

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DE *Rhizoctonia solani* KÜHN, AGENTE CAUSAL
DA MELA DA SOJA [*Glycine max* (L.) MERRILL], SELEÇÃO DE
GENÓTIPOS E CONTROLE QUÍMICO**

MAURÍCIO CONRADO MEYER

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU – SP
Fevereiro – 2002

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DE *Rhizoctonia solani* KÜHN, AGENTE CAUSAL
DA MELA DA SOJA [*Glycine max* (L.) MERRILL], SELEÇÃO DE
GENÓTIPOS E CONTROLE QUÍMICO**

MAURÍCIO CONRADO MEYER

Orientador: Prof. Dr. Nilton Luiz de Souza

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU – SP
Fevereiro – 2002

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - FCA
UNESP - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

M613c Meyer, Maurício Conrado, 1966-
Caracterização de *Rhizoctonia solani* Kühn, agente
causal da mela da soja (*Glycine max* (L.) Merrill), se-
leção de genótipos e controle químico / Maurício Conra-
do Meyer. -- Botucatu, [s.n.], 2002
xiii, 126 f. : il. color.

Tese (doutorado) -- Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrônômicas
Orientador: Nilton Luiz de Souza
Inclui bibliografia

1. Fungos fitopatogênicos 2. Soja - Resistência a
doenças e pragas 3. Soja - Doenças e pragas - Controle
I. Souza, Nilton Luiz de II. Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho (Campus de Botucatu).
Faculdade de Ciências Agrônômicas III. Título

Palavras-chave: Mela da soja; *Glycine max*; *Rhizoctonia solani*
AG1; Caracterização molecular; Resistência ge-
nética; Controle químico; Indução de resistên-
cia

*Aos meus pais, **Rolfi** (in memoriam)*

*e **Elizabeth**, pela vida.*

*À **Catia, Marianna e Maria Laura**, minha querida família,*

pelas doses diárias de amor.

*Aos meus irmãos **Karyn e Cleomar**, sogros,*

cunhados e sobrinhos, pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, presente em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Nilton Luiz de Souza pela orientação, confiança, apoio, incentivo e amizade.

Ao Dr. José Tadashi Yorinori (Embrapa Soja) pelo estímulo, ensinamentos, apoio e amizade.

À Embrapa, pela oportunidade da realização deste trabalho.

À Dra. Eiko Eurya Kuramae e Dra. Roseli Chela Fenille, pelos valiosos ensinamentos e colaboração na execução das análises moleculares.

Ao Dr. Leones Alves Almeida (Embrapa Soja) pela cessão dos genótipos de soja avaliados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo César Ceresini (Departamento de Biologia, FEIS – UNESP), pela cessão dos isolados padrões dos grupos de anastomose de *Rhizoctonia solani*.

Ao Dr. Carlos Arrabal Arias (Embrapa Soja) pelo auxílio nas análises estatísticas da avaliação de germoplasma.

Ao Prof. Dr. Carlos G. Raetano (FCA – UNESP) pelas orientações na condução dos trabalhos de controle químico.

Ao Prof. Dr. Norberto da Silva (FCA – UNESP) pelas sugestões nas avaliações de germoplasma.

Aos professores e funcionários do Departamento de Produção Vegetal da FCA – UNESP, pelos ensinamentos e colaboração.

Aos amigos e colegas César, Janaína, Anielo, Michelle, Natália, Denise, Ana Paula, Alexandre, Gustavo, Simone, Celso, Daniel, Samantha, Andréia e Maisa, pelo companheirismo e amizade.

