

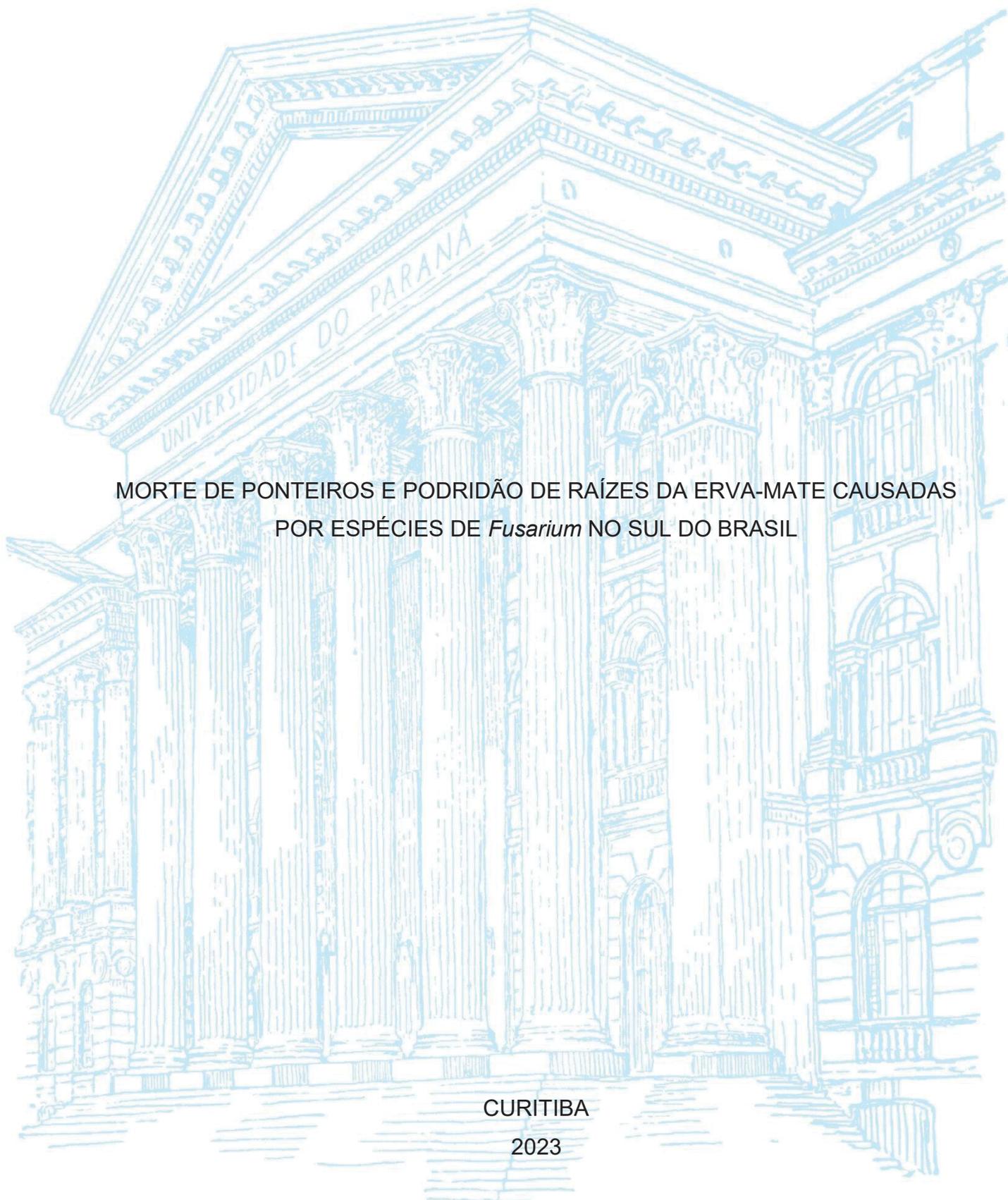
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VALDOMIRO BILENKI JUNIOR

MORTE DE PONTEIROS E PODRIDÃO DE RAÍZES DA ERVA-MATE CAUSADAS
POR ESPÉCIES DE *Fusarium* NO SUL DO BRASIL

CURITIBA

2023



VALDOMIRO BILENKI JUNIOR

MORTE DE PONTEIROS E PODRIDÃO DE RAÍZES DA ERVA-MATE CAUSADAS
POR ESPÉCIES DE *Fusarium* NO SUL DO BRASIL

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 requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos
Coorientador: Dr. Celso Garcia Auer
Coorientador: Prof. Dr. Dauri José Tessmann
Coorientador: Dr. Tiago Miguel Jarek

CURITIBA

2023

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

Bilenki Junior, Valdomiro

Morte de ponteiros e podridão de raízes da erva-mate causadas por espécies de *Fusarium* no Sul do Brasil/ Valdomiro Bilenki Junior. – Curitiba, 2023.
1 recurso online: PDF.

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

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos

Coorientador: Dr. Celso Garcia Auer

Coorientador: Prof. Dr. Dauri José Tessmann

Coorientador: Dr. Tiago Miguel Jarek

1. Erva-mate. 2. Fusarium. 3. Bactérias. I. Santos, Álvaro Figueredo dos. II. Auer, Celso Garcia. III. Tessmann, Dauri José. IV. Jarek, Tiago Miguel. V. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal). VI. Título.

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



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

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **VALDOMIRO BILENKI JUNIOR** intitulada: **MORTE DOS PONTEIROS E PODRIDÃO DE RAÍZES DA ERVA-MATE CAUSADAS POR ESPÉCIES DE *Fusarium* NO SUL DO BRASIL**, sob orientação do Prof. Dr. ÁLVARO FIGUEREDO DOS SANTOS, 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 Julho de 2023.

Assinatura Eletrônica

31/07/2023 15:42:01.0

ÁLVARO FIGUEREDO DOS SANTOS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

07/08/2023 22:57:47.0

TIAGO MIGUEL JAREK

Avaliador Externo (GOGENETIC AGRO)

Assinatura Eletrônica

02/08/2023 14:03:22.0

DAURI JOSE TESSMANN

Coorientador(a)

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia e Produção Vegetal da Universidade Federal do Paraná.

Ao meu Orientador Professor Doutor Álvaro Figueredo dos Santos.

Ao meu coorientador Dr. Celso Garcia Auer

Ao meu coorientador Dr. Dauri José Tessmann

Ao meu coorientador Dr. Tiago Miguel Jarek

A analista Caroline de Bastos Bühner do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas

A Embrapa Florestas

À CAPES, pelo investimento nas pesquisas e auxílio financeiro.

À minha mãe,

Como uma árvore que, mesmo sob a sombra das montanhas mais altas, floresce, você protegeu meus sonhos, mesmo estando seus próprios ramos desprovidos de folhas.

RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* (St. Hil.) é o principal produto florestal não madeireiro da região Sul do Brasil, sendo uma cultura de grande importância social, econômica e ambiental. A erva-mate é atacada por vários patógenos e entre esses, destaca-se o gênero *Fusarium*, causador da podridão de raízes, principal doença da cultura. Entretanto, as espécies envolvidas na etiologia dessa doença ainda não são totalmente conhecidas, dado o pequeno número de isolados caracterizados. Além disso, nos anos de 2021 e 2022, observou-se um fenômeno de morte de ponteiros de erva-mate, no município de União da Vitória, estado do Paraná, tanto em viveiros como em plantas adultas. Durante os procedimentos de isolamento realizados para identificar o agente causal dessa doença, foi constatada uma associação frequente de *Fusarium* com o tecido afetado. Essa doença já havia sido relatada; no entanto, as espécies envolvidas, bem como a patogenicidade dessas espécies de *Fusarium* às brotações de erva-mate nunca foram estudadas. Com isso, os objetivos deste estudo foram: Confirmar a patogenicidade dos isolados de *Fusarium* em brotações de erva mate, realizar a caracterização morfológica e filogenética visando a identificação dos isolados e desenvolver metodologia de inoculação de *Fusarium* spp. em folhas e brotos destacados de erva-mate. Os isolados foram oriundos de plantas adultas sintomáticas, de áreas produtoras de erva-mate dos municípios de União da Vitória, Cruz Machado e Colombo, estado do Paraná, e Venâncio Aires e Espumoso, estado do Rio Grande do Sul. Os isolados de *Fusarium* obtidos de brotos sintomáticos foram caracterizados por morfologia (conidiogênese, esporodóquios, macro e microconídios, clamidósporos, tipo de micélio aéreo e cor), sendo para isso, cultivados em meios de cultura específicos para cada avaliação, e filogenia molecular multilocus (RNA polimerase II subunidade, fator de alongação 1- α e β -tubulina). Os isolados obtidos de raízes foram caracterizados por morfologia. Para confirmar a capacidade desses isolados de *Fusarium* em causar doença em brotações de erva-mate, procedeu-se a inoculação em folhas destacadas, sob condições controladas, bem como em brotos de plantas adultas à campo, e reisolamento em meio Batata Dextrose Ágar (BDA), cumprindo os postulados de Koch. Com o objetivo de obter um método que permitisse comparar a agressividade dos isolados, bem como reproduzir melhor os sintomas observados no campo, aprimorou-se o método de inoculação em folhas destacadas e, desenvolveu-se metodologia para inoculação de *Fusarium* em brotos destacados. As espécies *F. guttiforme* e *F. mexicanum*, foram identificadas como agentes causais da morte de ponteiros em erva-mate. Este é o primeiro relato de *F. guttiforme* e *F. mexicanum* causando doença em brotos de erva-mate. Além dessas espécies identificadas, envolvidas com a etiologia desta doença, outros isolados do complexo *F. fujikuroi* e complexo *F. graminearum* também estão. Os complexos *Fusarium solani* e *F. oxysporum* foram identificados associados à podridão de raízes, estes isolados foram patogênicos quando inoculados em folhas destacadas. Os métodos de inoculação em folhas e brotos destacados de erva-mate foram adequados para estudos de patogenicidade. Essas informações serão úteis no desenvolvimento de medidas de controle das doenças.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*. inoculação. sintomas

ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* (St. Hil.) is the main non-timber forest product in the southern region of Brazil, holding significant social, economic, and environmental importance. Yerba mate is attacked by several pathogens and among these, the genus *Fusarium* stands out, causing root rot, the main disease of the crop. However, the species involved in the etiology of this disease are not yet fully known, given the small number of characterized isolates. Furthermore, in the years 2021 and 2022, a phenomenon of dieback in yerba mate shoots was observed, in the municipality of União da Vitória state of Paraná, in both nurseries and adult plants. During isolation procedures conducted to identify the causal agent of this disease, a frequent association with *Fusarium* was noted in the affected tissue. Although this disease had been previously reported, the species involved, as well as the pathogenicity of these *Fusarium* species to the shoots of yerba mate, had never been studied. Therefore, the objectives of this study were to confirm the pathogenicity of *Fusarium* isolates on yerba mate shoots, conduct morphological and phylogenetic characterization aiming at identification of the isolates, and develop a methodology for inoculating *Fusarium* spp. on detached yerba mate leaves and shoots. The isolates were obtained from symptomatic adult plants in yerba mate-producing areas of the municipalities of União da Vitória, Cruz Machado, and Colombo in the state of Paraná, and Venâncio Aires and Espumoso in the state of Rio Grande do Sul. The *Fusarium* isolates obtained from symptomatic shoots were characterized by morphology (conidiogenesis, sporodochia, macro and microconidia, chlamydospores, type of aerial mycelium and color), being cultivated in specific culture media for each evaluation, and multilocus molecular phylogeny (RNA polymerase II subunit, elongation factor 1- α and β -tubulin). The isolates obtained from roots were characterized by morphology. To confirm the ability of these *Fusarium* isolates to cause disease in yerba mate shoots, inoculation was carried out on detached leaves, under controlled conditions, as well as in shoots of adult plants in the field, and re-isolation on Potato Dextrose Agar (PDA) medium, fulfilling Koch's postulates. With the objective of obtaining a method that would allow comparing the aggressiveness of the isolates, as well as better reproducing the symptoms observed in the field, the method of inoculation in detached leaves was improved and a methodology was developed for inoculation of *Fusarium* in detached shoots. The species *F. guttiforme* and *F. mexicanum* were identified as causal agents of die back in yerba mate. This is the first report of *F. guttiforme* and *F. mexicanum* causing disease in yerba mate shoots. In addition to these identified species involved in the etiology of this disease, other isolates of the *F. fujikuroi* complex and *F. graminearum* complex are also present. *Fusarium solani* and *F. oxysporum* species complexes were identified associated with root rot, these isolates were pathogenic when inoculated on detached leaves. Inoculation methods on leaves and detached shoots of yerba mate were adequate for pathogenicity studies. This information will be useful in the development of disease control measures.

Key-words: *Ilex paraguariensis*. inoculation. symptoms.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	7
1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	10
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1 ERVA-MATE	11
3.2 DOENÇAS DA ERVA-MATE.....	14
3.3 O GÊNERO <i>Fusarium</i>	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp.....	22
4.2 OBTENÇÃO DAS CULTURAS MONOSPÓRICAS	23
4.3 PRESERVAÇÃO DAS CULTURAS MONOSPÓRICAS	23
4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp.	24
4.5 PATOGENICIDADE E MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp. EM ERVA-MATE.....	30
5 RESULTADOS.....	37
5.1 CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA	37
5.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	41
5.3 CARACTERIZAÇÃO SINTOMATOLÓGICA E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp. EM ERVA-MATE.	52
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÕES	64
8 REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* (St. Hil.) é o principal produto florestal não madeireiro do Sul do Brasil, sendo uma cultura de grande importância social, econômica e ambiental. A erva-mate é uma espécie nativa da América do Sul, ocorrendo no Sul do Brasil, Nordeste da Argentina e Leste do Paraguai (PENTEADO e GOULART, 2019). A planta é uma angiosperma característica da Floresta Ombrófila Mista (CARVALHO, 2003), onde é cultivada em remanescentes florestais nativos deste bioma, ou ainda, na forma de ervais que são arborizados com outras espécies nativas, como a araucária (PENTEADO e GOULART, 2019). Da erva-mate são colhidos folhas e ramos finos e esta matéria-prima recebe a denominação de erva-mate comercial (SANTIN et al., 2016).

A partir desta matéria-prima, são preparadas bebidas muito tradicionais: como o chá mate, o chimarrão e o tereré, sendo estas as principais formas de consumo no Brasil. Além dos usos tradicionais, a erva-mate faz parte da composição de produtos como alimentos, cosméticos e produtos de higiene e limpeza (FACCIN et al. 2015; DALLABRIDA et al., 2016). Possuindo ainda potencial para ser incluída na dieta de animais como bovinos (CELI, 2013; BARBATO et al., 2019) e ovinos (BAERLEY et al., 2023). O Brasil é o principal produtor de erva-mate do mundo e, em 2021, o total produzido foi de cerca de um milhão de toneladas de folha verde (IBGE, 2023). No Brasil é cultivada principalmente nos três estados do Sul: Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, que juntos representam mais de 99% da produção brasileira (IBGE, 2023). Para o Paraná, estado que mais produz a erva-mate no Brasil, a cultura representou um Valor Bruto da Produção (VPB) de R\$ 1,09 bilhão, o que representa 84% do VPB dos produtos florestais não madeiráveis (erva-mate, pinhão, palmito, resina e látex) sendo, portanto, o principal produto florestal não madeirável do estado (PEREIRA, 2022).

Com a saída da erva-mate do sistema extrativista, ela passou a ser cultivada em diferentes sistemas produtivos, como o adensamento de ervais nativos e o cultivo a pleno sol (PENTEADO e GOULART, 2019). A adoção de técnicas de manejo como o uso de mudas melhoradas, uso da adubação e diminuição do intervalo entre colheitas incrementou significativamente a produção desses ervais (GOULART et al., 2019). No entanto, com isso surgiram novos desafios com relação ao manejo fitossanitário da cultura, uma vez que a modificação do ambiente

favoreceu o agravamento de algumas doenças, como é o caso da podridão radicular causada por espécies de *Fusarium*, que é influenciada pelo nível de sombreamento do erval e pelo uso inadequado da adubação (POLETTTO et al., 2009; POLETTTO et al., 2011; AUER e DOS SANTOS, 2016).

Fusarium é um dos principais patógenos que ocorrem na erva-mate, pois pode causar doenças tanto em condições de viveiro como de campo (AUER e DOS SANTOS, 2016; POLETTTO et al., 2012). O conhecimento do agente causal de uma doença é o primeiro passo para a definição de estratégias de controle. No entanto, ainda há dúvidas em relação à identificação das espécies envolvidas na etiologia dessa doença. No caso do gênero *Fusarium*, essa identificação que até pouco antes dos anos 2000 era baseada apenas em morfologia, nos dias atuais está fundamentada em análise filogenética multilocus (TAYLOR et al., 2000; AOKI et al., 2014; CROUS et al., 2021). A filogenia molecular multilocus melhora a resolução dos cladogramas e o suporte estatístico dos ramos (FRØSLEV et al., 2005; TORRES-CRUZ et al., 2022). Sendo *tef-1α* e *rpb2* os dois principais genes usados para identificação ao nível de espécie, ambos os genes apresentam grande poder discriminatório e estão bem representados nos bancos de dados (GEISER et al., 2004; CROUS et al. 2021).

Nos anos de 2021 e 2022, verificou-se uma doença de etiologia desconhecida em viveiros e plantios de erva-mate nos municípios de União da Vitória, Cruz Machado e Colombo, estado do Paraná, e Venâncio Aires, estado do Rio Grande do Sul, caracterizada pela morte de brotos de mudas e plantas adultas. Nos isolamentos feitos em meio de cultura constatou-se associação constante de fungos do gênero *Fusarium* nos tecidos lesionados. Na literatura, há um relato de Grigoletti e Auer (1996) de *Fusarium* sp. Causando a morte de brotos de plantas de erva-mate; no entanto, desconhece-se qual a espécie de *Fusarium* está envolvida na etiologia dessa doença.

2 OBJETIVOS

Nos dois casos de ataque de *Fusarium* spp. (morte de ponteiros e podridão de raízes), os estudos realizados ainda são insuficientes para um melhor entendimento das espécies envolvidas, com isso, o objetivo deste estudo identificar e avaliar a patogenicidade de espécies de *Fusarium* patogênicas à erva-mate.

Os objetivos específicos do estudo são os seguintes:

- A. Realizar a caracterização morfológica dos isolados de *Fusarium* spp. obtidos de brotações e raízes sintomáticas de erva-mate, com o objetivo de identificação em nível de complexo.
- B. Realizar análise filogenética multilocus para os isolados do complexo *F. fujikuroi* obtidos de brotações, com o objetivo de identificação em nível específico.
- C. Avaliar a patogenicidade dos isolados de *Fusarium* spp. em folhas destacadas e brotações em campo, em plantas adultas de erva-mate.
- D. Desenvolver métodos de inoculação que permitam medir a agressividade dos isolados, bem como reproduzir o sintoma de morte descendente de brotações de erva-mate observado no campo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ERVA-MATE

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma planta Angiosperma, da família Aquifoliaceae, característica da Floresta Ombrófila Mista e trata-se de uma espécie clímax, tolerante à sombra (CARVALHO, 2003). A planta é originária da América do Sul, onde ocorre de forma natural nos países da região Sul do continente, como Brasil, Paraguai e Argentina (OLIVEIRA e ROTTA, 1985; PENTEADO e GOULART, 2019). No Brasil é cultivada principalmente nos três estados do Sul: Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, que juntos representam mais de 99% da produção brasileira (IBGE, 2023).

Da erva-mate são colhidos folhas e ramos finos, esta matéria prima recebe a denominação de erva-mate comercial (SANTIN et al., 2016), também chamada de erva-mate folha verde. No processo de preparação para chimarrão ou tereré, a erva-mate passa pelo "sapeco", uma etapa em que a erva-mate é brevemente exposta a calor intenso, essa etapa inativa enzimas, realça o sabor e fixa a cor verde. Em sequência, ocorre a secagem e a fragmentação das folhas e ramos, resultando na erva-mate cancheada. Notavelmente, a fragmentação pode ocorrer antes ou depois da secagem, dependendo do tipo de secador utilizado. Na fase final, a moagem e a classificação ocorrem de maneira distinta, adaptando-se ao uso pretendido (chimarrão ou tereré) (DANIEL, 2009).

A erva-mate é bastante conhecida por seus usos tradicionais em bebidas muito apreciadas, como o chimarrão, o tereré e o chá mate, sendo esta a principal forma de consumo de erva-mate no Brasil. Além dos usos tradicionais, a erva-mate faz parte da composição de produtos como alimentos, cosméticos e produtos de higiene e limpeza (FACCIN et al. 2015; DALLABRIDA et al., 2016). Possuindo ainda potencial para ser incluída na dieta de animais como bovinos (CELI, 2013; BARBATO et al., 2019) e ovinos (BAERLEY et al., 2023).

O Brasil é o principal país produtor de erva-mate, em 2021 representou cerca de 50% (1.064.121 toneladas de erva-mate folha verde) da produção mundial de erva-mate, em segundo lugar está a Argentina com 42%, seguida do Uruguai com 8% da produção mundial (PEREIRA, 2022). Na produção brasileira de erva-mate, considerando todos os sistemas produtivos, o Paraná é o estado que mais produz erva-mate, em 2021 foram produzidas cerca de 680.929 toneladas de erva-mate

folha verde (64% da produção nacional), seguido por Rio Grande do Sul com 25% e Santa Catarina com 11% (IBGE, 2023). A cultura é importante economicamente para o Sul do Brasil, sendo que em alguns municípios, como Cruz Machado, a erva-mate representa o principal produto agrícola (PEREIRA, 2022).

Parte da produção brasileira é exportada para países como Uruguai e Argentina, que são os principais importadores da erva-mate brasileira. De acordo com dados do AgroStat (2023), em 2021 foram exportados 55.211.982 Kg de erva-mate, sendo 33% na forma de erva-mate cancheada e 67% na forma de outros produtos.

A erva-mate pode ser cultivada junto com espécies arbóreas nativas, sistema conhecido como erva-mate sombreada, seja através da arborização de ervais implantados a pleno sol, ou pelo plantio de erva-mate em remanescente florestal nativo (PENTEADO e GOULART, 2019). Segundo dados do IBGE (2023), em 2021, 65% da erva-mate produzida no Paraná veio destes sistemas de cultivo.

O uso dessas espécies florestais junto com a erva-mate também melhora a retenção de carbono do erval (BAGGIO et al., 2008) e protege o solo do declínio de nutrientes (ILANY et al., 2010). Entre as espécies florestais nativas encontradas nos ervais, destaca-se a presença do pinheiro do paraná (*Araucária angustifólia*), da imbuia (*Ocotea porosa*) e do cedro (*Cedrela fissilis*) (CHAIMSOHN e RADOMSKI, 2016).

A erva-mate é uma fonte rica em compostos ativos, incluindo polifenóis com propriedades antioxidantes e metilxantinas como cafeína e teobromina, conhecidas por seus efeitos estimulantes (CARDOSO, 2021). A concentração desses compostos é influenciada por fatores ambientais, como o nível de sombreamento (FERRERA, 2016), bem como por fatores genéticos (STUEPP, 2021). Em um estudo realizado junto às ervateiras do Planalto Norte Catarinense, Dallabrida et al. (2016) destacam que a qualidade da matéria-prima da erva-mate produzida nessa região é um dos principais diferenciais de mercado.

As folhas jovens da planta de erva-mate apresentam características distintas, como uma tonalidade mais clara, frequentemente com pigmentação avermelhada, em contraste com as folhas maduras. Além disso, é marcante a presença de brilho nas folhas novas. Esse brilho está relacionado à variação na cerosidade das folhas jovens de erva-mate, conforme identificado por Silva e Silva em 1994.

Quando a luz incide sobre a superfície de uma folha, ela pode interagir de diversas maneiras. A luz pode ser refletida na superfície, resultando no fenômeno chamado refletância, que pode ser especular ou difusa. A reflexão especular (de forma direta) é determinada pela estrutura e composição química da cutícula. Quando a luz penetra internamente na folha, pode ser transmitida, absorvida ou refletida dentro dos tecidos. A reflexão interna da luz carrega informações relevantes sobre as propriedades bioquímicas e estruturais da folha (USTIN e JACQUEMOUD, 2020).

O brilho visível que se percebe na superfície das folhas jovens de erva-mate pode estar relacionado à deposição de ceras epicuticulares. Conforme discutido por Yeats e Rose (2013), a acumulação dessas ceras epicuticulares sobre o limbo foliar conferem certas propriedades, como o brilho visível observado quando presentes na forma de filme epicuticular. A cera cuticular desempenha papéis cruciais nas plantas, agindo como uma barreira protetora contra a perda excessiva de água por transpiração, protegendo contra radiação ultravioleta intensa e atuando como defesa contra pragas e patógenos (revisado por XUE et al. em 2017).

