

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROBERTO DE RESENDE LISBOA PIASSETTA

DOENÇAS EM MUDAS CLONAIAS DE ERVA-MATE EM DUAS ÉPOCAS DO ANO -
GUARAPUAVA, PARANÁ

CURITIBA

2022

ROBERTO DE RESENDE LISBOA PIASSETTA

DOENÇAS EM MUDAS CLONAIAS DE ERVA-MATE EM DUAS ÉPOCAS DO ANO -
GUARAPUAVA, PARANÁ

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Florestal, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer
Coorientador: Prof. Dr. Nilton José Sousa

CURITIBA
2022

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Florestais e da Madeira - UFPR

Piassetta, Roberto de Resende Lisboa

Doenças em mudas clonais de erva-mate em duas épocas do ano -
Guarapuava, Paraná / Roberto de Resende Lisboa Piassetta.
– Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

Coorientador: Prof. Dr. Nilton José Sousa

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Florestal. Defesa: Curitiba, 31/03/2022.

Área de concentração: Silvicultura.

1. Erva-mate - Guarapuava (PR). 2. Erva-mate - Cultivo. 3. Erva-mate
- Doenças e pragas. 4. Erva-mate - Melhoramento genético. 5. Teses.
I. Auer, Celso Garcia. II. Sousa, Nilton José. III. Universidade Federal
do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. IV. Título

CDD – 634.9

CDU – 634.0.285(816.2)

Bibliotecária: Berenice Rodrigues Ferreira – CRB 9/1160



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA
FLORESTAL - 40001016015P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA FLORESTAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ROBERTO DE RESENDE LISBOA PIASSETTA** intitulada: **DOENÇAS EM MUDAS CLONAIS DE ERVA-MATE EM DUAS ÉPOCAS DO ANO - GUARAPUAVA, PARANÁ**., sob orientação do Prof. Dr. CELSO GARCIA AUER, que após terem inquirido o aluno e realizada 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, 31 de Março de 2022.

CELSO GARCIA AUER

Presidente da Banca Examinadora

ALESSANDRO CAMARGO ANGELO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

LUCIENE MARTINS MOREIRA

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pelo dom da vida.

À minha família, e principalmente a minha companheira Ana Paula Mikos por sempre estar presente e disponível, pela grande ajuda na realização deste trabalho, pelo companheirismo, amor e paciência.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de realizar o Mestrado.

Ao meu professor orientador, Prof. Celso Garcia Auer e Prof. Nilton José Sousa, pela ajuda na realização deste trabalho.

Ao Prof. Álvaro Figueiredo dos Santos, que contribuiu para melhoria do trabalho.

Aos professores da pós-graduação que ao longo do meu mestrado contribuíram para essa dissertação.

Aos técnicos da Embrapa Florestas que me ajudaram a tornaram esse trabalho possível.

À Universidade Federal do Paraná pela estrutura e oportunidade de estudo.

À empresa Golden Tree, pelo material disponibilizado de erva-mate para os estudos de doenças em viveiro.

A Embrapa Florestas pelo apoio, fornecimento de materiais, base para que esse trabalho fosse realizado com sucesso.

À CAPES, pelo investimento nas pesquisas e auxílio financeiro na forma de bolsa de mestrado.

RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) é uma planta nativa da Floresta com Araucária (Floresta Ombrófila Mista), que ocorre nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Em 2020, a produção brasileira atingiu cerca de 954 mil toneladas de erva-mate, sendo 44,7% produzidos pelo extrativismo vegetal e 55,3% gerados por plantios de erva-mate. O Paraná produziu aproximadamente 600 mil toneladas, o que corresponde a 63,1% da produção nacional, resultando em um valor de R\$ 787 milhões. Apesar de haver estudos específicos sobre doenças na erva-mate, existe a necessidade de maior conhecimento sobre as doenças que ocorrem na produção de mudas clonais. O objetivo deste trabalho foi identificar as doenças e os agentes causais que ocorrem nas mudas de quatro diferentes clones de erva-mate de viveiro, em dois períodos do ano. No laboratório, foram realizadas análises com folhas e estacas de erva-mate provenientes de um viveiro da região de Guarapuava-PR. Foram coletadas 50 folhas e 50 estacas com sintomas, aleatoriamente ao acaso em dois períodos do ano, na primavera e no outono. Com as amostras foram realizados ensaios de isolamento e o sequenciamento genético dos fungos mais encontrados. Posteriormente, foi realizado o teste de patogenicidade em folhas com e sem ferimento. Os fungos com maior frequência e incidência identificados nas folhas e estacas analisadas foram dos gêneros *Fusarium* e *Colletotrichum*, dentre os sete fungos isolados nas amostras. As espécies identificadas por métodos moleculares foram *Fusarium oxysporum*, *Fusarium pseudocircinatum*, *Fusarium fujikuroi*, *Colletotrichum* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum kahawae*. O teste de patogenicidade mostrou que todas as espécies identificadas pelo sequenciamento genético foram patogênicas a folhas de erva-mate. As espécies de maior agressividade, inoculadas em folhas de erva-mate, foram *F. oxysporum* e *Colletotrichum* sp. Este é o primeiro relato de *F. fujikuroi* e *C. kahawae* causando doenças em erva-mate

Palavras-chaves: *Ilex paraguariensis*. *Fusarium*. *Colletotrichum*. Patogenicidade.

ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) is a native plant of the Araucaria Forest (Floresta Ombrófila Mista), which occurs in the states of Paraná, Santa Catarina, and Rio Grande do Sul. In 2020, Brazilian production reached about 954,000 tons of yerba mate, 44.7% produced by vegetal extractivism and 55.3% generated by yerba mate plantations. Paraná produced approximately 600,000 tons, which corresponds to 63.1% of the national production, resulting in a value of R\$ 787 million. Although there are specific studies on diseases in yerba mate, there is a need for more knowledge about the diseases that occur in the production of clonal seedlings. The objective of this work was to identify the diseases and causal agents that occur in the seedlings of four different clones of yerba mate from nurseries, in two periods of the year. In the laboratory, analyses were performed on yerba mate leaves and cuttings from a nursery in the Guarapuava-PR region. Fifty leaves and 50 symptomatic cuttings were randomly collected in two periods of the year, spring and fall. With the samples, isolation and genetic sequencing tests of the most commonly found fungi were performed. Subsequently, a pathogenicity test was performed on leaves with and without lesions. The fungi with the highest frequency and incidence identified on the leaves and cuttings analyzed were from the genera *Fusarium* and *Colletotrichum*, among the seven fungi isolated in the samples. The species identified by molecular methods were *Fusarium oxysporum*, *Fusarium pseudocircinatum*, *Fusarium fujikuroi*, *Colletotrichum* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum kahawae*. The pathogenicity test showed that all species identified by genome sequencing were pathogenic to yerba mate leaves. The most aggressive species inoculated on yerba mate leaves were *F. oxysporum* and *Colletotrichum* sp. This is the first report of *F. fujikuroi* and *C. kahawae* causing diseases in yerba mate

Key words: Yerba mate. *Fusarium*. *Colletotrichum*. Pathogenicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Vista geral do jardim clonal e identificação de mudas com sintomas de necrose e morte de folhas e de estacas	24
Figura 3.2 – Placa de Petri com amostras circulares de folha de erva-mate para isolamento indireto.....	27
Figura 3.3 – Detalhe de folhas de erva-mate com ferimentos induzidos para o teste de patogenicidade	30
Figura 3.4 – Detalhe da testemunha do teste de patogenicidade com folhas de erva-mate sadias.	31
Figura 4.1 – Comparação de média da incidência de fungos em folhas de duas coletas	35
Figura 4.2 – Comparação de média da incidência de fungos em estacas de duas coletas	37
Figura 4.3 – Folhas de erva-mate inoculadas com isolados dos fungos dos gêneros <i>Colletotrichum</i> e <i>Fusarium</i> . Legenda: Fotos (a) e (b) com <i>Colletotrichum</i> . Fotos (c) e (d) com <i>Fusarium</i>	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Principais estudos sobre <i>Fusarium</i> sp. no Brasil	21
Tabela 4.1 – Fungos encontrados em folhas e estacas de mudas de 4 clones em duas épocas do ano em isolamento direto. Guarapuava/PR. 2020/2021.....	33
Tabela 4.2 – Fungos encontrados a partir do isolamento indireto de folhas de mudas de 4 clones em duas épocas do ano. Guarapuava/PR. 2020/2021.....	34
Tabela 4.3 – Comparação de médias entre os fungos identificados nas folhas de clones de erva-mate em duas épocas de coleta.....	34
Tabela 4.4 – Fungos encontrados no isolamento indireto de estacas de quatro clones em duas épocas do ano. Guarapuava/PR. 2020/2021.	36
Tabela 4.5 – Comparação de médias entre os fungos identificados nas estacas das duas coletas.....	36
Tabela 4.6 – Identificação dos isolados de <i>Fusarium</i> e <i>Colletotrichum</i> encontrados em folhas e estacas clonais de erva-mate.....	40
Tabela 4.7 – Avaliação do teste de patogenicidade de isolados de <i>Fusarium</i> spp. em folhas destacadas de erva-mate aos 7 e 14 dias após a inoculação.....	41
Tabela 4.8 – Avaliação do teste de patogenicidade de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em folhas destacadas de erva-mate aos 7 e 14 dias após a inoculação.....	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. OBJETIVOS	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. ERVA-MATE NO BRASIL	12
2.2. ERVA-MATE NO PARANÁ	13
2.3. PRODUÇÃO DE MUDAS EM VIVEIROS.....	14
2.3.1. Clones de erva-mate	16
2.4. DOENÇAS NA ERVA-MATE	17
2.4.1. Podridão de estacas e miniestacas	17
2.4.2. Podridão de raízes	18
2.4.3. Antracnose	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. ÁREA DE ESTUDO	23
3.2. COLETA DE AMOSTRAS DE MATERIAL DOENTE	25
3.3. ISOLAMENTO DOS FUNGOS	25
3.3.1. Isolamento direto	26
3.3.2. Isolamento indireto	26
3.4. IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	27
3.5. TESTE DE PATOGENICIDADE	29
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. ISOLAMENTO DE FUNGOS.....	33
4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	39
4.3. TESTE DE PATOGENICIDADE	40
5. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) é uma planta nativa da Floresta com Araucária (Floresta Ombrófila Mista) e sua distribuição natural ocorre no Brasil, Uruguai, Argentina e Paraguai. No Brasil, a erva-mate é encontrada nos três estados da região Sul, (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande de Sul), além do estado do Mato Grosso do Sul e em pequenas áreas nos estados do Rio de Janeiro e de Minas Gerais. A espécie é fonte de vários produtos utilizados na indústria alimentícia, química e farmacêutica. As folhas e ramos são normalmente utilizados em sua forma natural, como exemplo com o chimarrão, chás e tererê (DANIEL, 2009).

A produção de erva-mate também é responsável pela preservação de grande parte dos fragmentos florestais, principalmente nas florestas de araucária, ainda existentes no país. Além disso, a exploração do erval nativo é a atividade extrativista que menos utiliza produtos químicos, e quando bem manejada pode ser um dos sistemas mais sustentáveis do país (MEDRADO E VILCAHUAMAN, 2014).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor de erva-mate do mundo, tendo produzido aproximadamente 880 mil toneladas produzidas no ano de 2019 (SIDRA, 2022). O segundo maior produtor é a Argentina, com produção de 840 mil toneladas, e em terceiro, o Paraguai com cerca de 170 mil toneladas (DERAL, 2020). Observa-se um crescimento da produção e produtividade dos ervais brasileiros ao longo dos anos da última década.

A produção de mudas de erva-mate é uma das etapas mais importantes na implantação da cultura, pois o sucesso da produção está diretamente relacionado à qualidade destas. As mudas seminais, provenientes de sementes, ainda são as mais utilizadas na cultura. No entanto, os sistemas de produção de mudas têm apresentado avanços importantes em relação às técnicas de produção para as fases de desenvolvimento das mudas nos viveiros. A adoção de boas práticas nos viveiros e a produção de mudas clonais de maior qualidade genética, fisiológica e sanitária, reflete em um aumento da produtividade e qualidade dos ervais (WENDLING et al., 2020).