Aos funcionários da Biblioteca e Seção de Pós-graduação da FCA-UNESP.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS	IX
LISTA DE FIGURAS	XII
1 RESUMO	1
2 SUMMARY	3
3 INTRODUÇÃO	5
4 REVISÃO DE LITERATURA	8
4.1 A cultura da soja	8
4.2 A mela da soja	9
4.3 Sintomas da doença	10
4.4 O agente causal	14
4.5 Epidemiologia	15
4.6 Controle	17
4.7 Resistência genética	18
4.8 Importância da identificação do grupamento de anastomose	20
5 MATERIAL E MÉTODOS	22
5.1 Coleção de isolados do patógeno	22
5.2 Caracterização citológica	23
5.2.1 Número médio de núcleos por célula	23
5.2.2 Diâmetro médio de hifas	25
5.3 Caracterização quanto ao grupamento de anastomose	26
5.4 Caracterização cultural	27

	Página
5.4.1 Aspecto de colônia	27
5.4.2 Taxa de crescimento micelial em função da temperatura	28
5.5 Formulação de micélio de <i>Rhizoctonia solani</i> AG1-IA	28
5.5.1 Formulação a partir de grãos de arroz colonizados	28
5.5.2 Formulação em talco	29
5.6 Avaliação de metodologias de inoculação	30
5.7 Patogenicidade e severidade dos isolados à soja	32
5.7.1 Avaliação em plantas inteiras	32
5.7.2 Avaliação em trifólios destacados	33
5.8 Caracterização dos isolados por marcadores moleculares RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”)	34
5.8.1 Extração de DNA genômico total	34
5.8.2 Reações de RAPD	35
5.9 Sequenciamento genético das regiões ITS e do gene 5,8s do rDNA	37
5.10 Avaliação de germoplasma de soja para resistência à mela	39
5.10.1 Avaliação em plantas inteiras	40
5.10.2 Avaliação em trifólios destacados	41
5.11 Avaliação da eficiência de fungicidas no controle da mela da soja	42
5.11.1 Efeito de fungicidas no desenvolvimento <i>in vitro</i> do patógeno	42
5.11.2 Efeito de fungicidas no controle da doença	44
5.12 Avaliação de indutores de resistência no controle da doença	46
5.12.1 Efeito de indutores de resistência no desenvolvimento <i>in vitro</i> do patógeno	46

	Página
5.12.2 Efeito de indutores de resistência no controle da doença	46
6 RESULTADOS	48
6.1 Coleção de isolados do patógeno	48
6.2 Caracterização citológica	48
6.2.1 Número médio de núcleos por célula	48
6.2.2 Diâmetro médio de hifas	49
6.3 Caracterização quanto ao grupamento de anastomose	52
6.4 Caracterização cultural	56
6.4.1 Aspecto de colônia	56
6.4.2 Taxa de crescimento micelial em função da temperatura	57
6.5 Formulação de micélio de <i>Rhizoctonia solani</i> AG1-IA	61
6.5.1 Formulação a partir de grãos de arroz colonizados	61
6.5.2 Formulação em talco	61
6.6 Avaliação de metodologias de inoculação	61
6.7 Patogenicidade e severidade dos isolados à soja	63
6.8 Caracterização dos isolados por marcadores moleculares RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”)	70
6.8.1 Extração de DNA genômico total	70
6.8.2 Reações de RAPD	70
6.9 Sequenciamento genético das regiões ITS e do gene 5,8s do rDNA	73
6.10 Avaliação de germoplasma de soja para resistência à mela	77
6.11 Avaliação da eficiência de fungicidas no controle da mela da soja	91