A absorção da luz nas plantas é principalmente mediada por pigmentos, tanto fotossintéticos quanto não fotossintéticos, que seletivamente absorvem certos comprimentos de onda e refletem os não absorvidos. A luz refletida, que compõe a aparência visual da folha, é o resultado da interação entre esses pigmentos. Nesse cenário, a presença significativa de certos pigmentos, como antocianinas e carotenoides, em concentrações mais elevadas nas folhas jovens, resulta na coloração avermelhada ou alaranjada dessas folhas, que contrasta com as cores predominantes encontradas nas folhas maduras. (USTIN e JACQUEMOUD, 2020).

As antocianinas compreendem uma classe de flavonoides, responsáveis por cores vermelha, rosa, roxa e azul nas plantas. Elas desempenham múltiplas funções na planta, uma das ideias mais amplamente aceitas sobre a função das antocianinas foliares é que elas protegem as folhas contra estressores bióticos e abióticos. A capacidade delas de mitigar os efeitos adversos do excesso de luz nos cloroplastos é o tópico mais amplamente discutido. Outras possíveis funções úteis na planta, como a capacidade de atuar como agente quelante de metais em solos com excesso de íons metálicos também foram estudadas (LANDI et al., 2015). Essa produção de folhas novas com cor avermelhada pelas plantas é uma característica que pode ser modificada pelo ambiente. Folhas novas de cor vermelha podem diferir das folhas

novas de cor verde quanto à presença de múltiplas características de defesa, como cutícula melhorada, epiderme multicamadas e posição vertical da folha, com folhas jovens verdes podendo usualmente desenvolver mais tipos de defesa (HAN et al., 2019).

3.2 DOENÇAS DA ERVA-MATE

Com relação à parte aérea, destacam-se as doenças: **Mal da teia** causada por *Ceratobasidium niltonsouzanum*, doença que causa o desprendimento das folhas da erva-mate que ficam retidas no ramo por um filamento de micélio do fungo, característica que dá nome a doença (AUER e DOS SANTOS, 2016; LIMA et al., 2019). A **pinta preta** causada por *Cylindrocladium spathulatum*, doença que atinge principalmente folhas mais velhas, causando uma intensa desfolha das plantas (AUER e DOS SANTOS, 2016). E a **antracnose**, causada pelo gênero *colletotrichum*, doença que causa manchas necróticas escuras e irregulares, causando perfurações e deformações de folhas novas (AUER e DOS SANTOS, 2016).

Dentre as doenças que afetam o caule e o sistema vascular estão a podridão de caule, cuja etiologia ainda não é bem conhecida, doença que pode progredir e causar a morte da planta. (GRIGOLETTI e AUER, 1996). E a murcha vascular causada por *Ceratocystis fimbriata*. A doença atinge plantas de diferentes idades e é caracterizada pela murcha das plantas. Os fatores relacionados ao aparecimento desta doença em erva-mate ainda não foram estudados (DOS SANTOS et al., 2018).

Com relação às doenças que afetam o sistema radicular, destaca-se a podridão de raízes de erva-mate, causada por *Fusarium* spp. (AUER e DOS SANTOS, 2016). Fatores como aplicação incorreta de calcário e NPK (POLETTO et al., 2011) e ausência de sombreamento (POLETTO et al., 2009) estão associados ao aparecimento e progressão da doença. Outra doença fúngica que atinge o sistema radicular causando também problemas de podridão é a roseliniose causada por espécies do gênero *Rosellinia*, os fatores relacionados incluem a presença de restos vegetais em decomposição e solos argilosos (AUER e DOS SANTOS, 2016).

3.2.1 O gênero *Fusarium* na erva-mate

Fusarium é o patógeno de maior frequência na cultura da erva-mate (GRIGOLETTI JUNIOR e AUER, 2000; AUER e DOS SANTOS, 2016) . Em viveiros, *Fusarium* spp. pode causar a mortalidade de plântulas e de mudas (GRIGOLETTI JUNIOR e AUER, 2000; AUER e DOS SANTOS, 2016; VARGAS, 2020). No campo, o patógeno causa a doença conhecida como podridão radicular, duas espécies estão associadas, *F. solani* e *F. oxysporum* (POLETTTO et al., 2012; MEZZOMO et al., 2018; MEZZOMO et al., 2021). E pode estar associado com sementes, flores e frutos de erva-mate (POLETTTO et al., 2015; MIRESKI 2018).

A podridão de raízes é a principal doença da cultura, causando grandes perdas aos produtores. Os principais sintomas reflexos relatados para mudas incluem amarelecimento, estagnação do crescimento, clorose das folhas seguida de necrose, queda de folhas e necrose de raízes (POLETTTO et al. 2009; POLETTTO et al. 2012). Em plântulas o fungo ataca a região do colo, causando seu tombamento (GRIGOLETTI JUNIOR e AUER 1997). A podridão de raízes pode ocorrer tanto na fase de viveiro quanto à campo (GRIGOLETTI JUNIOR e AUER 2000).

Os estudos realizados sobre caracterização de espécies de *Fusarium* associadas à erva-mate encontram-se na TABELA 1.

TABELA 1 - Espécies de *Fusarium* isolados a partir de raízes de plantas adultas, mudas, sementes e estacas de erva-mate.

Parte da planta	Espécie/ complexo identificado	Gene (s)	Árvore filogenética	Caracterização morfológica	Teste de patogenicidade	Fonte
SEMENTE	<i>F. sterilihyphosum</i>					
	<i>F. graminearum</i> (complexo de espécies)	<i>tef1</i>	+	+	+	Vargas (2020)
	<i>F. graminearum</i>					
	<i>F. guttiforme</i>	<i>tef1</i>	-	-	-	Souza et al. (2019)
	<i>F. oxysporum</i>					
	<i>F. fujikuroi</i> (complexo de espécies)					
PLANTA	<i>F. graminearum</i> (complexo de espécies)	<i>tef1</i>	-	+	+	Mireski (2018)
	<i>F. solani</i> (isolado M7C1)	<i>tef1</i> ITS <i>tub2</i>	+	+	+	Mezzomo et al. (2018, 2021)
	<i>F. decemcellulare</i>					
RAIZ	<i>F. solani</i> (complexo de espécies)	<i>tef1</i>	+	+	+	Vargas (2020)
	<i>F. graminearum</i> (complexo de espécies)					
RAIZ PLANTA ADULTA	<i>F. solani</i>	<i>tef1</i> ITS <i>tub2</i>	+	+	+	Mezzomo et al. (2018, 2021)
	<i>F. oxysporum</i>					
	<i>F. oxysporum</i>					
	<i>F. solani</i>					
	<i>F. decemcellulare</i>	-	-	+	+	Poletto et al. (2006)
	<i>F. tabacinum</i>					
	<i>F. tricinatum</i>					
	<i>F. solani</i> (complexo de espécies)	ITS	+	+	+	Poletto et al. (2012)
	<i>F. oxysporum</i> (complexo de espécies)					
	<i>F. oxysporum</i>					
ACA	<i>F. pseudocircinatum</i>	<i>tef1</i>	-	-	+	Piassetta (2022)
EST	<i>F. fujikuroi</i> (complexo de espécies)					

Caracterização morfológica incluiu: pigmentação da colônia, microconídios, macroconídios, conidiogênese, clamidósporos. (+) realizado (-) não realizado.

3.3 O GÊNERO *Fusarium*

O gênero *Fusarium* contém importantes fitopatógenos, causando doenças em várias culturas (AOKI et al., 2014) e, duas espécies, *F. graminearum* e *F. oxysporum* estão entre os cinco principais fungos patógenos de plantas, com base em sua importância científica e econômica (DEAN et al., 2012). Espécies deste gênero de fungos são comumente encontradas em plantas, em restos vegetais e no solo, mas também são encontradas na água, no ar, em insetos e até mesmo em humanos e animais, podendo sobreviver na forma de clamidósporos ou escleródios por longos períodos de tempo (revisado por NIKITIN et al., 2023).

Dentro do gênero *Fusarium*, a maior parte das espécies patogênicas de plantas estão incluídas dentro de quatro complexos de espécies, complexo *F. oxysporum* complexo *F. graminearum*, complexo *F. fujikuroi* e complexo *F. solani*. Espécies desses complexos causam doenças em diversas culturas importantes ao redor do mundo, como soja, arroz, milho, trigo, cana de açúcar, banana e pinus, além de contaminarem os alimentos com micotoxinas (revisado por AOKI et al., 2014). *Fusarium* também é conhecido causador de doenças em humanos, podendo causar infecções em pessoas saudáveis, como é o caso da ceratite, e infecções oportunistas com risco de vida em indivíduos imunocomprometidos (O'DONNELL et al., 2020).

O gênero *Fusarium* está incluído dentro da família *Nectriaceae* (INDEX FUNGORUM, 2023) e foi descrito por Heinrich Friedrich Link em 1809, tendo sido validado por Fries em 1821, essa descrição foi baseada em *F. roseum*, dois espécimes avaliados posteriormente por Wollenweber e Reinking (1935) foram identificados como pertencendo às espécies *F. sambucinum* e *F. graminearum* (BOOTH, 1971).

Desde a descrição do gênero *Fusarium* em 1809 até o primeiro sistema taxonômico de *Fusarium* ser publicado (*Die Fusarien*), espécies eram muitas vezes definidas com base em sua associação com determinado hospedeiro, o que levou a descrição de aproximadamente 1000 espécies. Posteriormente a essa publicação, diferentes sistemas taxonômicos foram propostos, com isso, o número de espécies de *Fusarium* aceitas sofreu grandes alterações ao longo do tempo (SUMMERELL, 2019; NIKITIN et al., 2023).

O primeiro sistema taxonômico para o gênero *Fusarium* foi proposto por Wollenweber e Reinking em 1935, onde foram reconhecidas 65 espécies, pertencendo a 16 sessões. Posteriormente, Snyder e Hansen (1940) modificaram este sistema taxonômico, as 10 espécies da sessão Elegans foram reduzidas à espécie *F. oxysporum* (SNYDER e HANSEN 1940), a sessão Martiella foi reduzida à espécie *F. solani* (SNYDER e HANSEN 1941). Essa visão ultra reducionista reduziu o número de espécies de *Fusarium* para apenas 8 (SNYDER e HANSEN 1945). O objetivo era criar um sistema taxonômico, baseado em morfologia, que fosse simples de usar. A próxima publicação relevante sobre taxonomia de *Fusarium*, *The Genus Fusarium*, foi publicada por Booth (1971), onde foram descritas 44 espécies, agrupadas em 12 seções. Essa publicação é considerada relevante, pois mostrou a diversidade do gênero *Fusarium*. Gerlach e Nirenberg (1982) publicaram *The Genus Fusarium- a Pictorial atlas*, onde o sistema Wollenweber e Reinking foi expandido e foram descritas 78 espécies. Nelson et al. (1983) publicaram um manual de identificação cuja filosofia seguiu o sistema de Snyder e Hansen, o número de espécies foi reduzido para 41. A última importante publicação com objetivo de identificação de espécies do gênero *fusarium* baseada em morfologia foi publicada por Leslie e Summerell (2006), onde foram descritas cerca de 70 espécies.

De acordo com as alterações que ocorreram no Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas, definido em 2011 no XVIII Congresso Internacional de Botânica em Melbourne, Austrália, onde adotou-se o fim da dupla nomenclatura para Fungos, O nome *Fusarium* prevaleceu em detrimento no nome *Giberella* dada ao seu teleomorfo (HAWKSWORTH, 2012).

Recentemente o gênero *Fusarium* foi reavaliado e com base em análise filogenética o complexo de espécies *F. solani*, que consistia em um clado do gênero *Fusarium*, foi proposto como o gênero *Neocosmospora* (SANDOVAL-DENIS et al., 2019; CROUS et al., 2021). No entanto, tal proposição foi contestada por O'Donnell et al., (2020) e Geiser et al., (2021).

Com isso, existem atualmente 220 espécies aceitas de *Fusarium*, e 71 espécies de *Neocosmospora* (complexo de espécies *F. solani*) (CROUS et al., 2021).

A taxonomia de *Fusarium* é bastante complexa, e essa dificuldade na definição dos critérios de espécie levou ao surgimento do termo complexo de espécies, usado para designar um grupo de espécies que compartilham certas

características (NIKITIN et al., 2023). Essa abordagem foi inicialmente utilizada para os complexos *F. oxysporum* e *F. fujikuroi*, sendo que o termo complexo de espécies *F. fujikuroi* foi utilizado como alternativa ao termo seção liseola, do sistema taxonômico de Wollenweber e Reinking, a partir daí novos complexos foram sendo criados, e novas espécies descobertas foram sendo adicionadas a estes complexos (revisado por SUMMERELL, 2019).

Os principais marcadores macroscópicos que têm sido empregados na taxonomia deste gênero incluem cor e tipo de micélio aéreo e esporodóquios. Os principais marcadores microscópicos podem ser de origem sexual ou assexual. Os de origem sexual incluem o peritécio (cor, tipo de parede, ornamentação...) e ascósporos (forma, cor, septação...). Para a forma assexuada os principais marcadores incluem a célula conidiogênica (mono ou polifiálide), microconídios (forma, arranjo), macroconídios (forma geral, septação, tipo de célula basal e apical) e clamidósporos (SUMMERELL et al., 2003; CROUS et al., 2021).

Os caracteres morfológicos (sexuais e assexuais) do grupo *Neocosmospora* são bastante distintos, esse grupo não produz micotoxinas, e são fungos de solo frequentemente associados à podridão radicular. Este grupo forma um clado monofilético e bem suportado na filogenia (CROUS et al., 2021).

Como citado acima, antes do advento da filogenia molecular, a taxonomia de *Fusarium* era fortemente baseada em morfologia, tendo sido propostos vários sistemas de classificação nesse período. Hoje está fundamentada em análise filogenética multilocus (TAYLOR et al., 2000; AOKI et al., 2014; CROUS et al., 2021).

Importante destacar que para um pesquisador ou um diagnosticador, nem sempre as nuances taxonômicas interessam. Muitas vezes, anexar um nome ao seu isolado é tudo o que precisa. No caso de *Fusarium*, quando se trata de doenças bem documentadas, uma identificação a nível de complexo pode ser feita utilizando simplesmente morfologia. Utilizando-se de ferramentas moleculares somente quando a diagnose for mais complexa (SUMMERELL, 2019).

Quando é necessário empregar ferramentas moleculares, os genes *tef1* e *rpb2* destacam-se como os principais marcadores utilizados para identificar espécies dentro do gênero *Fusarium*. Ambos os genes exibem uma boa capacidade discriminatória e têm uma representação abrangente nos bancos de dados (GEISER et al., 2004; CROUS et al. 2021).

O gene do fator de alongamento 1-alfa (*tef1*) codifica uma enzima que

pertence ao grupo das GTPases e está presente em todos os organismos celulares, desempenhando um papel crucial na iniciação, extensão e finalização da tradução. Este gene tem sido amplamente empregado em análises filogenéticas (KEELING e INAGAKI, 2004). No contexto de *Fusarium*, o gene *tef1* é de grande importância filogenética, pois fornece informações altamente discriminatórias a nível de espécie, não apresenta cópias não ortólogas e foram desenvolvidos primers universais capazes de abranger toda a diversidade filogenética do gênero (GEISER et al. 2004).

O uso do gene *rpb2* para análises filogenéticas foi proposto por Liu et al. (1999). De acordo com estes autores, uma considerável taxa de heterogeneidade de substituição de aminoácidos foi observada nas sequências da proteína *rpb2*, sendo a região central a mais variável, o que confere a este gene boa capacidade de resolução, podendo ser usada para análises filogenéticas em táxons intimamente relacionadas, tal como ocorre no complexo *F. fujikuroi* (CROUS et al. 2021). De acordo com Frøslev et al. (2005) as regiões variáveis *rpb1* e *rpb2* aumentam a resolução e o suporte estatístico para espécies intimamente relacionadas. Este desempenho está relacionado à quantidade de sítios informativos.

Muitos outros genes, tais como *act1*, *tub2*, *cmdA* e *rpb1*, são frequentemente utilizados de maneira suplementar nesse processo. A escolha entre esses genes pode variar de acordo com o complexo de espécies em questão (CROUS et al., 2021). Um exemplo é o estudo para desvendar o complexo de espécies *F. fujikuroi*, no qual foram utilizadas as seguintes regiões gênicas: fator de alongação 1-alfa (*tef1*), β -tubulina (*tub2*), calmodulina (*cmdA*), subunidade grande da RNA polimerase (*rpb1*) e subunidade grande da RNA polimerase II (*rpb2*) (YILMAZ et al. 2021).

O uso inadequado ou confuso de nomenclatura científica em *Fusarium* tem historicamente representado um desafio significativo no estudo desse gênero. Com o propósito de superar essa questão, diversas bases de dados foram desenvolvidas especificamente para sequências de *Fusarium* spp., como FUSARIUM-ID (GEISER et al., 2004; TORRES-CRUZ et al., 2022), Fusarioid-ID www.fusarium.org (CROUS et al. 2021) e Fusarium MLST (<http://fusarium.mycobank.org>). Fusarioid-ID contém sequências de vários genes comumente utilizados para identificar *Fusarium* spp. e fungos semelhantes (*act1*, *cmdA*, *his3*, *rpb1*, *rpb2*, *tef1*, *tub2*, ITS e LSU).

Inicialmente, FUSARIUM-ID (GEISER et al., 2004) abarcava exclusivamente sequências do gene *tef1*, com alguns complexos de espécies de importância não

sendo adequadamente representados. A versão 3.0 do FUSARIUM-ID trouxe melhorias substanciais, incluindo metadados atualizados (como complexo de espécies, hospedeiro/substrato e localidade geográfica) e uma ampliação nas espécies representadas para o gene *tef1*. Agora, aproximadamente 270 espécies de *Fusarium*, pertencentes a 23 complexos, estão representadas (TORRES-CRUZ et al., 2022).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *Fusarium* spp.

Os isolados de *Fusarium* spp. foram obtidos de plantas sintomáticas de erva-mate de áreas produtoras dos municípios de União da Vitória, Colombo e Cruz Machado do estado do Paraná e Venâncio Aires e Espumoso do estado do Rio Grande do Sul, conforme a TABELA 2.

TABELA 2 - Origem dos isolados de *Fusarium* spp. de erva-mate usados neste estudo.

Estado	Parte da planta	Local de coleta	Código do isolado/ espécie	Tipo de sintoma		
PARANÁ	RAIZ	Casca	União da vitória	R2B	Casca parcialmente lesionada, com cor esbranquiçada nos tecidos internos. Lenho com tecidos apodrecidos.	PLANTA ADULTA
		Lenho	União da vitória	R3B		
	CAULE	União da vitória	T1A	Caule parcialmente apodrecido (planta viva)		
		União da vitória	T1B			
	BROTO	União da vitória	RM1A	Lesão na haste do broto		
		União da vitória	RM2			
União da vitória		RM3A				
FOLHA	Colombo	F2A	Lesão em folhas novas			
	Colombo	F2B				
RIO GRANDE DO SUL	RAIZ	Espumoso	R6A	Murcha e podridão radicular		
		Espumoso	R6B			
		Espumoso	R6C			
	Ilópolis	<i>F. solani</i> (EM01)*	Podridão radicular			
FOLHA	Venâncio Aires	F3	Lesão em folhas novas			
PARANÁ	SEMENTE	Ivaí	<i>F. sterilihyposum</i> (EM18)*	-	MATERIAL DE PROPAGAÇÃO	
	BROTO (Matriz clonal)	Colombo	RMM1A	Lesão na haste do broto		
	ESTACAS	Guarapuava	<i>F. oxysporum</i> (RF1)*	Podridão de estacas		
		Guarapuava	<i>F. pseudocircinatum</i> (RF4)*			
		Guarapuava	<i>F. pseudocircinatum</i> (RF5)*			
Folha da estaca	Colombo	FE1	Podridão de estacas			

*Isolados provenientes da coleção de Fungos e Oomicetos Florestais da Embrapa Florestas, Colombo, PR.

As amostras dos brotos e raízes sintomáticas foram processadas através do isolamento indireto, conforme segue: fragmentos de tecidos foliares e radiculares foram desinfestados superficialmente pela imersão em álcool 70% por 30 s e em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 40 s, seguido pela lavagem em água ultrapurificada e plaqueamento em meio batata-dextrose-ágar (BDA) (TABELA 5) acrescido de ampicilina (80 ppm) e cloranfenicol (40 ppm).

Para o método direto, as amostras de brotos e raízes sintomáticos foram mantidas em câmara úmida constituída de caixas 'gerbox' com papel mata-borrão umedecido com água ultrapurificada. Após o surgimento de estruturas do patógeno, estas foram transferidas com auxílio de uma agulha estéril para placas de Petri contendo meio BDA.

As placas de Petri foram incubadas em estufa a 24 °C, no escuro, por cinco dias. Após este período, as colônias de *Fusarium* obtidas foram purificadas por repicagem para placas contendo meio sintetic nutrient Ágar (SNA) (Tabela 5).

4.2 OBTENÇÃO DAS CULTURAS MONOSPÓRICAS

Utilizou-se o método de cultura monospórica adaptado de Jarek (2018). Porções de micélio esporulante do isolado de *Fusarium* cultivado em meio SNA por 10 dias, fotoperíodo de 12 h, foram transferidos para eppendorf de 2 mL, contendo 1 mL de água ultrapurificada e, em seguida, agitados por 30 s. Posteriormente, com auxílio de um pipetador automático foram realizadas diluições seriadas até atingir a concentração de 1×10^{-3} esporos/mL. Alíquotas de 100 uL das suspensões de esporos nas concentrações 1×10^{-2} e 1×10^{-3} foram depositadas sobre placas de Petri contendo meio ágar-água e espalhada na superfície do meio com auxílio de uma alça de Drigalski. Após 18h, os esporos individualizados e germinados foram transferidos para placas de Petri contendo meio SNA.

4.3 PRESERVAÇÃO DAS CULTURAS MONOSPÓRICAS

A preservação dos isolados de *Fusarium* foi realizada em água destilada estéril (CASTELLANI, 1967), conforme segue: frascos de vidro com capacidade de 10 mL foram preenchidos com água ultrapurificada até a metade da sua capacidade e autoclavados a 120 °C por 20 min. Cinco discos (5 mm de diâmetro) de meio de cultivo com micélio em crescimento ativo foram transferidos para cada frasco com o

auxílio de uma alça de platina, sendo feitos três frascos para cada isolado. Os frascos foram lacrados, identificados e depositados na Coleção de Fungos e Oomicetos Florestais Florestais da Embrapa Florestas, Colombo, PR.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Fusarium* spp.

4.4.1 Caracterização molecular

Extração do DNA, PCR e sequenciamento

As etapas de extração, PCR e sequenciamento foram realizadas pela empresa GoGenetic, Curitiba, PR. O DNA genômico foi extraído de culturas após 7 dias de cultivo em placas de Petri contendo meio BDA, incubadas sob fotoperíodo de 12 h e temperatura de 24 °C, usando Loccus Extracta Kit Fast – DNA/RNA viral, seguindo as recomendações do fabricante. Três locais, ou seja sequências parciais das regiões genômicas fator de alongação 1-alfa (*tef1*), β -tubulina (*tub2*) e segunda maior subunidade da RNA polimerase (*rpb2*) foram amplificadas e sequenciadas em ambas as direções. Os pares de primers e as condições da PCR estão na TABELA 3. A mistura da reação de PCR de 25 μ L consistiu de 2,5 μ L de tampão, 2,5 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 0,8 μ M de cada primer (*forward* e *reverse*), 1 U de GoTaq DNA Polimerase e 20-40 ng de DNA. Os produtos da PCR foram separados em gel de ágarose 2%, corados com Sybrsafe e examinados sob luz ultravioleta. Os fragmentos amplificados foram purificados com Exo/Sap (Thermo Fisher Scientific) O sequenciamento dos fragmentos foi conduzido em Genetic Analyser 3500xL, pop7, capilar 50cm -.

Análise filogenética

Os eletroferogramas foram avaliados e as fitas consenso foram obtidas usando o programa SeqAssem. As fitas consenso foram comparadas com as sequências de referência disponíveis em Fusarioid-ID (CROUS et al. 2021), Fusarium MLST (<http://fusarium.mycobank.org>) e NCBI's GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências mais relevantes das espécies de *Fusarium* encontradas foram usadas neste estudo e encontram-se na TABELA 4.