Segundo Vargas (2020), a principal doença da erva-mate no Brasil é a fusariose, que é causada por *Fusarium spp.*, que pode causar até a morte da planta.

A doença pode afetar desde plântulas e mudas em viveiros, até árvores adultas em ervais. Destaca-se que ervais atacados pela podridão-de-raízes podem ter perdas de até 30% de produtividade (POLETTTO et al., 2006).

Diversos estudos vêm sendo realizados de modo a identificar os fungos incidentes na cultura da erva-mate, principalmente na região Sul do país. Cabe salientar, que não foi identificado nenhum estudo com mudas clonais. As amostras avaliadas de erva-mate podem consistir em partes da planta como folhas, raízes, sementes, frutos, flores, plântulas e mudas, ou no substrato, solo e recipiente em que as plantas são cultivadas. O fungo mais presente nos estudos referentes à fungos em erva-mate no Brasil foi *Fusarium* sp. (PIASSETTA et al., 2021).

Apesar de haver estudos específicos sobre doenças na erva-mate, existe a necessidade de maior conhecimento sobre as doenças que ocorrem na produção de mudas clonais.

1.1. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi identificar os agentes causais das doenças que ocorreram em mudas de quatro diferentes clones de erva-mate de viveiro, em dois períodos do ano. Os objetivos específicos foram:

- Identificar os principais fungos associados com a mortalidade em estacas clonais de erva-mate, em nível de espécie;
- Analisar o efeito da época do ano na frequência dos fungos isolados;
- Analisar a patogenicidade dos isolados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A erva-mate, *Ilex paraguariensis* A. St. Hil é uma planta originária do Brasil, Argentina e Paraguai, a qual possui folhas que são consumidas muitas vezes em sua forma natural. O produto é utilizado desde os povos nativos, passando depois para os europeus que colonizaram o Brasil a partir do século XVI. Também pode ser denominada chá-de-Paraguai, chá dos jesuítas, erva do diabo, yerba-santa e outros nomes (DANIEL, 2009).

2.1. ERVA-MATE NO BRASIL

O Brasil se tornou nos últimos anos o maior produtor de erva-mate do mundo, seguido da Argentina e do Paraguai, com produção no ano de 2019 de 880 mil, 840 mil e 170 mil toneladas, respectivamente (DERAL, 2020).

O país apresentou um aumento de aproximadamente 25% na produção de erva-mate entre os anos de 2015 e 2020, com consequente aumento no valor de produção total, de acordo com os dados apresentados no SIDRA (2021). A produção de erva-mate no país gerou uma renda de aproximadamente 560 milhões de reais em 2020, corresponde a 11,8% do valor da produção total da extração vegetal nacional não madeireiro, que consiste na coleta de produtos em matas e florestas. No Paraná, o valor da produção da erva-mate é expressivo e atingiu 84,7% do valor total da extração vegetal do Estado, em 2020 (SIDRA, 2021).

Em 2020, a produção do Brasil atingiu cerca de 954 mil toneladas de erva-mate, sendo 44,7% produzidos pelo extrativismo vegetal e 55,3% gerado por plantios de erva-mate. A produção da cultura gerou uma renda total de 1,36 bilhões de reais em 2020, tanto para o extrativismo vegetal quanto para lavouras permanentes. Em relação ao extrativismo vegetal, a produção de erva-mate foi 11,8% do valor total arrecadado no Brasil. Por outro lado, para as lavouras permanentes, a erva-mate apresentou baixo destaque, com menos de 1% do valor total da produção (IBGE, 2022).

O preço da erva-mate no mercado internacional apresentou tendência de crescimento nos últimos anos devido ao aumento na procura pelos exportadores e

pela qualidade do produto. No ano de 2019, o Brasil exportou 35.285 toneladas de outros tipos de mate como chimarrão, chá e tererê. O valor de exportação da erva-mate foi de US\$ 79.038 milhões. O país que mais importa do Brasil é o Uruguai, responsável por 80% de todo produto exportado. Os outros países com destaque na importação da erva-mate são Chile, Estados Unidos, Alemanha e Espanha (DERAL, 2020).

2.2. ERVA-MATE NO PARANÁ

Nos municípios produtores de erva-mate no Paraná, a cultura apresenta um grande valor econômico e cultural. O estado apresenta 138 municípios que a produzem, sendo que a região Sul do estado é a principal produtora. Os núcleos que se destacam são União da Vitória, Guarapuava e Irati, e sendo responsáveis por 88% do valor bruto da produção (DERAL, 2020).

Na cidade de Curitiba, capital do Paraná, foi onde se instalaram os primeiros engenhos do estado, sendo que no ano de 1870 os engenhos passaram a ser a vapor, representando uma evolução na indústria paranaense do mate. A riqueza gerada pela erva-mate possibilitou o desenvolvimento do Paraná e de sua infraestrutura de transporte como estradas, hidrovias e ferrovias, como a ferrovia Curitiba-Paranaguá. Uma das maiores indústrias de beneficiamento da erva-mate, a empresa Matte Leão, foi fundada em Curitiba no ano de 1901. A criação da Universidade Federal do Paraná também foi proporcionada pela economia ervateira do estado (WACHOWICZ, 1983).

O Paraná tem grande destaque na produção de erva-mate nacional, classificado em 2020 como estado com maior área plantada destinada à colheita do país. O Paraná apresenta aproximadamente 30 mil hectares de ervais, o que corresponde a 41,4% da plantação de erva-mate do território nacional (IBGE, 2020). Segundo DERAL (2020), a cultura sempre teve um papel muito importante no Paraná e na região Sul do Brasil, devido à geração de emprego e renda ao longo de toda sua cadeia produtiva. Além disso, a erva-mate representa sustentabilidade pela conservação da fisionomia vegetal nativa, uma vez que grande parte da produção é obtida através de ervais nativos ou sombreados. Da produção de erva-mate do ano de 2020 no Paraná, cerca de 62% da produção foi proveniente do extrativismo vegetal de ervais nativos, e 38% de ervais plantados (SIDRA, 2020).

Ainda em 2020, o Paraná se destacou como o maior produtor de erva-mate do Brasil, com produção de aproximadamente 600 mil toneladas, o que corresponde a 63,1% da produção nacional. A produção estadual proveniente de ervais nativos ou adensados da erva-mate correspondeu à 372 mil toneladas, o que representou 87,4% da produção nacional. Por outro lado, a produção de ervais plantados foi de 228 mil toneladas, que no cenário nacional corresponde à 43,4%. O valor da produção no Paraná em 2020 atingiu o valor de R\$ 787 milhões (IBGE, 2022).

Os produtores do estado estão buscando a aplicação de novas tecnologias e procedimentos de manejo, como adubação, podas e renovação dos ervais, os quais agregam valor e mercado. Em 2019, foram exportadas 2.857 toneladas de outros tipos de mate, como chimarrão, chá e tererê, mesma quantidade exportada no ano de 2018. O valor das exportações atingiu US\$ 6,5 milhões. O principal país comprador foi o Uruguai com 51% do produto, seguido do Chile com 22%. Outros países como Estados Unidos, Alemanha e França também possuem papel importante nas exportações. A quantidade de mate cancheado que foi exportada pelo Paraná em 2019 foi de 279 toneladas, totalizando US\$508 mil, com destaque para a Alemanha com 32% das exportações nesta modalidade (DERAL, 2020).

2.3. PRODUÇÃO DE MUDAS EM VIVEIROS

A produção de mudas de erva-mate é uma das etapas mais importantes das atividades relacionadas ao cultivo, uma vez que a qualidade e produtividade dos ervais está diretamente ligada à qualidade das mudas.

Segundo Poletto (2010a), a elevada contaminação por patógenos do sistema radicular em frutos, sementes, mudas e substrato, são as possíveis fontes de inóculo da doença em viveiro. Algumas medidas relacionadas ao manejo integrado de doenças devem ser utilizadas para redução da contaminação, como a adoção de nova técnica de beneficiamento e estratificação das sementes, realização de tratamentos antes da estratificação, utilização de substrato livre de patógenos, realização de análise sanitária das mudas por profissional habilitados antes de serem levadas para o campo, entre outras.

De acordo com o Manual de Produção de Mudas Clonais de Erva-Mate, desenvolvido pela Embrapa Florestas (WENDLING et al., 2020), os viveiros para

produção de erva-mate devem estar cadastrados e registrados nos órgãos competentes, como no Registro Nacional de Sementes e Mudas. Para garantir uma produção de qualidade, os viveiros devem apresentar:

- Sistema de drenagem adequado;
- Sementes ou materiais vegetativos com procedência qualificada;
- Substratos adequados ao método de propagação empregado;
- Aplicação de técnicas e manejo com a finalidade de produzir mudas com qualidade genética e sanitária superiores;
- Realização de práticas de irrigação e adubação;
- Aplicação de boas práticas, de acordo com as recomendações de pesquisas para a produção de mudas de erva-mate.

Nesse cenário, o viveiro em estudo utiliza a técnica de propagação vegetativa por miniestaquia proveniente de mudas de minijardim clonal. A propagação vegetativa permite a manutenção das características da planta matriz, gerando uma maior uniformidade na produção. Para miniestaquia, os materiais são selecionados pela qualidade e características desejáveis, uma vez que as mudas geradas são geneticamente idênticas ao clone. Apesar de normalmente do custo de produção com esta metodologia ser mais alto, as vantagens são que o erval é homogêneo e uniforme, facilitando aspectos relacionados ao manejo como adubação, poda e colheita. Além disso, é possível ter plantas com maior vigor e potencial de produção de massa foliar, gerando maior produtividade e rentabilidade dos plantios de erva-mate (WENDLING et al., 2020).

Segundo Wendling et al. (2020), o local de implantação do viveiro também é um fator essencial devido as variáveis climáticas como incidência de radiação, umidade e vento, além de características do terreno como as condições de drenagem, que refletem nos aspectos fitossanitários.

Os recipientes utilizados para produção de mudas e o substrato utilizado também são fatores importantes. Wendling et al. (2020) recomendam o uso de tubetes plásticos pelas suas vantagens como: melhor uso da área do viveiro, facilidade operacional e de manejo, reutilização das embalagens, melhor ergonomia e melhor desenvolvimento radicular das mudas. Em relação ao substrato, este deve ser isento de semente de plantas espontâneas, pragas e fungos patogênicos, para evitar a

incidência de doenças e a competição por água e nutrientes. Não é recomendado o uso de terra com materiais orgânicos como substrato devido a questões ambientais e maior ocorrência de doenças (WENDLING et al, 2020).

2.3.1. Clones de erva-mate

As mudas clonais vêm aumentando sua participação nos plantios de ervais por possuírem vantagens como: maior uniformidade, maior produtividade e características específicas, como o sabor da erva. Dentre os principais clones produzidos no estado do Paraná, tem-se o Aupaba, Yari, 408 e 409, que são abordados na sequência.

O clone BRS BLD Aupaba, produzido pela Embrapa Florestas e Baldo S/A Comércio, Indústria e Exportações, foi selecionado de erval nativo do município de São Mateus do Sul-PR. A produtividade esperada em 18 meses para cultivo sombreado entre 30% e 50%, e em pleno sol é de 15.000 kg ha⁻¹ e 25.000 kg ha⁻¹, respectivamente. Para essa produtividade é considerado um plantio de elevada adoção tecnológica (WENDLING et al., 2017a).

O clone BRS BLD Yari, produzido pela Embrapa Florestas e Baldo S/A Comércio, Indústria e Exportações, apresenta uma produtividade esperada de 24.000 kg ha⁻¹ de massa verde a cada 18 meses, em manejo adequado, sob pleno sol ou com sombreamento de até 30% (WENDLING et al., 2017a).

O clone BRS 408 foi obtido de um indivíduo procedente de Cascavel-PR e propagado por miniestaquia. A produtividade esperada para este clone é de 18.000 kg ha⁻¹ de massa verde, a cada 18 meses, em plantio com manejo adequado sob pleno sol ou sombreamento de 30% (WENDLING et al., 2017b).

O clone BRS 409 teve procedência de um indivíduo de Bocaiuva do Sul-PR, em que com as técnicas apropriadas de manejo espera-se atingir uma produtividade de 24.000 kg ha⁻¹ em um período de 18 meses sob pleno sol ou sombreamento de 30% (WENDLING et al., 2017b).