	Página
6.11.1 Efeito de fungicidas sobre o desenvolvimento <i>in vitro</i> do patógeno	91
6.11.2 Efeito de fungicidas sobre o desenvolvimento da doença	91
6.12 Avaliação de indutores de resistência no controle da doença	95
6.12.1 Efeito de indutores de resistência sobre o desenvolvimento <i>in vitro</i> do patógeno	95
6.12.2 Efeito de indutores de resistência sobre o desenvolvimento da doença	96
7 DISCUSSÃO	98
8 CONCLUSÕES	107
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
1 Isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> causando sintomas de mela, acrescentados à coleção da micoteca do Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, da Faculdade de Ciências Agrônomicas – UNESP, Botucatu, SP	24
2 Isolados padrões dos grupos de anastomose utilizados neste trabalho	24
3 Estádios de desenvolvimento da soja	31
4 Seqüência de bases dos “primers” usados nas reações de RAPD	36
5 Mistura de reagentes e DNA genômico para reação RAPD	36
6 Mistura de reagentes e DNA genômico para reação PCR	38
7 Composição do inóculo de <i>Rhizoctonia solani</i> para avaliação de resistência em soja .	40
8 Fungicidas utilizados nos experimentos de controle químico da mela da soja	43
9 Tratamentos utilizados no experimento de avaliação de indutores de resistência em plantas no desenvolvimento da mela da soja	47
10 Condição nuclear dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> causadores da mela da soja e dos padrões dos AGs 1, 2-3 e 4	50
11 Condição nuclear dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> causadores da mela da soja por estado de origem	51
12 Diâmetro médio de hifas dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> causadores da mela da soja e dos isolados padrões dos AGs 1, 2-3 e 4	52
13 Reação de anastomose e freqüência de fusão de hifas de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> causadores da mela da soja com os padrões do AG1	53

Quadro	Página
14 Taxas de crescimento micelial dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> causadores da mela da soja e dos isolados padrões dos AGs 1, 2-3 e 4, em função da temperatura	59
15 Quantificação de estruturas fúngicas viáveis de formulados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG1-IA em grãos de arroz colonizados e talco, armazenados em três ambientes	62
16 Médias de severidade da mela da soja entre diferentes metodologias de inoculação em plantas inteiras e trifólios destacados, em duas cultivares	63
17 Severidade da doença causada por isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> e por isolados padrões dos AGs 1, 2-3 e 4, em soja ‘MABRS Seridó RCH’	65
18 Média dos níveis de severidade dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> causadores da mela e dos isolados padrões dos AGs 1, 2-3 e 4, em soja ‘MABRS Seridó RCH’	69
19 Distribuição dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> causadores da mela da soja em função do grau de severidade da doença sobre ‘MABRS Seridó RCH’	69
20 Tamanho das seqüências de nucleotídeos das regiões ITS1, ITS2 e do gene 5,8s de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> causadores da mela da soja e de padrões de grupos de anastomose	74
21 Matriz de similaridade genética com base nas seqüências das regiões ITS1, ITS2 e do gene 5,8s de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> causadores da mela da soja e de padrões de grupos de anastomose	75
22 Reação de genótipos de soja à mela causada por <i>Rhizoctonia solani</i> AG1-IA e AG1-IB	78

Quadro	Página
23 Inibição do crescimento micelial <i>in vitro</i> e concentração letal de fungicidas no meio de cultura suficiente para reduzir o desenvolvimento do isolado SJ 121 de <i>Rhizoctonia solani</i> AG1-IA em 50% e 90%	92
24 Efeito protetor e curativo de fungicidas sobre a mela da soja, avaliado na cv. ‘MABRS Seridó RCH’ inoculada com o isolado SJ 121 de <i>Rhizoctonia solani</i> AG1-IA	93
25 Efeito de quatro concentrações de Acibenzolar-S-Metil (ASM) e ácido salicílico (AS) no meio de cultura sobre o crescimento micelial <i>in vitro</i> do isolado SJ 121 de <i>Rhizoctonia solani</i> AG1-IA	95
26 Efeito dos indutores de resistência Acibenzolar-S-Metil (ASM) e ácido salicílico (AS) sobre a mela da soja, avaliado na cv. ‘MABRS Seridó RCH’ inoculada com o isolado SJ 121 de <i>Rhizoctonia solani</i> AG1-IA	97