Todos os conjuntos de dados foram alinhados usando o programa Mega versão X (KUMAR et al., 2018), sendo o alinhamento ajustado manualmente, quando necessário. As análises filogenéticas por inferência Bayesiana e máxima

Likelihood foram realizadas no portal Cipres Science Gateway (MILLER et al., 2011). Para Máxima Likelihood foi utilizada a ferramenta RAxML hpc Blackbox, para 1000 bootstraps replicates. Para a Inferência Bayesiana foi utilizada a ferramenta MrBayes on XSEDE, com duas corridas paralelas, 04 cadeias de 10 000000 de gerações (das quais as 25% iniciais foram descartadas) e frequência amostral de 1000. As árvores foram visualizadas no Figtree v.1.4.4 (<https://github.com/rambaut/figtree/releases>) e editadas no Inkscape 1.1.1 (<https://inkscape.org/pt-br/release/inkscape-1.1.1/>).

TABELA 3: Primers e condições da PCR usadas neste estudo.

Locus	Primer		Condições da PCR		Referência
	Nome	Sequência (5'-3')*			
<i>tef1</i>	EF1-1018F	GAYTTCATCAAGAACATGAT	94 °C 5 min; 40 ciclos de 94 °C 50 s, 50 °C 50 s, 72 °C 50 s; 72 °C 7 min		Stielow et al. (2015) Stielow et al. (2015)
	EF1-1620R	GACGTTGAADCCACRATTGTC			
<i>rpb2</i>	fRPB2-5F	GAYGAYMGWGATCAYYTTYGG	95 °C 5 min; 35 ciclos de 94 °C 30 s, 51 °C 90 s, 68 °C 2 min; 68 °C 5 min		Liu, Whelen, e Hall (1999) Liu, Whelen, e Hall (1999)
	fRPB2-7cR	CCCATRGCTTGYTTRCCCAT			
<i>tub2</i>	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	95 °C 5 min; 35 ciclos de 95 °C 45 s, 52 °C 45 s, 72 °C 90 s; 72 °C 8 min		O'Donnell e Cigelnik (1997) O'Donnell e Cigelnik (1997)
	T2	TAGTGACCCCTTGCCCCAGTTG			

*R = A ou G; S = C ou G; W = A ou T; Y = C ou T

TABELA 4: Isolados de *Fusarium* usados neste estudo

Espécie	Identificação do isolado	N° acesso GenBank		Substrato	País	Referência
		<i>tef1</i>	<i>rpb2</i>			
<i>F. sterilihyphosum</i>	NRRL 25623 ^T	MN193869	MN193897	<i>Mangifera indica</i>	África do Sul	Laraba et al. (2019) O'Donnell et al. (2000)
<i>F. sacchari</i>	FRC R-6865	KU171729	KU171709	Desconhecido	Desconhecido	Brown et al. (2016) Laraba et al. (2019)
<i>F. sacchari</i>	NRRL 66326	MN193868	MN193896	Desconhecido	Desconhecido	Kim et al. (2020) Laraba et al. (2019)
<i>F. brevicatenuilatum</i>	NRRL 25447	MN193859	MN193887	<i>Striga asiatica</i>	Madagascar	Kim et al. (2020) Yilmaz et al. (2021)
<i>F. brevicatenuilatum</i>	CBS 404.97 ^T	MN533995	MT010979.1	<i>Striga asiatica</i>	Madagascar	Yang et al. (2020) Laraba et al. (2019)
<i>F. anthophilum</i>	NRRL 25214	MN193857	MN193885	<i>Hippeastrum</i> sp.	Alemanha	Proctor et al. (2013) Yilmaz et al. (2021)
<i>F. anthophilum</i>	CBS 119858	MN533990	MT010965.1	<i>Triticum aestivum</i>	EUA	Yang et al. (2020) Yilmaz et al. (2021)
<i>F. dlaminii</i>	CBS 119860 ^T	MW401995	KU171701	Restos de planta no solo	África do Sul	Brown et al. (2016) Al-Hatmi et al. (2016)
<i>F. ficicrescens</i>	CBS 125178 ^T	KU604452	MT010977.1	Frutos de figo	Irã	Yang et al. (2020)
<i>F. ficicrescens</i>	CBS 125177	-	MN534281	<i>Ficus carica</i> - frutos	Irã	Yilmaz et al. (2021) Kim et al. (2020)
<i>F. mexicanum</i>	NRRL 53147 ^T	JAAOAM010000080*	JAAOAM01000013	<i>Mangifera indica</i>	México	Otero-Colina et al. (2010) Sandoval-Denis. (2019)
<i>F. mexicanum</i>	NRRL 47473	-	LR792615.1	<i>Mangifera indica</i> - <i>inflorescência</i>	México	Otero-Colina et al. (2010) Yang et al. (2020)
<i>F. ananatum</i>	CBS 118516 ^T	MT010996	LT996137	<i>Ananas comosus</i>	África do Sul	Sandoval-Denis. (2019)

Continua...

TABELA 4: Isolados de *Fusarium* usados neste estudo (conclusão)

Espécie	Identificação do isolado	N° acesso GenBank			Substrato	País	Referência
		<i>tef1</i>	<i>rpb2</i>	<i>tub2</i>			
<i>F. ananatum</i>	CBS 118517	KU604417.1	MN534229.1	MN534090.1	África do Sul	Al-Hatmi et al. (2016) Yilmaz et al. (2021) Wingfield et al. (2018)	
<i>F. fracticaudum</i>	CBS 137234 ^T	PDNT01000006.1	PDNT01000004.1	KJ541048.1	Colômbia	Herron et al. (2015)	
<i>F. guttiforme</i>	CBS 409.97 ^T	MT010999.1	MT010967.1	MT011048	Brasil	Yang et al. (2020) Kim et al. (2020)	
<i>F. bulbicola</i>	NRRL 22947	JAAOAH010000458.1	JAAOAH01000091 2.1	KU171779.1	Alemanha	Brown et al. (2016) Laraba et al. (2019)	
<i>F. begoniae</i>	NRRL 25300 ^T	MN193858.1	MN193886	U61543	Alemanha	O'Donnell et al. (1998) Yang et al. (2020)	
<i>F. begoniae</i>	CBS 452.97	MT010998.1	MN534243	MN534101	Alemanha	Yilmaz et al. (2021)	
<i>F. sororula</i>	FCC 5425	JACWFA010000005.1	JACWFA01000000 7.1	JACWFA010000001 .1	Alemanha	Yilmaz et al. (2021)	
<i>F. marasgianum</i>	CMW:25512	JAJEQZ010000008.1	MN534249.1	MN534113.1	Colômbia	Van Der Nest (2021) Wingfield et al. (2022)	
<i>F. pininemorale</i>	CMW:25243 ^T	NFZR01000006.1	NFZR01000003.1	MN534115.1	Colômbia	Wingfield et al. (2017) Yilmaz (2019)	
<i>F. succisae</i>	NRRL 13298	KU171732.1	KU171712.1	JAAOAW01000031 4.1	Colômbia	Wingfield et al. (2017) Yilmaz (2019)	
<i>F. succisae</i>	CBS 219.76 ^{ET}	-	MW402766	U34419	Alemanha	Brown et al. (2016) Kim et al. (2020) Yilmaz et al. (2021)	
<i>F. ophioides</i>	CBS 118515	-	MN534298	MN534120	África do Sul	O'Donnell et al. (1998) Yilmaz et al. (2021)	
<i>F. ophioides</i>	CBS 118514	-	MN534302	MN534117	África do Sul	Yilmaz et al. (2021)	
<i>F. mexicanum (F2A)</i>					Brasil	Este estudo	
<i>F. mexicanum (F2B)</i>					Brasil	Este estudo	
<i>F. guttiforme (F3)</i>					Brasil	Este estudo	
<i>F. venenatum</i>	A 3/5	NC038012	LN649230	NC 038015.1	King (2014)	King (2014)	

(^T) Ex-type specimen (^E) Ex-epitype specimen. Abreviações para as coleções de cultura: (NRRL) USDA Agricultural Research Service Culture Collection, Peoria (Illinois), EUA; (FCR) Fusarium Research Center collection at Pennsylvania State University, University Park, USA; (CBS) Culture collection of the Central Bureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands; (CMW) the working collection of FABI, University of Pretoria, South Africa. (*tef1*) fator de elongação 1-alfa; (*tub2*) β-tubulina; (*rpb2*) segunda maior subunidade da RNA polimerase. *Códigos de acesso com esse formato se referem a depósitos de genoma.

4.4.2 CARACTERIZAÇÃO CULTURAL E MORFOLÓGICA

Os isolados de *Fusarium* foram caracterizados morfológicamente seguindo a metodologia descrita por Leslie e Summerell (2006). A composição dos meios de cultura utilizados encontra-se na TABELA 5.

Para cor de micélio aéreo e pigmentação difundida no meio, os isolados foram crescidos em tubos de ensaio contendo meio BDA natural. A incubação ocorreu no escuro sob temperatura de 24°C, por sete dias para cor do micélio aéreo e por 14 dias para cor difundida no meio. A avaliação das cores seguiu a metodologia de Nelson (1983).

Para a caracterização das células conidiogênicas (presença e tipo das falsas cabeças, presença de mono e polifálides), os isolados foram crescidos em placas de Petri contendo meio SNA. Para a formação de cadeias, o meio usado foi o KCl sob temperatura de 24°C e fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi realizada observando-se as placas diretamente no microscópio óptico, na objetiva de 20x.

Para a caracterização dos esporodóquios, os isolados foram crescidos em meio folha de cravo ágar (FCA) sob temperatura de 24°C e fotoperíodo de 12 horas ou luz negra contínua, para os isolados que não produziram na condição anterior. Os isolados que não produziram esporodóquios nas condições citadas anteriormente foram inoculados em folhas de erva-mate e incubados sob temperatura ambiente e fotoperíodo de 12h luz/escuro. A avaliação consistiu na observação da cor, tamanho e abundância das estruturas, usando microscópio estereoscópio. As avaliações foram realizadas semanalmente, por até cinco semanas.

Para caracterização dos clamidósporos, os isolados foram crescidos em meio solo-ágar (SA), sob temperatura de 24°C e escuro, por até cinco semanas. A avaliação consistiu na observação de lâminas montadas com azul de metileno, na objetiva de 40x. As avaliações foram realizadas semanalmente, por até cinco semanas. Os clamidósporos também foram observados em meio SNA.

Para a caracterização dos macro e microconídios foram confeccionadas lâminas a partir dos esporodóquios, formados nos ensaios descritos anteriormente, para macroconídios e, micélio esporulante de culturas crescidas em SNA para microconídios. As lâminas foram montadas usando líquido glicerinado e observadas ao microscópio óptico, na objetiva de 40x.

TABELA 5. Meios de cultivo utilizados neste estudo para a caracterização cultural e morfológica dos isolados de *Fusarium* spp.

Meio de cultura*	Composição	Forma de preparo	Incubação	Característica	Estruturas alvo	Referência
SNA	1 g KH ₂ PO ₄ 1 g KNO ₃ 0,5 g MgSO ₄ •7H ₂ O 0,5 g KCl 0,2 g Glucose 0,2 g Sucrose e 20 g Ágar 01 L H ₂ O	Os ingredientes foram misturados e autoclavados por 20 min a 121 °C.	24°C.	Este meio promoveu esporulação e bom desenvolvimento das células conidiogênicas. Clamidósporos também foram visualizados neste meio.	Microconídios, Células conidiogênicas, Clamidósporos.	Nirenberg (1976)
SA	250g de solo seco e peneirado 7,5 g Ágar 500 mL de H ₂ O	Os ingredientes foram misturados e autoclavados por 20 min a 121 °C. Para dispensar nas placas, o frasco foi constantemente agitado a fim de garantir a distribuição dos sólidos. A inoculação foi feita com grandes pedaços da cultura em crescimento ativo.	24°C escuro.	A formação de clamidósporos foi favorecida por este meio.	Clamidósporos.	Klotz et al (1988)
BDA	20 g Dextrose 20 g Ágar 250 g de batatas branca 01 L H ₂ O	As batatas foram lavadas, fatiadas e cozidas (500 mL de H ₂ O). Na sequência o caldo foi filtrado e o volume corrigido com água destilada. Misturou-se o caldo ao ágar (o ágar água foi preparado separadamente, usando 500 mL de H ₂ O) e então adicionou-se a dextrose. O volume final foi dispensado em tubos de ensaio e autoclavado.	24°C escuro até 14 dias.	Permitiu visualizar a cor do micélio aéreo e a cor difundida no meio.	Pigmentação.	Nelson et al. (1983)
FCA	Ágar água (2%), onde são adicionados pequenos pedaços de folha de cravo (<i>Dianthus caryophyllus</i>)	As folhas de cravo foram cortadas em pedaços de 5x5 mm, esterilizadas em autoclave e adicionadas nas placas de Petri contendo o meio ainda fundido, na proporção de um pedaço de folha de cravo para cada 2 ml de meio.	24°C. Fotoperíodo de 12 horas ou luz negra contínua.	Este meio promoveu bom crescimento, a formação de esporodóquios e a produção de conídios uniformes com morfologia típica.	Esporodóquios, Macroconídios.	Fisher et al (1982)
KCI	4-8 g/L KCl 20g Ágar 01 L H ₂ O	O meio ágar- água foi preparado e então adicionou-se o KCl.	24°C e fotoperíodo de 12 horas.	-	Cadeias de microconídios.	Fisher et al (1983)

*Synthetic Nutrient Ágar (**SNA**), Solo Ágar (**SA**), Batata Dextrose Ágar (**BDA**), Folhas de Cravo Ágar (**FCA**), Cloreto de Potássio Ágar (**KCI**).

4.5 PATOGENICIDADE E MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp. EM ERVA-MATE.

4.5.1 Caracterização de folhas da erva-mate.

Para padronizar as folhas a serem utilizadas nos métodos de inoculação, folhas jovens e maduras de plantas adultas de erva-mate foram coletadas e agrupadas em cinco tipos (I, II, III, IV e V). Essa categorização foi baseada na presença de brilho e pegajosidade, que estão relacionadas com a deposição de cera epicuticular, bem como na consistência do limbo foliar (flexível ou quebradiço) e cor da superfície adaxial (Figura 1).

Tipo I: Folha jovem com presença de brilho intenso em ambas as faces, tornando-se pegajosa quando pressionada entre os dedos. O limbo foliar é relativamente quebradiço, e a coloração varia em tons de verde ou avermelhado mais claro.

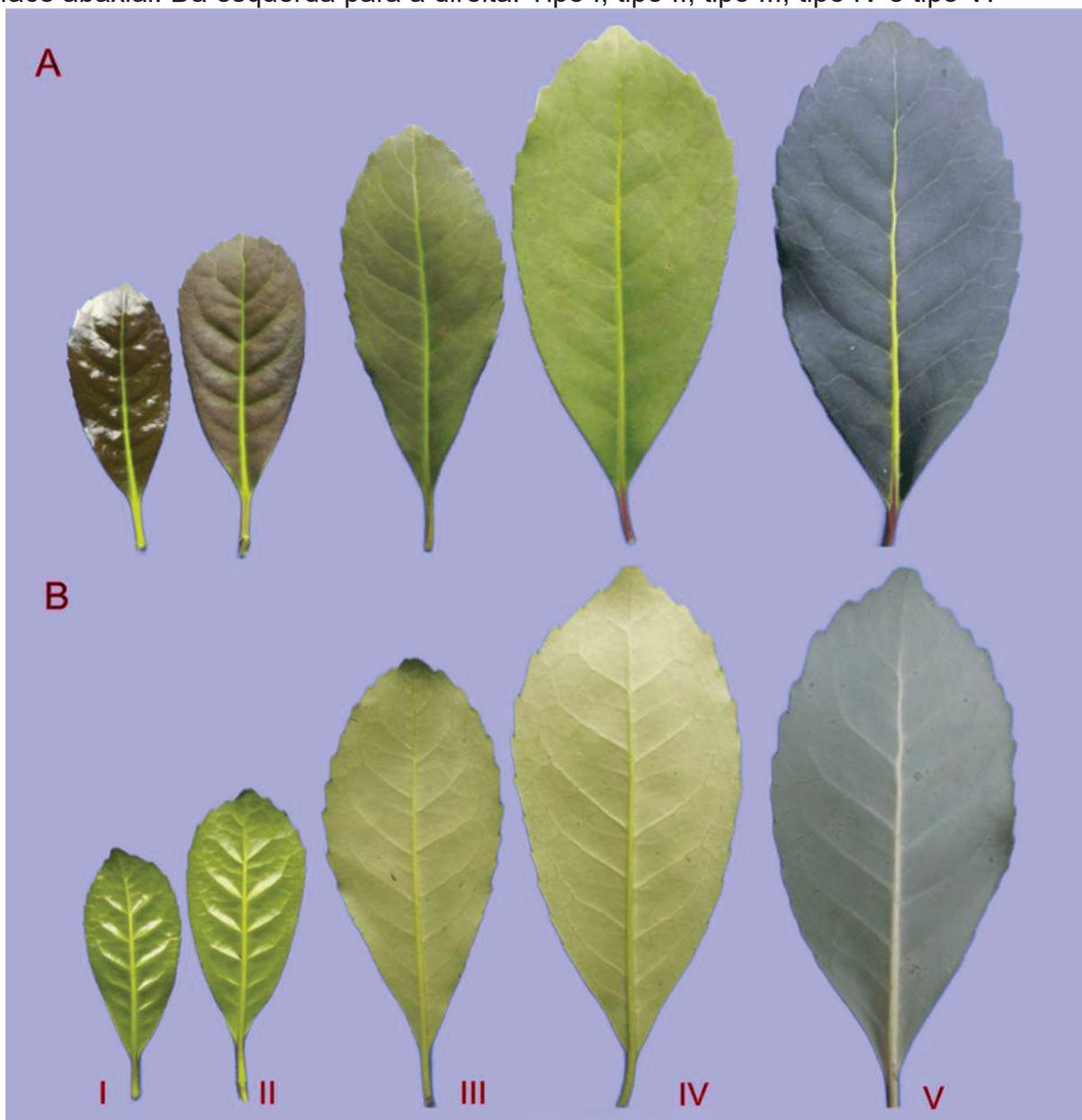
Tipo II: Folha jovem com brilho intenso apenas na face abaxial, podendo adquirir pegajosidade ao ser pressionada entre os dedos. O limbo foliar é pouco quebradiço, com coloração em tons de verde ou avermelhado mais claro.

Tipo III: Folha jovem sem brilho e pegajosidade ausente. O limbo foliar é flexível, mantendo uma coloração em tons de verde ou avermelhado mais claro.

Tipo IV: Folha ainda considerada jovem, mas completamente expandida, sem brilho e não pegajosa quando pressionada entre os dedos. O limbo foliar é bastante flexível. As folhas usualmente tendem a perder gradativamente a pigmentação avermelhada o longo do estágio anterior, dando a este estágio uma cor predominantemente verde-claro, embora possa apresentar tons mais escuros.

Tipo V: Folha madura, sem brilho e não pegajosa ao ser pressionada entre os dedos. O limbo foliar é quebradiço e possui uma coloração verde-escura.

Figura 1: Tipos de folhas de erva-mate usados neste estudo. (A) face adaxial e (B) face abaxial. Da esquerda para a direita: Tipo I, tipo II, tipo III, tipo IV e tipo V.



Fonte: O autor (2023)

4.5.2 Teste de patogenicidade dos isolados de *Fusarium* spp. em folhas destacadas.

O teste de patogenicidade em folhas destacadas foi realizado para todos os isolados, usando folhas de erva-mate do tipo III (Figura 1), provenientes de plantas adultas do clone Aupaba. As folhas de erva-mate foram desinfestadas superficialmente (imersão em álcool 70% por 5s e hipoclorito de sódio a 1% por

30s). O pecíolo foi envolto com algodão esterilizado e umedecido com água ultrapurificada.

Para a inoculação foram realizados cinco ferimentos na porção central do limbo foliar próxima à nervura central, utilizando uma agulha estéril. A inoculação consistiu da deposição de um disco (7 mm de diâmetro) de BDA contendo micélio em crescimento ativo do isolado de *Fusarium* sp. sobre a região ferida. O experimento foi conduzido em caixa 'gerbox' contendo duas folhas de papel mata-borrão umedecidas com água ultrapurificada esterilizada. Foram colocadas três folhas de erva-mate por gerbox e quatro gerbox por tratamento, totalizando 12 folhas por isolado. O material foi incubado sob fotoperíodo de 12 horas, em sala climatizada com temperatura de 24 °C.

A avaliação consistiu na medição do tamanho da lesão com auxílio de um paquímetro digital aos quatro dias após a inoculação. Mediu-se também a área lesionada aos seis dias após a inoculação utilizando o *software* Quant (VALE et al., 2003).

4.5.3 Teste de patogenicidade dos isolados de *Fusarium* spp. em brotos de plantas adultas.

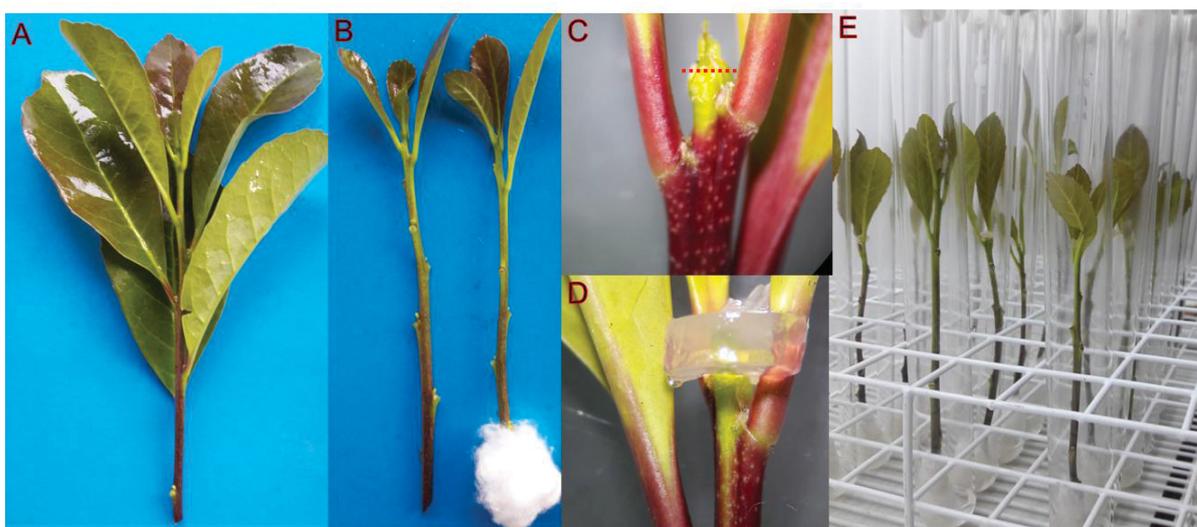
Plantas adultas do clone Aupaba foram inoculadas utilizando o método de pino de mapa descrito por Talgø e Stensvand (2013). Foram inoculados isolados de *F. guttiforme* (isolado F3), *F. mexicanum* (isolados F2A e F2B) e do complexo *F. fujikuroi* (isolados RM3A e FE1). Os isolados de *Fusarium* spp. foram crescidos em placas de Petri contendo meio BDA, por sete dias. Inicialmente, o pino foi introduzido no broto da planta, na região próxima ao meristema apical, produzindo uma abertura (transpassando todo o diâmetro do broto), com auxílio do mesmo pino, foi colocada uma porção de micélio da colônia de *Fusarium* sp.. O pino foi mantido nesta região por todo o período de condução do experimento. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo que cada isolado foi considerado um tratamento e cada repetição foi constituída de um broto.

A avaliação foi realizada aos 21 dias após a inoculação e consistiu na observação da presença ou não de sintomas na região inoculada. Procederam-se os reisolamentos em meio de cultura BDA.