2.4. DOENÇAS NA ERVA-MATE

A erva-mate tem como ambiente de ocorrência natural a Mata Atlântica, que possui grande biodiversidade, e que contribui para as diferenças morfológicas observadas nas plantas. São exemplos a altura, tamanho da árvore, formato das folhas, e também a suscetibilidade à doenças e pragas, que dependem do ambiente que estão inseridas. Fatores climáticos e variações genéticas das populações influenciam diretamente nas características das plantas (COELHO *et al.*, 2002).

O que também interfere nos problemas encontrados na produção de erva-mate é o sistema de cultivo. De acordo com Borges *et al.* (2011), ervais nativos apresentam menor ocorrência de pragas quando comparados com ervais adensados. Cabe salientar que a rentabilidade do erval adensado é superior ao nativo, mas apresenta maiores problemas com pragas. Por isso, devem ser controlados com estratégias integradas de manejo, de modo a atender os requisitos de produção, rentabilidade econômica e manutenção do equilíbrio ecológico do ecossistema.

O grande número dos insetos encontrados na cultura de erva-mate não causa danos econômicos significativos devido ao baixo nível populacional, sendo necessário apenas um monitoramento frequente para manter o equilíbrio. Com relação a sanidade na erva-mate, as doenças de maior ocorrência na produção são relacionadas aos fungos (DANIEL, 2009).

Os maiores problemas com doenças fúngicas na erva-mate normalmente ocorrem em viveiros de produção de mudas clonais, pois estes combinam as condições favoráveis para a disseminação dos problemas, como alta temperatura e umidade. As doenças principais encontradas em erva-mate são a podridão de estacas e miniestacas, podridão de raízes, pinta preta e antracnose (WENDLING *et al.*, 2020).

2.4.1. Podridão de estacas e miniestacas

A podridão de estacas e miniestacas é causada por fungos dos gêneros *Colletotrichum*, *Cylindrocladium*, *Fusarium* e *Rhizoctonia*, sendo o principal sintoma uma lesão escura que evolui da base para o ápice da estaca (AUER & SANTOS, 2016). A doença pode ocorrer próximo ao substrato ou em regiões superiores da

estaca. A lesão ataca os tecidos da planta e impede o enraizamento levando a morte das gemas devido à queda das folhas (AUER & SANTOS, 2016).

Os fatores que propiciam a doença são: a presença de contaminação no substrato, tubetes, bandejas, material genético ou minijardim e excesso de umidade. Para controle do patógeno é necessária a melhoria do manejo e da estrutura do viveiro. Dentre os principais itens, destacam-se: um adequado sistema de drenagem em relação ao substrato, limpeza e desinfestação de materiais utilizados no processo produtivo, limpeza da casa de vegetação, utilização de substrato estéril, coleta de cepas com qualidade e remoção de mudas e folhas mortas e caída (WENDLING et al., 2020).

2.4.2. Podridão de raízes

O principal fungo associado à doença podridão de raízes é pertencente ao gênero *Fusarium*. A doença foi constatada inicialmente no estado do Paraná na década de 1990, causada por *Fusarium* sp. (AUER & SANTOS, 2016). No Rio Grande do Sul, a doença foi identificada em 2006 por Poletto et al. (2006), causada por diferentes espécies do gênero *Fusarium*, além de *Pythium* sp. e *Rhizoctonia* sp. No entanto, os autores indicaram que os sintomas foram observados na região desde 1996.

Segundo Paula et al. (2018), *Fusarium* é o patógeno mais abundante em viveiros e ervais e se destaca em relação aos demais fungos. Os principais sintomas da podridão de raízes ocorrem no sistema radicular, com lesões necróticas que provocam o escurecimento e podridão da parte aérea (AUER & SANTOS, 2016)).

Nos viveiros de erva-mate observados por Poletto (2010b) foi constatada alta porcentagem de sementes infectadas por *Fusarium* e *Rhizoctonia*, indicando que a infecção se inicia na fase de flores e frutos. Além disso, a técnica de beneficiamento e estratificação de sementes, que é utilizada por viveiristas contribui para o aumento da incidência de patógenos. Além das sementes, o autor também observou que plântulas e mudas no final do ciclo de viveiro podem apresentar incidência por patógenos nas raízes, mesmo sem apresentar sintomas de podridão de raízes.

Poletto et al. (2015) estudaram a podridão de raízes em erva-mate em viveiro e em ervais no Rio Grande do Sul, pela análise de flores, frutos, sementes, plântulas, mudas e substrato. Os autores identificaram os gêneros *Fusarium*, *Rhizoctonia* e *Pythium*, sendo que *Fusarium* spp. e *Rhizoctonia* sp. foram os principais patógenos incidentes nas sementes de erva-mate. Em relação às sementes, foi identificado que o método de estratificação utilizado pelos viveiristas gerou um aumento significativo da contaminação por patógenos, com incidência de 100% das sementes no momento da semeadura. Os autores constataram que 80% das flores estavam contaminadas. A presença de *Fusarium* nas flores e substrato pode indicar que estes são portas de entrada para o patógeno.

Oliveira et al. (2015) realizaram análises de sementes e frutos de erva-mate coletados em municípios do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Foram identificados seis fungos, sendo *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., *Phomopsis* sp. e *Trichoderma* sp. O principal fungo foi o *Penicillium* sp. e o *Fusarium* sp. foi detectado tanto em frutos como em sementes, de um dos lotes avaliados.

Pimentel et al. (2006) realizaram a identificação dos fungos presentes em folhas de erva-mate no município de Colombo-PR, com a comparação de ervais nativos e plantados. Os autores identificaram que a maior diversidade de fungos ocorreu em folhas de ervais adultos em florestas nativas. Mesmo apresentando maior diversidade de patógenos, os ervais nativos apresentaram maior potencial para biocontrole quando comparado com ervais plantados.

Segundo Poletto (2010b), a não uniformidade do substrato observado em viveiros em relação aos elementos químicos, como altos teores de nutrientes, pode contribuir para a predisposição das mudas às doenças. Além disso, a matéria orgânica é a que mais influencia na população de *Fusarium* no solo, além dos teores de cálcio e fósforo no solo.

Paula et al. (2017) avaliaram os fungos presentes em amostras de solo de ervais localizados no Rio Grande do Sul. O principal gênero identificado foi *Fusarium* sp., além de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Verticillium* sp., *Botrytis* sp., *Phomopsis* sp. e *Rhizopus* sp. Alguns fungos identificados não causam prejuízos para a cultura, como o gênero *Trichoderma* sp. com alto percentual nas amostras, que apresentam potencial de biocontrole das espécies do gênero *Fusarium*, que são prejudiciais a cultura da erva-mate.

Borges et al. (2011) também detectaram que gêneros de fungos identificados podem ser utilizados para o controle de pragas e doenças da erva-mate. Os autores avaliaram amostras de solo de um erval de Santa Catarina coletados nas quatro estações do ano, e identificaram *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Acremonium* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp., *Metarhizium* sp., *Gliocladium* sp. e *Lecanicillium* sp. O fungo *Fusarium* sp. foi identificado somente nas estações de verão e inverno, e *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. foram encontrados em todas as estações avaliadas.

Plantas de erva-mate que são submetidas aos menores níveis de sombreamento ou a pleno sol apresentaram um desenvolvimento prejudicado e ficaram mais suscetíveis à doença podridão de raízes (POLETTTO, 2008). Poletto et al. (2010c) avaliaram o cultivo de erva-mate a pleno sol e com sombreamento de 26%, 41%, 84% e 95% em mudas inoculadas com isolados de *F. oxysporum* e *F. solani*. Os autores concluíram que o maior crescimento, desenvolvimento e resistência da erva-mate ocorreram com os maiores níveis de sombreamento.

Mezzomo et al. (2018a) avaliaram o crescimento e esporulação de *Fusarium* spp. em diferentes meios e níveis de luminosidade. Independente do meio de cultura, a maior concentração de esporos de *Fusarium* ocorreu sob luz contínua, indicando que culturas a pleno sol podem estar mais suscetíveis a doença. Poletto (2008) testou bioprotetores comerciais nos testes realizados no controle da podridão-de-raízes na erva-mate, porém não foram eficientes para as condições do experimento.

Piassetta et al. (2021) realizaram uma revisão bibliográfica sobre o tema de doenças fúngicas na erva-mate, com a apresentação dos principais estudos relacionados aos fungos do gênero *Fusarium* (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Principais estudos sobre *Fusarium* sp. no Brasil

Autor	Estado	Tipo de amostra	Patógeno
Poletto et al. (2006)	RS	Solo, raiz e planta	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. decemcellulare</i> , <i>F. tabacinum</i> . e <i>F. tricinctum</i> .
Poletto et al. (2010b)	RS	Solo e mudas	<i>F. oxysporum</i> e <i>F. solani</i>
Poletto et al. (2012)	RS	Raízes e planta	<i>F. oxysporum</i> e <i>F. solani</i>
Mezzomo et al. (2018a)	RS	Raízes e mudas	<i>F. oxysporum</i> e <i>F. solani</i>
Mezzomo et al. (2018b)	RS	Isolados	<i>F. oxysporum</i> e <i>F. solani</i>
Vargas (2020)	PR	Raízes e sementes	<i>F. solani</i> , <i>F. decemcellulare</i> , <i>F. sterilihyphosum</i> , <i>F. graminearum</i> ,

Vargas (2020) avaliou diferentes espécies de isolados de *Fusarium* para realização de teste de patogenicidade na erva-mate. As espécies de *Fusarium* avaliadas foram: *F. sterilihyphosum*, *F. decemcellulare*, *F. tucumaniae*, *F. cortaderiae*, *F. graminearum*, *F. striatum*, *F. ambrosium*, *F. virguliniforme*, *F. brasiliense*, *F. cuneirostrum*, *F. phaseoli*, *F. falciforme*, *Nectria plagianthi*, *F. asiaticum*, *F. boothii*, *F. austroamericanum*, *F. meridionale*, *F. acaciae-mearnsii*, *F. brasiliicum*, *F. mesoamericanum*, *F. staphyleae*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. anthophilum*, *F. chlamydosporum*, *F. globosum*, *Giberella fujikuroi*, *F. fujikuroi*, *F. subglutinans*, *F. circinatum*, *F. nygamai*, *F. guttiforme*, *F. bulbicoa*, *F. udum*, *F. acutatum*, *F. pseudocircinatum*, *F. nisikadoi*, *F. thapsinum* e *F. sacchari*. Os resultados demonstraram que *F. decemcelullare* e *F. solani* foram associadas com a patogenicidade em raízes, enquanto *F. sterilihyphosum* e *F. graminearum* foram os causadores da fusariose de sementes em erva-mate. A autora também identificou pela primeira vez o fungo *F. sterilihyphosum* como agente causal de doenças relacionadas ao *Fusarium*.

2.4.3. Antracnose

A antracnose é uma doença causada pelo fungo *Colletotrichum* sp. e ocorre principalmente nas partes tenras das plantas, como brotações e ramos jovens. Nas sementeiras, a doença pode queimar o ápice das plantas impedindo seu crescimento. Os principais sintomas são manchas escuras e irregulares que ocorrem normalmente

nas bordas e deformam as folhas jovens. Plantas em ambientes com muita umidade podem apresentar sinais do patógeno na forma de massa de conídios de coloração amarelo-alaranjada (AUER & SANTOS, 2016). O que favorece o aparecimento da doença são o excesso de umidade e sombreamento, e estresses físicos, como geadas, que aumentam a possibilidade de infecção pelo fungo (WENDLING et al., 2020).

O controle da antracnose pode ser realizado pela desinfestação do substrato e dos recipientes antes da semeadura, adubação nitrogenada e seleção de plântulas saudáveis (AUER & SANTOS, 2016).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDO

Os estudos das patologias em mudas de erva-mate foram realizados no Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, Colombo-PR. As amostras sintomáticas de erva-mate foram coletadas no viveiro comercial da empresa *Golden Tree*, no município de Guarapuava-PR. O viveiro *Golden Tree* produz mudas de diferentes espécies florestais, e entre elas a erva-mate, com diferentes clones. A produção de mudas de erva-mate ocorre por miniestaquia.

O município de Guarapuava está a uma altitude de 1098 m, na região Centro-Sul do estado do Paraná (IPARDES, 2018). Segundo a classificação climática de Köppen, seu clima predominante é o Cfb (clima temperado), com temperatura média no mês mais frio abaixo de 18 °C, com verões frescos e sem estação seca definida (IAPAR, 2021).

