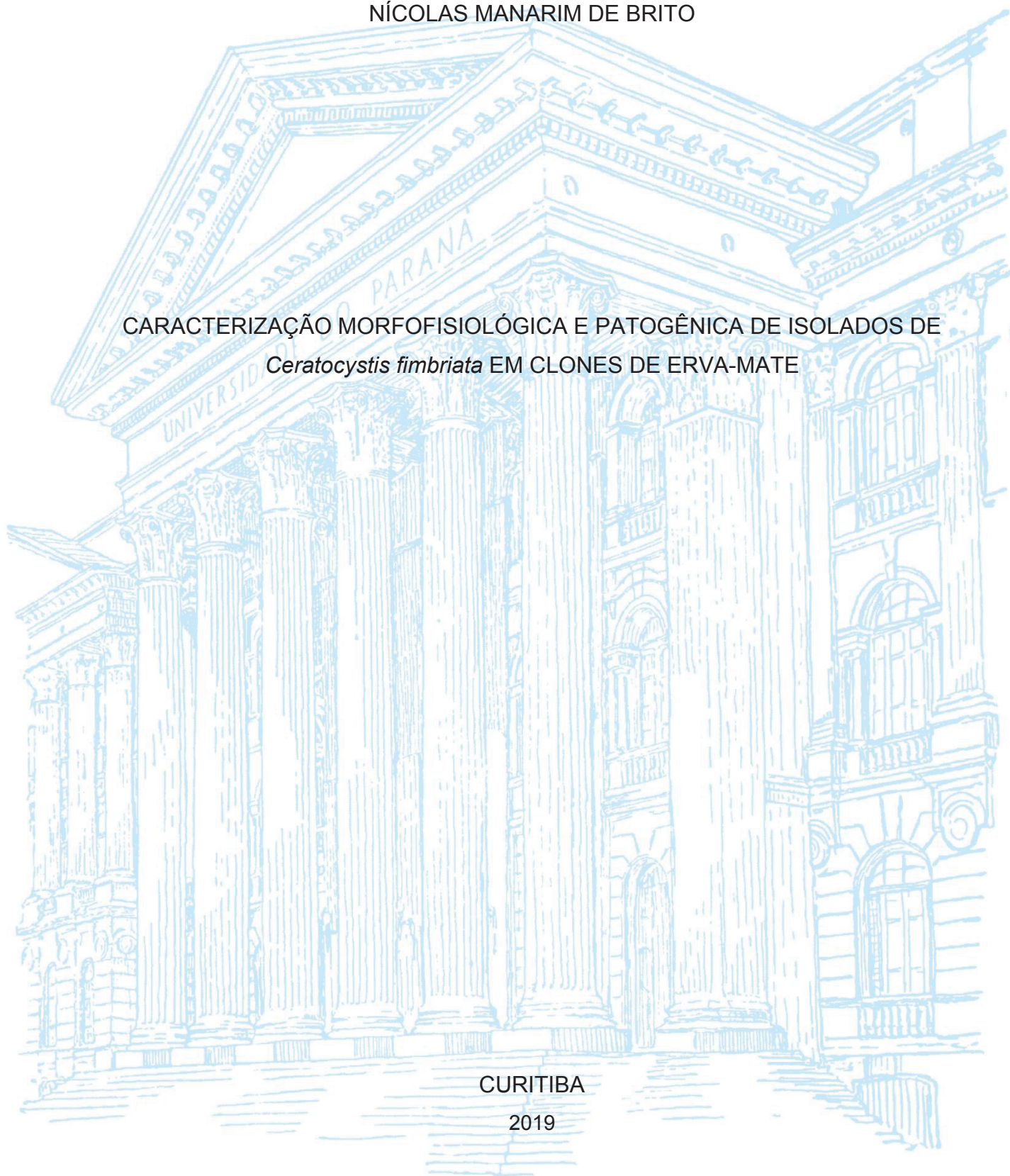
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NÍCOLAS MANARIM DE BRITO

CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE
Ceratocystis fimbriata EM CLONES DE ERVA-MATE

CURITIBA

2019



NÍCOLAS MANARIM DE BRITO

CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE
Ceratocystis fimbriata EM CLONES DE ERVA-MATE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia, Área de Concentração Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos
Coorientador: Prof. Dr. Ivar Wendling
Coorientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

CURITIBA

2019

B862c Brito, Nicolás Manarim de
Caracterização morfofisiológica e patogênica de isolados de
Ceratocystis fimbriata em clones de erva-mate / Nicolás Manarim
de Brito. - Curitiba, 2019.
52 p.: il.

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

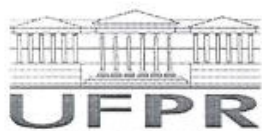
Orientador: Álvaro Figueredo dos Santos

Coorientador: Ivar Wendling

Coorientador: Celso Garcia Auer

1. Erva-mate - Doenças e pragas. 2. Erva-mate - Análise. 3.
Erva-mate - Cultivo. I. Santos, Álvaro Figueredo dos. II. Wendling,
Ivar. III. Auer, Celso Garcia. IV. Título. V. Universidade Federal do
Paraná.

CDU 633.77



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRARIAS
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 em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **NICOLAS MANARIM DE BRITO** intitulada: **CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE *Ceratocystis fimbriata* EM CLONES DE ERVA-MATE**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre 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, 22 de Fevereiro de 2019.

ALVARO FIGUEREDO DOS SANTOS

Presidente da Banca Examinadora ()

FLAVIO AUGUSTO DE OLIVEIRA GARCIA

Avaliador Externo (UNICENTRO)

CELSO GARCIA AUER

Avaliador Externo (EF)

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha família por todo apoio e suporte durante o período que me dediquei ao mestrado.

Aos amigos e familiares por compreenderem que em muitos momentos eu não pude estar com eles para que eu pudesse obter um aperfeiçoamento e me capacitar melhor para os futuros desafios da vida.

A professora Doutora Daniela Cleide Azevedo de Abreu, que abriu a oportunidade para eu iniciar meus estudos com fungos no estágio obrigatório da graduação.

Ao meu Orientador Doutor Álvaro Figueredo dos Santos por entrar comigo nesse desafio que foi trabalhar com uma novidade em erva-mate.

Ao Doutor Ivar Wendling pela disponibilização das mudas de erva-mate.

Ao Doutor Celso Garcia Auer pelas sugestões no trabalho, e pelos momentos de descontração na Embrapa Florestas.

Ao Professor Flávio Augusto de Oliveira Garcia com suas sugestões e observações para a melhoria deste trabalho.

Ao Professor Henrique da Silva Silveira Duarte por auxiliar nas análises e interpretações dos dados e sugerindo ideias para agregar a esta dissertação.

A Professora Maria Alves Ferreira pelos primeiros momentos e método de trabalho com as culturas de *Ceratocystis fimbriata*.

A Embrapa Florestas pelo apoio, fornecimento em materiais base para que esse trabalho fosse feito.

À CAPES, pelo investimento nas pesquisas e bolsa para auxílio financeiro.

RESUMO

A produção de erva-mate se constitui em uma fonte de renda para pequenas e médias propriedades rurais dos estados da região Sul do Brasil e do Mato Grosso do Sul. A murcha-de-ceratocystis, causada por *Ceratocystis fimbriata*, foi encontrada em erva-mate pela primeira vez em 2018, nos municípios de São Mateus do Sul – PR e Arvorezinha - RS. Devido ser patógeno importante para vários hospedeiros, como mangueira, eucalipto, kiwi, iniciou-se este trabalho com os objetivos: a) caracterizar morfológicamente os isolados de *C. fimbriata*; b) avaliar o efeito do meio de cultura e da temperatura no crescimento micelial (CM) e na esporulação (E) de *C. fimbriata*; c) avaliar a patogenicidade dos isolados de *C. fimbriata*; e d) avaliar a resistência de genótipos de erva-mate em mudas e discos de folhas (DF) à *C. fimbriata*. Os experimentos foram conduzidos: no Laboratório de Patologia Florestal e na Casa de Vegetação da Embrapa Florestas, Colombo, PR e no Fitotron da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. Os experimentos em laboratório foram conduzidos com culturas monospóricas de *C. fimbriata* crescidas em meio batata-dextrose-ágar (BDA), a 24 °C por 15 dias em fotoperíodo 12h luz / 12h escuro. Após este período, foram retirados discos (5 mm de diâmetro) dessas culturas e colocados em meios V8-ágar, cenoura-ágar (CA) e BDA para avaliar o crescimento em diferentes temperaturas (8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 e 36 °C). Foram preparadas também lâminas em azul de metileno para determinar as dimensões das estruturas sexuadas e assexuadas do fungo. Para os experimentos de patogenicidade e resistência os inóculos utilizados foram suspensões de esporos (ascósporos, aleuroconídios e endoconídios) de *C. fimbriata* na concentração de $2,5 \cdot 10^6$ esporos.mL⁻¹. Foram inoculados 5 µL de suspensão de esporos em fermento feito no caule a 5 cm do colo da muda e para o DF foi depositada uma gota da suspensão, em fermento feito na nervura principal da face adaxial da folha. Os maiores valores CM e E ocorreram em meio BDA (62,1 mm e 4,6 esporos.mL⁻¹) e V8-Ágar (60,7 mm e 4,5 esporos.mL⁻¹); as temperaturas ótimas para CM e E foram 22,9 °C e 22,4 °C, respectivamente. Os isolados apresentaram peritécios com pescoço de marrom a preto, hifa ostiolar divergente, ascósporos hialinos, endoconídios unicelulares, cilíndricos, e aleuroconídios com formato globoso a ovoide. Todos os isolados foram patogênicos à erva-mate e todos genótipos – alta, média e baixa cafeína – foram suscetíveis ao patógeno. O método de disco de folhas destacadas não apresentou similaridades à avaliação de resistência em mudas.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*. Disco de folha. Murcha vascular.

ABSTRACT

The production of yerba mate constitutes a source of income for small and medium-sized rural properties in the States of Southern region of Brazil and Mato Grosso do Sul state. Ceratocystis wilt, caused by *Ceratocystis fimbriata*, was found for the first time in 2018, in the cities of São Mateus do Sul - PR and Arvorezinha - RS. Due to the fact that it is an important pathogen for several hosts, such as hose, eucalyptus, kiwi, this work was started with the objectives: a) to characterize morphologically the isolates of *C. fimbriata*; b) to evaluate the effect of culture medium and temperature on mycelial growth (MG) and sporulation (S) of *C. fimbriata*; c) to evaluate the pathogenicity of *C. fimbriata* isolates; and d) to evaluate the resistance of mate genotypes in seedlings and leaf discs (LD) to *C. fimbriata*. The experiments were conducted: in Laboratório de Patologia Florestal and the Casa de Vegetação of Embrapa Florestas, Colombo, PR and Fitotron of the Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. The laboratory experiments were conducted with *C. fimbriata* monosporic cultures grown on potato-dextrose-agar (PDA) at 24 °C for 15 days in 12h light / 12h dark photoperiod. After this period, discs (5 mm diameter) were removed from these cultures and placed in V8-agar, carrot-agar (CA) and PDA to evaluate growth at different temperatures (8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 and 36 °C). Slides were also prepared in methylene blue to determine the dimensions of the sexed and asexual structures of the fungus. For the pathogenicity and resistance experiments the inoculums used were suspensions of *C. fimbriata* spores (ascospores, aleuroconidia and endoconides) in the concentration of $2.5 \cdot 10^6$ spores.mL⁻¹, 5 µL of wound spore suspension was inoculated on the stem 5 cm from the molt neck and for LD a drop of the suspension was deposited on a wound made in the main vein of the adaxial leaf face. The highest MG and S occurred in PDA (62.1 mm and 4.6 spores.mL⁻¹) and V8-Agar (60.7 mm and 4.5 spores.mL⁻¹); the optimum temperature for MG and S was 22.9 °C and 22.4 °C, respectively. The isolates presented perithecia with brown to black neck, divergent ostiolar hyphae, hyaline ascospores, unicellular, cylindrical endoconides, and globuroid globular to ovoid. All isolates were pathogenic to mate and all genotypes - high, medium and low caffeine - were susceptible to the pathogen. The disc method of detached leaves did not present similarities to the evaluation of pathogenicity in seedlings.

Keywords: *Ilex paraguariensis*. Leaf disc. Vascular wilt.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. ERVA-MATE	10
2.2. GÊNERO <i>Ceratocystis</i>	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. HOSPEDEIRO	15
3.2. ORIGEM DOS ISOLADOS	15
3.3. OBTENÇÃO DE CULTURAS MONOSPÓRICAS	16
3.4. PRODUÇÃO DE INÓCULO	17
3.5. EXPERIMENTOS EM LABORATÓRIO	17
3.5.1. Avaliação do crescimento micelial e esporulação de <i>Ceratocystis fimbriata</i> em três meios de cultura.....	17
3.5.2. Avaliação do crescimento micelial e esporulação de isolados de <i>Ceratocystis fimbriata</i> em diferentes temperaturas.....	19
3.5.3. Caracterização morfológica de <i>Ceratocystis fimbriata</i>	19
3.5.4. Método de disco de folhas de erva-mate para avaliar a patogenicidade de <i>Ceratocystis fimbriata</i> à erva-mate	20
3.6. EXPERIMENTOS EM CASA DE VEGETAÇÃO E FITOTRON.....	22
3.6.1. Avaliação da agressividade de 11 isolados de <i>Ceratocystis fimbriata</i> em mudas de erva-mate	22
3.6.2. Avaliação da resistência de seis clones de erva-mate à <i>Ceratocystis</i> <i>fimbriata</i>	23
4. RESULTADOS	25
4.1. EXPERIMENTOS EM LABORATÓRIO	25
4.1.1. Avaliação do crescimento micelial e esporulação de <i>Ceratocystis fimbriata</i> em meios de cultura.....	25

4.1.2. Avaliação do crescimento micelial e esporulação de isolados de <i>Ceratocystis fimbriata</i> em diferentes temperaturas.....	25
4.1.3. Caracterização morfológica de <i>Ceratocystis fimbriata</i>	30
4.1.4. Método de disco de folhas de erva-mate para avaliar a patogenicidade de <i>Ceratocystis fimbriata</i> à erva-mate	36
4.2. EXPERIMENTOS EM CASA DE VEGETAÇÃO E FITOTRON.....	38
4.2.1. Avaliação da agressividade de 11 isolados de <i>Ceratocystis fimbriata</i> em mudas de erva-mate	38
4.2.2. Avaliação da resistência de seis clones de erva-mate à <i>Ceratocystis fimbriata</i>	39
5. DISCUSSÃO	41
CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) é conhecida pelo consumo na forma de chimarrão, tererê e chás, porém o seu uso abrange as áreas alimentícia, farmacêutica, cosmética e médica (SANTOS et al., 2014). O cultivo da erva-mate ocorre nos estados da região sul do Brasil e em Mato Grosso do Sul, numa área de 78.190 hectares, englobando mais de 180 mil propriedades rurais, gerando mais de 700 mil empregos em toda sua cadeia produtiva, tendo grande impacto socioeconômico nas regiões produtoras (ANTONIAZZI et al., 2018).