4.5.4 Método de inoculação de isolados de *Fusarium* spp. em brotos destacados.

Para esse método foram utilizados brotos destacados do clone EC25 e isolados de *F. guttiforme* (isolado F3), *F. mexicanum* (isolados F2A e F2B) e do complexo *F. fujikuroi* (isolado RM3A). Brotos com cerca de 13 cm de comprimento tiveram as folhas laterais removidas e sendo mantidas apenas algumas folhas pequenas do ápice (Figura 2B)). Os brotos foram previamente desinfestados com solução de hipoclorito de sódio (0,5 %) por 50s e lavados por imersão em água destilada esterilizada. A base do broto foi cortada em bisel e um chumaço de algodão foi colocado nesta região (Figura 2B). Para a realização do ferimento, foi realizado um corte, com auxílio de um bisturi, na região do meristema apical, com cuidado para não cortar as folhas próximas (Figura 2C). Em seguida, um disco de BDA (4,5 mm de diâmetro) obtido da borda da colônia do isolado de *Fusarium* foi posicionado sobre este ferimento (Figura 2D). Em seguida, o broto foi colocado em um tubo de ensaio (2,5 x 25 cm) contendo 3,5 mL de água destilada esterilizada, o qual foi parcialmente vedado com algodão esterilizado.

Figura 2: Etapas do processo de inoculação em brotos destacados de erva-mate: A - broto antes da remoção das folhas; B - broto preparado para inoculação - folhas já removidas, corte em bisel na base e algodão envolvendo a base; C - detalhe do corte no ápice do broto; D - disco de meio batata-dextrose-água com micélio do isolado de *Fusarium* sp. depositado na região ferida do broto; E - disposição dos brotos inoculados nos tubos de ensaio.



Fonte: O autor (2023)

A incubação foi realizada em condições de laboratório, sob fotoperíodo de 12

h (duas lâmpadas de 40W). A avaliação foi realizada aos seis dias após a inoculação, contando-se o número de brotos em que ocorreram sintomas e medindo-se o comprimento da região lesionada. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com sete repetições e os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA e teste de Tukey a 5% de probabilidade, usando o *software* R.

4.5.5 Métodos de inoculação de isolados de *Fusarium* spp. em folhas destacadas

Nos métodos de inoculação optou-se por trabalhar apenas com os isolados de *Fusarium* spp. obtidos de parte aérea, pois alguns destes foram caracterizados também molecularmente. Não foi possível utilizar o mesmo clone de erva-mate para todos os ensaios, devido a não disponibilidade de folhas.

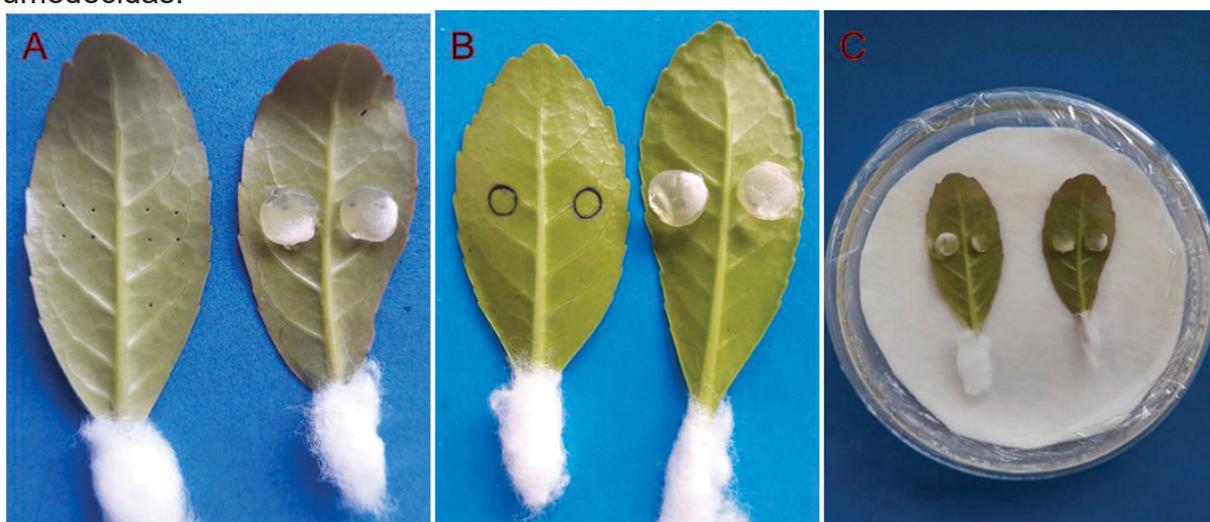
Inoculação sem ferimento. Para este método, foram utilizadas folhas destacadas tipo II do clone Aupaba e isolados de *F. guttiforme* (isolado F3), *F. mexicanum* (Isolados F2A e F2B), *F. sterilihyphosum* (isolado EM18) e demais isolados dos complexos *F. fujikuroi* (isolados RM3A, FE1, RF4, RF5, RF8 e RMM1A) e *F. graminearum* (isolados RM1A e RM2). A inoculação consistiu em colocar discos (7 mm de diâmetro) de BDA com micélio fúngico em crescimento ativo sobre a superfície abaxial da folha, sem ferimento. As folhas foram desinfestadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio (0,5 %) por 50s, seguido de lavagem em água ultrapurificada esterilizada. O experimento foi conduzido em caixa 'gerbox' contendo duas folhas de papel mata-borrão umedecidas com água ultrapurificada esterilizada. O material foi incubado em estufa na temperatura de 24 °C e fotoperíodo de 12h. Do quarto até o décimo dia após a inoculação foram realizadas avaliações diárias para verificar o aparecimento de lesões (considerou-se, para isso, uma lesão, que independente da sua forma, possuísse um tamanho maior que 5 mm de diâmetro). Foram utilizados três pontos de inoculação por folha e cinco folhas para cada tratamento.

Inoculação com ferimento (FD1). Neste ensaio, foram utilizadas folhas do tipo II do clone EC25 e isolados de *F. guttiforme* (isolado F3) e *F. mexicanum* (Isolados F2A e F2B). Para a inoculação em folhas destacadas com ferimento (FD1), utilizou-se a seguinte metodologia: as folhas foram desinfestadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio (0,5 %) por 50s, seguido de lavagem em água

ultrapurificada esterilizada. O pecíolo das folhas foi envolto com algodão esterilizado e umedecido com água ultrapurificada. Os ferimentos consistiram de quatro furos, usando uma agulha estéril, dispostos na forma de um quadrado e distanciados em três mm um do outro. Sobre este ferimento, foi posicionado na face abaxial da folha um disco de BDA (7 mm de diâmetro) e este procedimento foi repetido em cada lado da nervura principal (Figura 3). A testemunha recebeu apenas o disco de BDA sem o fungo. O ensaio foi conduzido em caixas 'gerbox' contendo duas folhas de papel mata-borrão umedecido com água ultrapurificada esterilizada. Foram utilizadas oito folhas de erva-mate por tratamento, sendo cada folha considerada uma repetição. A incubação foi realizada em estufa estufa a 24 °C e fotoperíodo de 12h.

Inoculação com ferimento (FD2). O método de inoculação em folhas destacadas com ferimento foi repetido com algumas variações nos procedimentos (FD2). Os ajustes em relação ao método anterior se referem ao processo de desinfestação (0,5 % por 120s), tipo de ferimento (uso de um furador de 3 mm de diâmetro (Figura 3B)), uso de placas de Petri esterilizadas no lugar de 'gerbox' (Figura 3C) e incubação em sala com temperatura controlada de 24 °C. Foram utilizadas sete folhas de erva-mate por tratamento, sendo cada folha considerada uma repetição. Neste ensaio foram utilizadas folhas destacadas, do clone Yari.

Figura 3: Inoculação em folhas destacadas de erva-mate: A – quatro furos em forma de um quadrado; B – ferimento feito com um furador (3 mm de diâmetro); C – folhas dispostas em placa de Petri contendo duas folhas de papel mata-borrão umedecidas.



Fonte: O autor (2023)

A avaliação dos ensaios foi realizada oito dias após a inoculação para o

primeiro ensaio e quatro dias para o segundo, contando-se o número de pontos de inoculação em que ocorreram sintomas e medindo-se o diâmetro das lesões (a medição foi realizada nos dois sentidos da lesão, utilizando-se a média das duas leituras). Como foram realizados dois pontos de inoculação por folha, o diâmetro final foi obtido pela média das duas lesões formadas, ou, quando apenas uma lesão presente, pelo diâmetro desta. Procederam-se os reisolamentos em meio de cultura BDA. O primeiro ensaio foi analisado em delineamento inteiramente casualizado com parcela perdida, e o segundo ensaio, em delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA e teste de separação de médias de Tukey a 5% de probabilidade, usando o *software* R.

5 RESULTADOS

Nos isolamentos foram obtidos 14 isolados de *Fusarium* spp., sendo oito de brotos, dois de caule e quatro de raízes (Tabela 6). Os isolados foram identificados por filogenia e morfologia. Os isolados obtidos de brotos pertencem aos complexos *Fusarium fujikuroi* e *F. graminearum*. No complexo *F. fujikuroi* foram identificadas duas espécies: *F. guttiforme* e *F. mexicanum*. Os isolados obtidos de raízes e caule pertencem aos complexos *F. solani* e *F. oxysporum*. (TABELA 6).

TABELA 6: Espécies e complexos de espécies de *Fusarium* identificados neste estudo.

Complexo	Espécie	Isolado	Identificação		Patogenicidade	Doença
			Morfológica	Filogenética		
<i>F. fujikuroi</i>	<i>F. guttiforme</i>	F3	+	+	++*	Morte dos ponteiros
	<i>F. mexicanum</i>	F2A e F2B	+	+	++*	
	<i>Fusarium</i> sp.	FE1	+	-	+ -*	Podridão de estaca
	<i>Fusarium</i> sp.	RM3A	+	-	++*	Morte dos ponteiros
	<i>Fusarium</i> sp.	RMM1A	+	-	+ -	
<i>F. graminearum</i>	<i>Fusarium</i> spp.	RM1A e RM2	+	-	+ -	Morte dos ponteiros
<i>F. solani</i>	<i>Fusarium</i> spp.	T1A e T1B	+	-	+ -	Podridão de caule
	<i>Fusarium</i> spp.	R2B, R3B e R6B	+	-	+ -	Podridão de raízes
<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium</i> sp.	R6C	+	-	+ -	Podridão de raízes

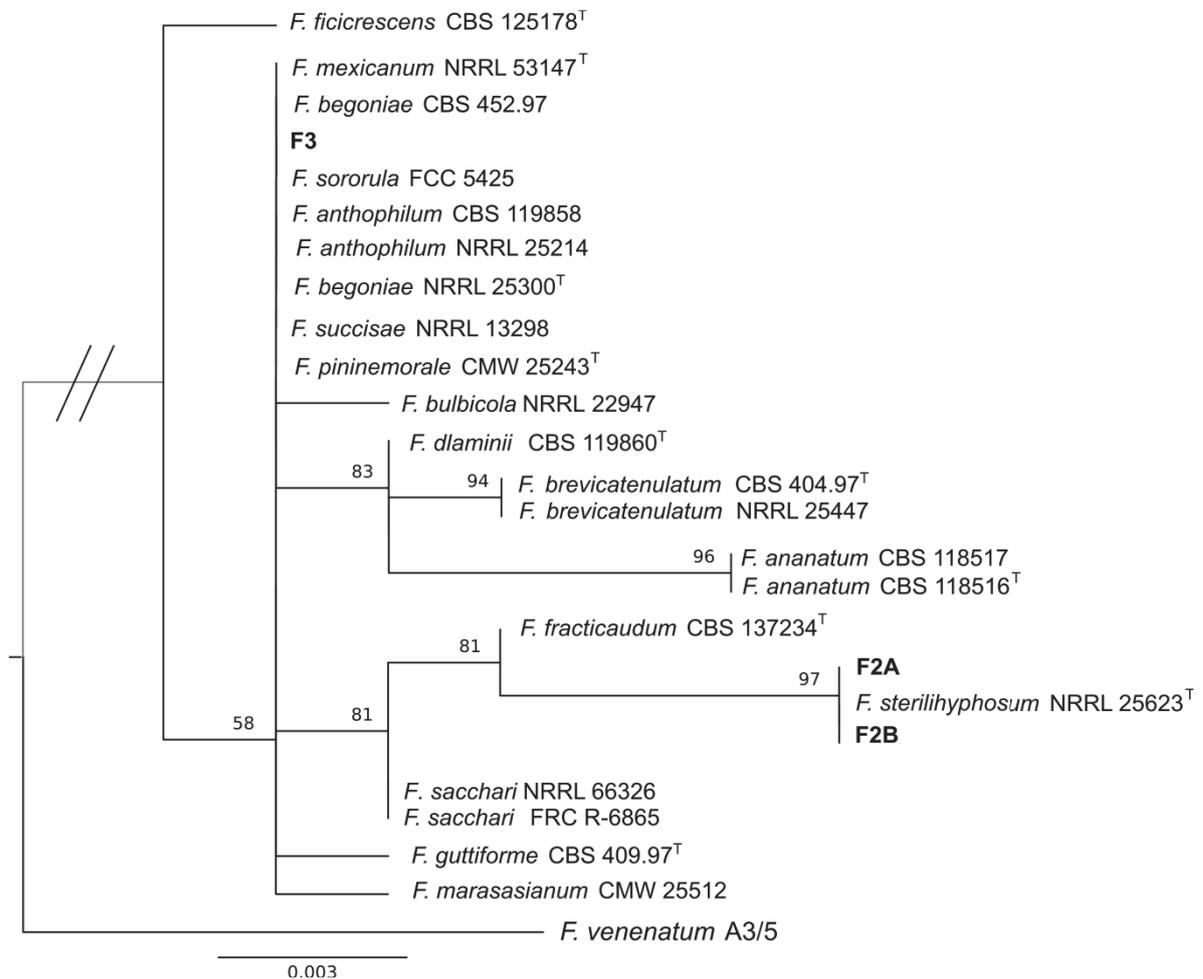
Teste de patogenicidade positivo para: (+) Folhas destacadas; (++) Folhas destacadas e brotos destacados; (*) Brotos de plantas adultas à campo; (-) Não realizado.

5.1 CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA

Apenas os isolados F3, F2A e F2B, do complexo *Fusarium fujikuroi* (pertencentes às espécies *F. guttiforme* e *F. mexicanum*), foram identificados por filogenia. Estes isolados foram selecionados com base em sua agressividade.

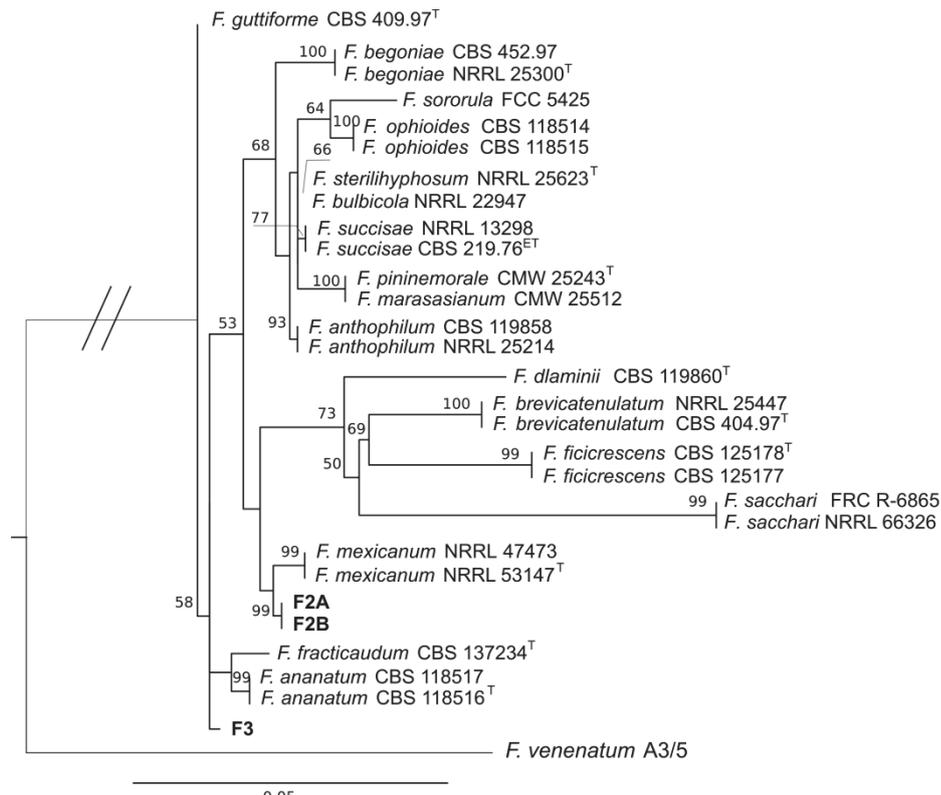
Para os isolados F2A e F2B de *Fusarium* spp., a filogenia individual dos genes mostrou concordância para *rpb2* e *tub2*, agrupando F2A e F2B junto com o clado *F. mexicanum*. No entanto, para *tef1*, os isolados F2A e F2B foram agrupados junto com o clado *F. sterilihyphosum*. Para o isolado F3, embora para os genes *rpb2* e *tub2* este isolado tenha se aproximado da espécie *F. guttiforme*, este clado não pôde ser resolvido por nenhum dos genes individuais. As Figuras 4, 5 e 6 mostram os resultados das análises de máxima likelihood para *tef1*, *rpb2* e *tub2*, respectivamente.

Figura 4: Árvore filogenética obtida por máxima Likelihood com base no gene *tef1* .



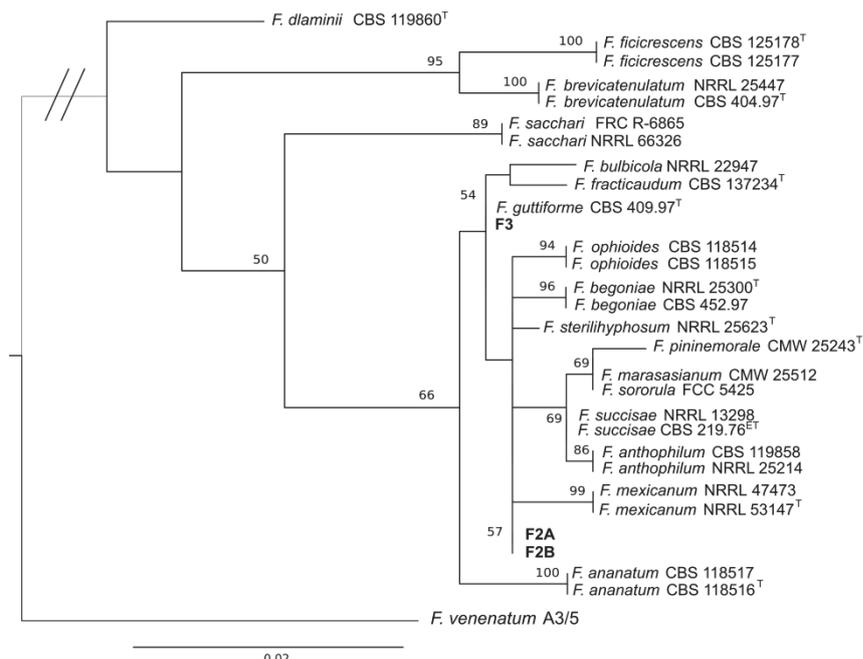
Filogenia do gene *tef1*, de espécies do complexo *F. fujikuroi*. *F. venenatum* (A3/5) foi utilizado como out-group. Os valores de suporte de bootstrap >50 (ML) são mostrados nos nós. (^T) Ex-type espécime; (^{ET}) Ex-epitype espécime. Os isolados caracterizados neste estudo estão destacados em negrito.

Figura 5: Árvore filogenética obtida por máxima Likelihood com base no gene rpb2.



Filogenia do gene *rpb2*, de espécies do complexo *F. fujikuroi*. *F. venenatum* (A3/5) foi utilizado como out-group. Os valores de suporte de bootstrap >50 (ML) são mostrados nos nós. (^T) Ex-type espécime; (^{ET}) Ex-epitype espécime. Os isolados caracterizados neste estudo estão destacados em negrito.

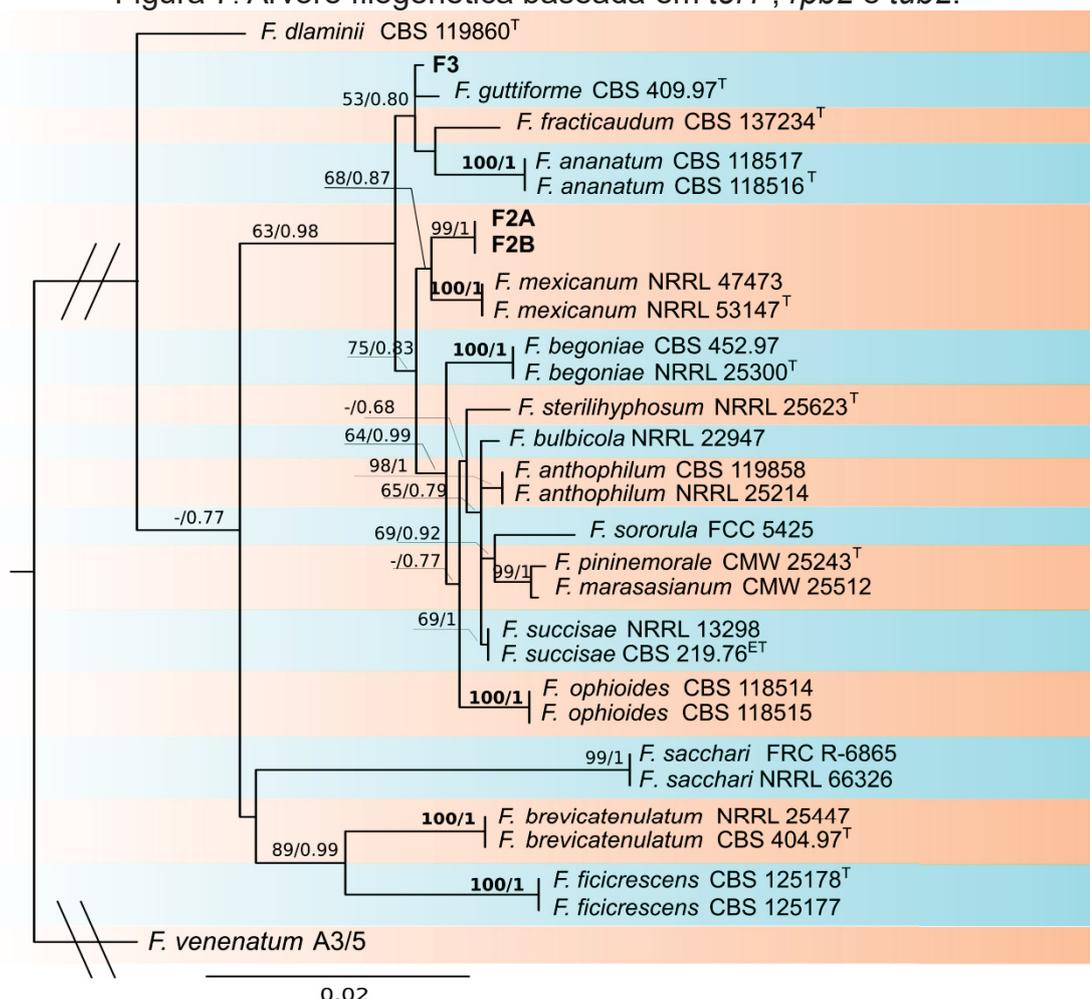
Figura 6: Árvore filogenética obtida por máxima Likelihood com base no gene tub2.



Filogenia do gene *tub2*, de espécies do complexo *F. fujikuroi*. *F. venenatum* (A3/5) foi utilizado como out-group. Os valores de suporte de bootstrap >50 (ML) são mostrados nos nós. (^T) Ex-type espécime; (^{ET}) Ex-epitype espécime. Os isolados caracterizados neste estudo estão destacados em negrito.

O alinhamento concatenado incluiu 30 sequências, todas do complexo *F. fujikuroi*, com exceção do out-group, e 1897 pares de base. O isolado F3 agrupou com *F. guttiforme* Nirenberg and O'Donnell; no entanto, este ramo apresentou um baixo suporte estatístico (53% de bootstrap e 0,80 de probabilidade posterior), sendo suportado apenas pela árvore concatenada (Figura 7). Os isolados F2A e F2B agruparam com o clado *F. mexicanum* T. Aoki, S. Freeman, Otero-Colina, Rodr.-Alv., Fern.-Pavía, R.C. Ploetz e O'Donnell com um suporte estatístico de 68% de Bootstrap e 0,87 de Probabilidade Posterior; este ramo foi suportado por dois dos três genes analisados. Dentro do clado *F. mexicanum*, a separação de F2A e F2B em um ramo distinto foi sustentado por dois dos três genes analisados e com suporte estatístico de 99% de bootstrap e 1 de probabilidade posterior, sugerindo fortemente que pode se tratar de uma nova espécie filogenética.