O processo de miniestaquia é feito conforme Wendling et al. (2020) e consiste em obter mudas por estaquia a partir de uma planta matriz, a qual tem as características desejadas, localizada em um minijardim clonal para produção de brotos. A partir dos brotos da matriz, são coletadas brotações denominadas miniestacas para a formação de novas mudas. As brotações são plantadas em tubetes com substrato apropriado e mantidas na casa de vegetação para o seu enraizamento. Após o enraizamento, as mudas são levadas para casa de vegetação com umidade e temperatura controladas, protegidas das intempéries para a sua aclimação e crescimento. Depois de aclimatadas é feita a seleção das mudas, sendo que as mortas ou com algum problema fitossanitário são descartadas. As mudas que apresentam as características desejadas, como um bom enraizamento, boa formação da parte aérea e livre de patógenos são levadas a rustificação em sol pleno, para então estarem aptas para plantio definitivo em campo.

Dentre os clones de erva-mate produzidos pelo viveiro, os clones avaliados neste estudo foram BRS BLD Aupaba, BRS BLD Yari, BRS 408 e BRS 409, produzidos pela Embrapa Florestas e parceiros. A descrição dos clones é apresentada no item 2.3.1.

A Figura 3.1 apresenta o minijardim clonal de erva-mate, de onde foram retiradas as estacas (Figura 3.1a) para a produção de mudas. Pode-se observar algumas mudas de erva-mate na casa de vegetação (Figura 3.1b) com folhas apresentando sintomas de necrose e morte.



Figura 3.1 – Vista geral do jardim clonal e identificação de mudas com sintomas de necrose e morte de folhas e de estacas

Legenda: (a) Minijardim clonal; (b) Casa de vegetação com mudas clonais doentes.

Fonte: O autor (2022).

O presente estudo se deu pelo fato de o viveiro estar encontrando dificuldades em seu sistema produtivo, com alta mortalidade das miniestacas de erva-mate. Durante a visita foi possível identificar alguns problemas no processo produtivo que podem contribuir para o aparecimento de doenças nas mudas de erva-mate, como:

- Tubetes muito próximos entre si, o que gera baixa ventilação e sombreamento das mudas;
- Bandejas muito próximas ao solo, que pode ocorrer contaminação por respingos nas mudas durante a irrigação;
- Excesso de folhas mortas, que podem ser possível fonte de inóculo de patógenos e de doenças.

3.2. COLETA DE AMOSTRAS DE MATERIAL DOENTE

As coletas foram realizadas em duas épocas do ano, a primeira foi em 19 de outubro de 2020 e a segunda em 26 de abril de 2021. O objetivo da realização de duas coletas foi avaliar as doenças e sua incidência em duas épocas diferentes do ano, sendo primavera e outono.

No viveiro foram coletadas folhas e estacas com sintomas caracterizados por podridão basal, podridão mediana das miniestacas ou que apresentavam folhas com manchas. Tentou-se verificar a presença de reboleiras de miniestacas com podridão estacas mortas, folhas com manchas e folhas caídas. A ocorrência destes sintomas estava presente por toda a casa de vegetação e, em uma observação preliminar, os sintomas apresentavam as características de doenças como antracnose e fusariose. A coleta das amostras foi realizada ao acaso, percorrendo-se toda a estrutura da casa de vegetação.

Para a avaliação nas duas coletas foram retiradas amostras de 4 diferentes clones de erva-mate, sendo: Aupaba, Yari, 408 e 409. Em cada coleta, ocorreu a retirada de aproximadamente 50 folhas e 50 estacas de mudas de erva-mate com sintomas, para cada clone. O material coletado foi separado por clone, colocado em sacos plásticos e acondicionados em caixa de isopor para preservação do material até sua análise laboratorial. As análises foram realizadas na Embrapa Florestas, no dia seguinte ao de sua coleta.

3.3. ISOLAMENTO DOS FUNGOS

Para a realização do estudo foram adotados dois procedimentos de isolamento dos fungos: isolamento direto (material em câmara úmida) e isolamento indireto. Estes procedimentos foram baseados na metodologia proposta por Alfenas et al. (2016b). Antes de realizar as análises de isolamento direto e indireto, todos os materiais coletados foram desinfestados com a imersão em álcool 70% por 30 s e posteriormente em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 1 min. Na sequência, foi realizada a lavagem com água ultrapurificada estéril.

3.3.1. Isolamento direto

Para a metodologia da câmara úmida, o material coletado foi disposto em caixas de gerbox com o objetivo de formação das estruturas reprodutivas e posterior identificação. As amostras de estacas e folhas foram isoladas separadamente. As caixas foram desinfestadas com o uso de solução de hipoclorito de sódio a 1%. Foi utilizado papel mata-borrão esterilizado em autoclave a 120 °C e 1 atm por 20 min, e posteriormente umedecido com água ultrapurificada estéril. Em cada caixa foram colocadas de 3 a 5 folhas ou estacas desinfestadas sobre o papel umedecido. As folhas e estacas foram dispostas de maneira que nenhuma delas ficasse sobreposta às outras. As caixas foram fechadas e envoltas com filme de PVC e acondicionadas em estantes com iluminação contínua com lâmpadas de LED à temperatura ambiente. O período de incubação foi de 7 a 14 dias, de modo a possibilitar a formação de estruturas reprodutivas e posterior identificação dos fungos.

3.3.2. Isolamento indireto

O isolamento indireto foi realizado com pedaços circulares de folhas com 5 mm de diâmetro produzidos com a utilização de um furador de rolha e seções das estacas cortadas com bisturi. O furador e o bisturi foram esterilizados por flambagem, após a cada uso. As amostras utilizadas apresentavam tanto uma parte sadia, como a parte doente, e foram desinfestadas conforme abordado anteriormente. Para cada clone, as amostras foram dispostas em dez placas de Petri com meio de cultura, com cinco pedaços em cada (Figura 3.2).

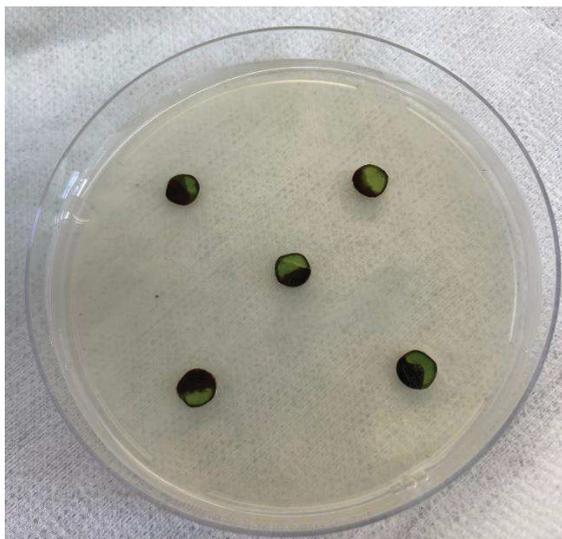


Figura 3.2 – Placa de Petri com amostras circulares de folha de erva-mate para isolamento indireto

O meio utilizado nas placas de Petri plásticas foi o meio batata-dextrose-ágar (BDA), preparado com 42 g de extrato comercial e 1.000 mL de água ultrapurificada, e adição de antibiótico. O meio de cultura BDA foi esterilizado em autoclave por 20 min, depois foi suplementado com antibióticos (ampicilina 80 ppm e cloranfenicol 40 ppm) e vertido nas placas de Petri. A colocação das amostras de folhas e estacas nas placas foi realizada em uma câmara de fluxo laminar para redução de contaminação. Posteriormente, as placas foram identificadas, vedadas e acondicionadas na câmara de crescimento do tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), à temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h luz/escuro, por 7 dias. Após o crescimento das colônias dos fungos, estes foram repicados para obtenção de culturas puras.

3.4. IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

A identificação preliminar dos fungos foi realizada após a purificação das culturas obtidas no primeiro isolamento indireto. Para tal, retirou-se um pedaço do micélio, juntamente com o meio de cultura das placas, colocou-se em lâminas para microscopia e preparadas as lâminas semipermanentes.

O procedimento de ensaio foi baseado na técnica apresentada por Alfenas et al. (2016a), que consiste em utilizar uma lâmina de vidro para a colocação das estruturas fúngicas, sua coloração com uma solução de lactoglicerol mais azul de metileno e recobrimento com uma lamínula de microscopia. Para auxiliar a identificação dos fungos foram utilizadas as descrições de fungos de Barnett e Hunter

(1972), com a observação das lâminas através de microscópio ótico em aumentos de 100x e 400x.

Após a identificação dos fungos, optou-se por trabalhar somente com fungos dos gêneros *Fusarium* e *Colletotrichum*, devido à maior frequência de isolados e por se tratar de fungos que são frequentes agentes causais de doenças e danos na cultura da erva-mate.

Deste modo, foram selecionados oito isolados identificados preliminarmente como *Fusarium* sp. e quatro isolados de *Colletotrichum* sp. para serem identificados por sequenciamento genético. A escolha desses isolados se deu a partir da variação dos tipos de esporos e da coloração dos diferentes morfotipos, de modo a avaliar também se a variação cromática poderia indicar espécies diferentes.

Posteriormente, foi realizado o cultivo monospórico para obtenção de cultura pura, de somente um único isolado por espécie. O procedimento consistiu em retirar massas de esporos de culturas puras do fungo em questão, diluir em gota de água estéril e distribuir os esporos diluídos, na superfície da placa de Petri com meio de cultura BDA, utilizando uma alça de Drigalsky. Após a germinação, com o uso de um microscópio ótico em aumentos de 100x, o esporo foi localizado e a superfície do meio sob o esporo foi cortada com auxílio de uma agulha esterilizada. O conjunto composto por meio de cultura e esporo germinado foi transferido para uma nova placa com meio de cultura BDA, obtendo-se uma cultura monospórica.

Para a identificação molecular, os isolados foram repicados em meio BDA. Após 14 dias, 11 amostras foram submetidas à extração e sequenciamento de DNA. Tais procedimentos foram executados pela empresa de biotecnologia especializada em sequenciamento GoGenetic, incubada na Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), utilizando os seguintes protocolos:

A extração do DNA dos isolados foi feita com as culturas dos isolados dos gêneros *Fusarium* e *Colletotrichum* identificados como: FUS01, FUS02, FUS03, FUS04, FUS05, FUS06, FUS07, FUS08, COL02, COL03 e COL04, crescidas em placas de Petri contendo meio BDA por um período de 14 dias. Aproximadamente 15 mg de micélio foram utilizados para extração de DNA com o kit *Wizard Magnetic DNA Purification System* (Promega, Madison, EUA), conforme recomendações do

fabricante. O DNA foi quantificado e avaliado quanto à pureza em *Nanodrop2000* (*ThermoFisher Scientific, Waltham, MA*).

A amplificação das amostras de DNA genômico foi realizada em termociclador Veriti (*ThermoFisher Scientific, Waltham, MA*), em reação contendo 20 ng de DNA genômico purificado. Para a amplificação da região ITS utilizou-se os *primers* ITS1(5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG '3) e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC '3), foram utilizados 32 ciclos de desnaturação (96 °C por 30 s), anelamento do *primers* (58 °C por 45 s) e extensão do produto (72 °C por 45 s).

Os produtos do DNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (tampão TAE). As reações foram purificadas com Exol/SAP (*Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA*), conforme recomendação do fabricante.

As amostras foram sequenciadas em *Genetic Analyser 3500xL* (*Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA*), utilizando capilares de 50 cm com polímero Pop7 (*Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA*), conforme orientações do fabricante. Os eletroforetogramas gerados foram convertidos em sequência de bases com o programa *Sequencing Analysis v5.4* (*Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA*).

As sequências obtidas foram comparadas com acessos depositados no GenBank utilizando-se o "*Nucleotide BLAST*" no servidor do NCBI para identificação.

3.5. TESTE DE PATOGENICIDADE

Para avaliar a patogenicidade, foram utilizados os isolados dos fungos que apresentaram maior incidência dentre os fungos encontrados. Além disso, os gêneros selecionados são os responsáveis pelas principais doenças da cultura da erva-mate. Para os testes foram utilizados os isolados identificados através do sequenciamento genético: *Fusarium oxysporum* (Schlecht.), *F. pseudocircinatum* (O'Donnell & Nirenberg), *F. fujikuroi*, (Nirenberg), *Colletotrichum* sp., *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. e *C. kahawae*. (J.M. Waller & Bridge).