Em 2018, em alguns plantios comerciais localizados em São Mateus do Sul, PR e Arvorezinha, RS foi relatado a mortalidade de até 5% das plantas, devido a murcha da erva-mate causada por *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted (SANTOS et al., 2018). Esta doença pode tornar-se limitante para o cultivo de erva-mate, visto que os relatos da murcha-de-ceratocystis em outros hospedeiros tiveram grandes impactos, como nos caso da mangueira (*Mangifera indica* L.) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) em que houve a queda de produção, devido a morte das plantas (FIRMINO et al., 2013). Diante disso, é importante a obtenção de informações sobre este patossistema para que se possa desenvolver estratégias de controle.

O fungo *Ceratocystis* spp. é polífago e está distribuído no território nacional em vários hospedeiros como a mangueira, eucalipto, seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.Juss.) Müll. Arg.), café (*Coffea* sp.) e batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). O gênero *Ceratocystis* possui cinco espécies no Brasil, sendo elas *Ceratocystis fimbriata*, *Ceratocystis cacaofunesta* Engelberecht & Harrigton e *Ceratocystis paradoxa* (De Seynes) Moreau (FIRMINO, 2011; ANTONIO et al., 2016; RODRIGUES et al., 2018; SANTOS et al., 2017), causando descoloração dos tecidos internos do caule, murcha de folhas e vindo até a causar a morte de plantas (SILVA et al., 2018).

As medidas de controle da murcha-de-ceratocystis envolvem a remoção e destruição de plantas infectadas, diminuição de ferimentos (redução das chances de infecção pelo patógeno), rotação de culturas com plantas que não sejam hospedeiras do patógeno e uso de materiais genéticos resistentes em áreas onde se sabe que o patógeno já esteja estabelecido (TUMURA; DE PIERI; FURTADO, 2012). O uso de

materiais genéticos resistentes à *Ceratocystis* spp. tem se mostrado como a opção mais efetiva no controle da doença (TUMURA; DE PIERI; FURTADO, 2012).

A utilização de métodos que selecionem materiais genéticos resistentes à *Ceratocystis* spp. de forma mais rápida, colabora para a obtenção em um menor espaço de tempo. Dessa forma, a utilização do método de disco foliar para verificação prévia de resistência e suscetibilidade de indivíduos a este fungo tornou-se uma importante ferramenta (OLIVEIRA, 2017), pois diminui o tempo de espera e avaliação quando comparado a métodos de inoculação em mudas.

Embora tenha um importante papel socioeconômico para os estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, sendo a principal fonte de renda para famílias de pequenas e médias propriedades, a erva-mate tem sido pouco trabalhada na área fitossanitária. Neste trabalho, objetivou-se caracterizar morfofisiologicamente isolados de *Ceratocystis fimbriata* e avaliar a resistência clonal da erva-mate. Os objetivos específicos foram: a) caracterizar morfológicamente os isolados de *C. fimbriata*; b) avaliar o efeito do meio de cultura e da temperatura no crescimento micelial e na esporulação de *C. fimbriata*; c) avaliar a patogenicidade dos isolados de *C. fimbriata*; e d) avaliar a resistência de genótipos de erva-mate em mudas e discos de folhas à *C. fimbriata*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ERVA-MATE

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) é uma planta nativa, não endêmica do Brasil, ocorrendo nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (FLORA DO BRASIL, 2018) (Figura 1). Fora do território nacional, também é encontrada na Argentina, Paraguai e Uruguai (SILVESTRINI; WEINGARTNER; TACHIBANA, 2018) (Figura 1).

FIGURA 1: DISTRIBUIÇÃO DE *Ilex paraguariensis* NO BRASIL



FONTE: FLORA DO BRASIL (2018)

Pertencente à família Aquifoliaceae, possui um porte arbustivo, com alturas variando de acordo com a idade e o sítio em que se localizam as plantas. Geralmente, árvores que sofreram tratamentos silviculturais de podas não ultrapassam sete metros de altura (MAZUCHOWSKI, 1991). O tipo de erval também influencia na altura das árvores, se cultivado atinge alturas entre três a cinco metros, e quando se encontra

em sua área de ocorrência natural, em sub-bosques, chega a atingir trinta metros de altura (CARVALHO, 2003).

O cultivo de erva-mate é diretamente ligado a permanência de famílias no meio rural, por se tratar de uma árvore que consegue se adaptar bem às intempéries climáticas, sofrendo pouco com suas variações, fato que não ocorre com a maioria das espécies agrícolas (LUZ; DAL SOGLIO; KUBO, 2017).

A produção nacional de erva-mate é realizada por quatro estados brasileiros, sendo o Paraná o maior produtor, seguido por Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul (JUNQUEIRA; BASSO; SOUZA, 2017). Em termos mundiais, no ano de 2017, o Brasil liderou a produção de erva-mate com 619 mil toneladas, seguido por Argentina com 290 mil toneladas e Paraguai com 105 mil toneladas (FAO, 2019). A exportação brasileira de erva-mate em 2011, foi de quase US\$ 61 milhões de dólares colaborando economicamente com o país, principalmente com a região Sul do Brasil, que é responsável pela produção deste produto (VIEIRA, 2012).

Segundo a resolução da ANVISA, RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005, aprova e regulamenta o “Regulamento Técnico para Café, Cevada, Chá, Erva-mate e Produtos Solúveis”, descrevendo que a erva-mate é um produto constituído por folhas e ramos de *Ilex paraguariensis*, sendo estes obtidos por processos de secagem e fragmentação tendo seu destino a produção de chimarrão e tererê, podendo ou não ser adicionado açúcar (ANVISA, 2018). O consumo de erva-mate é diversificado em várias áreas, partindo da parte alimentícia, como o chá-mate, chimarrão, tererê, bebidas energéticas, sorvetes, cremes e aditivos alimentícios como antioxidante, corante e conservante; passando para parte de cosméticos que variam desde pó faciais, maquiagens, sabonetes, desodorantes, cremes, gel e emulsões; até a utilização em medicamentos em forma de cápsulas, tintura, extratos, comprimidos e antimicrobianos (BERTÉ, 2011).

A produção de erva-mate está diretamente ligada a qualidade das mudas que são plantadas para a formação do erval. Comumente as mudas utilizadas são produzidas via sementes, por ser um método de produção mais simplificado, estando intrínseco as atividades dos produtores de erva-mate que trabalham nesse ramo a mais tempo, pelo domínio da tecnologia e por ser mais barata em relação a utilização da propagação vegetativa (WENDLING; SANTIN, 2015).

A propagação via sementes é a base dessa produção de mudas de erva-mate, assim garante-se herdabilidade de algumas características da planta-mãe, fato este que pode tornar uma muda mais adaptável ao ambiente (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013). Muitas vezes devido a este fato, é encontrado em plantios comerciais, uma grande diversidade de plantas e rendimento por planta na colheita.

Como as plantas de erva-mate produzem pouca ou nenhuma semente, faz-se necessário a utilização de outras formas de propagação. Com a utilização de técnicas como estaquia, miniestaquia, enxertia, minienxertia e micropropagação, as mudas geradas terão as mesmas características produtivas e qualidade da planta matriz, sendo possível obter plantios homogêneos (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

2.2. GÊNERO *Ceratocystis*

O gênero *Ceratocystis* está inserido na classe dos Pyrenomycetes, na ordem Ophistomatales, na subdivisão Ascomycota e na família Ceratocystidaceae (TRINDADE; FURTADO, 1997). Este fungo é caracterizado pela presença de peritécios negros, com pescoço longo e/ou curto, ascósporos unicelulares hialinos, sendo estes liberados em grandes quantidades numa massa gelatinosa. Este fungo produz diferentes tipos de esporos da fase assexuada, podendo apresentar endoconídio hialino e cilíndrico, e aleuroconídios (clamidósporos) que surgem lateralmente ao micélio e podem ser encontrados sozinhos ou em cadeias (ENGELBRECHT; HARRINGTON, 2005). Em algumas espécies também podem ser encontrados endoconídios barriliformes (JOHNSON; HARRINGTON; ENGELBRECHT; 2005).

Este gênero de fungo é responsável por um grande número de doenças em diversos hospedeiros de importância econômica atingindo plantas perenes e anuais e caracteriza-se principalmente pela murcha (HARRINGTON, 2009). Diferentes espécies deste gênero de fungo (*C. fimbriata*, *C. cacaofunesta*, *C. paradoxa*, *C. mangicola* M. van Wyk & M.J. Wingf., *C. mangivora* M. van Wyk & M.J. Wingf.) já foram relatadas causando danos em culturas no Brasil como: *Mangifera indica* (ARRUDA, 1940; WYK et al., 2011), *Cajanus indicus* Spreng., *Crotalaria expectabilis* ROTH e

Nicotiana tabacum L. (VIÉGAS, 1961), *Ficus carica* L. (FIGUEIREDO; PINHEIRO, 1969; YAKUSHIJI et al., 2012), *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg. (ALBUQUERQUE; DUARTE; SILVA, 1972), *Theobroma cacao* L. (BASTOS; EVANS, 1978), *Citrus* spp. (BORJA; CAYCEDO; RÍOS, 1995), *Eucalyptus* spp. (FERREIRA et al., 1999), *Acacia mearnsii* De Wild. (SANTOS; FERREIRA, 2003), *Coffea arabica* L. (MARIN et al., 2003), *Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Liang & A. R. Ferguson (SONEGO et al., 2010), *Passiflora edulis* Sims (FIRMINO et al., 2016) e, mais recentemente, *Ilex paraguariensis* (SANTOS et al., 2018).

Ceratocystis fimbriata ganhou maior importância no Brasil em meados de 1990, onde este deixou de ser apenas um problema para plantios de mangueira (*Mangifera indica*) (FIRMINO, 2011). Em 1997, em alguns plantios comerciais de eucalipto no sudeste da Bahia foi constatada a ocorrência de *C. fimbriata* causando acima de 40% de mortalidade de plantas. Inicialmente foram atacados apenas dois clones de eucalipto e, posteriormente, outros três foram infectados. Com o passar dos anos, dez clones em quatro estados brasileiros (Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo) apresentavam a infecção (FERREIRA et al., 2006), e assim a cultura de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) passou a sofrer com a ação deste fungo (ALFENAS et al., 2009).

Ceratocystis fimbriata é encontrado em vários estados brasileiros, sendo que o mesmo se encontra estabelecido como patógeno do eucalipto em Minas Gerais, Espírito Santo, Pará, Maranhão, Mato Grosso do Sul e São Paulo (ALFENAS et al., 2009; FERREIRA, 2009). Recentemente, produtores de kiwi (*Actinidia deliciosa*) no Rio Grande do Sul tiveram perdas de produção devido ao *C. fimbriata* (PIVETA et al., 2013) e, desde 2016, alguns produtores de erva-mate do Paraná e Rio Grande do Sul tiveram perdas pela ação de *C. fimbriata* (SANTOS et al., 2018).

Ceratocystis fimbriata é um típico fungo vascular, atingindo principalmente o xilema das plantas, provocando sintomas como o amarelecimento das folhas, seguido de murcha, secamento das folhas e morte das plantas (FIRMINO, 2011). A infecção de *Ceratocystis* em plantas lenhosas costuma ocorrer por ferimentos ou a partir do solo, via raízes, atingindo o colo das plantas. A observação de sintomas como murcha de ramos e galhos é um dos primeiros sintomas dessa doença. Através do xilema o fungo se move na planta e após se estabelecer num determinado local do xilema, este começa a se mover no sentido radial no interior das células do parênquima. Neste

momento, os primeiros sintomas visuais são observados, como o amarelecimento de folhas, murcha da copa e galhos, e posterior, morte da planta (FERREIRA; ALFENAS; MAFIA, 2013).

A dispersão do inóculo de *C. fimbriata* pode ocorrer via cupins e coleobrocas que se alimentam do fungo e ao entrar em contato com o fungo, este acaba ficando em seu interior e ao redor do corpo pelo contato direto, podendo levar para outras plantas. A disseminação pode ser realizada por água de chuvas, irrigação, transferência de mudas, tratos culturais e ferramentas de corte e podas (FERREIRA; ALFENAS; MAFIA, 2013). Estudos de resistência a *C. fimbriata* já foram realizados por Zauza et al. (2004), Alfenas et al. (2009), Firmino (2011) e Magalhães et al. (2016).

O teste de resistência genética de indivíduos a *C. fimbriata* é demorado, pois passa pela inoculação em plantas e pode demorar meses para se obter uma resposta ou resultado desse teste. Visando uma resposta mais rápida Magalhães et al. (2016) utilizaram o método de discos de folhas de cacaueiro, que consistiu em obter discos foliares, remover a nervura central do disco, colocar uma gota de suspensão de esporos do fungo, incubar por alguns dias e avaliar a formação de peritécios. Os testes realizados por Magalhaes et al. (2016) foram similares aos testes a campo, dessa forma os autores conseguiram diferenciar genótipos resistentes e suscetíveis à *C. fimbriata*. A utilização de discos foliares também foi utilizada em outro hospedeiro desse fungo, Oliveira (2017) testou o método de discos foliares em eucalipto e também obteve respostas satisfatórias, diferenciando genótipos resistentes dos suscetíveis.

3.MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados *in vitro* e *in vivo* no Laboratório de Patologia Florestal e na Casa de Vegetação da Embrapa Florestas, Colombo, PR e no Fitotron da Universidade Federal do Paraná, Campus Agrarias, Curitiba, PR.

3.1.HOSPEDEIRO

As mudas de erva-mate utilizadas nos experimentos foram cedidas pelo programa de melhoramento da Embrapa Florestas, sendo que para os experimentos foram utilizadas mudas seminais e mudas clonais de erva-mate com diferentes concentrações de cafeína (Tabela 1). As mudas clonais encontravam-se com idade entre oito a dez meses, em tubete de 110 cm³, com o substrato comercial TNMIX[®] da Agrinobre e receberam adubação mensal (uréia – 4 g.L de água; Yoorin – 3 g.L de água; FTE BR10 – 0,25 g.L de água; Cloreto de potássio – 3 g.L de água).

TABELA 1: MUDAS CLONAIIS DE ERVA-MATE, SEU TEOR DE CAFEÍNA E ORIGEM.

Clones	Teor de cafeína	Origem
IVA7	Baixo	Ívai – PR
IVA8	Baixo	Ívai – PR
A35	Médio	Ponta Grossa – PR
AC1	Médio	Ívai – PR
IVA42	Alto	Ívai – PR
BRS BLD Aupaba	Alto	São Mateus do Sul – PR

FONTE: O autor (2018)

3.2.ORIGEM DOS ISOLADOS

Neste trabalho foram utilizados 11 isolados de *C. fimbriata* pertencentes à coleção de Fungos e Oomicetos Florestais da Embrapa Florestas, Colombo, PR. Os isolados foram oriundos de amostras sintomáticas de plantas de erva-mate de duas regiões: os isolados G, I, J e K são provenientes de São Mateus do Sul, PR e os isolados L, M, N, O, P, Q e R são procedentes de Arvorezinha, RS (Tabela 2).

TABELA 2: ISOLADOS DE *Ceratocystis fimbriata*, DE ERVA-MATE: ORIGEM E ÉPOCA DE OBTENÇÃO.