Figura 7: Árvore filogenética baseada em *tef1*, *rpb2* e *tub2*.



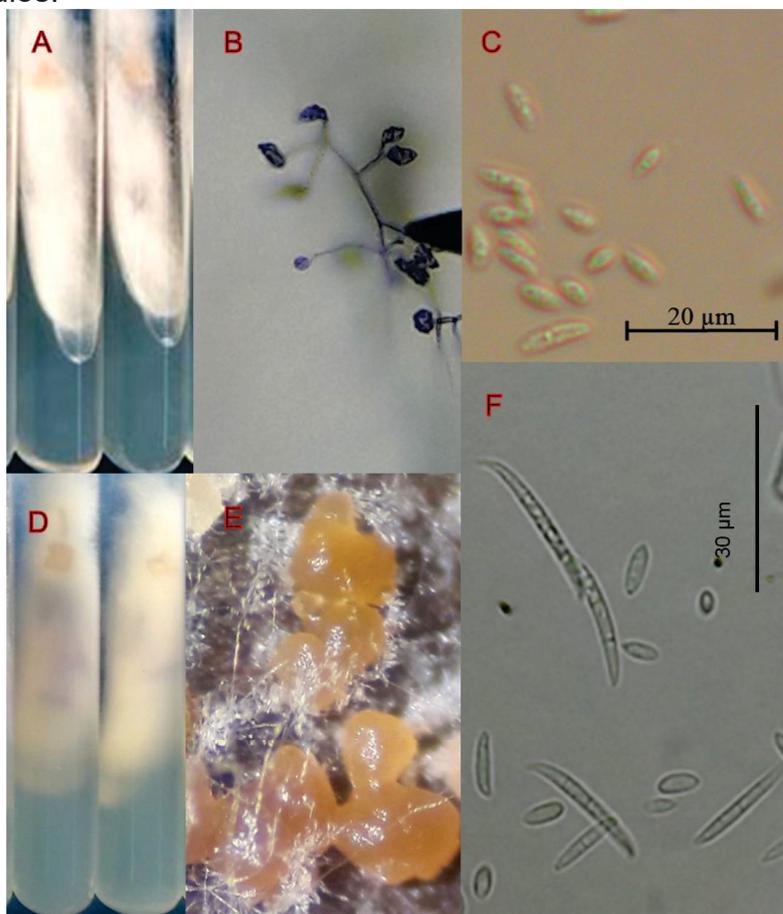
Filogenia combinada dos genes *tef1*, *rpb2* e *tub2*, de espécies do complexo *F. fujikuroi*. *F. venenatum* (A3/5) foi utilizado como out-group. Os valores de probabilidade posterior Bayesiana >0,65 (IB) e valores de suporte de bootstrap >50 (ML) são mostrados nos nós. (^T) Ex-type espécime; (^{ET}) Ex-type espécime. Os isolados caracterizados neste estudo estão destacados em negrito.

5.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

5.2.1 Complexo *Fusarium fujikuroi*.

O isolado F3 identificado como *F. guttiforme* apresentou micélio aéreo cotonoso, de cor branca e pigmentação difundida no meio não visualizada (Figura 8). Os microconídios foram abundantes em micélio aéreo, sendo formados em falsas cabeças de tamanho médio, usualmente sob monofiálides, mas ocasionalmente sob polifiálides, de formato oval à obovóide, usualmente sem septos, mas ocasionalmente 1 septo. Os esporodóquios de cor laranja foram formados somente sobre as folhas de erva-mate. Macroconídios delgados, retos à levemente curvados, com célula basal em forma de pé e pouco desenvolvida e célula apical em forma de bico, tendo entre 3 e 5 septos, sendo mais comumente encontrado 3 septos. Não se observou a presença de clamidósporos. Foi observado a presença de hifa espiralada (Figura 8).

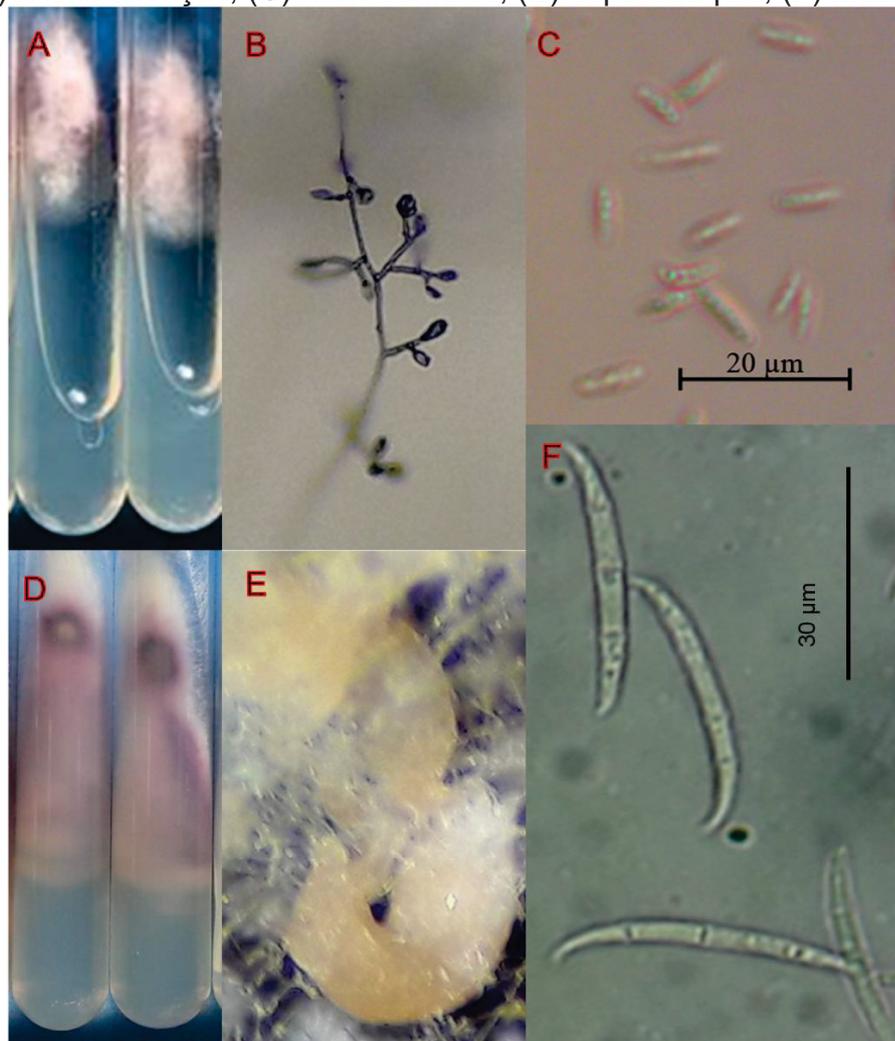
Figura 8: Características morfológicas de *Fusarium guttiforme*. (A e D) características da colônia; (B) falsas cabeças; (C) microconídios; (E) esporodóquios; (F) macroconídios.



Fonte: O autor (2022)

Os isolados F2A e F2B identificados como *F. mexicanum* apresentaram micélio aéreo cotonoso, cor roxa (quase branco) e pigmentação difundida no meio não visualizada (Figura 9). Os microconídios foram formados abundantemente em micélio aéreo, sendo formados em falsas cabeças médias em tamanho, em monofiálides e polifiálides, de formato elipsoidal (mais comum) e alantóide, contendo entre 0 e 1 septos; o tipo não septado foi o mais comum. Os esporodóquios de cor creme, com leve tom de laranja foram formados somente sobre folhas de erva-mate. Macroconídios delgados, levemente curvos, geralmente mais largos na parte média de seu comprimento e se estreitando em ambas as extremidades, com célula basal usualmente em forma de pé, célula apical em forma de bico leve, tendo usualmente entre 03 e 06 septos. Não se observou a presença de clamidósporos (Figura 9).

Figura 9: Características morfológicas de *F. mexicanum*. (A e D) características da colônia; (B) falsas cabeças; (C) microconídios; (E) esporodóquio; (F) macroconídios.



Fonte: O autor (2022)

As características morfológicas dos demais isolados do complexo *F. fujikuroi* - FE1, EM18, RM3A, RF8, RF4, RF5 e RMM1A - encontram-se a seguir:

Esses isolados não formaram clamidósporos.

Os macroconídios dos isolados FE1, EM18, RM3A, RF8, RF4, RF5 e RMM1A foram característicos do complexo *F. fujikuroi*, delgados, retos ou levemente curvos, com célula basal usualmente em forma de pé e célula apical em forma de bico (TABELA 7 e Figura 10).

TABELA 7: Características de macroconídios (forma geral, tipo de célula apical e basal e número de septos) de isolados do complexo *F. fujikuroi*.

Isolado/ espécie	Forma geral	Célula basal	Célula Ap.	Nº de septos
FE1	Delgado, reto à levemente curvado, parede fina	Forma de pé e pouco desenvolvida	01	3 - 5
EM18*	=	Forma de pé	01	3 - 5
RM3A	=	Pouco desenvolvida	01	3 - 6
RF8**	=	Usualmente forma de pé	02	3 - 4
RF4**	=	=	02	3 - 5
RF5**	=	=	02	3 - 5
RMM1A	=	=	02	3 - 4 -5

(=) igual anterior; (**negrito**) valor mais comum. Tipos de célula apical: (1) bico leve; (2) bico.

F. sterilihyphosum* e *F. pseudocircinatum*, Coleção de Fungos e Oomicetos Florestais da Embrapa Florestas.

Figura 10: Tipos de Macroconídios. (A e B) delgado, reto a levemente curvado, parede fina, isolados EM18 e RM3A, respectivamente; (C) célula basal em forma de pé e célula apical em em forma de bico bastante evidentes.



Fonte: O autor (2022)

Os microconídios dos isolados FE1, EM18, RM3A, RF8, RF4, RF5 e RMM1A foram formados, em sua maioria, em falsas cabeças, sob monofiálides e polifiálides (TABELA 8 e Figura 11). As características tamanho da falsa cabeça, comprimento da célula fialidica e abundância das falsas cabeças, são resultado de comparação entre todos os isolados caracterizados neste estudo.

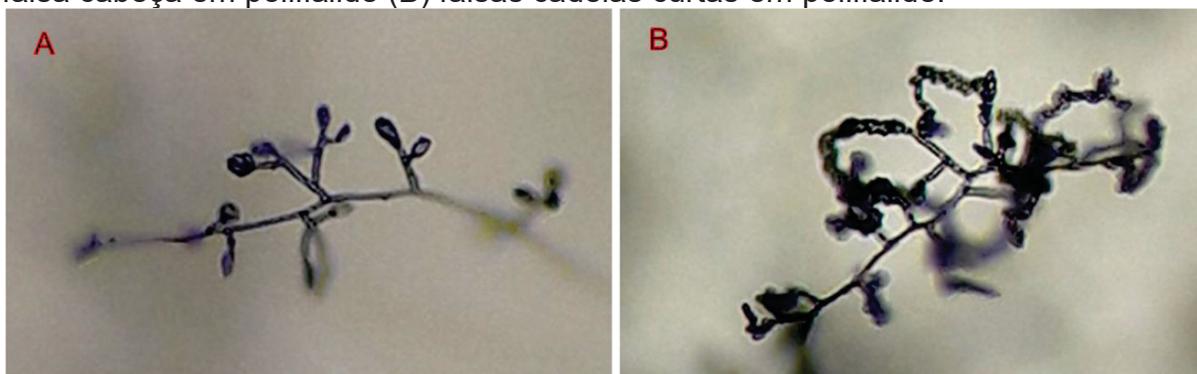
TABELA 8: Características das células conidiogênicas (presença de polifiálide, tamanho da falsa cabeça, comprimento da célula fialidica e presença de cadeia) de isolados do complexo *Fusarium fujikuroi*.

Isolado/ Espécie	Mono	Poli	Abundância das falsas cabeças	Tamanho	Fiálide (comprimento)	Cadeias
FE1	+	+	Abundante	Médio	Médio	
EM18*	+	+	Muito abundante	Médio	Médio	-
RM3A	+	+	Muito abundante	Médio	Médio	-
RF8**	+	+	Abundante	Médio	Médio	+
RF4**	+	+	Muito abundante	Médio	Médio	+
RF5**	+	+	Muito abundante	Médio	Médio	+
RMM1A	+	+	Abundante	Médio	Médio	+

Para mono (monofiálides), poli (polifiálides) e cadeias: (+) presente (-) ausente. Abundância: Pouco comum, comum, abundante, muito abundante. Tamanho da falsa cabeça: Pequeno, médio, grande, muito grande. Comprimento da fiálide: Curto, médio, longo, muito longo.

F. sterilihyphosum* e *F. pseudocircinatum*, Coleção de Fungos e Oomicetos Florestais da Embrapa Florestas.

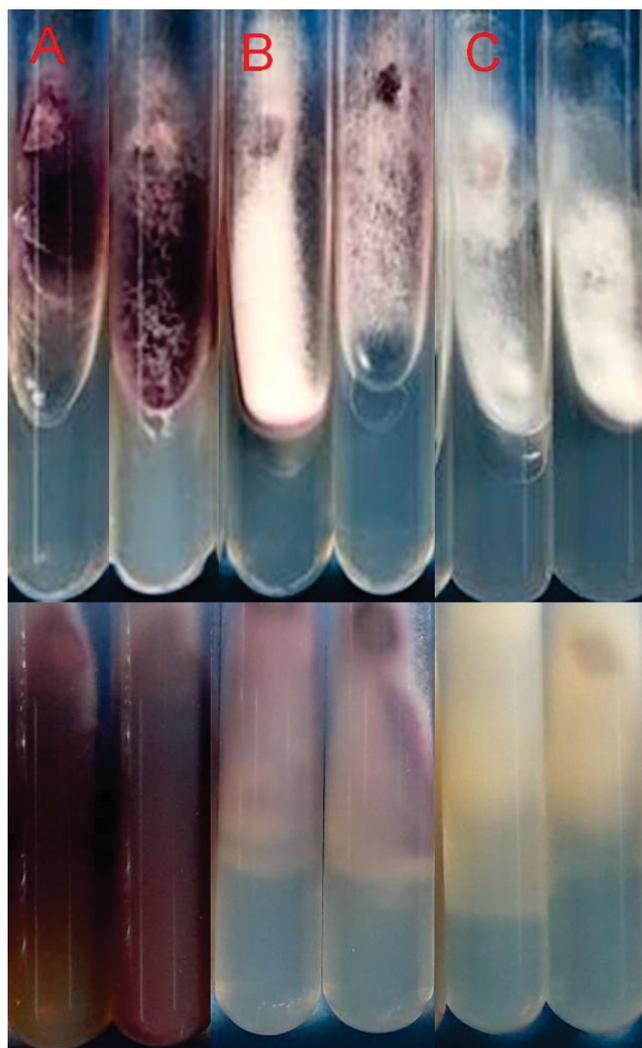
Figura 11: Tipos de conidiogênese observadas no complexo *Fusarium fujikuroi*: (A) falsa cabeça em polifiálide (B) falsas cadeias curtas em polifiálide.



Fonte: O autor (2022)

Os isolados RF4, RF5, RF8 e RMM1A formaram micélio aéreo curto ou ausente e pigmentação difundida no meio de grau forte e de cor roxa (Figura 12A). Enquanto que, o isolado RM3A formou micélio aéreo roxo (quase branco), pigmentação difundida no meio não visualizada (Figura 12B). O isolado FE1 formou micélio aéreo branco e pigmentação difundida no meio não visualizada (Figura 12C). A cor difundida no meio foi mais nítida aos 14 dias (Figura 12, parte inferior da imagem). Quanto ao tipo de micélio aéreo, os isolados RF4, RF5, RF8, RMM1A apresentaram micélio aéreo curto ou ausente (como visualizado em Figura 12A) e os demais isolados apresentaram micélio aéreo cotonoso.

Figura 12: Tipo de micélio aéreo, cor e cor difundida no meio (parte inferior da imagem) observadas nos isolados do complexo *Fusarium fujikuroi*: (A) micélio aéreo curto ou ausente e pigmentação difundida no meio de grau forte e de cor roxa; (B) micélio aéreo cotonoso, roxo (quase branco), pigmentação difundida no meio não visualizada; (C) micélio aéreo cotonoso, branco e pigmentação difundida no meio não visualizada.



Fonte: O autor (2022)

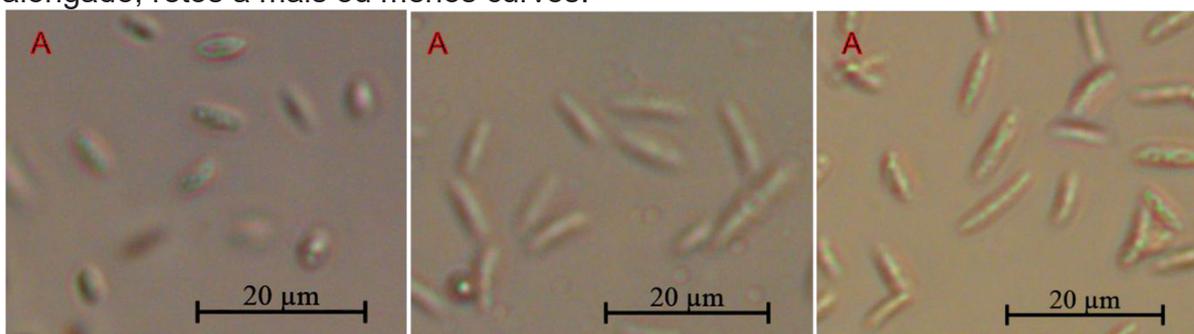
Os microconídios produzidos neste grupo (isolados FE1, EM18, RM3A, RF8, RF4, RF5 e RMM1A) apresentaram usualmente formato oval ou elipsoidal, com 0 ou 1 septo, os detalhes na TABELA 9 e Figura 13.

TABELA 9 - Características de microconídios (forma e número de septos) de isolados do complexo *Fusarium fujikuroi*.

Espécie	Isolado	Forma geral	Nº de septos
<i>Fusarium</i> sp.	FE1	Elipsoidal bastante alongado.	0 - 1
<i>F. sterilihyphosum</i>	EM18*	Elipsoidal bastante alongado, retos à mais ou menos curvos.	0 - 1
<i>Fusarium</i> sp.	RM3A	=	0 - 1
<i>F. pseudocircinatum</i>	RF8*	Oval à obovóide.	0
	RF4*	=	0 - 1
	RF5*	=	0
<i>Fusarium</i> sp.	RMM1A	=	0

(=) igual anterior; (**negrito**) valor mais comum; *Coleção de Fungos e Oomicetos Florestais da Embrapa Florestas.

Figura 13: Tipos de microconídios observados nos isolados do complexo *Fusarium fujikuroi*: (A) oval à obovóide (B) elipsoidal bastante alongado (C) elipsoidal bastante alongado, retos à mais ou menos curvos.



Fonte: O autor (2022)

Os esporodóquios formados sobre folhas de erva-mate (isolado FE1), foram menores e mais numerosos que aqueles formados sobre folhas de cravo (EM18, RM3A, RF8, RF4, RF5 e RMM1A), por isso os esporodóquios deste isolado não foram descritos com relação a estas características (TABELA 10 e Figura 14). As características tamanho do esporodóquio e abundância, são resultado de comparação entre todos os isolados caracterizados neste estudo.

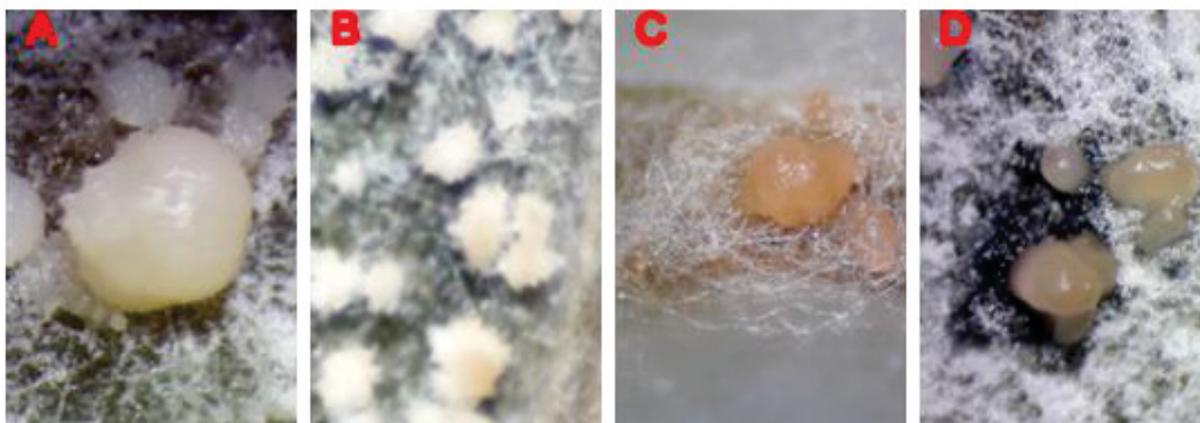
TABELA 10: Características de esporodóquios de isolados do complexo *Fusarium fujikuroi* quanto à cor, tamanho, abundância e tempo para a formação.

Isolado/ espécie	Cor	Tamanho	Abundância	Tempo (semanas)	Condição/ substrato
FE1	Branco	-	-	02	A/ 2
EM18*	Creme	Grande	Muito abundante	02	A/ 1
RM3A	Laranja	Pequeno	Raro	02	B/ 1
RF8**	Creme acinzentado	Pequeno	Abundante	02	A/ 1
RF4**	Creme acinzentado	Pequeno	Comum	04	A/ 1
RF5**	Creme acinzentado	Pequeno	Abundante	02	A/ 1
RMM1A	Creme acinzentado	Pequeno	Abundante	03	A/ 1

Abundância: Raro, comum, abundante, muito abundante. Tamanho: Pequeno, médio, grande. CONDIÇÃO: (A) fotoperíodo de 12 horas (B) luz negra contínua. SUBSTRATO: (1) folha de cravo (2) folha de erva mate.

F. sterilihyphosum* e *F. pseudocircinatum*, Coleção de Fungos e Oomicetos Florestais da Embrapa Florestas.

Figura 14: Tipos de esporodóquios de isolados do complexo *Fusarium fujikuroi* formados sobre folhas de cravo em A, C e D e sobre folhas de erva-mate em B. (A) EM18 (B) FE1 (C) RM3A e (D) RMM1A.

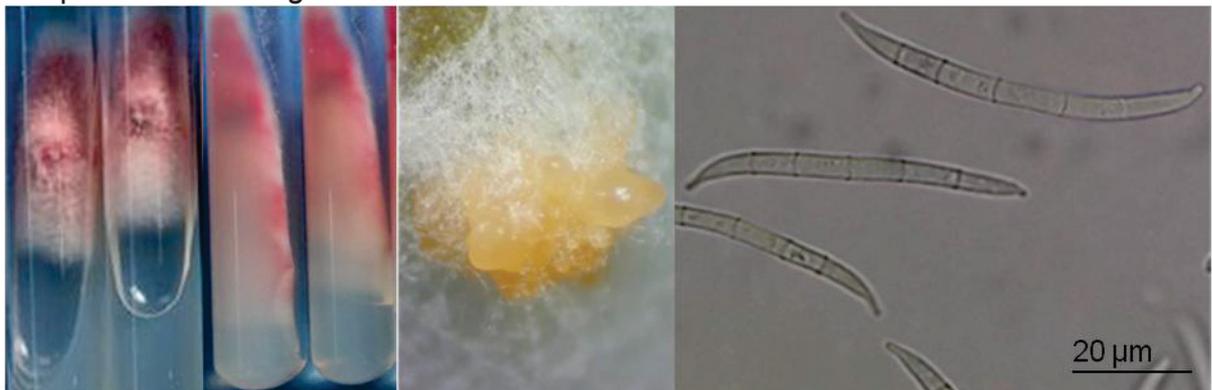


Fonte: O autor (2022)

5.2.2 Complexo *Fusarium graminearum*

Os isolados RM1A e RM2 do complexo *Fusarium graminearum* apresentaram micélio aéreo cottonoso, de cor rosa e pigmentação difundida no meio não visualizada. Ausência de microconídios. Esporodóquios formados sob luz negra em até duas semanas sobre as folhas de cravo, de cor laranja, grandes em tamanho e abundantes. Os macroconídios formados eram delgados, moderadamente curvados, com célula basal usualmente com bem desenvolvida forma de pé, célula apical cônica, às vezes com a forma da ponta lembrando um focinho, tendo usualmente entre 05 e 06 septos (Figura 15). O isolado RM1A produziu clamidósporos pouco comuns, formados lentamente (>5 semanas), solteiros ou em pares, intercalares ou terminais.