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Sintomas de mela em soja	12
2 Sintomas de mela em soja	13
3 Anastomose de hifas (região circundada) entre isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> causadores da mela da soja e isolados padrões dos grupos de anastomose	55
4 Aspecto de colônias de alguns isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> causadores da mela da soja e dos AGs 1, 2-3 e 4, em meio BDA a 27°C por 10 dias na ausência de luz	58
5 Taxa de crescimento micelial de isolados padrões de <i>Rhizoctonia solani</i> , média dos isolados definidos como pertencentes aos AG1-IA e AG1-IB pela caracterização molecular (item 6.8), e dos SJ 89, 92 e 94, em função da temperatura	60
6 Severidade da mela em soja em função da metodologia de inoculação	64
7 Padrão de bandas de polimorfismo de DNA amplificadas ao acaso (RAPD) com o “primer” OPP-14, de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> causadores da mela da soja e dos padrões AG1 (IA, IB, IC), AG2-3 e AG4 (HGI, HGII, HGIII)	71
8 Dendrograma gerado por UPGMA, baseado no coeficiente “Simple Matching”, a partir de bandas polimórficas obtidas por RAPD de amostras de DNA genômico de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> causadores da mela da soja e dos padrões AG1 (IA, IB, IC), AG2-3 e AG4 (HGI, HGII, HGIII)	72
9 Dendrograma gerado por “Neighbor-joining” ilustrando a homologia nas seqüências de nucleotídeos das regiões ITS1, ITS2 e do gene 5,8s do rDNA de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> causadores da mela da soja e de padrões do AG1 (IA, IB, IC), AG2-3 e AG4 (HGI, HGII, HGIII)	76

Figura	Página
10 Avaliação de genótipos de soja para resistência à mela, em planta inteira inoculada por aspersão de suspensão de fragmentos de micélio e escleródios	90
11 Efeito de fungicidas no controle da mela da soja	94

1 RESUMO

A mela da soja ocorre em várias regiões tropicais e subtropicais no mundo, sendo responsável por reduções de produtividade de até 50% nos EUA e de 31% no Brasil. A doença é causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* AG1-IA e AG1-IB, com relatos do AG2-3 somente no Japão. No Brasil há incidência de mela nas regiões Norte, Nordeste e Centro Oeste. A caracterização do patógeno é fundamental para o estabelecimento de estratégias de controle e direcionamento de programas de melhoramento na busca de resistência genética. O controle químico representa a única alternativa após a instalação da doença, cuja eficiência varia em função das condições ambientais. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o agente causal da mela da soja no Brasil, bem como desenvolver metodologia de seleção e avaliar a variabilidade genética em germoplasma de soja para resistência à doença, e o efeito de fungicidas e indutores de resistência sobre o patógeno e a doença. Isolados de *R. solani* provenientes do Mato Grosso, Maranhão, Roraima e Tocantins, foram analisados quanto às características citológicas, morfológicas, culturais e fusão de hifas para determinação do grupamento de anastomose. Estes isolados foram também comparados por

marcadores moleculares RAPD e pela homologia de sequência de nucleotídeos das regiões ITS1, ITS2 e do gene 5,8s do rDNA. Foram comparadas metodologias de avaliação de germoplasma para resistência à mela por diferentes formas de inoculação. Os efeitos de fungicidas e indutores de resistência foram avaliados *in vitro* e *in vivo*. Não foi possível distinção completa dos grupos intraespecíficos de anastomose pelas características citológicas, morfológicas, culturais e fusões de hifas. A caracterização por RAPD agrupou isolados do Mato Grosso, Maranhão e Tocantins com o AG1-IA, apresentando níveis de similaridade acima de 63%. O sequenciamento das regiões ITS e 5,8s confirmou a homologia destes isolados com o AG1-IA e definiu os isolados provenientes de Roraima como AG1-IB. Três isolados procedentes de Mato Grosso, Maranhão e Roraima, respectivamente, não se enquadraram a nenhum grupo de anastomose. A melhor metodologia de avaliação de germoplasma foi a de inoculação em plantas inteiras com suspensão de fragmentos de micélio e escleródios. Dos 337 genótipos avaliados, 13 mostraram-se moderadamente resistentes, destacando-se os cultivares 'IAC-8', 'FT-16', 'Leflore' e 'UFV-9 (Sucupira)'. Maiores reduções na severidade da doença foram obtidas com aplicações preventivas de fungicidas, destacando-se as estrobirulinas como mais eficientes. Foi observado efeito do Ácido Salicílico e Acibenzolar-S-Metil na redução da severidade quando aplicado aos 10 dias antes da inoculação nas dosagens de 2,5mM e 12,5mg i.a./L, respectivamente.