Isolado	Origem	Data de obtenção
G, I, J, K	São Mateus do Sul – PR	11.04.2016
L, M	Arvorezinha - RS	09.07.2016
N, O, P, Q, R	Arvorezinha – RS	10.08.2016

Fonte: O autor (2018)

3.3.OBTENÇÃO DE CULTURAS MONOSPÓRICAS

As culturas de *C. fimbriata* foram crescidas em placas de Petri de plástico (90 mm de diâmetro) contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) comercial da marca KASVI (42 g.L de água ultrapura), por 15 dias em câmara BOD, a temperatura de 24 ± 2 °C, em fotoperíodo de 12 h luz/ 12 h escuro. Para a obtenção das culturas monospóricas para os 11 isolados fez-se uma adaptação do método de Jarek (2018) que utilizou para *Fusarium spp.* e *Colletotrichum spp.*, e procedeu-se, conforme segue:

Inicialmente utilizando uma micropipeta automática (P200), foi coletado 0,03 mL de Tween 20. Após isso a placa de Petri contendo a cultura de *Ceratocystis* foi colocada em uma lupa, esse procedimento visou favorecer a coleta apenas de ascósporos, colocando o Tween na massa de ascósporos e puxando-os para dentro da ponteira da micropipeta. Essa porção adquirida foi transferida para um tubo de micro centrífuga contendo 0,02 mL de água ultrapura esterilizada. Fez-se uma agitação deste em vortex por 1 minuto e na sequência, essa porção coletada foi transferida para um tubo de ensaio com 9,5 mL de água ultrapura esterilizada. Fez-se uma agitação de 3 minutos em vortex e foi coletada uma amostra para contagem de esporos em hemacitômetro. Se a concentração de esporos estivesse acima de 7.10^5 esporos.mL⁻¹, uma suspensão fracionada foi preparada a partir desta primeira concentração obtida, passando 1 mL da primeira suspensão para um novo tubo de ensaio contendo 9 mL de água ultrapura esterilizada. E, este procedimento era repetido sucessivamente até a obtenção da concentração desejada.

Com a suspensão em concentração menor do que 7.10^5 esporos.mL⁻¹, foram coletadas gotas de 5 µL e acondicionadas em placas de Petri de plástico, normalmente 20 gotas por placa. Em seguida, invertia-se a placa e, após uma hora

(período para decantar os esporos contidos em cada gota), estas gotas foram observadas em microscópio com aumento de 100x. Caso fosse observado a presença de apenas um esporo, esta gota era transferida para uma placa de Petri contendo meio de cultura BDA, incubada em câmara BOD a 24 °C com fotoperíodo de 12h luz/12h escuro. Nos dias subsequentes, observou-se crescimento micelial e, nos casos positivos, este foi mantido como isolado monospórico.

3.4.PRODUÇÃO DE INÓCULO

As culturas monospóricas obtidas no item 3.3 foram crescidas em placas de Petri por 15 dias em câmara BOD, a 24 °C, em fotoperíodo de 12 h luz / 12 h escuro. A esta cultura adicionou-se 10 mL de água ultrapura esterilizada em autoclave e, com uma alça de Drigalski, raspou-se superficialmente a colônia fúngica para liberação das estruturas reprodutivas. Com estes propágulos fúngicos liberadas na suspensão, fez-se uma dupla filtração com uma peneira e dupla camada de voal (para evitar a passagem de peritécios e micélio). Com esta suspensão inicial, fez-se a determinação da concentração de esporos com um hemacitômetro. A concentração foi ajustada para $2,5 \cdot 10^6$ esporos.mL⁻¹.

3.5.EXPERIMENTOS EM LABORATÓRIO

3.5.1. Avaliação do crescimento micelial e esporulação de *Ceratocystis fimbriata* em três meios de cultura

Foram testados três meios de cultura para o crescimento micelial e esporulação das culturas de *C. fimbriata*: meio BDA, meio cenoura-ágar (CA) e meio V8-ágar.

O meio CA foi preparado a partir de 200 g de cenoura sem casca. Cortou-se a cenoura em pequenos pedaços, colocou em liquidificador, adicionou 500 mL de água ultrapura. Triturou-se a cenoura no liquidificador em alta velocidade por aproximadamente 5 minutos. Posteriormente, esta mistura foi filtrada em peneira e

voal, completou-se para 1 litro com água ultrapura, adicionou 20,0 gramas de ágar bacteriológico e foi esterilizada em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

O meio V8-ágar foi preparado utilizando 200 mL de suco V8 (Campbell), adicionando-se 3,0 g de carbonato de cálcio, 800 mL de água ultrapura e 20,0 g de ágar bacteriológico. Após a mistura destes ingredientes, o meio foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

Os meios de cultura foram vertidos em placas de Petri descartáveis (90 mm de diâmetro) para a realização do ensaio.

Discos de cultura de 5 mm de diâmetro do isolado M de *C. fimbriata* previamente cultivado em meio BDA por 15 dias em câmara BOD a 24 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h de luz / 12h de escuro, foram repicados para o centro das placas contendo os três meios de cultura. Posteriormente, essas placas foram fechadas e vedadas com filme plástico PVC sendo incubadas em câmara BOD a 24 °C, em fotoperíodo de 12h luz e 12h escuro. O experimento foi instalado com 3 repetições, sendo considerada uma placa com uma repetição, no delineamento inteiramente casualizado.

Na avaliação foi realizada medição de crescimento micelial a cada três dias, com paquímetro digital, até a cultura atingir 15 dias de idade. Após a última medição, foi feita a avaliação da esporulação. Para tal, foram adicionados 10 mL de água ultrapura esterilizada em placa de Petri e, com uma alça de Drigalski, raspou-se superficialmente a cultura para liberação das estruturas e, com estes propágulos soltos do meio de cultura, fez-se uma dupla filtração das estruturas obtidas com uma peneira e dupla camada de voal (para evitar peritécios e micélio). Com a obtenção desta suspensão, fez-se a determinação da concentração de esporos (ascósporos, endoconídios e aleuroconídios) em um hemacitômetro.

O delineamento experimental utilizado foi um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições, e após a obtenção dos dados foi realizada uma estatística descritiva dos resultados obtidos no Programa R®.

3.5.2. Avaliação do crescimento micelial e esporulação de isolados de *Ceratocystis fimbriata* em diferentes temperaturas

A avaliação de crescimento micelial e esporulação foi realizada a partir de culturas crescidas em BDA por 15 dias a temperatura de 24 ± 2 °C em fotoperíodo de 12 h luz / 12 h escuro. Após esse período, repicou-se três discos de meio de cultura com micélio (5 mm) de cada isolado e colocado no centro de três placas de Petri de plástico (90 mm de diâmetro) com meio de cultura BDA. Posteriormente, estas placas foram fechadas, lacradas com filme plástico PVC e mantidas em câmara BOD em diferentes temperaturas: 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 e 36°C.

O crescimento micelial (mm) foi determinado com auxílio de um paquímetro digital (Starrett®, modelo 799A), a intervalo de 3 dias, até a cultura atingir 15 dias de idade.

Após a última medição, fez-se a determinação da esporulação. Para isso, adicionou-se 10 mL de água ultrapura esterilizada à cultura de *C. fimbriata* na placa de Petri. As estruturas fúngicas foram liberadas com o auxílio de uma alça de Drigalski. Então, a suspensão foi passada por peneira e dupla camada de voal e foi feita a avaliação da esporulação (ascósporos, endoconídios e aleuroconídios) das três placas de cada isolado com um hemacitômetro.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e teste F a 5% de probabilidade no Programa R®, também foi realizada uma análise de regressão quadrática polinomial, obtendo-se o R^2 da equação, posteriormente fez-se a derivada da equação para obtenção da temperatura ótima de crescimento e esporulação para cada um dos isolados.

3.5.3. Caracterização morfológica de *Ceratocystis fimbriata*

As colônias de *C. fimbriata* formadas em meio BDA possuem cor marrom a marrom escura, com presença de micélio na cor branca, formação de peritécios marrons a negros, com rostro longo e no ápice destes a presença de uma massa de ascósporos. Essas estruturas morfológicas sexuadas e assexuadas dos 11 isolados de *C. fimbriata* foram obtidos, conforme segue: as culturas foram crescidas durante 15

dias em meio BDA em câmara BOD a 24 ± 2 °C, em fotoperíodo de 12h luz / 12h escuro. Após, foram coletadas porções do fungo com uma alça e depositadas em lâmina para microscopia com uma gota de corante azul de metileno e examinadas em Microscópio Zeiss Axio Lab.A1 com software específico do fabricante. Em aumento de 100x foram determinada as medidas de largura e comprimento da base ascomatal; do comprimento do pescoço do peritécio, da largura da base e do ápice deste pescoço; Em aumento de 400x, determinou-se o comprimento da hifa ostiolada; o comprimento e largura do ascósporo; o comprimento do endoconidióforo e a largura da base e do ponto mais amplo; o comprimento e largura do conídio e o comprimento e largura do clamidósporo. Foram quantificadas 100 repetições de cada estrutura fúngica.

3.5.4. Método de disco de folhas de erva-mate para avaliar a patogenicidade de *Ceratocystis fimbriata* à erva-mate

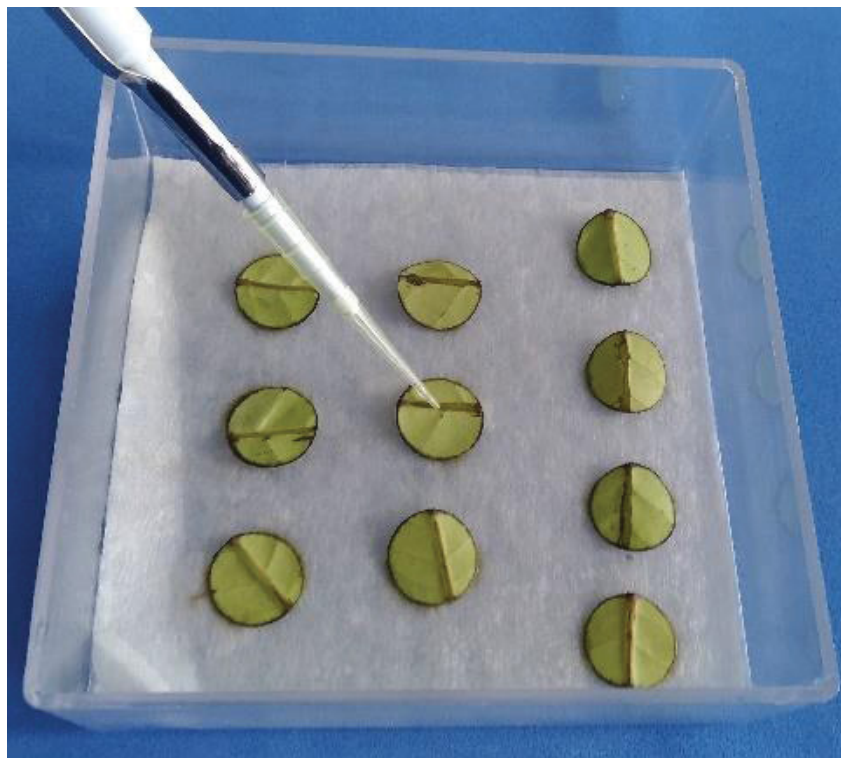
Folhas de erva-mate foram coletadas de mudas clonais em minijardim com idade entre 2 a 3 anos que estão em canaletões dentro de estufas do Laboratório de Propagação de Espécies Florestais da Embrapa Florestas em Colombo, PR. Em seguida, foram lavadas em água de torneira para remoção dos resíduos que pudessem estar agregados à folha. Após este primeiro enxague, foi realizado outro com água ultrapura esterilizada e na sequência foram preparados discos de folhas com 15,9 mm de diâmetro. Com os discos prontos, a nervura principal dos mesmos era removida com um bisturi, depois eram colocados 10 discos por caixa gerbox contendo duas folhas de papel filtro umedecidas, para manter a saturação de umidade. Cada disco recebeu uma gota de suspensão de *C. fimbriata* na concentração de $2,5 \cdot 10^6$ esporos.mL⁻¹ do isolado M ou isolado O (Figura 2). Para testemunha, utilizou-se 10 discos que receberam apenas uma gota de água ultrapura esterilizada. Todas as caixas gerbox foram fechados com tampa e vedadas com plástico filme PVC para preservar a umidade. Sendo incubadas em bancada a temperatura ambiente com luz fria contínua.

Foram inoculados seis clones de erva-mate, conforme segue: alta cafeína IVA42 e BRS BLD Aupaba; média cafeína A35 e AC1; e baixa cafeína IVA7 e IVA8.

Este experimento foi realizado duas vezes, sendo a primeira vez em 24 de setembro de 2018, com a temperatura média do laboratório em torno de 18°C. A segunda vez foi realizada em 6 de dezembro de 2018 com a temperatura média em torno de 25°C.

A avaliação ocorreu no sétimo dia após a inoculação, contando-se o número de peritécios formados em cada um dos discos de folha dos seis genótipos testados, com auxílio da Lupa Zeiss Stereo Discovery.V20. O experimento foi realizado no delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial 3 (isolados e testemunha) x 6 (clones).

FIGURA 2: INOCULAÇÃO EM DISCOS DE FOLHAS DE ERVA-MATE COM *Ceratocystis fimbriata*



Fonte: O autor (2018)

Após obtenção dos dados, estes foram submetidos a análise de variância e teste F a 5% de probabilidade. Depois da realização deste teste, fez um agrupamento

das médias de peritécios obtidos por clone com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade no Programa R®.

3.6.EXPERIMENTOS EM CASA DE VEGETAÇÃO E FITOTRON

3.6.1. Avaliação da agressividade de 11 isolados de *Ceratocystis fimbriata* em mudas de erva-mate

Para a execução do teste foram utilizados 11 isolados de *C. fimbriata* oriundos de culturas monospóricas e cultivados por 15 dias em meio BDA em câmara BOD a 24 ± 2 °C, em fotoperíodo de 12h luz / 12h escuro.

Foi preparada uma suspensão de esporos (ascósporos, endoconídios e aleuroconídios) para cada um dos 11 isolados na concentração de $2,5 \cdot 10^6$ esporos.mL⁻¹. Realizou-se um corte transversal no caule das mudas com um bisturi flambado a altura de 5 cm do colo da muda e com uma seringa foi inoculado 5 µL da suspensão e em seguida, os ferimentos inoculados foram cobertos com filme plástico PVC por 49 dias.

Este experimento foi realizado duas vezes: a primeira na casa de vegetação da Embrapa Florestas em Colombo, PR, que possui sombrite e a irrigação ocorre de forma manual, com temperaturas que variaram entre 10 e 40 °C e temperatura média foi de 27,5 °C; a segunda foi realizada em Fitotron do setor de Fitossanidade da UFPR Agrárias – Curitiba, PR, com irrigação manual e a temperatura usada foi de 25 ± 2 °C.

A avaliação ocorreu semanalmente após a inoculação, observando a incidência ou não da doença. Foi considerada doente quando uma muda apresentou: folhas amareladas, folhas murchas ou quando a muda morreu. Caso contrário foi considerado sadia. Essas avaliações foram realizadas durante 7 semanas.

Após a última avaliação os dados foram tabulados, foi realizada uma análise de incidência da doença, calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Os dados obtidos receberam uma análise de variância e foi realizado teste F a 5% de probabilidade no Programa R®.

3.6.2. Avaliação da resistência de seis clones de erva-mate à *Ceratocystis fimbriata*

Para a realização deste experimento foram utilizadas suspensões de esporos (ascósporos, endoconídios e aleuroconídios) dos isolados M e O (estes isolados foram os que mataram todas as mudas do teste 3.6.1 em menor tempo) de *C. fimbriata* na concentração de $2,5 \cdot 10^6$ esporos.mL⁻¹.