Figura 15: Cor de colônia, esporodóquio e macroconídios observados nos isolados do complexo *Fusarium graminearum*.

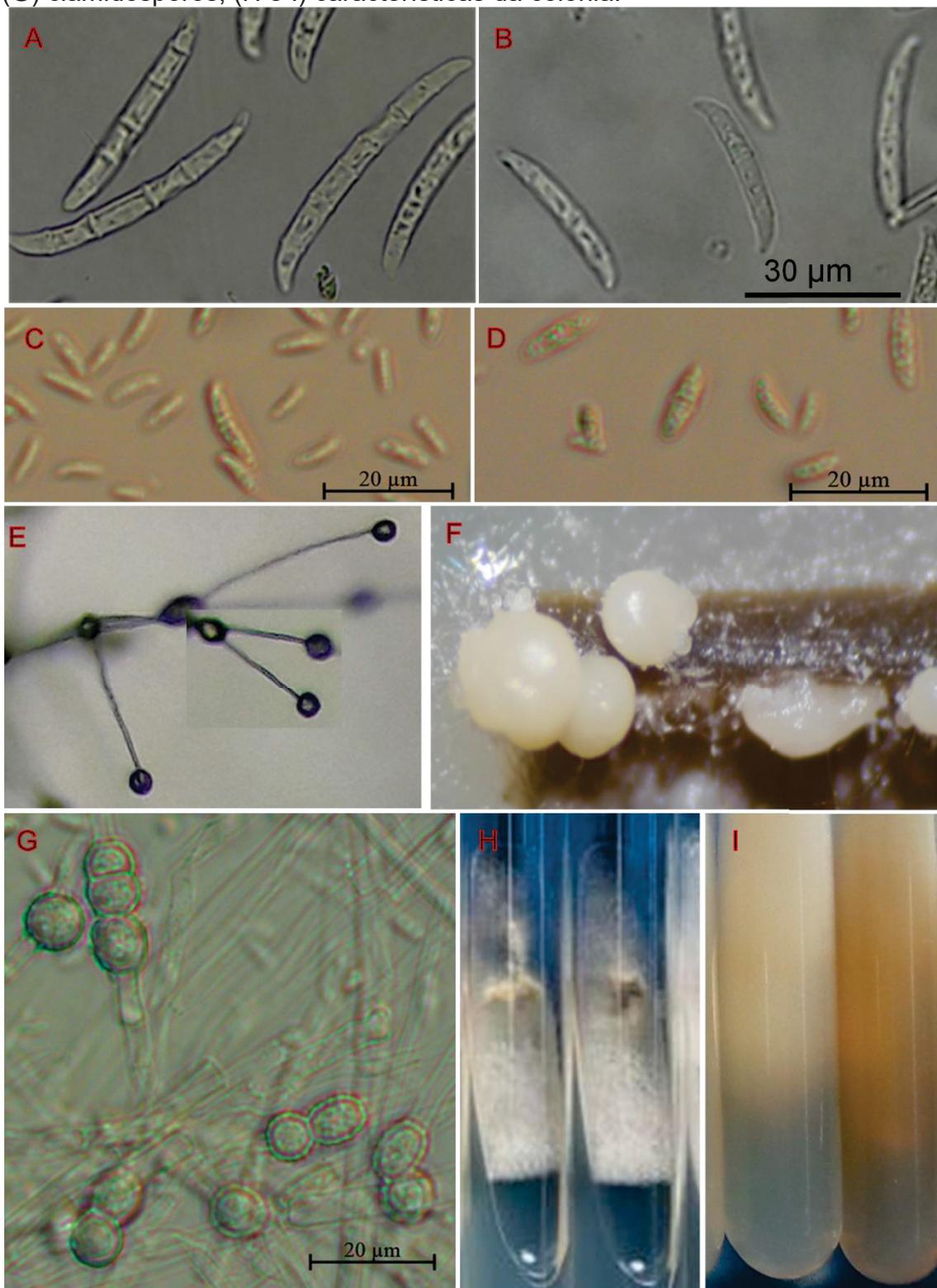


Fonte: O autor (2022)

5.2.3 Complexo *Fusarium solani*

Os isolados EM01, R2B, R3B, R6B, T1A e T1B do complexo *F. solani* apresentaram micélio aéreo cotonoso, de cor creme ou branco e pigmentação difundida no meio usualmente de grau médio. Os isolados desse complexo formaram microconídios de formato elipsoidal, retos ou levemente curvos, com fusiforme e reniforme também presentes, com número de septos variando de 0 a 2, sendo entre 0 e 1 o mais comum, usualmente abundantes em micélio aéreo, formados sob falsas cabeças circulares, grandes em tamanho, sob monofiálides longas. Esporodóquios pequenos a médios, de cor branca a creme, usualmente variando de comum a muito abundante, formados em até duas semanas sobre as folhas de cravo e sobre a superfície do ágar. Macroconídios largos, retos a ligeiramente curvados, célula basal variando de pouco desenvolvida a bem desenvolvida forma de pé e célula apical cega e arredondada, tendo de 3 até 7 septos (à depender do isolado). Os clamidósporos foram formados abundantemente, entre duas e quatro semanas, solteiros, em pares ou em pequenas cadeias, em posição intercalar e/ ou terminal (Figura 16).

Figura 16: Características morfológicas dos isolados do complexo *Fusarium solani*. (A e B) macroconídios; (C e D) microconídios; (E) falsas cabeças; (F) esporodóquio; (G) clamidósporos; (H e I) características da colônia.

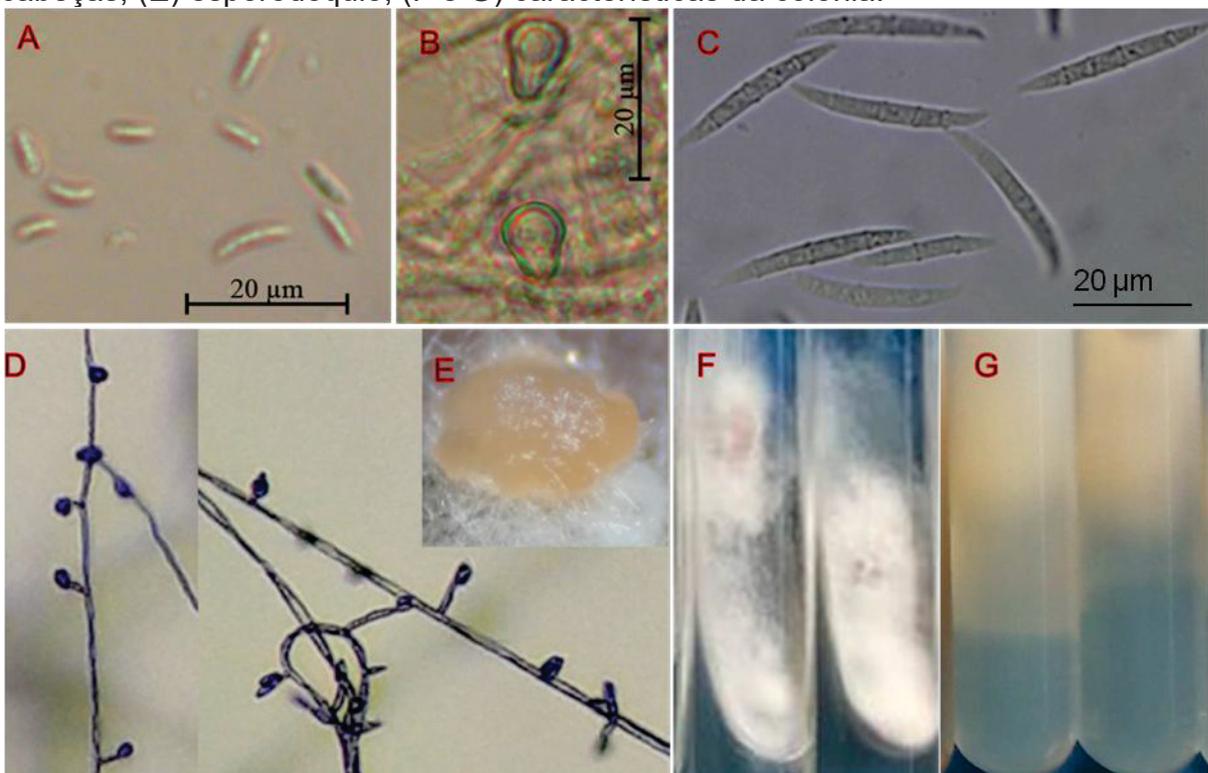


Fonte: O autor (2022)

5.2.4 Complexo *Fusarium oxysporum*

Os isolados RF1* e R6C do complexo *F. oxysporum* apresentaram micélio aéreo cotonoso, de cor branca e pigmentação difundida no meio não visualizada. Microconídios comuns em micélio aéreo, de formato elipsoidal, retos à mais ou menos curvados, reniforme também presente. Sendo asseptados ou com um septo, com o tipo asseptado o mais comum, formados em falsas cabeças pequenas em tamanho, formadas sob monofiálides curtas. Os isolados formaram esporodóquios de cor laranja brilhante, usualmente médios em tamanho, abundância variável, formados sob luz negra e podendo levar mais de três semanas para formar, em folhas de cravo e na superfície do ágar. Os macroconídios eram relativamente delgados, retos a ligeiramente curvados, com célula basal usualmente em forma de pé, célula apical cônica e curvada, tendo usualmente 3 septos. Os isolados apresentaram clamidósporos abundantes, formados em até duas semanas, preferencialmente em posição terminal (Figura 17).

Figura 17: Características morfológicas dos isolados do complexo *Fusarium oxysporum*. (A) microconídios; (B) clamidósporos; (C) macroconídios; (D) falsas cabeças; (E) esporodóquio; (F e G) características da colônia.

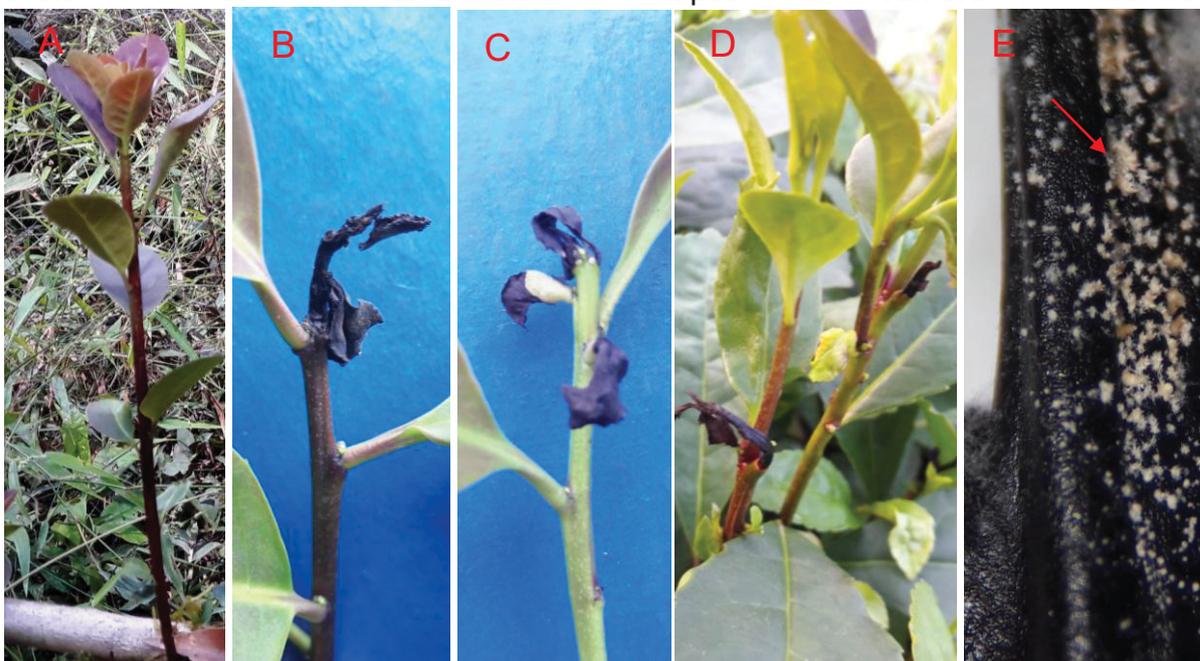


Fonte: O autor (2022)

5.3 CARACTERIZAÇÃO SINTOMATOLÓGICA E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp. EM ERVA-MATE.

Sintomas da morte de ponteiros em mudas e plantas adultas de erva-mate resultantes de infecção natural de *Fusarium* spp. (Figura 18). A doença se caracteriza pela presença de lesões necróticas de cor escura, que se iniciam no ápice dos brotos, podendo essa necrose progredir de forma descendente ao longo do broto, causando a sua morte (Figura 18B, C e D). Em condições de alta umidade é possível observar a presença de sinais do patógeno (Figura 18E).

Figura 18: (A) Broto sadio; (B e C) Sintomas de morte de ponteiros em plantas adultas e (D) mudas; (E) detalhes da esporulação formada sobre a superfície do broto de erva-mate após câmara úmida.



Fonte: o autor (2023)

5.3.1 Teste de patogenicidade em folhas destacadas.

Os isolados obtidos de parte aérea, do complexo *F. fujikuroi*, incluindo as espécies *F. guttiforme* e *F. mexicanum*, e do complexo *F. graminearum*, bem como os isolados obtidos de raízes, mostraram-se patogênicos à erva-mate. Verificou-se uma maior agressividade dos isolados do complexo *F. solani* em comparação aos isolados dos complexos *F. fujikuroi*, *F. graminearum* e *F. oxysporum* (TABELA 11). As lesões apresentaram maior uniformidade aos quatro dias após a inoculação.

TABELA 11 - Diâmetro Médio de Lesão (DML) e Área média de lesão (Área) em folhas tipo III de erva-mate, inoculadas com diferentes isolados de *Fusarium* spp..

Complexo	Espécie	Isolado	DML (mm)	Área (mm ²)
<i>F. fujikuroi</i>	<i>F. guttiforme</i>	F3	6,5	181
	<i>Fusarium</i> sp.	FE1	3,5	14
	<i>F. sterilihyphosum</i>	EM18*	2,7	10
	<i>Fusarium</i> sp.	RM3A	2,9	18
	<i>F. mexicanum</i>	F2A	4,6	23
	<i>F. mexicanum</i>	F2B	4,1	19
	<i>F. pseudocircinatum</i>	RF8*	3,6	17
	<i>F. pseudocircinatum</i>	RF5*	3,5	18
	<i>F. pseudocircinatum</i>	RF4*	2,4	10
	<i>Fusarium</i> sp.	RMM1A	2,0	8
<i>F. graminearum</i>	<i>Fusarium</i> sp.	RM1A	2,9	12
	<i>Fusarium</i> sp.	RM2	2,4	8
<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i> *	RF1	2,2	6
	<i>Fusarium</i> sp.	R6C	2,0	5
<i>F. solani</i>	<i>F. solani</i>	EMO1*	7,7	364
	<i>Fusarium</i> sp.	R2B	7,2	687
	<i>Fusarium</i> sp.	T1A	6,9	215
	<i>Fusarium</i> sp.	T1B	6,2	333
	<i>Fusarium</i> sp.	R6B	3,2	16
Testemunha			-	-

Isolados obtidos de: Broto Raiz Caule

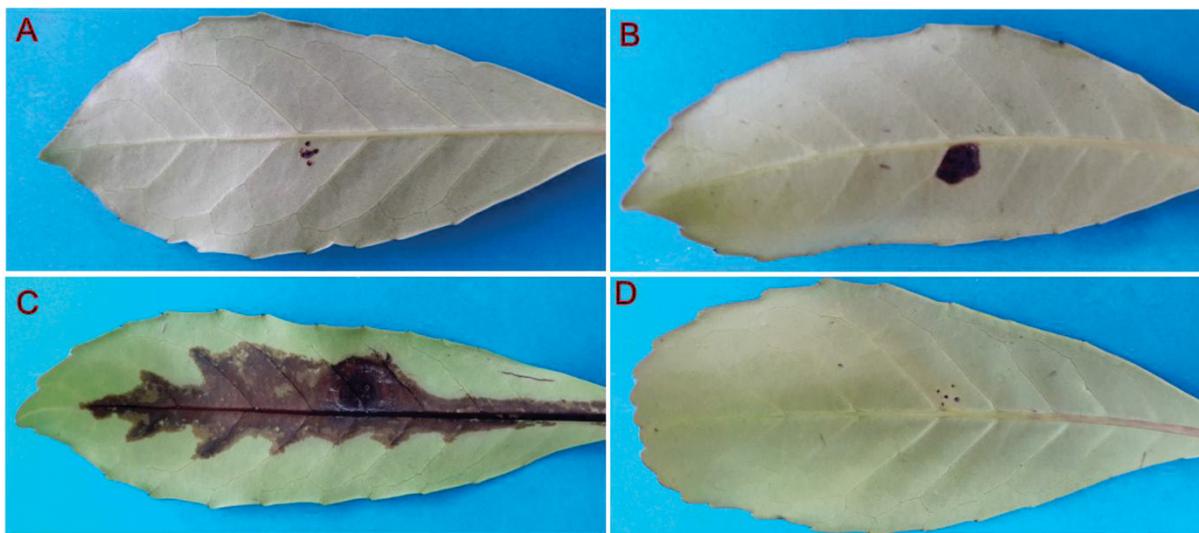
O DML foi medida com auxílio de um paquímetro (04 dias após inoculação) e foi expressa em mm. A área (seis dias após inoculação) das lesões foi obtida utilizando o software Quant 1.0.1 e foi expressa em mm².

*Coleção de Fungos e Oomicetos Florestais da Embrapa Florestas.

Em algumas folhas que foram inoculadas, notou-se o surgimento de lesões que se iniciavam na base do pecíolo e se estenderam em direção ao centro da folha. Quando corado a superfície da folha com corante azul de algodão, foi possível observar o crescimento micelial do fungo que havia sido inoculado. Essas hifas se desenvolviam em todas as direções, chegando inclusive à base do pecíolo. A peculiaridade de causar lesões no pecíolo foi observada apenas em alguns isolados, com destaque para o isolado F3, onde todas as folhas exibiram essa característica. Além disso, foi possível re-isolar o patógeno a partir dessas lesões. Foi realizado um ensaio inoculando o fungo nessa região e constatado sintomas no pecíolo semelhantes aos observados anteriormente.

Houve variação de agressividade entre os isolados de *Fusarium* spp. (TABELA 12; Figura 19A, B e C). A leitura com o paquímetro foi dificultada aos seis dias após a inoculação, devido a forma irregular das lesões. Todos os isolados de *Fusarium* spp. inoculados foram reisolados

Figura 19: Variações nos tipos de lesões de folhas de erva-mate inoculadas com diferentes isolados de *Fusarium* spp. (A e B) pequenas e médias lesões observadas no complexo *F. fujikuroi*; (C) grandes lesões observadas no complexo *F. solani* e (D) testemunha.



Fonte: O autor (2022)

5.3.2 Teste de patogenicidade em brotos de plantas adultas de erva-mate.

Todos os isolados inoculados *F. guttiforme* (isolado F3), *F. mexicanum* (isolados F2A e F2B) e demais isolados do complexo *F. fujikuroi* (isolados FE1 e RM3A) produziram sintomas, esses sintomas se caracterizaram por uma necrose na região ao redor do ponto de inoculação. Também foi observado uma interrupção no desenvolvimento da região apical dos brotos inoculados (Figura 20). Os isolados puderam ser recuperados através do reisolamento em BDA.

Figura 20: Sintomas observados em brotos de plantas adultas inoculadas *Fusarium* spp.. A e B Testemunha; C - *F. mexicanum*; D e E - *F. guttiforme*.



Fonte: O autor (2023)

5.3.3 Método de inoculação em brotos destacados

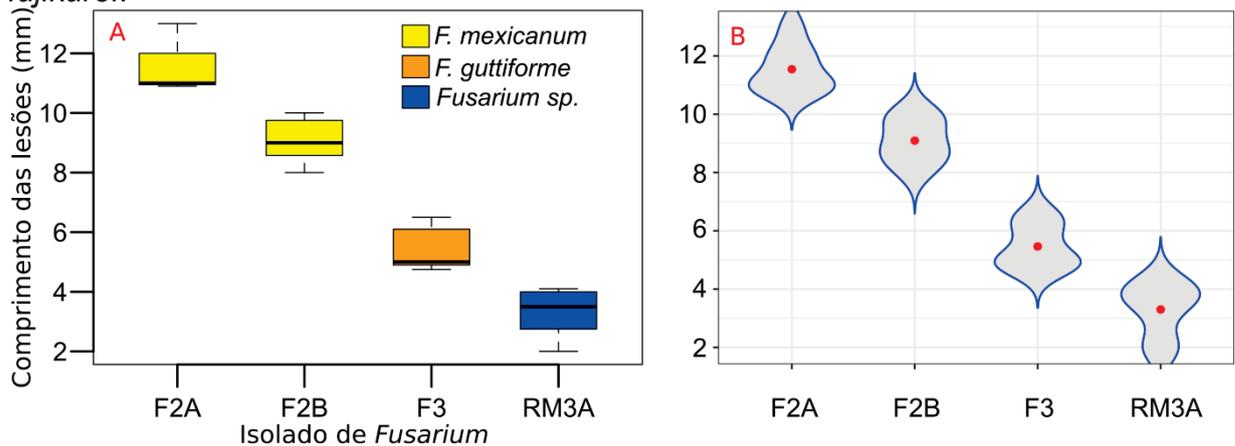
A inoculação em brotos destacados de erva-mate produziu sintomas semelhantes àqueles observados no campo, com o aparecimento de uma necrose de coloração escura que progrediu do ponto inoculado para baixo no broto e para as folhas próximas (Figuras 22 e 23). Houve diferença estatística entre os isolados (TABELA 12 e Figura 21).

TABELA 12: Incidência (%) e tamanho da lesão (mm) aos seis dias após a inoculação em brotos destacados de erva-mate inoculados com ferimento. Isolados do complexo *F. fujikuroi*.

Brotos destacados				
Espécie/ Isolado	Incidência (%)	Tamanho da lesão (mm)	DP	CV (%)
<i>F. mexicanum</i> (F2A)	100	11,5 A	0,8	7,0
<i>F. mexicanum</i> (F2B)	100	9,0 B	0,7	8,4
<i>F. guttiforme</i> (F3)	100	5,46 C	0,7	13,9
<i>Fusarium</i> sp. (RM3A)	100	3,3 D	0,9	27,9
Testemunha	00	0,0	-	-

Coefficiente de variação (CV) e desvio padrão (DP). Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste tukey a 5% de probabilidade. CV 11,12%. Valor-p para o teste de Shapiro-Wilk 0,140. Valor-p teste de Bartlett 0,965.

Figura 21: Boxplot (A) e violinplot (B) para comprimento médio de lesões em brotos destacados de erva-mate inoculados com diferentes isolados do complexo *F. fujikuroi*.