O teste consistiu-se na inoculação de discos de micélio-ágar dos seis isolados identificados, em folhas saudáveis de erva-mate. Para realização do experimento foram utilizadas folhas do clone Aupaba, proveniente do minijardim clonal da Embrapa Florestas, localizado em Colombo-PR. Este clone foi selecionado por apresentar

maior quantidade disponível de folhas, no momento do estudo. Para seleção das folhas, buscou-se coletar brotações apicais novas e sadias livres de qualquer sintoma e sinais de patógenos, e folhas de tamanhos próximos. As folhas foram cortadas da planta matriz com uma tesoura esterilizada e posteriormente desinfestadas superficialmente com imersão em álcool 70%, solução de hipoclorito a 1% e seguido de lavagem com água ultrapurificada para retirada do excesso.

Para cada fungo avaliado, foram utilizadas três folhas por caixa Gerbox com papel mata borrão esterilizado e umedecido com água ultrapurificada, com duas repetições para cada um dos três tratamentos, totalizando 18 folhas por isolado e 108 folhas no total. Os tratamentos adotados foram: folhas sadias; folhas com ferimentos induzidos; e testemunha.

Os ferimentos foram realizados no centro das folhas com o auxílio de agulhas, formando quatro furos (Figura 3.3). Todos os pecíolos das folhas foram envoltos com algodão esterilizado e embebido em água ultrapurificada para fornecer água para a folha durante o período do ensaio.

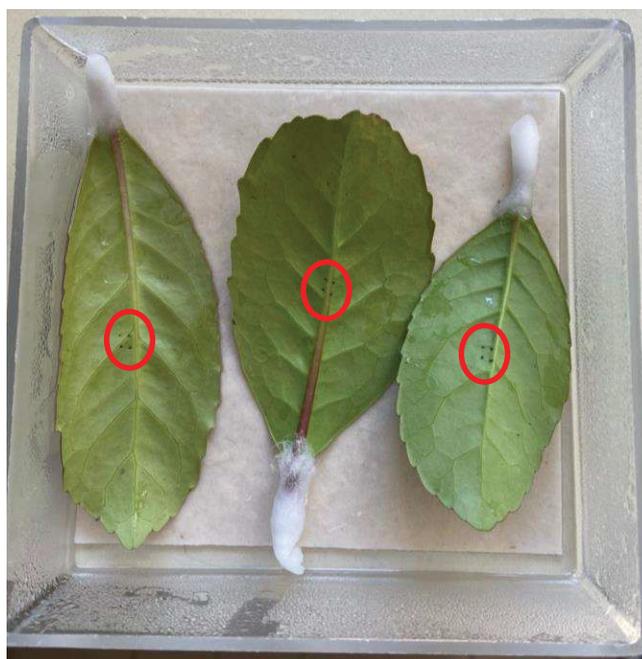


Figura 3.3 – Detalhe de folhas de erva-mate com ferimentos induzidos para o teste de patogenicidade

Para a inoculação dos isolados nas folhas, foram retirados pequenos discos de micélio-ágar com 5 mm de diâmetro, com o auxílio de um furador de esterilizado, e colocados sobre o centro das folhas (Figura 3.4b). Para a testemunha, foram utilizados

discos de meio BDA sem micélio com 5 mm de diâmetro sobre as folhas (Figura 3.4a). Os discos foram colocados sempre na face inferior da folha (Figura 3.4).

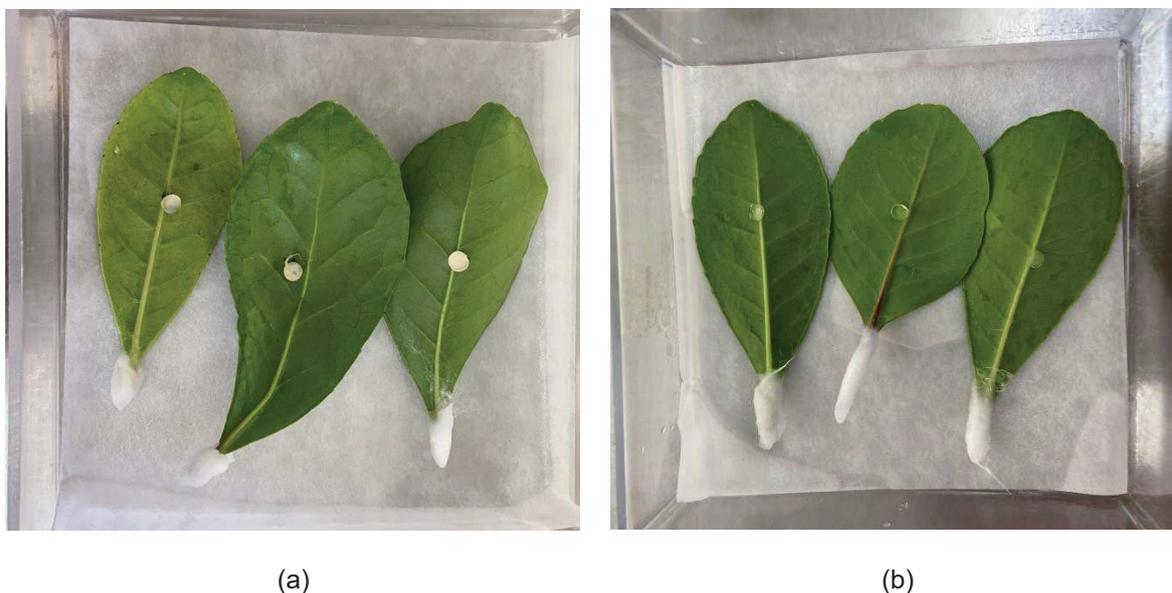


Figura 3.4 – Detalhe da testemunha do teste de patogenicidade com folhas de erva-mate saudáveis.

Legenda: (a) Discos de meio BDA com fungo; (B) Disco de meio BDA sem fungo.

As caixas gerbox foram colocadas em uma sala com temperatura controlada de 25 ± 2 °C, com luz de LED contínua por 14 dias. A verificação da presença de sintomas ocorreu no sétimo e décimo quarto dia após a inoculação.

A avaliação do teste de patogenicidade consistiu na atribuição de notas para diferentes níveis de severidade da lesão nas folhas inoculadas, baseado no trabalho de Vargas (2020), sendo:

- 0 - Ausência de sintomas nas folhas;
- 1 - Presença de lesões necróticas nas folhas ou manchas com comprometimento de até 25 % do limbo foliar;
- 2 - Presença de lesões necróticas ou manchas entre 25 e 50% da superfície;
- 3 - Presença de lesões necróticas ou manchas entre 50 e 75% da superfície e,
- 4 - Presença de lesões necróticas ou manchas acima de 75% da superfície. A severidade foi estimada visualmente com a divisão da folha em quadrantes e avaliação da área afetada pelo fungo.

Para análise dos dados foi definida a média entre a nota da severidade e o número de folhas avaliadas.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados obtidos foram analisados estatisticamente a partir da análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade através do *software* Assistat 7.7.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ISOLAMENTO DE FUNGOS

Para o isolamento direto, os gêneros dos fungos foram identificados e classificados como presentes ou ausentes nas amostras de maneira qualitativa. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.1, em relação ao clone, tipo de amostra: folha ou estaca, coleta 1 e coleta 2. A coleta 1 ocorreu em outubro de 2020 e a coleta 2 foi realizada em abril de 2021, nas estações de primavera e outono, respectivamente.

Tabela 4.1 – Fungos encontrados em folhas e estacas de mudas de 4 clones em duas épocas do ano em isolamento direto. Guarapuava/PR. 2020/2021.

Fungo	Aupaba				Yari				408				409				
	C1		C2		C1		C2		C1		C2		C1		C2		
	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	
<i>Fusarium</i> sp.	-	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	x	x	x	x	x	-
<i>Colletotrichum</i> sp.	x	x	x	-	x	x	x	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Gliocladium</i> sp.	x	-	x	-	x	x	x	-	-	-	-	x	-	x	-	x	-
<i>Trichoderma</i> sp.	x	-	x	x	x	x	-	-	x	x	-	-	-	x	x	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	x	-	-	-	x	-	x	-	-	x	x	x	-	-	x	-	-
<i>Rhizopus</i> sp.	x	x	x	-	x	x	-	x	x	-	x	x	x	x	x	-	x
<i>Aspergillus</i> sp.	x	-	x	x	x	x	x	-	-	x	x	x	-	x	x	-	-

Legenda: "C1": coleta 1; "C2": coleta 2; "F": folha; "E": estaca; "X": presente; "-": ausente.

Nos ensaios em câmara úmida foram identificados os fungos dos gêneros *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Rhizopus*. e *Aspergillus*. Isolados dos fungos *Fusarium* spp. e *Colletotrichum* spp. foram identificados em praticamente todas as amostras de folhas e estacas, de ambas as coletas e em todos os clones.

Para os ensaios de isolamento indireto realizados nas folhas de erva-mate, em ambas as coletas foram identificados sete gêneros de fungos, sendo: *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Rhizopus* e *Aspergillus*. Também ocorreram fungos em que não foi possível realizar a identificação com auxílio do microscópio, por falta de esporulação, e estes foram relacionados como "Não identificados".

A Tabela 4.2 apresenta a frequência dos fungos identificados para cada clone para as duas coletas realizadas. Para cada clone, foram utilizadas 50 folhas, divididas em 10 placas. Desse modo, algumas amostras apresentaram mais de um fungo no isolamento.

Tabela 4.2 – Fungos encontrados a partir do isolamento indireto de folhas de mudas de 4 clones em duas épocas do ano. Guarapuava/PR. 2020/2021.

Fungo	Aupaba		Yari		408		409	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
<i>Fusarium</i> sp.	15	24	17	18	12	22	12	18
<i>Colletotrichum</i> sp.	14	13	16	21	15	20	15	18
<i>Gliocladium</i> sp.	6	6	2	2	5	4	5	4
<i>Trichoderma</i> sp.	10	4	9	5	4	10	4	3
<i>Cladosporium</i> sp.	7	6	3	3	5	5	5	5
<i>Rhizopus</i> sp.	4	1	3	3	2	2	2	2
<i>Aspergillus</i> sp.	6	2	8	3	12	7	12	5
Não identificado	7	6	4	4	6	5	6	3
Total	62	56	58	55	55	70	55	55

Legenda: C1: coleta 1; C2: coleta 2. Valores indicam a quantidade de folhas com a presença do fungo em 50 amostras.

A análise estatística entre os resultados foi realizada com a comparação entre a média da quantidade de cada fungo nas diferentes coletas encontrados em todos os clones, e pode ser observada na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Comparação de médias entre os fungos identificados nas folhas de clones de erva-mate em duas épocas de coleta

Fungo	Coleta 1	Coleta 2
<i>Fusarium</i> sp.	14,75 aB	20,50 aA
<i>Colletotrichum</i> sp.	15,75 aA	18,00 aA
<i>Gliocladium</i> sp.	5,00 bcA	4,00 bA
<i>Trichoderma</i> sp.	8,75 bA	5,50 bB
<i>Cladosporium</i> sp.	5,25 bcA	4,75 bA
<i>Rhizopus</i> sp.	3,25 cA	2,00 bA
<i>Aspergillus</i> sp.	9,25 bA	4,25 bB
Não identificado	5,50 bcA	4,50 bA

Legenda: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não se diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A Figura 4.1 apresenta as médias obtidas para as folhas dos quatro clones nas duas coletas.