Para o ensaio utilizou-se seis clones de erva-mate, conforme segue: IVA42 e BRS BLD Aupaba (alta cafeína); A35 e AC1 (média cafeína); e IVA7 e IVA8 (baixa cafeína).

Foram inoculadas 10 mudas de cada genótipo para cada isolado (M e O), sendo realizadas incisões no caule de mudas dos clones à 5 cm do colo, depositando-se nestes 5 µL de suspensão de esporos dos isolados, e posteriormente envolvidos em filme plástico PVC por 49 dias (Figura 3).

A testemunha foram 10 mudas que receberam um corte transversal no caule a 5 cm do colo e, em seguida, foi depositado 5 mL de água ultrapura esterilizada, posteriormente o ferimento foi coberto com plástico filme PVC. O experimento foi realizado no delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial 3 (isolados e testemunha) x 6 (clones).

A avaliação ocorreu semanalmente após a inoculação, observando a incidência ou não da doença. Foi considerada doente quando uma muda apresentou: folhas amareladas, folhas murchas ou quando a muda morreu. Caso contrário foi considerado sadia. Essas avaliações foram realizadas durante 7 semanas.

Após a última avaliação os dados foram tabulados, foi realizada uma análise de incidência da doença, calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Os dados obtidos receberam uma análise de variância e foi realizado teste F a 5% de probabilidade no Programa R®.

FIGURA 3: INOCULAÇÃO DE MUDAS CLONAIS DE ERVA-MATE COM *Ceratocystis fimbriata*.



FONTE: O autor (2018)

LEGENDA: A) Corte transversal (seta), B) Inoculação da suspensão de esporos (seta).

Este experimento foi realizado duas vezes, conforme segue: a primeira no Fitotron do setor de Fitossanidade da UFPR Agrárias – Curitiba, PR, com irrigação manual e a temperatura foi de 25 ± 2 °C; a segunda vez ocorreu na casa de vegetação da Embrapa Florestas em Colombo, PR, que possui sombrite, com irrigação manual, as temperaturas variaram entre 13 e 40 °C, e a temperatura média de 29,5 °C.

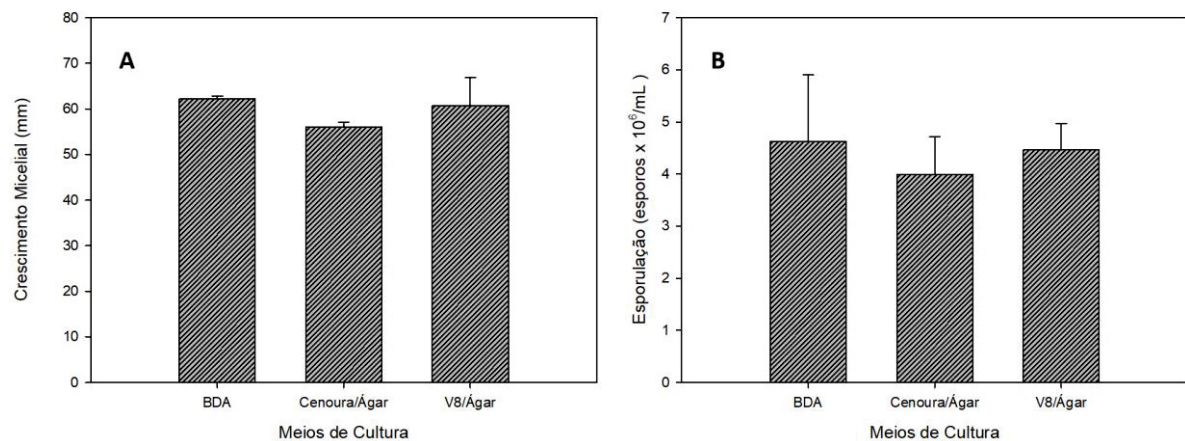
4. RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTOS EM LABORATÓRIO

4.1.1. Avaliação do crescimento micelial e esporulação de *Ceratocystis fimbriata* em meios de cultura

Os meios BDA, V8-ágar e CA produziram um bom crescimento micelial e esporulação, embora tenha havido um menor crescimento micelial em CA (Figura 4A). Também nota-se que os desvios padrão apresentados em cada um dos meios de cultura, acabou expressando uma equivalência entre eles, não ocorreu diferença na esporulação entre os meios, em função da grande variação estatística.

FIGURA 4: CRESCIMENTO MICELIAL (A) E ESPORULAÇÃO (B) DE *Ceratocystis fimbriata* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA



FONTE: O autor (2018).

NOTA: As barras representam o desvio padrão das médias de crescimento micelial e da esporulação nos diferentes meios de cultura.

4.1.2. Avaliação do crescimento micelial e esporulação de isolados de *Ceratocystis fimbriata* em diferentes temperaturas

A temperatura ótica de crescimento micelial dos 11 isolados de *C. fimbriata*, foi observada em um intervalo de temperatura que variou de 22,2 a 23,1 °C (Figura 5).

FIGURA 5: CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL DOS 11 ISOLADOS DE *C. fimbriata* EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

(continua)

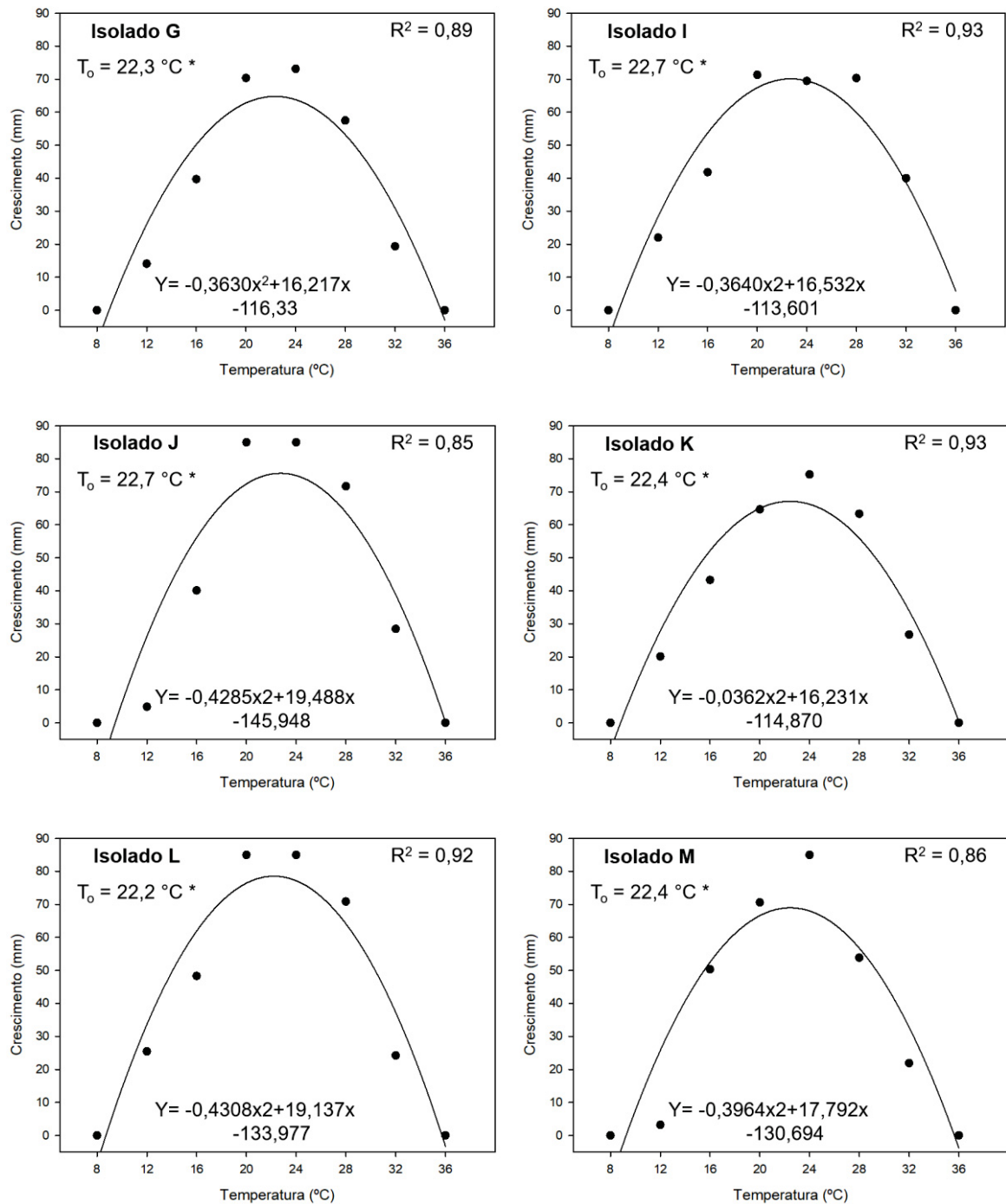
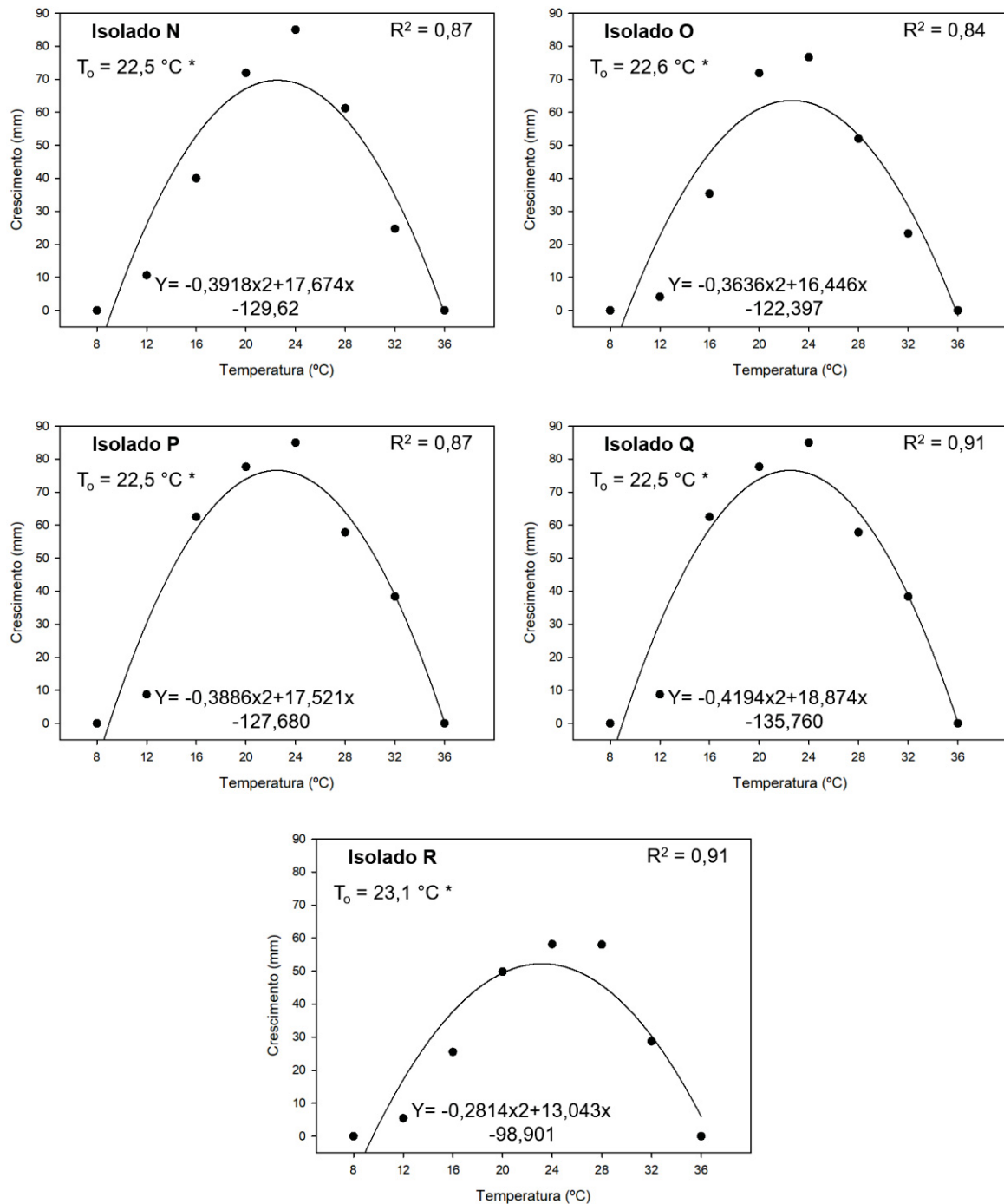


FIGURA 5: CURVAS DE CRESCIMENTO MICIAL DOS 11 ISOLADOS DE *C. fimbriata* EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

(fim)



FONTE: O autor (2018)

LEGENDA: * Temperatura ótima

NOTA: Para cada um dos isolados foi calculada a equação da curva e o R quadrado.

A temperatura ótima para esporulação dos 11 isolados de *C. fimbriata*, foi observada em um intervalo de temperatura que variou de 21,7 a 23,5 °C (Figura 6).