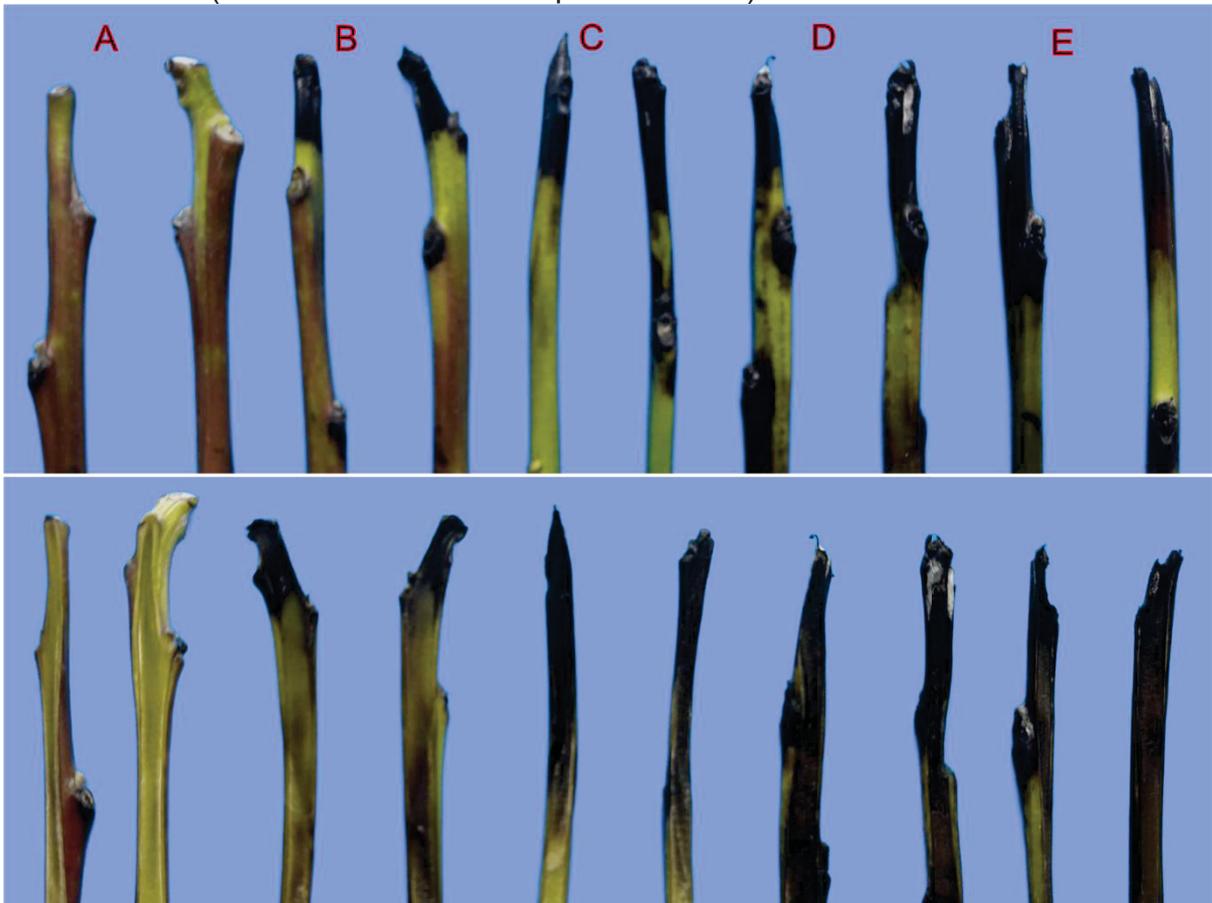
O violinplot foi empregado como uma ferramenta complementar à visualização do boxplot. Por meio dele, foi possível observar a densidade da distribuição dos dados em diferentes regiões do gráfico, permitindo a identificação de assimetrias nessa distribuição e proporcionando uma compreensão mais detalhada sobre como os valores estão distribuídos. O ponto vermelho no gráfico representa a média, enquanto áreas mais amplas indicam uma maior concentração de dados e áreas mais estreitas indicam uma menor densidade.

Figura 22: Sintomas observados em brotos de erva-mate seis dias após inoculação com isolados do complexo *F. fujikuroi*. (A) testemunha; (B) *Fusarium* sp. (Isolado RM3A); (C) *F. guttiforme* (isolado F3); (D e E) *F. mexicanum* (isolados F2A e F2B respectivamente).



Fonte: O autor (2023)

Figura 23: Corte longitudinal mostrando os sintomas em tecidos internos de brotos de erva-mate seis dias após inoculação com isolados do complexo *F. fujikuroi*. (A) testemunha; (B) *Fusarium* sp. (Isolado RM3A); (C) *F. guttiforme* (isolado F3); (D e E) *F. mexicanum* (isolados F2A e F2B respectivamente).



Fonte: O autor (2023)

5.3.4 Métodos de inoculação em folhas destacadas

A TABELA 13 mostra o aparecimento de lesões ao longo do tempo para diferentes isolados de *Fusarium* spp. inoculados em folhas de erva-mate **sem ferimento**. Devido aos resultados inconsistentes, optou-se por fazer ferimentos nas folhas nas inoculações subsequentes.

TABELA 13: Aparecimento de lesões em folhas de erva-mate tipo II, inoculadas com isolados de *Fusarium* spp. sem a presença do ferimento.

Complexo	Espécie	Isolado	Dias após a inoculação							
			4	5	6	7	8	9	10	
	<i>F. guttiforme</i>	F3	4**	7	8	10	12	14	15	
	<i>Fusarium</i> sp.	FE1	3	4	4	5	6	7	8	
	<i>F. sterilihyphosum</i>	EM18*	6	7	8	9	10	10	10	
	<i>Fusarium</i> sp.	RM3A	10	12	12	12	13	13	14	
	<i>F. fujikuroi</i>	<i>F. mexicanum</i>	F2A	0	0	0	2	4	6	7
		<i>F. mexicanum</i>	F2B	1	1	1	2	5	7	9
		<i>F. pseudocircinatum</i>	RF8*	0	0	0	0	0	0	0
		<i>F. pseudocircinatum</i>	RF5*	0	0	0	1	1	4	5
		<i>F. pseudocircinatum</i>	RF4*	1	2	3	3	3	3	3
		<i>Fusarium</i> sp.	RMM1A	0	0	0	0	0	0	0
<i>F. graminearum</i>	<i>Fusarium</i> sp.	RM1A	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Fusarium</i> sp.	RM2	0	0	0	0	0	0	0	

*Coleção de Fungos e Oomicetos Florestais da Embrapa Florestas.

**Número de pontos de inoculação (de um total de 15) que apareceram sintomas.

Para a inoculação de folhas destacadas **com ferimento**, os dois métodos de inoculação produziram sintomas, no entanto, a incidência e a uniformidade das lesões foi maior em FD2 (ferimento circular - mais padronizado) do que FD1 (ferimento em forma de furo). Para FD1, não houve diferença estatística entre as médias (TABELA 14 e Figura 24 A e B). Para a inoculação em folhas destacadas pelo método FD2, houve diferença estatística entre as médias (TABELA 14 e Figura 24C e D e Figura 25). O desenvolvimento das lesões ocorreu de forma mais rápida e uniforme (forma e tamanho).

TABELA 14: Incidência (%) e tamanho médio de lesão (mm) em folhas destacadas de erva-mate com ferimentos em furos (FD1) e circular (FD2) inoculadas com isolados de *F. mexicanum* (isolados F2A e F2B) e *F. guttiforme* (isolado F3) aos oito dias após a inoculação para FD1 e 04 dias para FD2.

Isolado	FD1				FD2			
	Incidência (%)	Tamanho de lesão(mm)	DP	CV (%)	Incidência (%)	Tamanho da lesão (mm)	DP	CV (%)
F2A	62	5,1A	2,0	40,3	100	10,9 A	1,1	10,5
F2B	100	6,9A	1,4	20,5	100	11,4 A	1,1	9,99
F3	64	4,9A	1,3	26,7	79	5,7 B	1,8	32,8
Testemunha	-	-	-	-	-	-	-	-

Coefficiente de variação (CV) e desvio padrão (DP). Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. CV 28,99 % (**15, 38 % para FD2**). Valor-p para o teste de Shapiro-Wilk 0,053 (**0,217 para FD2**). Valor-p teste de Bartlett 0,455 (**0,359 para FD2**).

Figura 24: boxplot e violinplot para comprimento médio de lesões em folhas, método FD1 (A e B) e método FD2 (C e D).

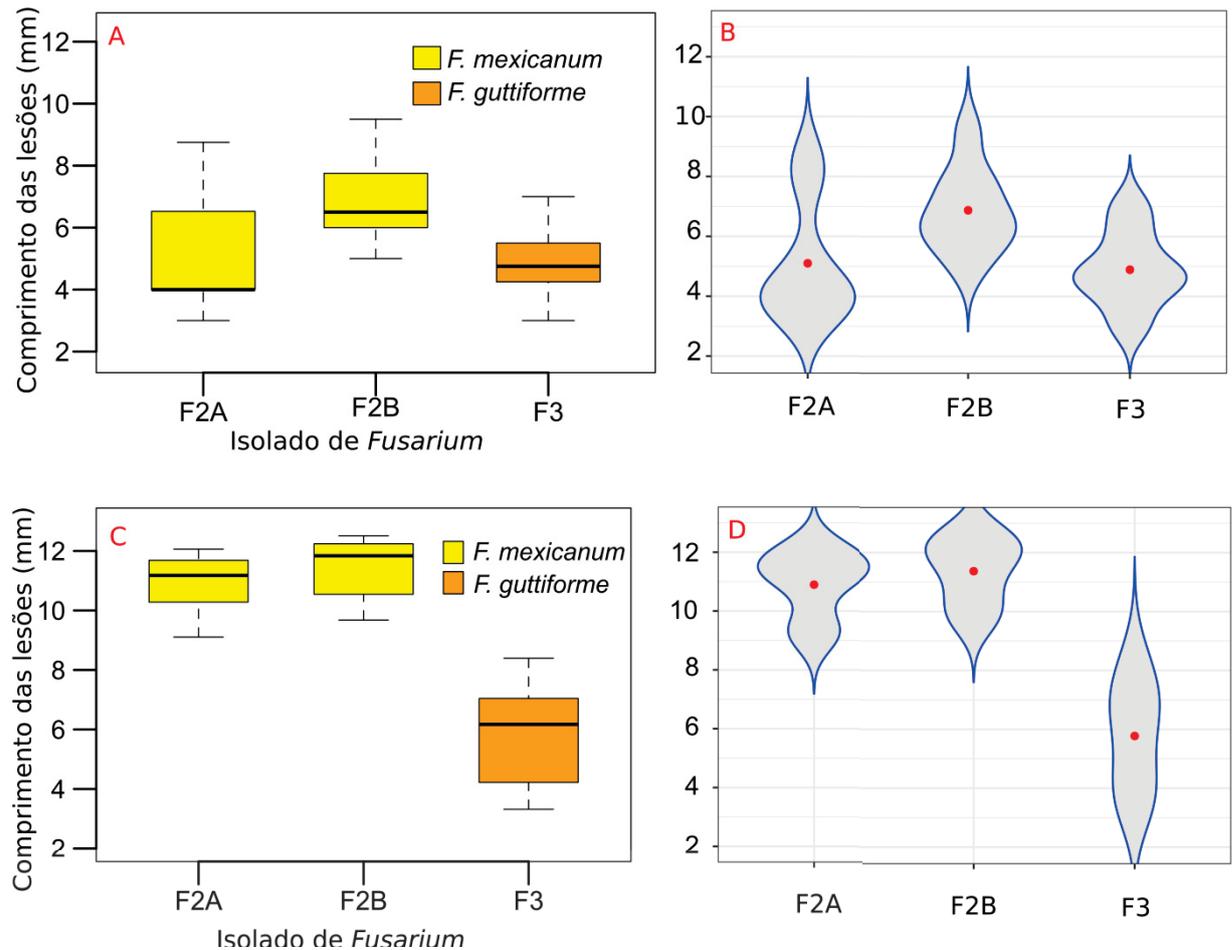
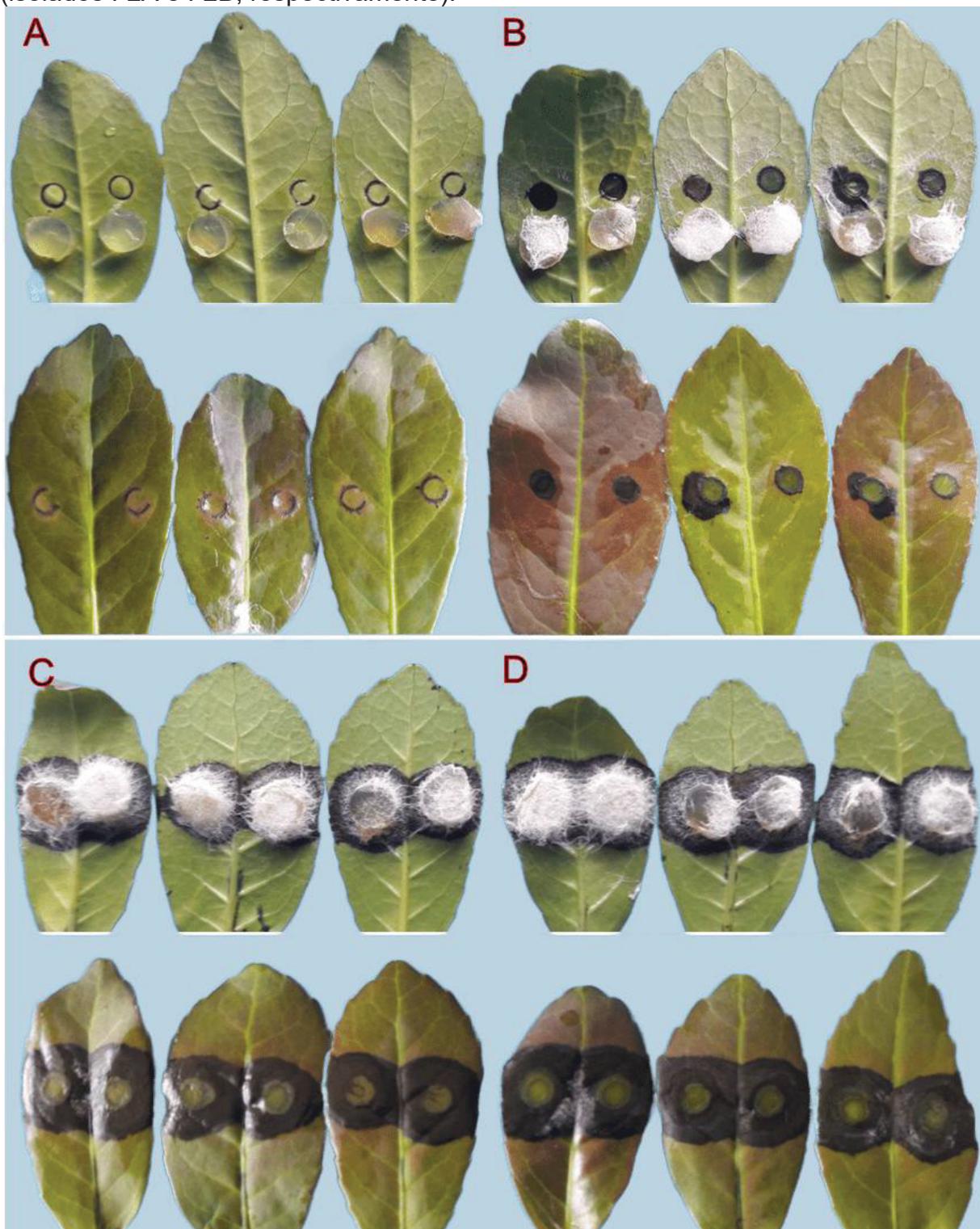


Figura 25: Sintomas observados em folhas (faces abaxial e adaxial) de erva-mate quatro dias após inoculação pelo método FD2 (ferimento circular - mais padronizado). (A) testemunha; (B) *F. guttiforme* (isolado F3); (C e D) *F. mexicanum* (isolados F2A e F2B, respectivamente).



Fonte: O autor (2023)

Mesmo com o maior tempo de desinfestação na solução de hipoclorito de sódio e o uso de placas de Petri e tubos de ensaio esterilizados, as testemunhas (tanto broto como folhas) apresentaram problema de contaminação em algumas repetições. Nos reisolamentos das testemunhas que apresentaram lesão, de um modo geral, o fungo que foi isolado com mais frequência foi *Fusarium* spp. Dessa forma, utilizou-se um número maior de repetições, descartando as repetições que apresentaram problemas.

Para todos os ensaios de inoculação em folhas e brotos destacados, o isolado F2B foi o que apresentou o desenvolvimento mais uniforme das lesões.

6 DISCUSSÃO

Este estudo verificou que as espécies *Fusarium guttiforme* e *Fusarium mexicanum* foram patogênicas à erva-mate e causaram lesões necróticas em folhas e brotos destacados e em brotos de plantas adultas de erva-mate. Esse consiste no primeiro relato destas espécies causando doença em brotos de erva-mate no mundo. *Fusarium mexicanum* foi descrito por Otero-Colina et al. (2010), no México, causando a malformação da manga (*Mangifera indica* L.); no entanto, não há relato da sua ocorrência em erva-mate. Enquanto que, *F. guttiforme* foi descrito por Nirenberg e O'Donnell (1998) causando a podridão basal do abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) e, em erva-mate, *F. guttiforme* foi encontrado em associação com sementes (SOUZA et al. (2019). No entanto, estes autores não comprovaram a patogenicidade de *F. guttiforme* à erva-mate e a identificação foi baseada apenas em *tef1* e não apresentaram a árvore filogenética e a descrição morfológica.

Neste estudo, esses fungos foram identificados com base na filogenia molecular multilocus (RNA polimerase II subunidade, fator de alongação 1- α e β -tubulina), bem como características culturais e morfológicas. A caracterização cultural e morfológica são ferramentas úteis na taxonomia de *Fusarium*, pois complementam a análise molecular e ajudam no agrupamento inicial dos isolados. De acordo com Crous et al. (2021), nos dias atuais, a taxonomia de *Fusarium* está fortemente fundamentada na filogenia molecular; no entanto, a morfologia é um componente fundamental dos conceitos de espécie e não deve ser negligenciada.

Na literatura há um relato da associação de *Fusarium* sp. com a morte de ponteiros da erva-mate feito por (GRIGOLETTI e AUER, 1996). A ocorrência dessa

doença em erva-mate também foi registrada por Paula et al. (2018), em um estudo na região do Alto Uruguai Gaúcho. Na Argentina (GUTIÉRREZ et al., 2021), há o relato da ocorrência de uma doença na erva-mate com sintomas semelhantes aos observados neste estudo; no entanto, o agente causal não pôde ser determinado. Nenhum desses estudos identificou as espécies de *Fusarium* envolvidas, ou mesmo comprovou a sua patogenicidade. Com isso, destaca-se a importância deste estudo, ao identificar de forma confiável e em nível específico o agente causal desta doença, bem como de comprovar a sua patogenicidade a erva-mate.

Os demais isolados de *Fusarium* obtidos de parte aérea, identificados apenas com base em características culturais (tipo de micélio aéreo e cor) e morfológicas, pertencem a dois complexos: *F. graminearum* e *F. fujikuroi*. Espécies destes complexos já foram relatadas em erva mate, como o complexo *F. graminearum*, encontrado em sementes de erva-mate por Mireski (2018), Souza et al. (2019), e Vargas (2020), e espécies do complexo *F. fujikuroi* (*F. pseudocircinatum* e *F. sterilihyphosum*) associadas com a podridão de miniestacas (PIASSETA, 2022) e sementes de erva-mate (VARGAS, 2020), respectivamente. Os isolados deste estudo apresentaram morfologia semelhante à descrita para estas espécies, entretanto, estudos filogenéticos precisam ser realizados.

Os complexos *F. solani* e *F. oxysporum* foram encontrados associados à podridão radicular. Estes isolados foram patogênicos quando inoculados em folhas destacadas. Estes complexos foram identificados com base nas características culturais e morfológicas, de acordo com Leslie e Summerell (2006), e estudos filogenéticos precisam ser realizados para a identificação das espécies envolvidas. O gênero *Fusarium* é um importante fitopatógeno habitante do solo e vários autores (GRIGOLETTI JÚNIOR e AUER 2001; POLETTO et al., 2012; MEZZOMO et al., 2018; MEZZOMO et al., 2021) já relataram a associação patogênica destes dois complexos de espécies em raízes da erva-mate.

Com as mudanças recentes na taxonomia do gênero *Fusarium* (CROUS et al., 2021), o complexo de espécies de *F. solani* passou a ser considerado um gênero distinto chamado *Neocosmospora* pertencente à família Nectriaceae. Neste estudo, manteve-se o nome *F. solani*, em referência ao Index Fungorum (2023).

Os métodos de inoculação em folhas e brotos destacados de erva-mate foram apropriados para se determinar a patogenicidade e agressividade dos isolados de *Fusarium* spp., pois apresentaram uma boa incidência e lesões que se

desenvolveram de forma rápida e consistente, permitindo a análise estatística dos dados.

A presença e o tipo de ferimento usado nas folhas de erva-mate foram determinantes para a ocorrência da infecção e desenvolvimento das lesões. Resultados semelhantes foram observados por Piassetta (2022), ao inocular *Fusarium* spp. em folhas destacadas de erva-mate. Garcia (2013) também comparou a presença e ausência de ferimento para a inoculação de *F. guttiforme* em folhas destacadas de abacaxizeiro, e concluiu que o ferimento do tecido hospedeiro foi necessário para a infecção do patógeno.

Para a inoculação em brotos, a remoção do ápice das brotações permitiu que o fungo penetrasse nos tecidos da planta. Shin et al. (2013) trabalhando no desenvolvimento de um método que permitisse uma avaliação rápida para testar a resistência de cultivares de trigo à *Fusarium*, concluíram que a inoculação com o corte do ápice do coleóptilo foi o método mais eficiente, pois trata-se de um método rápido, que permitiu detectar cultivares resistentes e apresentou correlação significativa entre o comprimento das lesões e a resistência encontrada nas plantas adultas inoculadas em casa de vegetação.

Metodologia semelhante foi utilizada por Wu et al. (2005), onde a inoculação do coleóptilo de trigo cortado permitiu o bom desenvolvimento das lesões, onde em 7 dias após a inoculação, essas lesões se desenvolveram de forma consistente e em graus variados, a depender do isolado. O comprimento das lesões mostrou diferenças significativas, o que permitiu separar os isolados em grupos.

Neste estudo, foi observado que apesar da assepsia utilizada para a montagem do experimento, não foi possível eliminar 100% da incidência de lesão no tratamento testemunha. Nos reisolamentos a partir destas folhas, foram obtidas culturas de *Fusarium* spp. Há registro na literatura da presença deste fungo de forma endofítica nas folhas de erva-mate, como citado por Pimentel et al. (2006). Outros estudos sobre inoculação em folhas destacadas de erva-mate são escassos, o que limita um melhor entendimento do problema. Dentre os poucos artigos que abordaram a inoculação em folhas de erva-mate, podemos citar o estudo de López et al. (2010), mas nesse caso, não foi utilizado o disco de meio BDA sem o fungo sobre o ferimento no tratamento controle.

Da mesma forma que acontece com o milho, onde várias espécies de *Fusarium* estão envolvidas em diversas doenças que afetam a cultura durante todo o

ciclo de cultivo, como a podridão do caule, a podridão da espiga, a podridão da semente e a podridão da raiz (TIRU, et al., 2021), é possível que a cultura da erva-mate também enfrente um cenário semelhante. Isso significa que várias espécies podem estar envolvidas em diferentes doenças e, uma única espécie pode ser responsável por mais de um tipo de doença na planta de erva-mate.

7 CONCLUSÕES

Fusarium guttiforme e *Fusarium mexicanum* são agentes causais da morte de ponteiros da erva-mate;

Além dessas espécies identificadas, outros isolados dos complexos *F.fujikuroi* e *F. graminearum* também estão envolvidos com a etiologia da morte de ponteiros da erva-mate;

Isolados dos complexos *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* estão associados com a podridão de raízes da erva-mate e causaram doença em folhas destacadas.

Os métodos de inoculação em folhas e brotos destacados de erva-mate são adequados para estudos de patogenicidade.

8 REFERÊNCIAS

AGROSTAT – Estatísticas do Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro. Disponível em: https://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/AGR_OSTAT.html. Acesso em: 06 jul. 2023.

AL-HATMI, A. M.; MIRABOLFATHY, M.; HAGEN, F.; NORMAND, A. C.; STIELOW, J. B.; KARAMI-OSBO, R.; DIEPENINGEN, A. D.; MEIS, J. F.; DE HOOG, G. S. DNA barcoding, MALDI-TOF, and AFLP data support *Fusarium ficicrescens* as a distinct species within the *Fusarium fujikuroi* species complex. **Fungal Biology**, v. 120, n. 2, p. 265-278, 2016. DOI. 10.1016/j.funbio.2015.08.001.

AOKI, T.; O'DONNELL, K.; GEISER, D. M. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, p. 189-201, 2014. DOI. 10.1007/s10327-014-0509-3.

AUER, C. G.; DOS SANTOS, A. F. Doenças da erva-mate. IN: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. p. 343-349.

BAERLEY, V. R. et al. Antioxidant action of yerba mate on carcass and meat characteristics and fatty acid profile in meat and fat of lambs finished in tropical pastures. **Tropical Animal Health and Production**, v. 55, n. 2, p. 109, 2023.

BAGGIO, A. J.; MONTOYA VILCAHUAMAN, L. J.; CORREA, G. Arborização da cultura da erva-mate: aspectos gerais, resultados experimentais e perspectivas. Colombo: **Embrapa Florestas**, 2008. 24 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 161). Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/314232/arborizacao-da-cultura-da-erva-mate-aspectos-gerais-resultados-experimentais-e-perspectivas>. Acesso em: 08 jul. 2023.

BARBATO, O.; HOLMES, B.; FILIPESCU, I. E.; CELI, P. Dietary supplementation of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) during the dry period improves redox balance in lactating dairy cows. **Antioxidants**, v. 8, n. 2, p. 38, 2019.