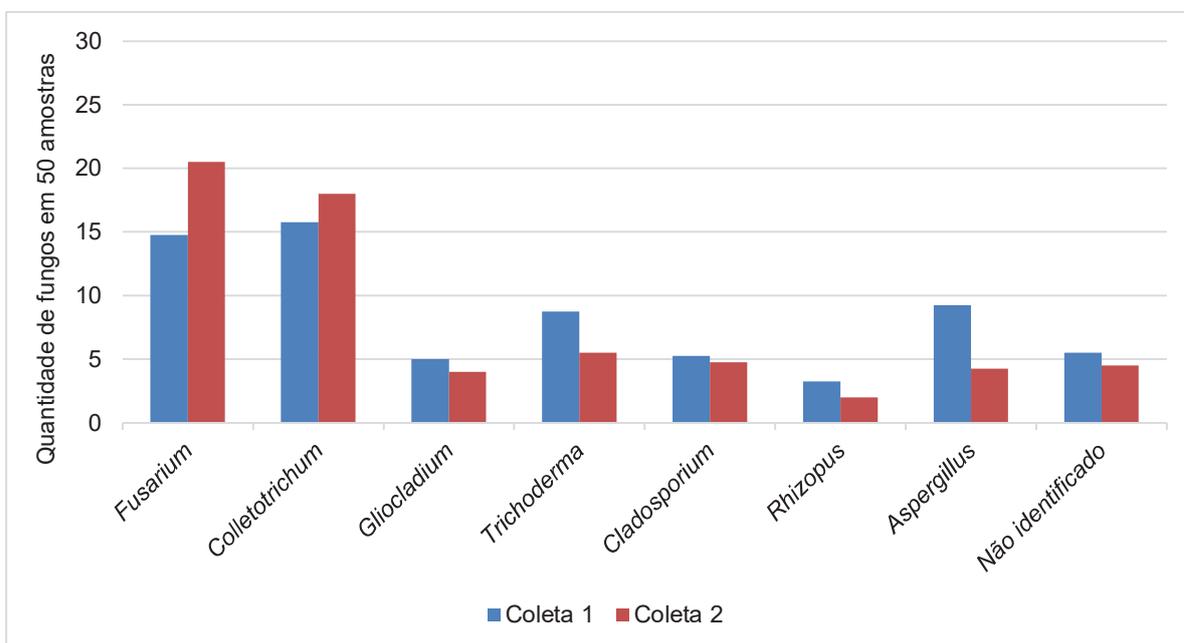


Figura 4.1 – Comparação de média da incidência de fungos em folhas de duas coletas

É possível perceber que a incidência maior foi dos fungos dos gêneros *Fusarium* e *Colletotrichum*, quando comparados com os demais. Além disso, todos apresentaram variações entre as épocas de coleta.

Os gêneros *Fusarium* e *Colletotrichum* foram os fungos, em ambas as coletas, que se diferenciaram estatisticamente dos demais, sendo os mais abundantes nos isolados retirados das folhas de erva-mate. Em relação a estes dois fungos, somente para o *Fusarium* houve uma diferença estatística significativa entre as coletas (Tabela 4.3), o que pode indicar alguma correlação do fungo com a época do ano.

O *Fusarium* e *Colletotrichum* são fungos expressivos na cultura da erva-mate, e já foram identificados em diversos estudos. Dentre os demais fungos, *Trichoderma* sp. e o *Aspergillus* sp. o também apresentaram diferença significativas entre épocas de coleta.

Nos ensaios realizados com as estacas de erva-mate coletadas na primavera (C1) e no outono (C2) foram identificados cinco fungos, sendo: *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Gliocladium* sp., *Trichoderma* sp. e *Aspergillus* sp. Os cinco gêneros também foram detectados nas amostras de folhas coletadas de mudas dos mesmos clones e no mesmo período.

A Tabela 4.4 apresenta a quantidade de fungos identificados em estacas de mudas de erva-mate. Para cada clone foram avaliadas 50 estacas em cada coleta.

Tabela 4.4 – Fungos encontrados no isolamento indireto de estacas de quatro clones em duas épocas do ano. Guarapuava/PR. 2020/2021.

Fungo	Aupaba		Yari		408		409	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
<i>Fusarium</i> sp.	25	34	21	37	21	14	14	26
<i>Colletotrichum</i> sp.	23	18	17	8	25	17	20	13
<i>Gliocladium</i> sp.	4	0	3	1	8	7	3	3
<i>Trichoderma</i> sp.	9	9	10	12	6	5	8	10
<i>Aspergillus</i> sp.	1	1	7	6	8	2	3	1
Total	62	62	58	64	68	45	48	53

Legenda: C1: coleta 1; C2: coleta 2. Valores indicam a quantidade de estacas com a presença do fungo em 50 amostras.

A Tabela 4.5 apresenta a análise estatística realizada entre os resultados com a comparação entre a média da quantidade de cada fungo nas diferentes coletas encontrados em todos os clones.

Tabela 4.5 – Comparação de médias entre os fungos identificados nas estacas das duas coletas

Fungo	Coleta 1	Coleta 2
<i>Fusarium</i> sp.	20,3 aA	27,8 aB
<i>Colletotrichum</i> sp.	21,3 bA	14,0 aA
<i>Gliocladium</i> sp.	4,5 cA	2,8 bA
<i>Trichoderma</i> sp.	8,3 bcA	9,0 bA
<i>Aspergillus</i> sp.	4,8 cA	2,5 bA

Legenda: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não se diferem estatisticamente entre si.

A Figura 4.2 apresenta as médias obtidas para as estacas dos quatro clones nas duas coletas.

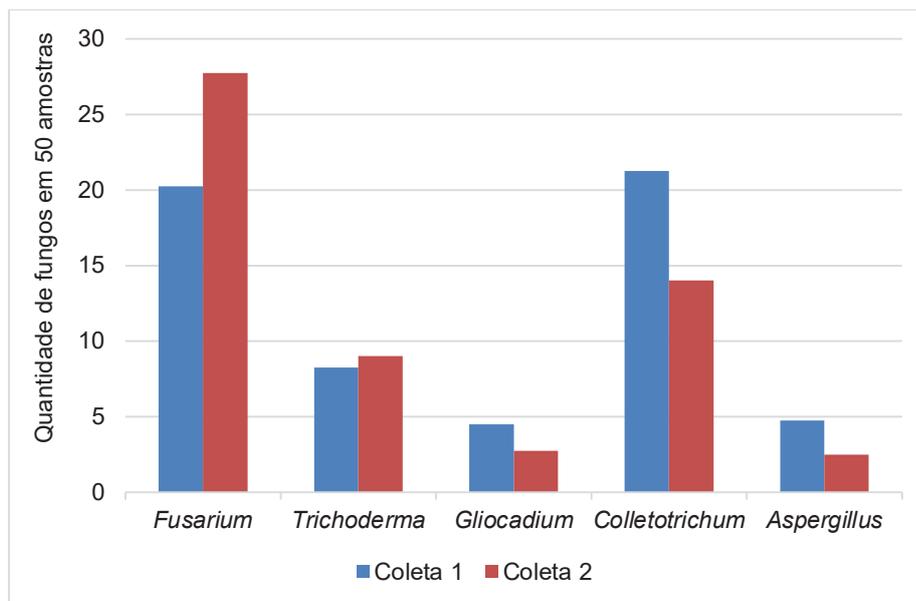


Figura 4.2 – Comparação de média da incidência de fungos em estacas de duas coletas

A incidência dos gêneros *Fusarium* e *Colletotrichum* foi estatisticamente diferente dos demais fungos, sendo que *Fusarium* foi o que mais se destacou. A diferença entre as coletas se mostrou significativa somente para o *Fusarium* (Tabela 4.5), diferente do identificado nas folhas, o que indica que a incidência do fungo em diferentes partes da planta pode estar relacionada com a estação do ano.

Nos ensaios de isolamento realizados, foram identificados sete gêneros de fungos nas folhas, como nas estacas de erva-mate, sendo *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Rhizopus* e *Aspergillus*. Para melhor análise dos resultados, os fungos encontrados foram comparados com outros trabalhos semelhantes.

Os gêneros *Fusarium*, *Colletotrichum* e *Rhizoctonia* são os principais causadores da doença de podridão de estacas e miniestacas, sendo *Fusarium* o principal agente causal da podridão de raízes, enquanto o *Colletotrichum* está associado com a doença antracnose (WENDLING et al., 2020).

O gênero *Fusarium* foi o gênero com maior frequência de identificação nas folhas e estacas, e se apresenta como um fungo comum da cultura da erva-mate. Poletto et al. (2006) constataram *Fusarium* em amostras de raízes de ervais indicando patogenicidade para a doença podridão de raízes. Borges et al. (2011) identificaram, em amostras de solo, a maior incidência do *Fusarium* nas estações de verão e outono (dezembro a maio), como também foi observado nas folhas da coleta 2 (outono), com

maior média de incidência (Tabela 4.3). Para as estacas, a maior média foi observada na coleta 1 (primavera), com diferença significativa entre épocas de coleta (Tabela 4.5).

Pimentel et al. (2006) identificaram o fungo *Fusarium* nos ensaios realizados em amostras de folhas, com incidência em folhas jovens e velhas de erva-mate cultivada, e somente em folhas velhas de erva nativa. Paula et al. (2017) indicaram que o *Fusarium* também foi o patógeno mais abundante entre os fungos identificados nas amostras de solo de ervais coletadas em profundidades de 10 e 20 cm. Oliveira et al. (2015) avaliaram sementes e frutos de erva-mate, e *Fusarium* foi o segundo gênero mais incidente, tanto nos frutos quanto nas sementes. Poletto et al. (2015) identificaram que *Fusarium* foi o principal contaminante, com mais de 80% de contaminação das flores, as quais podem ser a porta de entrada do patógeno. Para as sementes, a contaminação pelo fungo variou entre 45% a 84%.

O gênero *Colletotrichum* foi o segundo gênero com maior incidência, tanto nas folhas como nas estacas, com a maior média na coleta 1 para folhas e na coleta 2 para estacas, apesar de não se diferenciar estatisticamente entre coletas. Borges et al. (2011) identificaram a presença do gênero somente nas estações de verão e outono. Pimentel et al. (2006), que também avaliaram folhas de erva-mate, identificaram o fungo com maior incidência em folhas velhas de erva-mate cultivada.

Borges et al. (2011) identificaram a presença de *Gliocladium* sp. em amostra de solo somente na estação da primavera. No presente trabalho, a coleta que apresentou maior média também foi a primavera (coleta 1), tanto para folhas quanto para estacas, apesar de não apresentarem diferença significativa entre coletas.

Trichoderma foi o terceiro fungo mais frequente, tanto nas folhas como nas estacas de erva-mate. A maior média ocorreu na coleta 1 (primavera) para folhas e na coleta 2 (outono) para estacas. Borges et al. (2011) relataram a presença deste fungo somente na estação do inverno. Este fungo também foi identificado em diversas pesquisas (Pimentel et al. 2006, Borges et al. 2011, Oliveira et al. 2015, Poletto et al. 2015, Paula et al. 2017, Paula et al. 2018). Poletto et al. (2015) identificaram a presença de *Trichoderma* em diferentes amostras de erva-mate, que possivelmente atuou como antagonista contra a infecção por *Fusarium*. Paula et al. (2017) também identificaram alta incidência de *Trichoderma* nas amostras de solo dos ervais avaliados, e apresentaram potencial para o biocontrole do patógeno *Fusarium*.

O gênero *Cladosporium* foi observado somente nas folhas e apresentou maior média de incidência na coleta 1, que ocorreu na primavera, porém sem diferença estatística significativa em relação a coleta no outono. Borges et al. (2011) identificaram este fungo no solo somente no verão e no outono. O fungo também foi identificado por Paula et al. (2017) em amostras de solo, sendo que foi o segundo fungo mais presente na camada mais superficial (até 10 cm) e terceiro na camada mais profunda (10 a 20 cm).

Nas folhas analisadas, o gênero *Rhizopus* não apresentou diferença estatística entre coletas no outono e na primavera, sendo que a maior média de incidência ocorreu na primavera (coleta 1). Este gênero foi identificado somente nas folhas e também foi o que apresentou a menor frequência entre todos os fungos encontrados. Diferente do obtido no presente trabalho, Borges et al. (2011) identificaram a presença de *Rhizopus* em amostra de solo apenas na estação do outono.

O fungo *Aspergillus* foi o quarto mais identificado nas amostras de folhas e estacas. Para ambas as amostras, o fungo apresentou maior média de incidência na coleta 1, que ocorreu na primavera, mas somente para as folhas a coleta 1 se difere estatisticamente da coleta 2 (outono). Pimentel et al. (2006) também identificaram *Aspergillus* como o segundo fungo mais frequente em folhas de erva-mate, com presença em folhas jovens e adultas, de ervais nativos e plantados. Borges et al. (2011) identificaram que o fungo do gênero *Aspergillus* sp. foi o mais abundante em solo na cultura de erva-mate avaliada e foi identificado em todas as estações do ano.