FIGURA 6: CURVAS DE ESPORULAÇÃO DOS 11 ISOLADOS DE *C. fimbriata* EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

(continua)

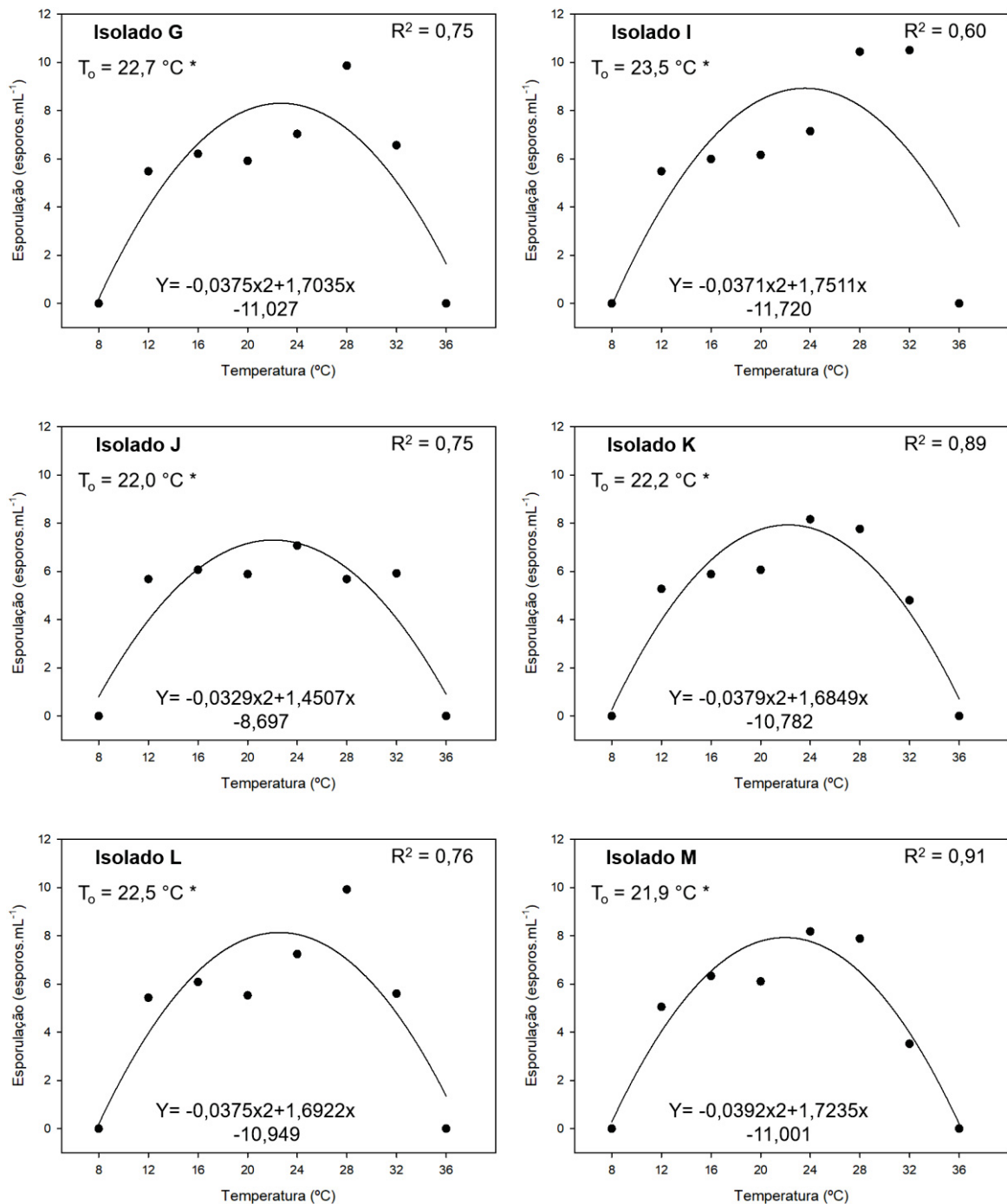
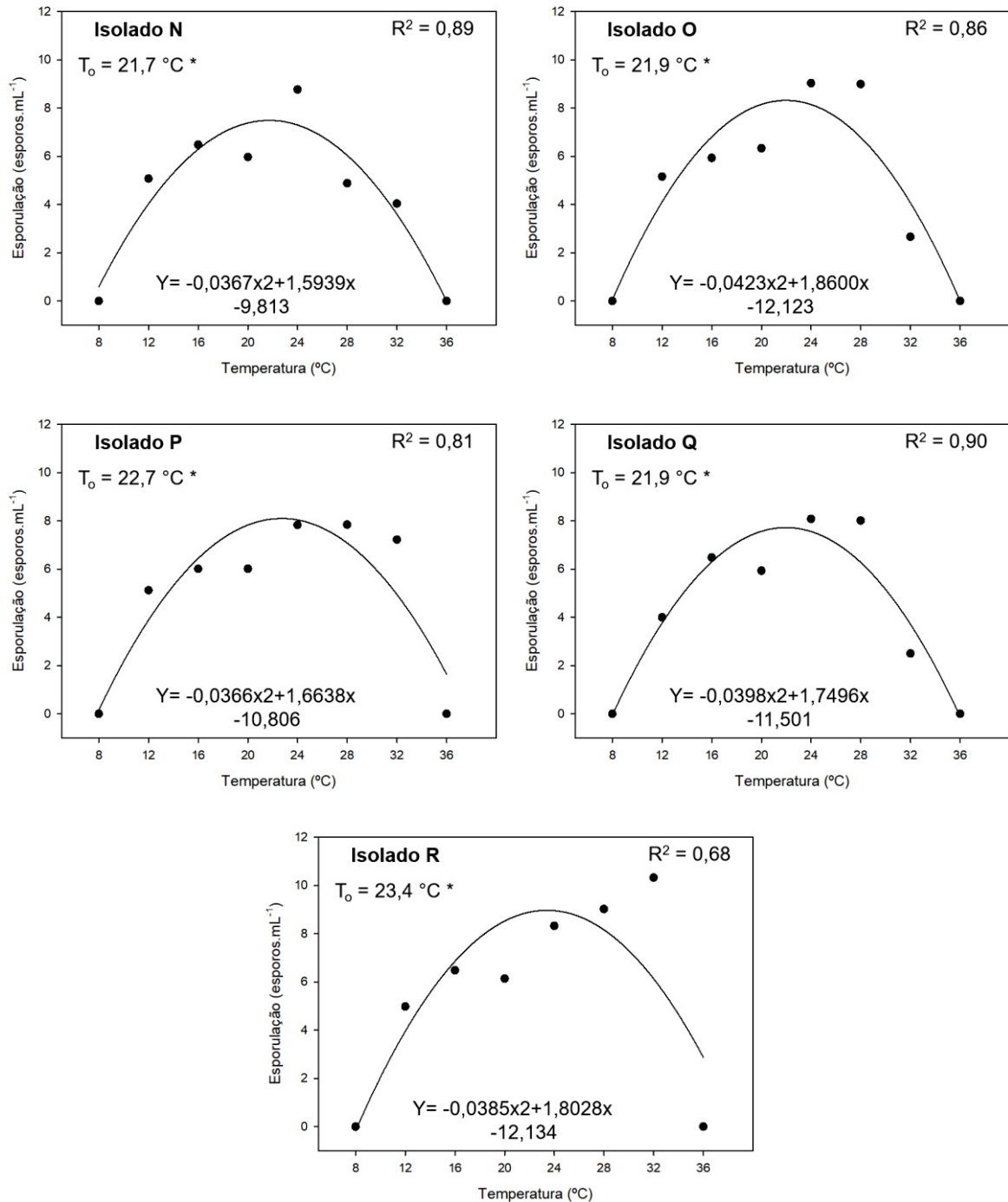


FIGURA 6: CURVAS DE ESPORULAÇÃO DOS 11 ISOLADOS DE *C. fimbriata* EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

(fim)



FONTE: O autor (2018)

LEGENDA: * Temperatura ótima

NOTA: Para cada um dos isolados foi calculada a equação da curva e o R quadrado.

4.1.3. Caracterização morfológica de *Ceratocystis fimbriata*

Os dados morfológicos das estruturas sexuadas e assexuadas dos 11 isolados de *C. fimbriata* encontram-se nas Tabelas 3, 4, 5 e 6. Os isolados apresentaram peritécios (Figura 7B) superficiais ou submersos no substrato, com coloração variando de marrom a preta na base, com 94,6 - 353,8 μm de comprimento e 79,0 - 330,8 μm de largura. O pescoço do peritécio apresentou a mesma coloração da base e seu comprimento variou de 254,7 - 1354,4 μm , o diâmetro da base do pescoço mediu 21,7 - 52,0 μm e 14,1 - 26,8 μm na extremidade distal. As hifas ostiolas (Figura 7A) são divergentes, marrom clara a hialina, não septadas, medindo 23,5 - 72,6 μm de comprimento. Os ascósporos (Figura 7C) são hialinos, pequenos, em formato de chapéu e apresentam 3,6 - 5,9 μm de comprimento e 1,8 - 3,4 μm de largura, os ascósporos encontram-se acumulados em uma matriz creme na extremidade do peritécio. Os endoconidióforos (Figura 7E) originam-se lateralmente as hifas vegetativas com dimensões de 15,9 - 53,1 μm de comprimento e 3,1 - 6,4 μm de largura na base. Os endoconídios são unicelulares, hialinos a marrom claro, cilíndricos com dimensões 8,5 - 27,6 μm de comprimento e 3,2 - 6,6 de largura. Os aleuroconídios (Figura 7D) possuem dimensões de 9,7 - 15,3 μm de comprimento e 7,1 - 12,2 μm de largura.

TABELA 3: DADOS MORFOLÓGICOS DOS ISOLADOS G, I e J DE *Ceratocystis fimbriata*.

(continua)

ESTRUTURAS	ISOLADO G	ISOLADO I	ISOLADO J
Base Ascomatal			
Comprimento (μm)	179,6 - 216,3 - 248,4 ^a	94,5 - 148,9 - 177,6	156,8 - 189,4 - 270,2
Largura (μm)	130,5 - 181,3 - 225,6	78,9 - 139,1 - 175,4	129,5 - 175,1 - 264,6
Pescoço Ascomatal			
Comprimento (μm)	694,0 - 997,8 - 1354,4	376,8 - 764,0 - 978,4	254,6 - 682,5 - 977,1
Largura (base) (μm)	28,5 - 39,8 - 51,6	21,6 - 30,6 - 49,0	28,5 - 36,4 - 46,3
Largura (ápice) (μm)	17,8 - 21,5 - 25,41	14,2 - 17,1 - 22,2	14,8 - 18,6 - 22,2
Hifa Ostiolo			
Comprimento (μm)	27,4 - 49,6 - 72,5	33,2 - 42,4 - 52,8	24,9 - 38,0 - 52,8

TABELA 3: DADOS MORFOLÓGICOS DOS ISOLADOS G, I e J DE *Ceratocystis fimbriata*.

(fim)

Ascósporo			
Comprimento (µm)	3,9 - 4,6 - 4,9	4,7 - 4,9 - 5,1	4,5 - 5,0 - 5,8
Largura (µm)	2,2 - 3,1 - 3,4	2,1 - 2,3 - 3,0	2,8 - 3,1 - 3,1
Endoconidióforo			
Comprimento (µm)	34,4 - 39,6 - 43,9	15,8 - 28,7 - 36,1	28,6 - 33,0 - 47,1
Largura (base) (µm)	4,7 - 5,2 - 6,4	4,8 - 5,2 - 5,7	4,6 - 5,3 - 6,4
Largura (ponto mais amplo) (µm)	5,4 - 6,2 - 7,9	5,3 - 6,1 - 6,7	6,0 - 6,7 - 7,9
Endoconídio			
Comprimento (µm)	12,9 - 19,8 - 27,5	12,2 - 13,0 - 13,5	15,2 - 19,2 - 22,6
Largura (µm)	3,2 - 4,5 - 27,5	3,5 - 4,2 - 4,9	4,2 - 5,0 - 6,5
Aleuroconídio			
Comprimento (µm)	12,1 - 13,4 - 14,5	9,9 - 10,5 - 11,3	10,3 - 13,5 - 14,6
Largura (µm)	9,8 - 10,7 - 11,9	9,3 - 9,8 - 10,1	9,1 - 10,6 - 12,1

FONTE: O autor (2018)

LEGENDA: ^a Valor mínimo, médio e máximo encontrado para cada estrutura do fungo.TABELA 4: DADOS MORFOLÓGICOS DOS ISOLADOS K, L e M DE *Ceratocystis fimbriata*.

(continua)

ESTRUTURAS	ISOLADO K	ISOLADO L	ISOLADO M
Base Ascomatal			
Comprimento (µm)	180,0 - 239,4 - 275,4 ^a	147,8 - 157,6 - 169,9	193,1 - 225,7 - 255,2
Largura (µm)	179,8 - 201,7 - 223,8	124,8 - 141,9 - 169,5	191,4 - 210,3 - 233,2
Pescoço Ascomatal			
Comprimento (µm)	860,2 - 928,5 - 1026,6	652,6 - 691,3 - 705,6	597,2 - 802,6 - 985,2
Largura (base) (µm)	35,2 - 39,5 - 44,7	31,9 - 34,3 - 36,7	29,2 - 34,9 - 39,9
Largura (ápice) (µm)	14,1 - 16,8 - 23,4	15,0 - 17,8 - 20,2	14,1 - 17,4 - 21,2
Hifa Ostíolo			
Comprimento (µm)	23,4 - 31,7 - 39,9	38,5 - 40,8 - 47,5	31,1 - 36,3 - 39,9
Ascósporo			
Comprimento (µm)	5,2 - 5,4 - 5,5	3,99 - 4,83 - 5,0	4,25 - 4,72 - 5,1
Largura (µm)	2,5 - 2,7 - 2,8	1,77 - 2,44 - 2,6	1,82 - 2,52 - 3,1

TABELA 4: DADOS MORFOLÓGICOS DOS ISOLADOS K, L e M DE *Ceratocystis fimbriata*.

(fim)

Endoconidiófor			
o			
Comprimento (µm)	24,3 - 28,5 - 32,1	23,5 - 24,5 - 25,8	28,9 - 40,7 - 53,0
Largura (base) (µm)	4,6 - 5,2 - 5,8	3,5 - 3,9 - 4,1	4,8 - 5,3 - 6,2
Largura (ponto mais amplo) (µm)	5,1 - 6,1 - 7,8	3,8 - 4,6 - 5,1	5,6 - 6,9 - 8,0
Endoconídio			
Comprimento (µm)	11,6 - 16,1 - 20,2	15,9 - 16,3 - 16,8	11,9 - 12,3 - 12,7
Largura (µm)	4,4 - 5,1 - 5,5	4,4 - 4,6 - 4,8	4,0 - 4,1 - 4,2
Aleuroconídio			
Comprimento (µm)	12,2 - 13,0 - 13,5	12,5 - 12,8 - 13,2	13,0 - 14,3 - 15,2
Largura (µm)	8,5 - 9,2 - 9,9	7,4 - 9,5 - 10,5	7,7 - 10,3 - 11,0

FONTE: O autor (2018)

LEGENDA: ^a Valor mínimo, médio e máximo encontrado para cada estrutura do fungo.TABELA 5: DADOS MORFOLÓGICOS DOS ISOLADOS N, O e P DE *Ceratocystis fimbriata*.

(continua)

ESTRUTURAS	ISOLADO N	ISOLADO O	ISOLADO P
Base Ascomatal			
Comprimento (µm)	177,2 - 209,7 - 232,0 ^a	231,4 - 309,7 - 353,8	220,0 - 287,6 - 315,2
Largura (µm)	165,5 - 193,1 - 207,6	218,6 - 291,3 - 330,7	178,0 - 269,0 - 305,6
Pescoço Ascomatal			
Comprimento (µm)	656,2 - 795,5 - 893,4	450,4 - 663,4 - 1004,0	636,2 - 748,9 - 889,6
Largura (base) (µm)	33,3 - 43,3 - 52,0	37,2 - 40,6 - 46,2	28,6 - 35,0 - 39,9
Largura (ápice) (µm)	15,2 - 18,7 - 22,2	18,3 - 20,5 - 23,4	16,5 - 18,1 - 20,2
Hifa Ostíolo			
Comprimento (µm)	31,2 - 38,8 - 46,5	24,1 - 30,9 - 46,9	33,2 - 40,0 - 52,8
Ascósporo			
Comprimento (µm)	3,9 - 4,4 - 4,9	4,0 - 4,4 - 4,9	4,7 - 5,0 - 5,5
Largura (µm)	1,9 - 2,1 - 2,3	2,9 - 3,0 - 3,2	2,5 - 2,7 - 2,9

TABELA 5: DADOS MORFOLÓGICOS DOS ISOLADOS N, O e P DE *Ceratocystis fimbriata*.