BOOTH, C. **The genus *Fusarium***. Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute., 1971. 237 p.

BRITZ, H.; STEENKAMP, E. T.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, M. J. et al. Two new species of *Fusarium* section Liseola associated with mango malformation, **Mycologia**, v. 94. n. 4, p. 722-730, 2002. DOI. 10.1080/15572536.2003.11833199.

BROWN, D. W.; PROCTOR, R. H. Insights into natural products biosynthesis from analysis of 490 polyketide synthases from *Fusarium*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 89, p. 37-51, 2016. DOI. 10.1016/j.fgb.2016.01.008.

CARDOSO, A. G. L.; DA ROSA, R. L.; NOVAK, R. S.; FOLQUITTO, D. G.; SCHEBELSKI, D. J.; BRUSAMARELLO, L. C. C.; RIBEIRO, D. T. B. Erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-hil.): uma revisão abrangente sobre composição química, benefícios à saúde e recentes avanços. **Research, Society and Development**, v.

10, n. 11, 2021. DOI: 10.33448/RSD-V10I11.20036.

CARVALHO, P. E. R. Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*). IN: CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. 1. ed. v. 1. Brasília, DF: Embrapa, 2003. p. 455-466.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches. **Journal of Tropical Medicine e Hygiene**, Mclean, v. 70, p. 181-184, 1967.

CELI, P. Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) como suplemento estratégico para vacas leiteiras. **Documento sobre Produção e Saúde Animal da FAO** , n. 175, pág. 11-18, 2013.

CHAIMSOHN, F. P.; RADOMSKI, M. I. Sistemas tradicionais de erva-mate: características biofísicas, socioeconômicas e ambientais. In: **Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: **SEMINÁRIO ERVA-MATE XXI: Modernização no cultivo e diversificação do uso da erva-mate**. 2016.

CROUS, P. W. et al. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. **Studies in mycology**, v. 98, p. 1-184, 2021. DOI. 10.1016/j.simyco.2021.100116.

DALLABRIDA, V. R.; DUMKE, C. I.; MOLZ, S.; FURINI, V.; GIACOMELLI, M. B. O. Com erva-mate não se faz só chimarrão! Situação atual e perspectivas de inovação no setor ervateiro do Planalto Norte Catarinense. **DRd-Desenvolvimento Regional em debate**, v. 6, n. 2, p. 247-273, 2016. DOI. 10.24302/drd.v6i2.1225.

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

DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.

DOS SANTOS, A. F.; FERREIRA, M. A.; AUER, C. G.; BUHRER, C. D. 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. DOI. 10.1094/PDIS-02-18-0228-PDN.

FACCIN, C.; VIEIRA, L. R.; DE FREITAS, E. M. Application of yerba mate (*Ilex paraguariensis* a.St.-hil.) in food - a review. **Caderno pedagógico**, v.12, n.3, p.200-209, 2015.

FERRERA, T. S.; HELDWEIN, A. B.; DOS SANTOS, C. O.; SOMAVILLA, J. C.; SAUTTER, C. K. Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erva-mate sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 588-596, 2016. DOI. 10.1590/1983-084X/15_197.

FISHER, N. L.; BURGESS, L. W.; TOUSSOUN, T. A.; NELSON, P. E. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. **Phytopathology**, v. 72, n. 1, p. 151-153, 1982.

FISHER, N. L.; MARASAS, W. F. O.; TOUSSOUN, T. A. Taxonomic importance of microconidial chains in *Fusarium* section *Liseola* and effects of water potential on their formation. **Mycologia**, v. 75, n. 4, p. 693-698, 1983.

FRØSLEV, T. G.; MATHENY, P. B.; HIBBETT, D. S. Lower level relationships in the mushroom genus *Cortinarius* (Basidiomycota, Agaricales): a comparison of RPB1, RPB2, and ITS phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 37, n. 2, p. 602-618, 2005. DOI. 10.1016/j.ympev.2005.06.016.

GARCIA, W. M. **Comportamento in vitro, métodos de inoculação e Fontes de resistência à *Fusarium guttiforme* em abacaxizeiro**. 2013. 58 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade do Estado de Mato Grosso, Tangará da Serra, 2013.

GEISER, D. M.; JIMÉNEZ-GASCO, M. del Mar; KANG, S.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T. J.; ZHANG, N.; KULDAU, G. A.; O'DONNELL, K. FUSARIUM-ID v. 1.0: a dna sequence database for identifying *fusarium*. **European Journal Of Plant Pathology**, [S.L.], v. 110. p. 473-479, jun. 2004. DOI. [10.1023/b:ejpp.0000032386.75915.a0](https://doi.org/10.1023/b:ejpp.0000032386.75915.a0).

GOULART, I. C. G. R.; SANTIN, D.; BRASILEIRO, B. P. Fatores que afetam a produtividade na cultura da erva-mate. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 32, n. 3, p. 1345-1367, 2022. DOI 10.5902/1980509863661. Disponível em: <https://doi.org/10.5902/1980509863661>.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G. **Doenças da erva-mate: identificação e controle**. Colombo-PR: Embrapa Florestas, 1996. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/290764/1/circtec25.pdf>. Acesso em: 29 abril 2023.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G. Doenças da erva-mate. IN: GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G.; IEDE, E. T.; SOARES, C. M. S. **Manual de identificação de pragas e doenças da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Colombo-PR: Embrapa Florestas, 2000. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/290728>. Acesso em: 29 abril 2023.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G. Podridão de raízes em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill) causada por *Fusarium* sp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, p. 572, 2001.

GUTIÉRREZ, S.; GALLARDO, R.; ROÑISKI, T.; NARHIÑAK, A. Conocimiento de patologías que afectan cultivos de Yerba Mate (*Ilex Paraguayensis*) en la región NE de la Provincia de Corrientes. **Anuario de Investigación USAL**, n. 8, 2021.

HAN, T.; WANG, J.; REN, H.; YI, H.; ZHANG, Q.; GUO, Q. Changes in defense traits of young leaves in subtropical forests succession. **Plant Ecology**, v. 220, p. 305-320, 2019. DOI. 10.1007/s11258-019-00916-1.

HAWKSWORTH, D. L. Managing and coping with names of pleomorphic fungi in a period of transition. **IMA fungus**, v. 3, n. 1, p. 15-24, 2012.

HERRON, D. A.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D.; RODAS, C. A.; MARINCOWITZ, S.; STEENKAMP, E. T. Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. **Studies in Mycology**, v. 80, p. 131-150, 2015. DOI. 10.1016/j.simyco.2014.12.001.

GERLACH, W.; NIRENBERG, H. **The genus *Fusarium*: a pictorial atlas**. Berlin: Kommissionsverlag Paul Parey, 1982. 406 p.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Dados PAM e PEVS. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/pms/brasil>. Acesso em: 06 jul. 2023.

ILANY, T.; ASHTON, M. S.; MONTAGNINI, F.; MARTINEZ, C. Using agroforestry to improve soil fertility: Effects of intercropping on *Ilex paraguariensis* (yerba mate) plantations with *Araucaria angustifolia*. **Agroforestry Systems**, v. 80, n. 3, p. 399–409, 2010.

INDEX FUNGORUM. Disponível em: < <http://www.indexfungorum.org/> >. Acesso em: 13.jun.2023.

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

KEELING, P. J.; INAGAKI, Y. A class of eukaryotic GTPase with a punctate distribution suggestint multiple functional replacements of translation elongation factor 1 α . **Proceedings of the National Academy of Science, Washington DC**, v. 101, n 43, p. 15380-15385, 2004.

KIM, H. S.; LOHMAR, J. M.; BUSMAN, M.; BROWN, D. W.; NAUMANN, T. A.; DIVON, H. H.; LYSØE, E.; UHLIG, S.; PROCTOR, R. H. Identification and distribution of gene clusters required for synthesis of sphingolipid metabolism inhibitors in diverse species of the filamentous fungus *Fusarium*. **BMC genomics**, v. 21, n. 1, p. 1-24, 2020. DOI. 10.1186/s12864-020-06896-1.

KLOTZ, L. V.; NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A. A Medium for Enhancement of Chlamydospore Formation In *Fusarium* Species, **Mycologia**, v. 80, n.1, p. 108-109, 1988. DOI: 10.1080/00275514.1988.12025505.

LANDI, M.; TATTINI, M.; GOULD, K. S. Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 119, p. 4-17, 2015. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2015.05.012.

LARABA, I.; KIM, H.-S.; PROCTOR, R. H.; BUSMAN, M.; O'DONNELL, K.; FELKER, F. C.; AIME, M. C.; KOCH, R. A.; WURDACK, K. J. *Fusarium xyrophilum*, sp. nov., a member of the *Fusarium fujikuroi* species complex recovered from pseudoflowers on yellow-eyed grass (*Xyris* spp.) from Guyana. **Mycologia**, v. 112, n. 1, p. 39-51, 2019. DOI. 10.1080/00275514.2019.1668991.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. First Edition. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2006, 388 p.

LIMA, N. B.; KRYVENKI, M. A.; CONFORTO, C.; SERRI, D.; KRAMER, R.; ROCA, M.; VARGAS-GIL, S. First report of white thread blight caused by *Ceratobasidium niltonsouzanum* on yerba mate in Argentina. **Plant Disease**, v. 104, n. 2, p. 572-572, 2020. DOI. 10.1094/PDIS-08-19-1603-PDN.

LINK, H. F. Observationes in ordines plantarum naturales. Dissertatio I. **Mag Ges Naturf Freunde Berlin**, v. 3, p. 3-42, 1809.

LIU, Y. J.; WHELEN, S.; HALL, B. D. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. **Molecular biology and evolution**, v. 16, n. 12, p. 1799-1808, 1999. DOI. 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092.

LOMBARD, L.; SANDOVAL-DENIS, M.; LAMPRECHTET, S. C.; CROUS, P. W. et al. Epitypification of *Fusarium oxysporum*: clearing the taxonomic chaos. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 43, n. 1, p. 1-47, 2019, DOI: 10.3767/persoonia.2019.43.01.

LÓPEZ, A. C.; ALVARENGA, A. E.; SHOE, P. D.; MOON, M. F.; VILLALBA, L. L. Aislamiento e identificación de hongos asociados a *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Revista de Ciencia y Tecnología**, Costa rica, n. 33, p. 20-26, 2020.

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, 2018. DOI. 10.1590/01047760201824032535.

MEZZOMO, R.; ROLIM, J. M.; POLETTO, T.; WALKER, C.; MILANESI, P. M.; MUNIZ, M. F. B. Molecular characterization and vegetative compatibility groups of *Fusarium spp.* pathogenic to *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 31, n. 2, p. 846-862, 2021. DOI. 10.5902/1980509846843.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. The CIPRES science gateway: A community resource for phylogenetic analyses. **Proceedings of the TeraGrid 2011 Conference: Extreme Digital Discovery, TG'11**, p. 1–8, 2011. DOI. 10.1145/2016741.2016785.

MIRESKI, M. C. **Fatores físicos, químicos e biológicos que afetam a germinação de *Ilex paraguariensis* St. Hil**, 2018. 116 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium species: an illustrated manual for identification***. University Park: Pennsylvania State University Press, 1983. 226 p.

NIKITIN, D. A.; IVANOVA, E. A.; SEMENOV, M. V.; ZHELEZOVA, A. D.; KSENOFONTOVA, N. A.; TKHAKAKHOVA, A. K.; KHOLODOV, V. A. Diversity, Ecological Characteristics and Identification of Some Problematic Phytopathogenic *Fusarium* in Soil: A Review. **Diversity**, v. 15, 2023. DOI. 10.3390/d15010049.

NIRENBERG, H. I. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium* Sektion Liseola. **Mitteilungen aus der**

Biologischen Bundesanstalt Für Land- und Forstwirtschaft, Berlin – Dahlem, v. 169, p. 1-117, 1976.

NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 434-458, 1998.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *fusarium* are nonorthologous. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 7, n. 1, p. 103-116, 1997. DOI. 10.1006/mpev.1996.0376.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 465-493, 1998. DOI. 10.1080/00275514.1998.12026933.

O'DONNELL, K.; NIRENBERG, H. I.; AOKI, T.; CIGELNIK, E. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, v. 41, n. 1, p. 61-78, 2000.

OLIVEIRA, E. de.; MACIEL, C. G.; CAMPAGNOLO, K. Qualidade sanitária de sementes de erva-mate. **Unoesc e Ciência-ACET**, Joaçaba, v. 6, n. 2, p. 233-240, 2015.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. Área de Distribuição natural da erva-mate. Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais. Curitiba: **Embrapa Florestas**: 17-36 p, 1985.

OTERO-COLINA, G. RODRÍGUEZ-ALVARADO, G.; FERNÁNDEZ-PAVÍA, S.; MAYMON, M.; PLOETZ, R. C.; AOKI, T.; O'DONNELL, K.; FREEMAN, S. et al. Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in Mexico, *Fusarium mexicanum* sp. nov. **Phytopathology**, v. 100, n. 11, p. 1176-1184, 2010. DOI. 10.1094/PHYTO-01-10-0029.

PAULA, S.; WOLF, K. R.; MARTÍNI, A. F.; MILANESI, P. M. Doenças fúngicas em erva-mate. **Scientific Electronic Archives**, v. 11, n. 2, p. 26–34, 2018.

PENTEADO JUNIOR, J. F.; GOULART, I. C. G. R. **Erva 20: sistema de produção de erva-mate**. Embrapa. Brasília –DF, 2019. 152 p.

PEREIRA, J. R. Prognóstico agropecuário erva-mate 2022/2023. **Prognóstico Agropecuário**, v. 43 n. 47, 2022.

PIASSETTA, R. de L. R. **Doenças em mudas clonais de erva-mate em duas épocas do ano-Guarapuava**, 2022. 52 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2022.

PIMENTEL, I. C.; KUCZKOWSKI, F. R.; CHIME, M. A.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Floresta**, Curitiba, v. 36, n. 1, p. 123-128, 2006.

POLETTO, I.; MUNIZ, M. F. B.; CECONI, D. E.; SANTI, D.; WEBER, M. N. D.; BLUME, E. Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causador de podridãode-

raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) na região do vale do Taquarí, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2006.

POLETTO, I.; MUNIZ, M. F. B.; CECONI, D. E.; ARAUJO, M. M.; RODRIGUES, J.; MEZZOMO, R. Inoculação de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* e níveis de sombreamento na erva-mate: influência na severidade da podridão-de-raízes. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 19, n. 3, p. 267-278, 2009.

POLETTO, I.; MUNIZ, M. F. B.; CECONI, D. E.; BLUME, E. Influência da aplicação de NPK e calcário sobre o crescimento da erva-mate, severidade da podridão-de-raízes e população fúngica do solo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 3, p. 429-444, 2011.

POLETTO, I.; LUPATINI, M.; MUNIZ, M. F. B.; ANTONIOLLI, Z. I. Caracterização e patogenicidade de isolados de *Fusarium spp.* causadores de podridão-de-raízes da erva-mate. **Floresta**, Curitiba, v. 42, n. 1, p. 95-104, 2012.

POLETTO, I.; MUNIZ, M. F. B.; CECONI, D. E.; POLETTO, T. Aspectos epidemiológicos da podridão-de-raízes da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 2, p. 281-291, 2015.

PROCTOR, R. H.; VAN HOVE, F.; SUSCA, A.; STEA, G.; BUSMAN, M.; VAN DER LEE, T.; WAALWIJK, C.; MORETTI, A.; WARD, T. J. Birth, death and horizontal transfer of the fumonisin biosynthetic gene cluster during the evolutionary diversification of *Fusarium*. **Molecular Microbiology**, v. 90, n. 2, p. 290-306, 2013. DOI. 10.1111/mmi.12362.

ROLIM, J. M.; RABUSKE, J. E.; SAVIAN, L. G.; SARZI, J. S.; WALKER, C.; MUNIZ, M. F. B. Characterization of *Fusarium spp.* causal agent of wilt in pecan. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 69, n. 6, p. 720-730, 2022. DOI. 10.1590/0034-737X202269060011.

SANDOVAL-DENIS, M.; LOMBARD, L.; CROUS P. W. Back to the roots: a reappraisal of Neocosmospora. **Persoonia**, v. 43, p. 90-185, 2019. DOI. 10.3767/persoonia.2019.43.04.

SANTIN, D.; BENEDETTI, E. L.; DE BARROS, N. F.; DE ALMEIDA, I. C.; WENDLING, I. Intervalos de colheita e adubação potássica influenciam a produtividade da erva-mate. **Floresta**, v.46, n. 4. p. 509-518, 2016. DOI. 10.5380/rf.v46i3.41551.

SCHROERS, H. J.; SAMUELS, G. J.; ZHANG, N.; SHORT, D. P. G.; JUBA, J.; GEISER, D. M. et al. Epitypification of *Fusisporium (Fusarium) solani* and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, v. 108, n. 4, p. 806-819, 2016, DOI: 10.3852/15-255.

SHIN, S.; KIM, K. H.; KANG, C. S.; CHO, K. M.; PARK, C. S.; OKAGAKI, R.; PARK, J. C. A. simple method for the assessment of *Fusarium* head blight resistance in Korean wheat seedlings inoculated with *Fusarium graminearum*. **The Plant Pathology Journal**, v. 30, n. 1, p. 25-32, 2013. DOI. 10.5423/PPJ.OA.06.2013.0059.

SILVA, A. O. da; SILVA, K. da. Desenvolvimento de sistemas agrossilvipastoris atividade base erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.). 1994.

SNYDER, W. C.; HANSEN, H. N. The species concept in *Fusarium*. **American Journal of Botany**, v. 27, n. 2, p. 64-67, 1940.

SNYDER, W. C.; HANSEN, H. N. The species concept in *Fusarium* with reference to section Martiella. **American Journal of Botany**, v. 28, n. 9, p. 738-742, 1941.

SNYDER, W. C.; HANSEN, H. N. The species concept in *Fusarium* with reference to Discolor and other sections. **American Journal of Botany**, v. 32, n. 10, p. 657-666, 1945.

SOUZA, G.F.; OLIVEIRA, L.M.; AGOSTINETTO, L.; PUCHALE, L.Z.; SÁ, A.C.S. Efeito da estratificação em substrato esterelizado na qualidade sanitária de sementes de *Ilex paraguariensis*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.29, n.2, p.854-862, 2019.

STIELOW, B.; LÉVESQUE, C. A.; SEIFERT, K. A. et al. One fungus, which genes? Assessing primers for potential universal secondary DNA barcodes. **Persoonia**, v. 35, p. 242-263, 2015. DOI. 10.3767/003158515X689135.

STUEPP, C. A. **Silvicultura Clonal de Erva-Mate: Compostos Bioativos e Enraizamento Adventício**. 2021. 72 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2021.

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant disease**, v. 87, n. 2, p. 117-128, 2003. DOI. 10.1094/PDIS.2003.87.2.117.

SUMMERELL, B. A. Resolving *Fusarium*: Current status of the genus. **Annual review of phytopathology**, v. 57, p. 323-339, 2019. DOI. 10.1146/annurev-phyto-082718-100204.

TALGØ, V.; STENSVAND, A. A simple and effective inoculation method for *P. hytophthora* and fungal species on woody plants. **EPPO Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 276-279, 2013. DOI. 10.1111/epp.12038.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D. M.; HIBBETT, D. S.; FISHER, M. C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal genetics and biology**, v. 31, n. 1, p. 21-32, 2000. DOI. 10.1006/fgbi.2000.1228.

TIRU, Z.; MANDAL, P.; CHAKRABORTY, A. P.; PAL, A.; SADHUKHAN, S. *Fusarium* Disease of Maize and Its Management through Sustainable Approach. In: MIRMAJLESSI, S. M. (Ed.). ***Fusarium-An Overview of the Genus***. IntechOpen, 2021. p. 61-77. DOI. 10.5772/intechopen.100575.

TORRES-CRUZ, T. J. et al. FUSARIUM-ID v. 3.0: an updated, downloadable resource for *Fusarium* species identification. **Plant disease**, v. 106, n. 6, p. 1610-1616, 2022. DOI: 10.1094/PDIS-09-21-2105-SR

USTIN, S. L.; JACQUEMOUD, S. How the optical properties of leaves modify the absorption and scattering of energy and enhance leaf functionality. In: CAVENDER-BARES, J.; GAMON, J. A.; TOWNSEND, P. A. (Eds.). **Remote Sensing of Plant Biodiversity**. Cham: Springer, 2020. p. 349-384. DOI. 10.1007/978-3-030-33157-3.

VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J. R. QUANT- A Software for Plant Disease Severity Assessment. **8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch New Zealand**, 2003. p. 105.

VAN DER NEST, M. A.; CHÁVEZ, R.; DE VOS, L.; DUONG, T. A. et al. IMA genome-F14: Draft genome sequences of *Penicillium roqueforti*, *Fusarium sororula*, *Chrysosporthe puriensis*, and *Chalaropsis populi*. **IMA fungus**, v. 12, n. 5, p. 1-11, 2021. DOI. 10.1186/s43008-021-00055-1.

VARGAS, L. C. **Patogenicidade e identificação de espécies de fusarium associadas a raízes de plantas com fusariose e sementes em erva-mate**. 2020. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2020.

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segredos. Parte II – chaves para identificação. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 8, n. 1, 2000. p. 303-338.

XUE, D.; ZHANG, X.; LU, X.; CHEN, G.; CHEN, Z. H. Molecular and evolutionary mechanisms of cuticular wax for plant drought tolerance. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 621-633, 2017. DOI. 10.3389/fpls.2017.00621.

WINGFIELD, B. D.; BERGER, D. K.; STEENKAMP, E. T.; LIM, H. J. et al. Draft genome of *Cercospora zeina*, *Fusarium pininemorale*, *Hawksworthiomyces lignivorus*, *Huntia decipiens* and *Ophiostoma ips*. **IMA fungus**, v. 8, n. 2, p. 385-396, 2017. DOI. 10.5598/imafungus.2017.08.02.10.

WINGFIELD, B. D.; BILLS, G. F.; DONG, Y. et al. Draft genome sequence of *Annulohyphoxylon stygium*, *Aspergillus mulundensis*, *Berkeleyomyces basicola* (syn. *Thielaviopsis basicola*), *Ceratocystis smalleyi*, two *Cercospora beticola* strains, *Coleophoma cylindrospora*, *Fusarium fracticaudum*, *Phialophora* cf. *hyalina*, and *Morchella septimelata*. **IMA fungus**, v. 9, n. 1, p. 199-223, 2018. DOI. 10.5598/imafungus.2018.09.01.13.

WINGFIELD, B. D.; DE VOS, L.; WILSON, A. M.; DUONG, T. A. et al. IMA Genome-F16: Draft genome assemblies of *Fusarium marasasianum*, *Huntia abstrusa*, two *Immersiophora knoxdaviesiana* isolates, *Macrophomina pseudophaseolina*, *Macrophomina phaseolina*, *Naganishia randhawae*, and *Pseudocercospora cruenta*. **IMA fungus**, v. 13, n. 3, p. 1-22, 2022. DOI. 10.1186/s43008-022-00089-z.

WOLLENWEBER, H. W.; REINKING, O. A. Die Fusarien: ihre beschreibung, schadwirkung und bekämpfung. Berlin: Paul Parey, 1935.

WU, A. B.; LI, H. P.; ZHAO, C. S.; LIAO, Y. C. Comparative pathogenicity of *Fusarium graminearum* isolates from China revealed by wheat coleoptile and floret inoculations. **Mycopathologia**, v. 160, n. 1, p. 75-83, 2005. DOI. 10.1007/s11046-005-1153-4.

YANG, M.; ZHANG, H.; VAN DER LEE, T. A.; WAALWIJK, C.; VAN DIEPENINGEN, A. D.; FENG, J.; BRANKOVICS, B.; CHEN, W. Population genomic analysis reveals a highly conserved mitochondrial genome in *Fusarium asiaticum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 839, 2020. DOI. 10.3389/fmicb.2020.00839.

YEATS, T. H.; ROSE, J. K. C. The formation and function of plant cuticles. **Plant physiology**, v. 163, n. 1, p. 5-20, 2013. DOI. 10.1104/pp.113.222737.

YILMAZ, N.; SANDOVAL-DENIS, M.; LOMBARD, L.; VISAGIE, C. M.; WINGFIELD, B. D.; CROUS, P. W. Redefining species limits in the *Fusarium fujikuroi* species complex. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 46, n. 1, p. 129-162, 2021. DOI. 10.3767/persoonia.2021.46.05.