4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

Vários isolados de *Fusarium* e *Colletotrichum* foram obtidos (Tabela 4.6) e foram identificadas três espécies diferentes de *Fusarium*, sendo *F. oxysporum*, *F. pseudocircinatum* e *F. fujikuroi*. Na triagem inicial uma das amostras foi identificada em laboratório como *Fusarium*, porém ao realizar o sequenciamento genético, esta foi identificada como *Clonostachys rosea*. Em relação ao *Colletotrichum*, das quatro amostras enviadas, em uma não foi possível realizar o sequenciamento genético e na outra não foi identificada a espécie (*Colletotrichum* sp.), as demais foram identificadas como *C. gloeosporioides* e *C. kahawae*.

Tabela 4.6 – Identificação dos isolados de *Fusarium* e *Colletotrichum* encontrados em folhas e estacas clonais de erva-mate

Código	Fonte	Espécie	Base	Identidade
FUS 01	Folha	<i>Fusarium oxysporum</i>	510/518	99%
FUS 02	Estaca	<i>Clonostachys rosea</i>	556/559	99%
FUS 03	Folha	<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	536/539	99%
FUS 04	Folha	<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	558/560	99%
FUS 05	Folha	<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	541/544	99%
FUS 06	Estaca	<i>Fusarium fujikuroi</i>	531/539	98%
FUS 07	Folha	<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	551/559	98%
FUS 08	Folha	<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	675/680	99%
COL 02	Folha	<i>Colletotrichum</i> sp.	467/471	99%
COL 03	Folha	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	468/470	99%
COL 04	Folha	<i>Colletotrichum kahawae</i>	458/463	99%

Vargas (2020) avaliou a patogenicidade de diferentes tipos de *Fusarium*, incluindo as espécies encontradas na identificação *F. pseudocircinatum* e *F. fujikuroi*. Cabe salientar que o *F. pseudocircinatum* é uma espécie pertencente ao complexo *Fusarium fujikuroi* (FFSC) que são observados como causadores de doenças em diversas plantas, causando danos significativos (WIGMANN et al., 2019). Todos os isolados de *Fusarium* avaliados por Vargas (2020) foram patogênicos às mudas de erva-mate com diferentes níveis de agressividade.

4.3. TESTE DE PATOGENICIDADE

Os testes foram realizados com inoculação dos discos de micélios com meio BDA para cada tratamento (folha sadia, folha com ferimentos e testemunha sem inóculo). Na Figura 4.3 pode-se observar as folhas de erva-mate inoculadas com os fungos dos gêneros *Colletotrichum* e *Fusarium*: folhas com ferimento ao 7º dia (a), folhas sem ferimento ao 7º dia (b), folhas sem ferimento ao 14º dia (c) e folhas sem ferimento ao 14º dia (d).

Os valores da Tabela 4.7 indicam a média da soma das notas de severidade em 6 folhas para cada espécie de fungo avaliada.

Figura 4.3 – Folhas de erva-mate inoculadas com isolados dos fungos dos gêneros *Colletotrichum* e *Fusarium*. Legenda: Fotos (a) e (b) com *Colletotrichum*. Fotos (c) e (d) com *Fusarium*.

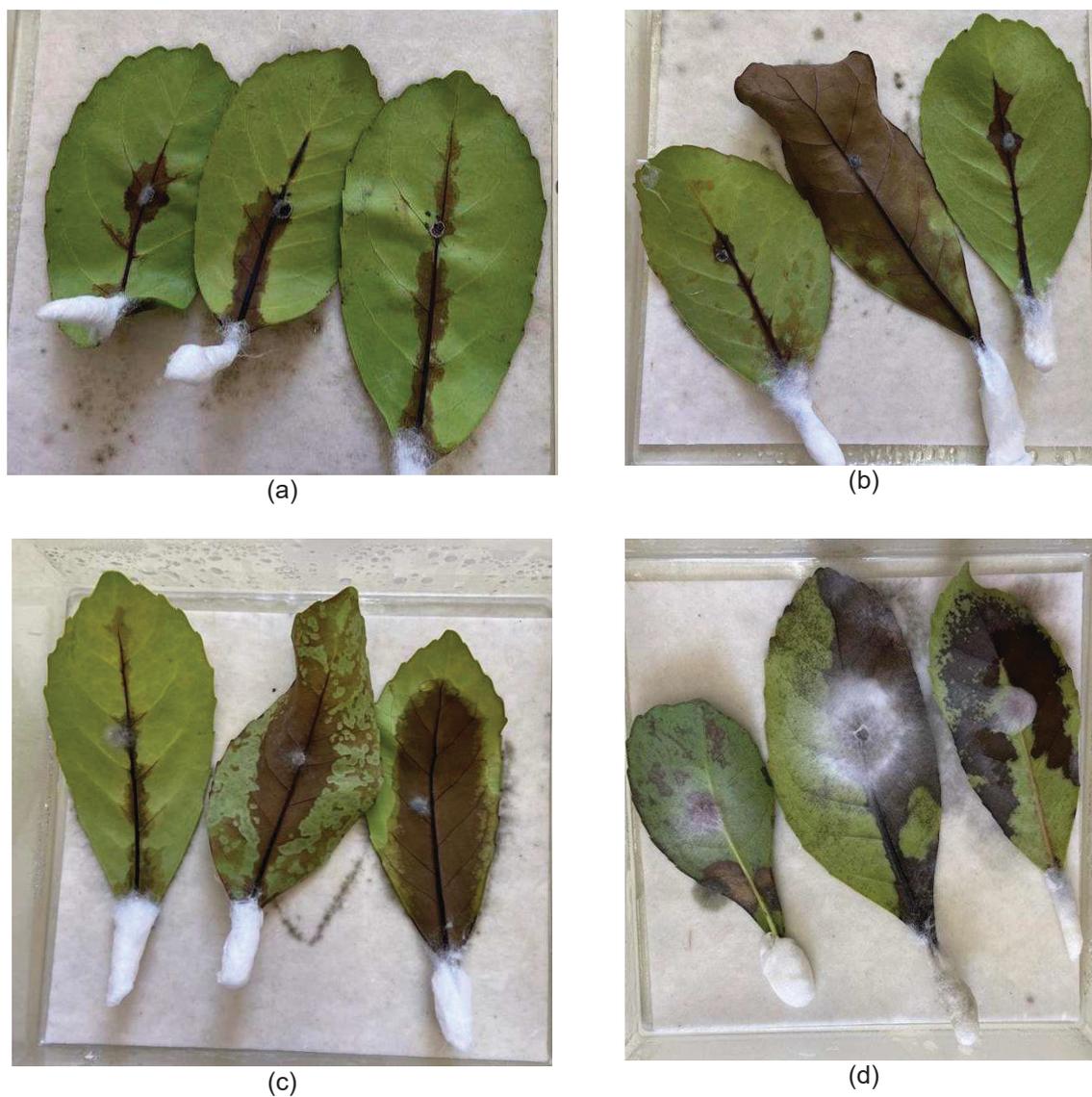


Tabela 4.7 – Avaliação do teste de patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. em folhas destacadas de erva-mate aos 7 e 14 dias após a inoculação.

Tratamento	<i>F. oxysporum</i>		<i>F. pseudocircinatum</i>		<i>F. fujikuroi</i>	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
Testemunha	0,0	0	0	0	0	0
Folha sadia sem ferimento	1,33	2,00	0,33	0,66	0,50	0,83
Folha sadia com ferimento	1,50	2,16	0,50	0,83	1,16	1,50

Os valores não apresentaram significância entre si, e por isso não foi realizada a comparação de médias. Para os isolados de *F. oxysporum* e *F. fujikuroi*, a comparação de médias foi superior entre as análises com folhas sadias e com ferimentos em comparação com os isolados de *F. pseudocircinatum*. A espécie *F. oxysporum* foi a que apresentou maiores médias de severidade, tanto em folhas sem ferimento como em folhas com ferimento. Verificou-se a formação de manchas e queimas foliares nas folhas inoculadas com os isolados de *Fusarium*.

A espécie mais agressiva foi *F. oxysporum* seguida por *F. fujikuroi* e *F. pseudocircinatum*. O isolado de *F. oxysporum* apresentou maior agressividade em relação aos demais isolados quando inoculados nas folhas de erva-mate, demonstrando capacidade de causar danos em folhas sadias com ferimentos. A espécie *F. fujikuroi* mostrou comportamento similar ao *F. oxysporum* de causar lesões em folhas sadias com ferimento. Somente para o isolado *F. pseudocircinatum* houve pequena diferença entre os valores dos ensaios com folhas sadias e folhas com ferimentos.

O fungo *F. oxysporum* também foi identificado por diversos autores, como Poletto et al. (2006), Poletto et al. (2010b), Poletto et al. (2012), Mezzomo et al. (2018a) e Mezzomo et al. (2018b). Mezzomo (2018a) identificou que esta espécie é responsável pela podridão de raízes em erva-mate. Além disso, Poletto et al. (2006) e Poletto et al. (2010a) indicam que *F. oxysporum* é uma das espécies mais virulentas e que possuem maior abrangência em plantios infestados. Poletto et al. (2006) indica que a grande disseminação da espécie pode ser causada pela contaminação das mudas em viveiro.

F. oxysporum e *F. pseudocircinatum* são causadores da doença podridão de estacas e miniestacas, e podridão de raízes. *Fusarium fujikuroi* é uma espécie que ainda não foi relatada causando doenças na cultura da erva-mate. Este é um patógeno de grande importância em outras culturas tais como arroz, cana de açúcar, trigo e outras (Cen et al. 2020).

Para os isolados de *Colletotrichum*, são apresentadas as médias das notas atribuídas para o grau de severidade observadas nas folhas no sétimo e décimo quarto dias após a inoculação (Tabela 4.8). Os valores indicam a média da soma das notas

de severidade em 6 folhas, e a análise estatística não revelou diferença significativa entre as médias.

Tabela 4.8 – Avaliação do teste de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. em folhas destacadas de erva-mate aos 7 e 14 dias após a inoculação.

Tratamento	<i>Colletotrichum</i> sp.		<i>C. gloeosporioides</i>		<i>C. kahawae</i>	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
Testemunha	0,0	0	0	0	0	0
Folha sadia sem ferimento	0,50	0,83	0,66	0,83	0,16	0,33
Folha sadia com ferimento	0,66	1,16	0,66	1,00	0,33	0,50

Foi possível perceber que a maior média de severidade ocorreu com *Colletotrichum* sp., seguido de *C. gloeosporioides*, e *C. kahawae*, este último apresentando a menor média. Para o fungo *Colletotrichum* sp. não foi possível identificar sua espécie no sequenciamento genético, porém sabe-se que pertence ao gênero de patógenos causadores da antracnose.

Em relação à agressividade, *Colletotrichum* sp. apresentou as médias levemente superiores aos demais e foi mais agressiva nas folhas de erva-mate. A espécie *C. gloeosporioides* veio em segundo lugar em agressividade nas folhas de erva-mate seguido pelo *C. kahawae*, o qual se mostrou menos agressivo. Em relação à capacidade de cada espécie em causar doenças, quer seja em folha sadia sem ou com ferimentos, não houve grande diferença entre as médias de severidade encontradas. Isto demonstrou que as espécies testadas possuem potencial de infectar tanto plantas sadias quanto com injuriadas.

Com o teste de patogenicidade foi possível verificar a diferença entre a agressividade dos fungos para cada espécie. Todas as espécies utilizadas no teste de patogenicidade se demonstraram patogênicas às folhas de erva-mate. O reisolamento dos isolados das espécies de *Fusarium* e *Colletotrichum* das folhas inoculadas, tanto sintomáticas quanto assintomáticas, foi elevado e variou de 75 a 100%. A testemunha não apresentou sintomas quer seja de antracnose ou fusariose e também no reisolamento não revelou a presença dos patógenos inoculados.

Na revisão da literatura não foram encontrados outros trabalhos com o patógeno *C. kahawae* causando doenças na cultura da erva-mate. Estudos demonstraram que este fungo é patogênico na cultura do café, em que Gimase et al. (2020) indicaram que 80% dos cultivares de *Coffea arabica* foram suscetíveis a doença dos grãos de café causados por esse fungo.