(fim)

Endoconidiófor			
o			
Comprimento (µm)	38,2 - 41,1 - 44,4	18,2 - 26,3 - 33,5	36,4 - 42,2 - 48,9
Largura (base) (µm)	3,1 - 3,8 - 4,5	4,2 - 4,6 - 5,0	3,8 - 4,0 - 4,6
Largura (ponto mais amplo) (µm)	5,9 - 6,2 - 6,9	5,1 - 5,7 - 6,2	5,4 - 6,1 - 6,8
Endoconídio			
Comprimento (µm)	8,5 - 15,4 - 17,0	14,9 - 15,3 - 15,9	18,6 - 20,4 - 22,2
Largura (µm)	3,5 - 3,8 - 4,3	3,6 - 3,9 - 4,2	3,8 - 4,5 - 5,5
Aleuroconídio			
Comprimento (µm)	9,7 - 10,3 - 11,2	10,5 - 12,6 - 13,6	10,2 - 11,8 - 12,8
Largura (µm)	7,1 - 7,8 - 8,1	8,2 - 9,0 - 9,9	8,9 - 9,1 - 9,2

FONTE: O autor (2018)

LEGENDA: ^a Valor mínimo, médio e máximo encontrado para cada estrutura do fungo.TABELA 6: DADOS MORFOLÓGICOS DOS ISOLADOS Q E R DE *Ceratocystis fimbriata*.

(continua)

ESTRUTURAS	ISOLADO Q	ISOLADO R
Base Ascomatal		
Comprimento (µm)	209,5 - 269,8 - 300,4 ^a	197,1 - 223,3 - 252,4
Largura (µm)	198,2 - 224,7 - 241,0	170,6 - 206,5 - 225,1
Pescoço Ascomatal		
Comprimento (µm)	540,3 - 714,4 - 893,4	628,8 - 809,6 - 928,0
Largura (base) (µm)	34,9 - 37,6 - 39,9	36,4 - 43,0 - 50,2
Largura (ápice) (µm)	17,8 - 20,8 - 26,7	22,2 - 23,7 - 26,2
Hifa Ostíolo		
Comprimento (µm)	35,3 - 41,1 - 47,9	33,6 - 38,9 - 46,9
Ascósporo		
Comprimento (µm)	3,5 - 3,8 - 4,2	4,6 - 5,2 - 5,8
Largura (µm)	2,1 - 2,2 - 2,5	2,3 - 2,8 - 3,0

TABELA 6: DADOS MORFOLÓGICOS DOS ISOLADOS Q E R DE *Ceratocystis fimbriata*.

(fim)

Endoconidióforo		
Comprimento (µm)	28,6 - 31,7 - 35,6	28,9 - 32,1 - 35,6
Largura (base) (µm)	3,1 - 3,6 - 4,1	3,2 - 3,6 - 4,0
Largura (ponto mais amplo) (µm)	5,0 - 5,5 - 6,3	5,0 - 5,3 - 6,2
Endoconídio		
Comprimento (µm)	17,5 - 19,9 - 23,5	14,1 - 19,2 - 22,1
Largura (µm)	3,3 - 4,0 - 4,4	3,8 - 4,2 - 4,7
Aleuroconídio		
Comprimento (µm)	10,9 - 11,6 - 12,0	9,9 - 12,3 - 15,1
Largura (µm)	9,0 - 9,7 - 10,1	9,0 - 9,8 - 10,2

FONTE: O autor (2018)

LEGENDA: ^a Valor mínimo, médio e máximo encontrado para cada estrutura do fungo.

A Tabela 7 compara os valores obtidos para cada estrutura morfológica mensurada dos isolados de erva-mate com os valores obtidos para isolados de seringueira, eucalipto e kiwi.

TABELA 7: COMPARAÇÃO DAS ESTRUTURAS MORFOLÓGICAS DE ISOLADOS DE *Ceratocystis fimbriata* DE ERVA-MATE COM SERINGUEIRA, EUCALIPTO E KIWI.

(continua)

ESTRUTURAS	Isolados de erva-mate	Isolados de seringueira (A)	Isolados de eucalipto (B)	Isolados de kiwi (C)
Nº de Isolados	11	4	-	4
Base Ascomatal				
Comprimento (µm)	94,6 - 353,8 ^a	120,0 - 252,0	120,0 - 250,0	70,0 - 234,0
Largura (µm)	79,0 - 330,8	115,0 - 241,0	110,0 - 250,0	86,0 - 250,0
Pescoço Ascomatal				
Comprimento(µm)	254,7 - 1354,4	172,0 - 668,0	440,0 - 770,0	143,0 - 721,0
Largura (base) (µm)	21,7 - 52,0	23,0 - 59,0	28,0 - 40,0	22,0 - 48,0
Largura (ápice) (µm)	14,1 - 26,8	14,0 - 24,0	16,0 - 24,0	10,0 - 34,0

TABELA 7: COMPARAÇÃO DAS ESTRUTURAS MORFOLÓGICAS DE ISOLADOS DE *Ceratocystis fimbriata* DE ERVA-MATE COM SERINGUEIRA, EUCALIPTO E KIWI.

(fim)

Hifa Ostíolo				
Comprimento (μm)	23,5 - 72,6	53,0 - 98,0	20,0 - 120,0	29,0 - 98,0
Ascósporo				
Comprimento (μm)	3,6 - 5,9	5,0 - 7,0	4,5 - 8,0	4,0 - 6,0
Largura (μm)	1,8 - 3,4	3,0 - 4,0	2,5 - 5,5	-
Endoconidióforo				
Comprimento (μm)	15,9 - 53,1	51,0 - 240,0	55,0 - 120,0	29,0 - 88,0
Largura (base) (μm)	3,1 - 6,4	2,0 - 5,0	3,0 - 8,0	2,0 - 7,0
Endoconídió				
Comprimento (μm)	8,5 - 27,6	10,0 - 22,0	9,0 - 33,0	9,0 - 21,0
Largura (μm)	3,2 - 6,6	3,0 - 5,0	3,0 - 5,0	3,0 - 5,0
Aleuroconídió				
Comprimento (μm)	9,7 - 15,3	13,0 - 18,0	11,0 - 16,0	9,0 - 14,0
Largura (μm)	7,1 - 12,2	8,0 - 14,0	6,5 - 12,0	6,0 - 11,0

FONTE: A) Valdetaro (2012), B) Ferreira, Alfnas e Mafia (2013), C) Piveta (2013), O autor (2018)

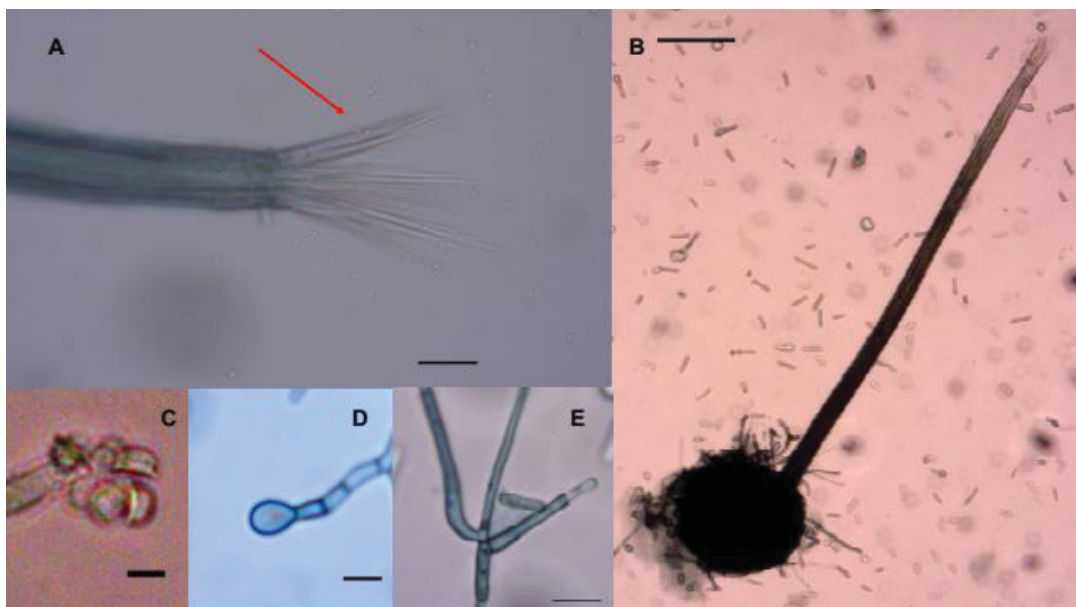
LEGENDA: ^a Valor mínimo e máximo encontrado para cada estrutura do fungo, (-) dados não encontrados.

FIGURA 7: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Ceratocystis fimbriata* DE ERVA-MATE.

A) HIFAS OSTIOLARES (SETA), BARRA = 20 μm . B) PERITÉCIO, BARRA = 100 μm .

C) ASCÓSPOROS EM FORMATO DE CHAPÉU, BARRA = 5 μm .

D) ALEUROCONÍDIÓ, BARRA = 10 μm . E) ENDONIDIÓFORO, BARRA = 20 μm .

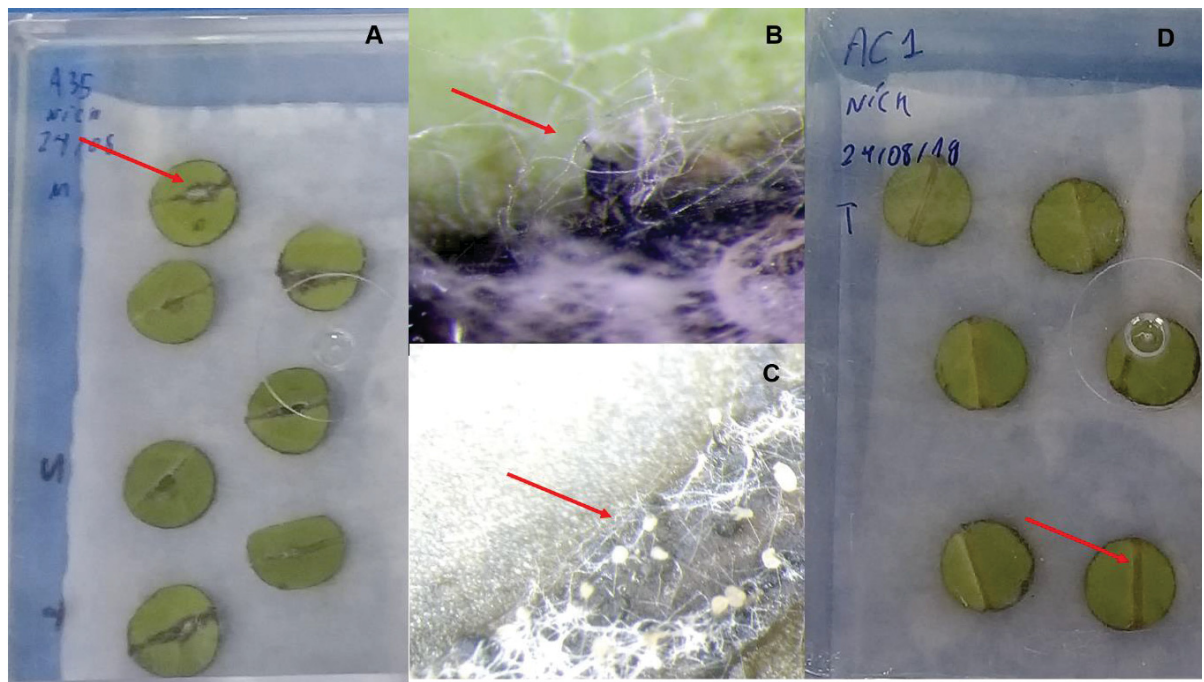


FONTE: O autor (2018)

4.1.4. Método de disco de folhas de erva-mate para avaliar a patogenicidade de *Ceratocystis fimbriata* à erva-mate

Os discos de folhas inoculados apresentaram, escurecimento parcial ou total da nervura principal, bem como surgiu uma colonização micelial branca devido ao fungo ter crescido nesta área (Figura 8A). A colonização do fungo na área, produziu peritécios (Figura 8B) superficiais ou pouco imersos no tecido foliar. É possível observar que houve formação de uma massa de coloração creme na extremidade de vários peritécios (Figura 8C), sendo esta composta por ascósporos, estando presente em todos os peritécios ao longo da nervura principal da folha. A testemunha apresentou ligeira modificação na coloração da nervura principal, porém não ocorreu presença de fungos lá, o que houve nesse caso foi o processo natural de oxidação da erva-mate devido aos seus metabolitos (Figura 8D), mesmo assim pode-se reparar que o material estava viável aos sete dias, quando ocorreu a avaliação dos discos de folhas.

FIGURA 8: DISCOS DE FOLHAS DESTACADAS DE ERVA-MATE INOCULADAS COM *Ceratocystis fimbriata*



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: A) Coloração da nervura principal modificada pela ação do isolado M de *C. fimbriata* (seta); B) Peritécio e micélio formado (seta); C) Peritécio, micélio e massa de ascósporos formada (seta); D) Disco de folhas de erva-mate inoculadas com água ultrapura esterilizada (seta).

No primeiro período pode-se constatar que houve interação significativa entre clones e isolados de *C. fimbriata* (Tabela 8). Então para uma melhor compreensão dos dados obtidos, foi realizado o teste de Scott-Knott para agrupar as médias de peritécios formados e pode-se visualizar melhor o comportamento entre clones e isolados. Ocorreu diferença entre o número de peritécios formados entre os dois isolados (M e O) para os genótipos IVA7 e BRS BLD Aupaba, sendo que o maior número foi formado pelo isolado M. Houve diferença entre os clones, formando menor número de peritécios em IVA8 e IVA42, para os dois isolados.

Para o segundo período, não houve interação entre os clones e isolados, sendo observado diferenças apenas entre o comportamento dos clones. Após o agrupamento de média realizado pelo teste de Scott-Knott, verificou-se que os clones apresentaram o mesmo comportamento do primeiro teste. Obtendo-se menor número de peritécios formados em IVA8 e IVA42. Os isolados apesar de terem formado números diferentes de peritécios em cada genótipo de erva-mate, não apresentaram diferença estatística.

TABELA 8: NÚMERO MÉDIO DE PERITÉCIOS FORMADOS PELOS ISOLADOS M E O DE *Ceratocystis fimbriata* EM DISCOS DE FOLHAS DE CLONES DE ERVA-MATE EM DUAS ÉPOCAS.

Teor de Cafeína	Clones	Número médio de peritécios			
		Inóculo M		Inóculo O	
		Época 1	Época 2	Época 1	Época 2
Médio	A35	23,2 Ac	26,0 Ac	27,9 Ab	28,2 Ac
	AC1	46,4 Aa	47,1 Aa	44,4 Aa	46,0 Aa
Baixo	IVA8	12,9 Ad	17,8 Ad	16,0 Ac	16,5 Ad
	IVA7	37,2 Ab	40,5 Ab	27,4 Bb	43,4 Ab
	IVA42	17,7 Ad	17,2 Ad	16,5 Ac	16,0 Ad
Alta	BRS BLD				
	Aupaba	43,7 Aa	44,6 Aa	30,6 Bb	50,8 Aa

FONTE: O autor (2018).

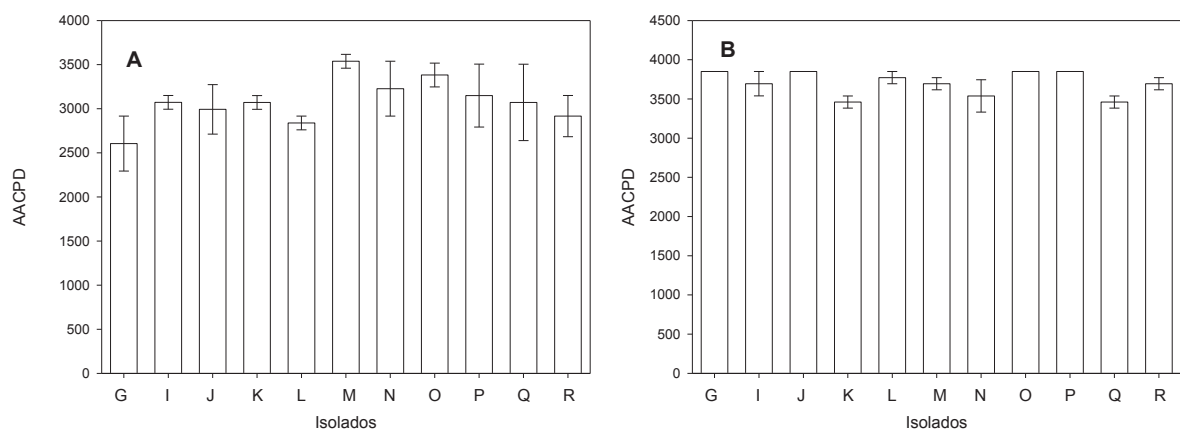
NOTA: Cada valor é número médio de peritécios por folhas; Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na linha e minúsculas na coluna não se diferem significativamente (Scott-Knott a 5% de probabilidade).

4.2. EXPERIMENTOS EM CASA DE VEGETAÇÃO E FITOTRON

4.2.1. Avaliação da agressividade de 11 isolados de *Ceratocystis fimbriata* em mudas de erva-mate

Os isolados de *C. fimbriata* foram agressivos a erva-mate. Na primeira época os isolados apresentaram um comportamento semelhante em relação a incidência de doença após a inoculação. Apesar das barras de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) aparentarem ser diferentes (Figura 9A), o erro padrão equiparou todos os isolados nesse teste de agressividade, não ocorrendo diferenças estatísticas entre os isolados. Também é possível observar que na segunda época, onde o teste ocorreu em Fitotron, as barras da AACPD são mais uniformes e o erro padrão diminuiu (Figura 9B), porém da mesma forma que ocorreu na primeira época, não houve diferença estatística entre os isolados.

FIGURA 9: ÁREA ABAIXO DA CURVA DE PROGRESSO DA DOENÇA (AACPD) PARA 11 ISOLADOS DE *Ceratocystis fimbriata* INOCULADOS EM MUDAS DE ERVA-MATE, EM CASA DE VEGETAÇÃO (A) E FITOTRON (B)



FONTE: O autor (2018).

NOTA: As barras representam os erros padrão das médias da AACPD de cada isolado.

4.2.2. Avaliação da resistência de seis clones de erva-mate à *Ceratocystis fimbriata*

Uma semana após a inoculação começou a ser observado que algumas mudas apresentavam mudanças, sendo observado com maior frequência o amarelecimento das folhas (Figura 10B) e algumas mudas apresentavam folhas murchas. Com o passar das semanas, várias plantas com murcha foliar e morte (Figura 10C).

FIGURA 10: MUDAS DE ERVA-MATE SEM SINTOMAS (A) E COM SINTOMAS DE AMARELECIMENTO (B) E MORTE (C)



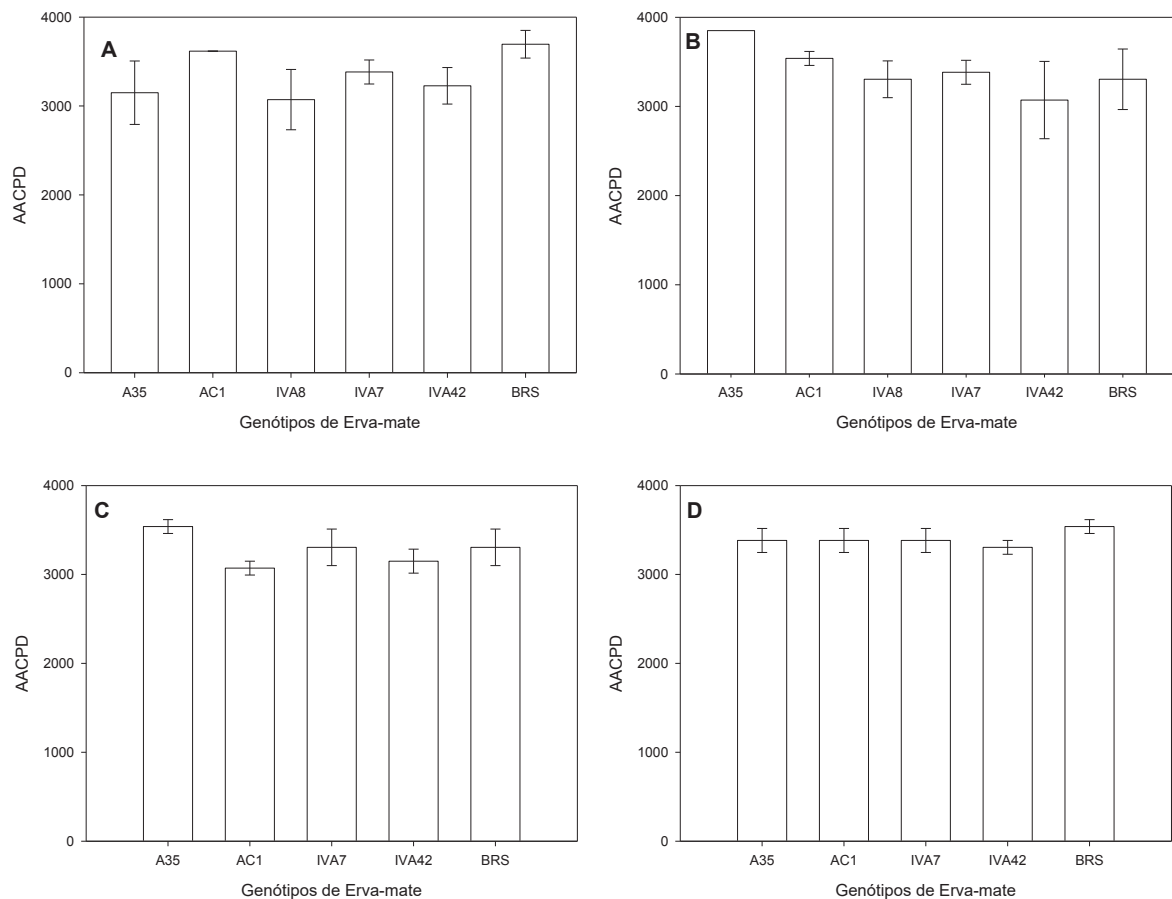
FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: A) muda sem sintomas de doença, B) muda com amarelecimento foliar (sete dias após a inoculação), C) muda totalmente seca e morta (a partir dos 14 dias após a inoculação).

Pode-se constatar que todas as barras de AACPI estão entre 3000 e 4000, os valores para cada clone testado tanto para o isolado M quanto para o isolado O foram próximas e devido ao erro padrão, todos os clones testados, não importando o ambiente e nem o isolado que foi inoculado, não apresentou diferença estatística quando submetidos ao teste F a 5% de probabilidade no programa R®.

Mesmo sendo realizado testes em diferentes ambientes como Fitotron (Figura 11A e Figura 11B) e casa de vegetação (Figura 11C e Figura 11D) não houve diferenças quanto a resistência dos clones aos dois isolados de *C. fimbriata*. Nota-se que mesmo em condições ambientais diferentes, os isolados de *C. fimbriata* causaram doença e as mudas tiveram um comportamento parecido.

FIGURA 11: ÁREA ABAIXO DA CURVA DE PROGRESSO DA DOENÇA (AACPD) DOS SEIS CLONES DE ERVA-MATE INOCULADOS COM DOIS ISOLADOS DE *Ceratocystis fimbriata* EM DUAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS DISTINTAS



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: A e B foram conduzidas em Fitotron; C e D foram conduzidas em casa de vegetação; Figura A e C foram inoculadas com o isolado M; B e D com o isolado O.

NOTA: As barras representam os erros padrão das médias da incidência da doença em cada isolado.

5. DISCUSSÃO

No Brasil, ocorrem diferentes espécies de *Ceratocystis* spp. que atacam vários hospedeiros perenes e anuais (HARRINGTON, 2009). Em 2018, foi relatado pela primeira vez a ocorrência de *C. fimbriata* em erva-mate (SANTOS et al., 2018). Diante disso, este trabalho contribui com estudos sobre a caracterização morfofisiológica e patogênica de 11 isolados de *C. fimbriata* em mudas e discos de folhas de erva-mate e quanto ao crescimento micelial e esporulação em CA, V8-água e BDA em diferentes temperaturas.

Os isolados de *C. fimbriata* apresentaram os maiores valores para crescimento micelial nos meios BDA e V8-água diferindo dos resultados obtidos por Santos et al. (2011) que verificaram os maiores valores em meio CA, enquanto que, Souza (2015) verificou que o maior crescimento micelial da forma anamorfo de *Ceratocystis* sp. foi em meio BDA. No presente trabalho, não houve diferenças entre os três meios de culturas testados para a esporulação de *C. fimbriata*, porém em trabalho também realizado por Souza (2015) com um anamorfo de *C. fimbriata*, a maior esporulação obtida foi em meio BDA.

Os isolados de *C. fimbriata* apresentaram um comportamento diferenciado para cada uma das temperaturas tanto para crescimento micelial quanto para esporulação. As faixas de temperaturas ótimas para crescimento micelial e esporulação dos isolados de *C. fimbriata* de erva-mate foram 22,2 à 23,1 °C e 21,7 à 23,5 °C, respectivamente. Estes valores aproximam-se dos encontrados para isolados de *C. fimbriata* de kiwi provenientes de Farroupilha, RS que foram entre 20 e 25 °C (PIVETA, 2013). No entanto, estas temperaturas ficaram abaixo dos 28,9 °C para crescimento micelial e 28,0 °C para esporulação encontrados por Costa e Carvalho et al. (2011) em um anamorfo de *C. fimbriata* em coqueiros. Os isolados utilizados por Costa e Carvalho et al. (2011) foram provenientes do Nordeste brasileiro, especificamente o estado de Sergipe, onde tem-se temperaturas mais elevadas e maior quantidade de dias quentes do que o observado para os isolados utilizados neste trabalho, provenientes do Paraná e Rio Grande do Sul, onde encontram-se temperaturas mais baixas e menor quantidade de dias quentes por ano do que o encontradas em Sergipe.

Os isolados de *C. fimbriata* de erva-mate apresentaram peritécios superficiais ou submersos no substrato, com coloração variando de marrom a preta tanto na base como no pescoço do peritécio assemelhando-se aos resultados de Engelbrecht e Harrigton (2005) em batata-doce, cacau e sicômoro, Valdetaro (2012) em seringueira, Ferreira, Alfenas e Mafia (2013) em eucalipto e Piveta (2013) em kiwi. No entanto, verificou-se maiores dimensões para comprimento e largura da base ascomatal e pescoço do peritécio; resultados que se aproximam dos valores encontrados por Firmino (2011), em eucalipto. Para os dados de largura da base e do ápice do pescoço, os valores encontrados estão muito próximos aos valores apresentados por Ferreira, Alfenas e Mafia (2013) e Valdetaro (2012). A hifa ostiolar é divergente, marrom clara a hialina, não septada. Os valores mínimos obtidos para as hifas ostiulares estão ligeiramente abaixo dos valores encontrados por Valdetaro (2012) e Piveta (2013), porém os mesmos encontram-se distribuídos dentro dos intervalos de medidas mínima (20 μm) e máxima (120 μm) de Engelbrecht e Harrigton (2005), Valdetaro (2012), Ferreira, Alfenas e Mafia (2013) e Piveta (2013).

Os ascósporos dos isolados de erva-mate são hialinos, pequenos, em formato de chapéu e encontram-se acumulados em uma matriz creme na extremidade do peritécio, com os comprimentos (3,6 – 5,9) semelhantes aos valores encontrados por Ferreira, Alfenas e Mafia (2013) (4,5 – 8,0) e Valdetaro (2012) (5,0 – 7,0), em eucalipto e seringueira, respectivamente. No entanto, os valores para largura foram ligeiramente inferiores com 1,8 – 3,4 μm para os isolados deste trabalho e 3,0 – 4,0 μm para os isolados de Valdetaro (2012), em seringueira. Os endoconidióforos originam-se lateralmente das hifas vegetativas, tendo o comprimento e largura acompanhando os valores obtidos por Valdetaro (2012), Ferreira, Alfenas e Mafia (2013) e Piveta (2013), com uma ressalva nos valores mínimos encontrados para os isolados obtidos de erva-mate onde a menor medida de comprimento foi 82% menor que os valores obtidos por Piveta (2013). Os endoconídios são unicelulares, hialinos a marrom claro, cilíndricos. Os aleuroconídios possuem um formato globoso a ovoide, diferenciando-se um pouco do formato globoso a piriforme descrito por Engelbrecht e Harrigton (2005).

Todos os isolados de *C. fimbriata* foram patogênicos à erva-mate, causando a morte das mudas em até sete semanas. Não se dispõe de outras informações para

erva-mate na literatura; no entanto, Piveta (2013) testou quatro isolados de *C. fimbriata* de kiwi e eucalipto, e todos os isolados utilizados causaram murcha e/ou morte nas plantas. Diferentemente de Oliveira (2010), que avaliou agressividade de isolados de *C. fimbriata* em clones de eucalipto e encontrou diferentes resultados para cada um dos clones utilizados, demonstrando que houve comportamento diferenciado da interação fungo e planta de acordo com os diferentes materiais genéticos utilizados. Fato este observado em outro trabalho realizado por Oliveira (2016) com isolados de *C. fimbriata* em *Mangifera indica*, sendo relatado comportamentos diferenciados entre os isolados utilizados e as diferentes cultivares testadas. Nesses dois trabalhos foram utilizados clones com comportamento conhecido de resistência e suscetibilidade dos hospedeiros em relação aos isolados do fungo.

Pouco se conhece sobre a resistência genética da erva-mate à *C. fimbriata*. Neste trabalho, verificou-se que os genótipos de alta, média e baixa cafeína foram suscetíveis, verificando-se a morte das plantas sete semanas após a inoculação. Em outro hospedeiro, kiwi, Piveta (2003) realizou teste de resistência em mudas e observou que não houve interação entre seus isolados de *C. fimbriata* e as cultivares utilizadas no teste, não sendo encontrada resistência por parte do kiwi à ação deste fungo. Esse resultado se assemelha com os resultados observados em erva-mate, onde não houve diferença estatística entre os clones utilizados, não havendo interação entre os clones e os isolados de *C. fimbriata*, conseqüentemente, todos os clones testados foram suscetíveis ao fungo. Para testes de resistência genética à ação de *C. fimbriata* em eucalipto, Oliveira (2010) encontrou diferentes níveis de resistência e suscetibilidade. Esses resultados encontrados por Oliveira (2010) foram obtidos testando um maior número de clones de eucalipto, isso contribuiu para ampliar a base genética das plantas testadas, favorecendo a obtenção de variabilidade para os clones analisados.

Em outros hospedeiros, como a mangueira, Oliveira (2016) encontrou materiais genéticos resistentes e suscetíveis a ação de *C. fimbriata*, demonstrando que mesmo com informações previamente obtidas, faz-se necessário o contínuo trabalho e estudos de resistência a ação deste fungo, que causa muitos danos a diversas culturas no Brasil.