5. CONCLUSÕES

Nas folhas e estacas doentes das mudas clonais, foram encontrados fungos dos gêneros *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Rhizopus* e *Aspergillus*. Os gêneros de maior frequência foram *Fusarium* e *Colletotrichum*.

As espécies do gênero *Fusarium* foram as causadoras de manchas e queima nas folhas de erva-mate. As espécies do gênero *Colletotrichum* foram os agentes causais da antracnose.

Para o fungo *Fusarium*, a época do outono (coleta 2) foi de maior incidência do fungo em amostras de folhas e estacas. Para os fungos *Trichoderma* e *Aspergillus*, a época de coleta que ocorreu maior incidência dos fungos nas folhas foi a primavera (coleta 1).

As espécies identificadas pelo sequenciamento genético pela região do ITS foram *Fusarium oxysporum*, *Fusarium pseudocircinatum*, *Fusarium fujikuroi*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum kahawae*.

O teste de patogenicidade indicou que os isolados de *Fusarium* e de *Colletotrichum* foram patogênicos às folhas de erva-mate inoculadas.

Os isolados de *F. oxysporum* e *Colletotrichum* sp. foram os fungos que apresentaram maior agressividade nas folhas de erva-mate.

Este é o primeiro relato de *F. fujikuroi* e *C. kahawae* causando doenças em erva-mate.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; ALFENAS, R.F. Inoculação de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. 2ª Edição. Viçosa (MG): Editora UFV, p. 123 – 144. 2016a.
- ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; MAFIA, R.G.; GONÇALVES, R.C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. 2ª Edição. Viçosa (MG): Editora UFV, 2016b, p. 55 – 93.
- AUER, C. G.; SANTOS, A. F. dos. Doenças da erva-mate. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 2, p. 343-349.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3. Ed. New York: MacMillan, 241 p1972
- BORGES, L. R., LAZZARI, S. M. N., PIMENTEL, I. C., & NOVA, M. X. V. Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v.9, n.2, p.185-194, 2011.
- BRASIL. Instrução normativa conjunta nº 2, de 23 de janeiro de 2006. Estabelecer procedimentos a serem adotados para efeito de registro de Agentes Biológicos de Controle. Brasília, 2006.
- BRITO, N. M. D., DUARTE, H. D. S. S., BÜHNER, C. D. B., AUER, C. G., & SANTOS, Á. F. D. Morphophysiological characterization of *Ceratocystis fimbriata* isolates from yerba mate. **Ciência Rural**, v.51, n.3, 2021.
- BURTNIK, O.J. **Manual del pequeño yerbatero correntino**. INTA, AER Santo Tomé, Corrientes, Argentina, 58 p. 2003.
- CEN, Y. K., LIN, J. G., WANG, Y. L., WANG, J. Y., LIU, Z. Q., & ZHENG, Y. G. The gibberellin producer *Fusarium fujikuroi*: Methods and technologies in the current toolkit. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v,8, 232. 2020.

COELHO, G. C.; MARIATH, J. E. de A.; SCHENKEL, E. P. Populational diversity on leaf morphology of Maté (*Ilex paraguariensis*, A. St.-Hil., Aquifoliaceae), **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 45, n. 1, p. 47-51, 2002.

DANIEL, O. **Erva-mate: sistema de produção e processamento industrial**. UFGD; UEMS. 288p. Dourados, 2009.

DERAL. Prognóstico Erva Mate- Novembro de 2020. **Departamento de Economia Rural**. Divisão de Conjuntura Agropecuária. Governo do Estado do Paraná. 2021.

FIEDLER, N. C.; SOARES, T. S.; SILVA, G. F. Florestais Não Madeireiros: Importância e Manejo Sustentável da Floresta. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.10, n. 2, Jul./Dez, 2008.

GIMASE, J. M., THAGANA, W. M., OMONDI, C. O., CHESEREK, J. J., GICHIMU, B. M., GICHURU, E. K., SNELLER, C. H. Genome-Wide Association Study identify the genetic loci conferring resistance to Coffee Berry Disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica* var. Rume Sudan. **Euphytica**, 216(6), 1-17. 2020.

GOMES, N.S.B. et al. Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n.43, p.123-138, 2001.

IAPAR - **Instituto Agrônomo do Paraná**. Cartas Climáticas do Paraná – Classificação Climática. Londrina, PR. Disponível em: <<http://www.iapar.br/pagina863.html>>. Acesso em 20 nov 2021.

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Estatística Paraná. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>>. 2021.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Estatísticas Paraná. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/por-cidade-estado-estatisticas.html?t=destaques&c=41>>. Acesso em 10 mai. 2021.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Produção da extração vegetal e da silvicultura. Sidra - Indicadores de Desenvolvimento Sustentável. Tabela 289 – Quantidade produzida e valor da produção na extração vegetal, por tipo de produto extrativo. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/289>>. Acesso em: 01 fev. 2022.

IPARDES. **Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social**. Indicadores de desenvolvimento sustentável por bacias hidrográficas do Estado do Paraná. Paraná, 2017. Disponível em: <<http://www.ipardes.pr.gov.br/IDS/index.php/IDS2017/issue/view/1>>. Acesso em 13 mai. 2018.

IPARDES. **Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social**. Indicadores de desenvolvimento sustentável por bacias hidrográficas do Estado do Paraná. Paraná, 2017. Disponível em: <<http://www.ipardes.pr.gov.br/IDS/index.php/IDS2017/issue/view/1>>. Acesso em 13 mai. 2021.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Números do Valor Bruto da Produção (VBP) – Lavouras e Pecuárias. Brasil. (<<http://www.agricultura.gov.br/noticias/valor-bruto-da-producao-estimado-para-2018-e-de-r-515-9-bilhoes>>)2018.

MEDRADO, M. J. S.; VILCAHUAMAN, L. J. M. **Cultivo da Erva-Mate: Importância socioeconômica e ambiental**. Embrapa Florestas – Sistemas de produção. 2014. Disponível em: <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaold=3601&p_r_p_-996514994_topicold=2902>. Acesso em: 11.jan.2022.

MEZZOMO, R., ROLIM, J. M., POLETTO, T., DE OLIVEIRA, M. B., LAZAROTTO, M., & MUÑIZ, M. F. B. M. B. Mycelial growth and sporulation of *Fusarium spp.* pathogenic to *Ilex paraguariensis* in different culture media and under exposure to different light levels. **Scientia Agraria**, v.19, n.1, p.14-19, 2018a.

MEZZOMO, R., ROLIM, J. M., POLETTO, T., ROSENTHAL, V. C., SAVIAN, L. G., REINIGER, L. R. S., & MUNIZ, M. F. B. Morphological and molecular characterization of *Fusarium spp.* pathogenic to *Ilex paraguariensis*. **Cerne**, v.24, n.3, p.209-218, 2018b

OLIVEIRA, E., MACIEL, C. G., & CAMPAGNOLO, K. Qualidade sanitária de sementes de erva-mate. **Unoesc & Ciência-ACET**, v.6, n.2, p.231-238, 2015.

PAULA, S., WOLF, K. R., MARTÍNI, A. F., & MILANESI, P. M. Doenças fúngicas em erva-mate. Fungal disease in" erva-mate". **Scientific Electronic Archives**, v.11, n.2, p.27-34, 2018.

PAULA, S., WOLF, K. R., MARTÍNI, A. F., & MILANESI, P. M. Incidência de fungos em solos cultivados com erva-mate no Alto Uruguai gaúcho. **Summa Phytopathologica**, v.47, p. 10-16, 2017.

PENTEADO, S. R. C. QUEIROZ, E. C. REIS FILHO, W. THOMAZINI, M. J. **Plantações florestais comerciais e o uso de agrotóxicos em relação a alguns produtos da agricultura. Plantações florestais: geração de benefícios com baixo impacto ambiental.** EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2015.

PENTEADO JUNIOR, J. F., GOULART, I. C. G. R. **Erva 20: Sistema de produção para erva-mate.** Embrapa Florestas. Brasília, 2019.

PIASSETTA, R. R. L.; MIKOS, A. P.; AUER, C. G. Doenças Fúngicas da Cultura da Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no Brasil. **BIOFIX Scientific Journal**, v. 6, n. 2, p. 153-159, 2021.

PIMENTEL, I. C., KUCZKOWSKI, F. R., CHIME, M. A., AUER, C. G., & JUNIOR, A. G. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Floresta**, 36. 2006

POLETTO, I., MUNIZ, M. F. B., CECONI, D. E., SANTIN, D., WEBER, M. N. D., & BLUME, E. Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) na região do vale do Taquarí, RS. **Ciência Florestal**, 16, 1-10. 2006.

POLETTO, I., MUNIZ, M. F. B., CECONI, D. E., WEBER, M. N. D., & BLUME, E. Primeira ocorrência de *Pythium* sp. e *Rhizoctonia* sp. causando podridão-de-raízes em ervais no Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, 17(1), 65-69. 2007.

POLETTI, I. **Nutrição, sombreamento e antagonismo biológico no controle da podridão-de-raízes da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill)**. Dissertação (mestrado). 2008. (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2008.

POLETTI, I. **Caracterização e manejo do patossistema erva-mate/podridão de raízes**. 94 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2010a.

POLETTI, I., MUNIZ, M. F. B., BLUME, E., & CECONI, D. E. Efeito da aplicação de NPK e calcário sobre a podridão-de-raízes em mudas de erva-mate. **Floresta**, 40(3). 2010b.

POLETTI, I., MUNIZ, M. F. B., CECONI, D. E., MEZZOMO, R., & RODRIGUES, J. Influência da inoculação de *Fusarium* spp. e níveis de sombreamento no crescimento e desenvolvimento da erva-mate. **Ciência Florestal**, 20, 513-521. 2010c.

POLETTI, I., LUPATINI, M., MUNIZ, M. F. B., & ANTONIOLLI, Z. Caracterização e patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. causadores de podridão-de-raízes da erva-mate. **Floresta**, 42(1), 95-104. 2012.

POLETTI, I., MUNIZ, M. F. B., CECONI, D. E., & POLETTI, T. Aspectos epidemiológicos da podridão-de-raízes da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Ciência Florestal**, 25, 281-291. 2015.

SANTOS, J. M F. Princípios básicos da aplicação de agrotóxicos. Fitossanidade. A cadeia produtiva do algodão. **Revista Visão Agrícola**, nº6, Julho/Dezembro de 2006.

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.

SEAB. **Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Paraná**. Área e Produção Agrícola no Estado do Paraná e comparativo com o Brasil. Paraná, 2015. (<<http://www.agricultura.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=137>>). Acesso em: 02 fev. 2022.

SEAB. **Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Paraná**. Produção Agrícola Paranaense por Município. Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=137>>. Acesso em: 02 fev. 2022.

SIDRA. Pesquisa Agrícola Municipal 2020. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**. Tabela 1613 - Área destinada à colheita, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras permanentes. Brasil, 2022.

VARGAS, L. C. **Patogenicidade e identificação de espécies de *Fusarium* associadas a raízes de plantas com fusariose e sementes em erva-mate**. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal do Paraná. 2020.

WACHOWICZ, R. C. Universidade do Mate: história da UFPR. **Edição da APUFPR**, 1983.

WENDLING, I.; SANTIN, D.; NAGAOKA, R.; STURION, J. A. **BRS BLD Aupaba e BRS BLD Yari: cultivares clonais de erva-mate para produção de massa foliar de sabor suave**. Colombo: Embrapa Florestas. 6 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 411). 2017a

WENDLING, I.; STURION, J. A.; SANTIN, D. **BRS 408 e BRS 409: cultivares clonais de erva-mate para produção de massa foliar**. Colombo: Embrapa Florestas. 6 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 411). 2017b

WENDLING, I., SANTAROSA, E., PENTEADO JUNIOR, J., AUER, C. G., PENTEADO, S. R. C. **Manual de produção de mudas clonais de erva-mate**. Documentos 336. Embrapa Florestas. Colombo, 2020

WIGMANN, É. F.; BEHR, J.; VOGEL, R. F.; NIESSEN, L. MALDI-TOF MS fingerprinting for identification and differentiation of species within the *Fusarium fujikuroi* species complex. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 13, p. 5323-5337, 2019.