Verificou-se que, neste trabalho, o uso de discos de folhas destacadas é de fácil execução e adequado para teste de patogenicidade e resistência. Este método

tem sido utilizado para vários hospedeiros com *Ceratocystis* como cacau (MAGALHÃES et al., 2016) e eucalipto (OLIVEIRA, 2017) e outros patógenos, tais como: *Sphaerotheca fuliginea* raça 1 em melão (COHEN, 1993), *Colletotrichum kahawae* em café (SILVA et al., 2018). No entanto, o estudo da resistência dos clones de erva-mate em mudas não mostrou correlação com os resultados encontrados para os discos de folhas, onde neste último houve interação entre patógeno e o material genético, fato este que não foi observado nas mudas. Em cacau, os resultados encontrados por Magalhães et al. (2016) mostraram correlação das interações entre patógeno e materiais genéticos testados, tanto nos discos de folhas quanto nas mudas. Uma consideração interessante aos resultados obtidos por estes autores foi o conhecimento de um material genético resistente a ação de *Ceratocystis*, que colaborou para se ter um comparativo inicial e poder qualificar melhor os níveis de resistência obtidos.

CONCLUSÕES

As características morfológicas de isolados de *C. fimbriata* de erva-mate são: peritécios com pescoço de marrom a preto, hifa ostiolar divergente, ascósporos hialinos em formato de chapéu, endoconídios unicelulares, cilíndricos, e aleuroconídios com formato globoso a ovoide.

Os meios que apresentaram maiores crescimento micelial e esporulação de *C. fimbriata* foram BDA e V8-ágar;

As temperaturas ótimas para crescimento micelial e esporulação dos isolados de *C. fimbriata* foram 22,9 °C e 22,4 °C, respectivamente;

Todos os isolados de *C. fimbriata* foram patogênicos à erva-mate;

Não houve diferença quanto à resistência dos clones à murcha de *C. fimbriata* em mudas de erva-mate;

O método de disco de folha destacada não apresentou similaridade à avaliação de resistência de clones em mudas de erva-mate.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R.; SILVA, H. M. **Ocorrência de mofo cinzento (*Ceratocystis fimbriata*) da seringueira**. In: Seminário Nacional da Seringueira. Cuiabá – MS, p. 125-128, 1972.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doença do eucalipto**. Editora UFV, Viçosa, Brasil, 2009.
- ARRUDA, S. C. Murcha (*Ceratostomella*) da mangueira, rubelose da jabuticabeira e o carvão da tamareira. **O Biológico**, v. 6, p. 330-311, 1940.
- ANTONIAZZI, M. S.; ROCHA, L. D.; SOUZA, E. L.; GUERRA, D.; SILVA, D. M.; REDIN, M. Análise da cultura de erva-mate como alternativa social, econômica e ambiental para comunidades rurais. **Revista Extensão em Foco**, n. 15, p. 108-119, 2018.
- ANTONIO, G. L.; DONATO, R. L.; IOSSI, M. R.; FIRMINO, A. C. **Indução de resistência de cacauero a *Ceratocystis cacaofunesta***. Crise: Tecnologias para a superação de desafios no setor agrário. In: 1º Encontro Internacional de Ciências Agrárias e Tecnológicas Crise: tecnologias para a superação de desafios no setor agrário. UNESP, Dracena, São Paulo, 2016.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 277**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/res0277_22_09_2005.html>. Acesso em: 18 de novembro de 2018.
- BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* Ell & Halst. na amazônia brasileira. **Acta Amazônica**, v. 8, p. 543-544, 1978.
- BERTÉ, K. A. S. **Tecnologia da erva-mate solúvel**. 160 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- BORJA, D. C.; CAYCEDO, J. E. L.; RÍOS, J. A. L. **El secamiento de los cítricos em la zona cafetera central**. Cenicafé Avances Tecnicos, Colombia, v. 212, 1995.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Centro Nacional de Pesquisas de Florestas – Colombo: EMBRAPA-CNPQ, Brasília. 2003. Vol.1. 1039 p.

COHEN, R. A leaf disc assay for detection of resistance of melons to *Sphaerotheca fuliginea* race1. **Plant Disease**, v. 77, p. 513-517, 1993.

COSTA E CARVALHO, R. R.; WARWICK, D. R. N.; SOUZA, P. E.; CARVALHO FILHO, J. L. S. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de esporos de *Thielaviopsis paradoxa* isolado de coqueiro em Sergipe. **Revista Scientia Plena**, v. 7, n. 9, 2011.

ENGELBRECHT, C. J.; HARRINGTON, T. C. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. **Mycologia**, v. 97, n. 1, p. 57-69, 2005.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT 2019**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>> Acessado em 1 de janeiro de 2019.

FERREIRA, F. A.; DEMUNER, A. M. M.; DEMUNER, N. L.; PIGATO, S. Murcha de *Ceratocystis* em eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 284, 1999.

FERREIRA, F. A.; MAFFIA, L. A.; BARRETO, R. W.; DEMUNER, N. L.; PIGGATO, S. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. **Revista Árvore**, v. 30, 155-162, 2006.

FERREIRA, M. A.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. *Ceratocystis fimbriata* em espécies florestais e agronômicas no Brasil. In: Patologia florestal: desafios e perspectivas. NEFIT – Núcleo de Estudos em Fitopatologia, São Carlos, SP, 2013.

FERREIRA, M. A. **Estrutura genética de populações e padrão espaço-temporal da murcha-de-ceratocystis**. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

FIGUEIREDO, P.; PINHEIRO, E. D. Uma nova doença da figueira (*Ficus carica* L.) na região de Valinhos, SP. **O Biológico**, v. 35, p. 227-203, 1969.

FIRMINO, A. C. **Caracterização de isolados de *Ceratocystis* sp., avaliação de resistência clonal de eucalipto e sensibilidade deste fungo a diferentes fungicidas**. Tese (Doutorado em Agronomia/ Proteção de Plantas), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu -SP, 2011.

FIRMINO, A. C.; FISCHER, I. H.; ANTONIO, G. L.; NOVAES, Q. S.; TOZZE JÚNIOR, H. J.; FURTADO, E. L. Characterization of *Ceratocystis fimbriata* from passion fruits. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 83, 1-7, São Paulo, 2016

FIRMINO, A. C.; TOZZE JUNIOR, H. J.; SOUZA, I. C. G.; FURTADO, E. L. Resistencia de genótipos de Eucalipto a *Ceratocystis* spp. **Scientia Forestalis**, v.41, n. 98, p. 165-173, 2013.

FLORA DO BRASIL 2020. *Ilex paraguariensis* **A. St.-Hil.** Informações. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>> Acesso em: 20/07/2018.

HARRINGTON, T. C. The genus *Ceratocystis*. Where does the oak wilt fungus fit?. In: NATIONAL OAK WILT SYMPOSIUM, 2.. 2009, Austin. **Proceedings**. The 2nd National Oak Wilt Symposium, 2009. p. 27–41.

JAREK, T. M.; Fusariose da pupunheira no Brasil: métodos de inoculação, efeito da compactação do solo, patogenicidade e identificação de espécies. 94 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

MEZZOMO, R. *Ceratocystis fimbriata* **Ellis & Halsted em espécies florestais no Rio Grande do Sul: comportamento e controle biológico**. 78 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014

JOHNSON, J. A.; HARRINGTON, T. C.; ENGELBRECHT, C. J. Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex. **Mycologia**, Corbalis, v. 97, n. 5, p. 1067-1092, 2005.

JUNQUEIRA, A. A.; BASSO, V. M.; SOUZA, N. D. Evolução da extração vegetal de erva-mate no período de 2004 a 2015. In: I Semana de Aperfeiçoamento em Engenharia Florestal, 2017, Curitiba. **Anais...**Curitiba: UFPR, 2017.

LUZ, M.; DAL SOGLIO, F. K.; KUBO, R. R. Resistência camponesa no âmbito da fabricação artesanal de erva-mate, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Pelotas, v. 12, n. 1, p. 68-80, 2017.

MACCARI JUNIOR, A. **Análise do pré-processamento da erva-mate para chimarrão**. 215 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MAGALHÃES, D. M. A.; LUZ, E. D. M. N.; LOPES, U. V.; NIELLA, A. R. R.; DAMACENO, V. O. Leaf disc method for screening *Ceratocystis* wilt resistance in cacao. **Tropical Plant Pathology**, março 2016.

MARIN, M.; CASTRO, B.; GAITAN, A.; PREISIG, O.; WINGFIELD, B. D. WINGFIELD, M. J. Relationships of *Ceratocystis fimbriata* isolates from Colombian Coffee-Growing regions based on molecular data and pathogenicity. **Journal of Phytopathology**, v.151, p. 395-405, 2003.

MEZZOMO, R. ***Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted em espécies florestais no Rio Grande do Sul: comportamento e controle biológico**. 78 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014

OLIVEIRA, L. S. S. **Agressividade de isolados de *Ceratocystis fimbriata* em clones de *Eucalyptus* spp.** 26 p. Dissertação (Mestrado em Etiologia; Epidemiologia; Controle), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

OLIVEIRA, L. S. S.; DAMACENA, M. B.; GUIMARÃES, L. M. S.; SIQUEIRA, D. L.; ALFENAS, A. C. *Ceratocystis fimbriata* isolates on *Mangifera indica* have different levels of aggressiveness. **European Journal of Plant Pathology**, v. 145, n. 4, p. 847-856, 2016.

OLIVEIRA, R. G. S. **Murcha-de-ceratocystis em eucalipto: método de detecção não destrutivo e precoce da resistência e aspectos morfofisiológicos e anatômicos da infecção**. 75 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES, 2017.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. **Área de distribuição natural de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)**, 1983. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/300244/1/Areadedistribuiçãonaturaldeervamate.pdf>> Acesso em: 20 de abril de 2017.

PIVETA, G. **Morfologia, caracterização molecular e patogenicidade de *Ceratocystis fimbriata* no Rio Grande do Sul**. 66 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

PIVETA, G; ALFENAS, A. C.; MUNIZ, M. F. B.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; FERREIRA, M. A. Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* em kiwi (*Actinidia deliciosa*) no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v. 35, n. 2, p. 665-669, 2013.

RODRIGUES, G. S.; MAGALHÃES, D. M. A.; COSTA, A. M.; LUZ, E. D. M. N. Antagonismo de *Trichoderma* spp. ao agente etiológico da Murcha de *Ceratocystis* em cacauero. **Summa Phytopathologica** v.44, n.1, Botucatu, 2018.

SANTOS, A. F. dos; FERREIRA, F. A. Murcha-de-*Ceratocystis* em Acácia-negra no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 325, 2003.

SANTOS, A. F. dos; FERREIRA, M. A.; AUER, C. G.; BUHRER, C. B.; BRITO, N. M.; SCREMIN, R. M.; MIRESKI, M. C. First report of Yerba Mate wilt caused by *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. **Plant Disease**, v. 102, n. 11, p. 2381, 2018.

SANTOS, P. H. D. dos; MUSSI-DIAS, V.; FREIRE, M. G. M.; CARVALHO, B. M.; SILVEIRA, S. F. Diagrammatic scale of severity for postharvest black rot (*Ceratocystis paradoxa*) in coconut palm fruits. **Summa Phytopathologica** v.43, n.4, Botucatu, 2017.

SANTOS, P. L.; FIRMINO, A. C.; TOZZE JÚNIOR, H. J.; BARROS, S. A.; FURTADO, E. L. Comportamento de *Ceratocystis* sp. in vitro sob diferentes temperaturas, meios de cultura e pH. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v. 1, n. 1, p. 7-14, 2011.

SANTOS, C. O.; TRINDADE, S. C.; SILVEIRA, M. L. R.; SANTOS, R. O.; SAUTTER, C. K. Caracterização, teor de polifenóis total e atividade antioxidante em diferentes tipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) para chimarrão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo- SP, p. 77-86, 2014.

SILVA, A. C.; OLIVEIRA SILVA, F. M.; MILAGRE, J. C.; OMENA-GARCIA, R. P.; ABREU, M. C.; MAFIA, R. G.; NUNES-NESI, A.; ALFENAS, A. C. Eucalypt plants are physiologically and metabolically affected by infection with *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 123, p. 170-179, 2018.

SILVA, R. A.; ZAMBOLIM, L.; CASTRO, I. S. L.; RODRIGUES, H. S.; CRUZ, C. D.; CAIXETA, E. T. The Híbrido de Timor germplasm: identification of molecular diversity and resistance sources to coffee berry disease and leaf rust. **Euphytica**, v. 214, p. 153, 2018.

SILVESTRINI, R.; WEINGARTNER, A.; TACHIBANA, LUÃ. A tríade “Guerra do Paraguai-Erva Mate-Território”: a contribuição da *Ilex paraguariensis* para a formação da fronteira do território brasileiro pós-guerra. **Revista Argamassa**, v. 1, n. 2, 2018.

SÔNEGO, O. R.; FERREIRA, M. A.; VALBENITO-SANHUEZA, R. M.; GAVA, R.; GARRIDO, L. R.; ALFENAS, A. C. Primeiro relato da murcha-de-ceratocystis em kiwi. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 233, 2010.

SOUZA, W. C. O.; NASCIMENTO, L. C.; SANTOS, T. S.; VIDAL, J. M.; SILVA, H. F. Comportamento in vitro de *Chalara paradoxa*, agente causal da podridão-negra do abacaxizeiro, em diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 37, n. 4, p. 845-851, 2015.

TRINDADE, D. R.; FURTADO, E. L. Doenças da seringueira. **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 3 ed., v. 2, São Paulo: Ceres, 1997. p. 628 - 641.

TUMURA, K. G.; DE PIERI, C.; FURTADO, E. L. Murcha por *Ceratocystis* em eucalipto: avaliação de resistência e análise epidemiológica. **Summa Phytopathologica**, Botucatu – SP, v. 38, n. 1, p. 54-60, 2012.

VALDETARO, D. C. O. F. **Morfologia, Variabilidade Genética e Patogenicidade de *Ceratocystis fimbriata* em *Hevea brasiliensis***. 28 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

VIEIRA, T. **Viabilidade econômica da cultura de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. – Hill) em áreas de reserva legal no Paraná**. 135 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

VIÉGAS, A. P. **Índice de fungos da américa do Sul**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1961, 921 p.

WENDLING, I.; SANTIN, D. **Propagação e nutrição de erva-mate**. Brasília: Embrapa, 2015, 195 p.

WYK, M.V.; WINGFIELD, B.D.; AL-ADAWI, A.O.; ROSSETTO, C.J.; ITO, M.F. Two new *Ceratocystis* species associated with mango disease in Brazil. **Mycotaxon** v. 117: p. 381-404, 2011.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clona: princípios e técnicas**. Viçosa, 2013, 279 p.

YAKUSHIJI, H.; MORITA, T.; JIKUMARU, S.; IKEGAMI, H.; AZUMA, A.; KOSHITA, Y. Interspecific hybridization of fig (*Ficus carica* L.) and *Ficus erecta* Thunb., a source of *Ceratocystis* canker resistance. **Euphytica**, v.183, p. 39-47, 2012.

ZAUZA, E. A. V.; ALFENAS, A. C.; HARRINGTON, T. C.; MIZUBITI, E. S.; SILVA, J. F. Resistance of *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Disease**, v. 88, p. 758-760, 2004.