Palavras-chave: mela da soja, *Glycine max* (L.) Merrill, *Rhizoctonia solani* Kühn AG1, caracterização molecular, resistência genética, controle químico, indução de resistência.

CHARACTERIZATION OF *Rhizoctonia solani* KÜHN, CAUSAL AGENT OF RHIZOCTONIA FOLIAR BLIGHT OF SOYBEAN [*Glycine max* (L.) MERRILL], GENOTYPES SELECTION AND CHEMICAL CONTROL. Botucatu, 2002. p. Tese (Doutorado em Agronomia / Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: MAURÍCIO CONRADO MEYER

Adviser: NILTON LUIZ DE SOUZA

2 SUMMARY

Rhizoctonia foliar blight (RFB) of soybean occur on some world tropical and subtropical regions, causing yield reductions of 50% in USA and of 31% in Brazil. The disease is caused by *Rhizoctonia solani* AG1-IA and AG1-IB, and by AG2-3 only in Japan. The RFB occurs in Brazil in the North, Northeast and Mid-West regions of the country. The characterization of the pathogen is important for the establishment of disease control strategies and breeding for genetic resistance. Chemical control remains the only measure for controlling RFB after its incidence in a field, but its efficiency depends on the environmental conditions. The objectives of the present work were: characterization of Brazilian RFB isolates, screening methodologies and evaluation of soybean germplasm for genetic resistance, evaluation of fungicides and activators for their effects upon systemic acquired resistance on the *R. solani* and RFB. Isolates from the states of Mato Grosso, Maranhão, Roraima and Tocantins were analyzed for cytological, morphological, cultural and

hyphal fusion characteristics. These isolates were also compared by Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD) and by homology of rDNA-ITS sequence regions in order to define anastomosis group (AG) and Intraspecific Group (ISG) of the pathogen. Germplasm evaluation methodologies for resistance to RFB were compared by different inoculation methods. The effect of fungicides and activators of plant resistance were tested *in vitro* and *in vivo*. It was not possible complete distinction of ISGs by cytological, morphological, cultural and hyphal fusion characteristics. The RAPD results inferred the isolates from Mato Grosso, Maranhão and Tocantins into AG1-IA, with genetic similarity levels above 63%. The rDNA-ITS sequence confirmed this isolates as AG1-IA and defined the isolates from Roraima as AG1-IB. Three isolates from Mato Grosso, Maranhão and Roraima, respectively, were not defined into any of the AGs analyzed. The best methodology to evaluate soybean germplasm for resistance to RFB was the whole plant assay, sprayed with suspension of mycelia and sclerotia fragments. Among 337 genotypes evaluated, 13 showed moderate resistance to RFB, notably cultivars 'IAC-8', 'FT-16', 'Leflore' and 'UFV-9 (Sucupira)'. Greatest reduction of disease severity was observed in preventive fungicide application and the strobirulines were more efficient. Salicylic Acid and Acibenzolar-S-Methyl showed reduction of disease severity when sprayed 10 days before *R. solani* inoculation, at doses of 2,5mM and 12,5mg a.i./L, respectively.

Keywords: Rhizoctonia Foliar Blight, *Glycine max* (L.) Merrill, *Rhizoctonia solani* Kühn AG1, molecular characterization, genetic resistance, chemical control, systemic acquired resistance.

3. INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é a mais importante fonte de proteína e óleo vegetal no mundo, em função da qualidade e baixo custo de produção (Wilcox, 1987). Sua produção mundial na safra 2000/2001 foi de 152,6 milhões de toneladas, sendo o Brasil o segundo maior produtor, responsável por cerca de 20% deste volume, com uma área cultivada de 13,6 milhões de hectares, dos quais, 5,5 milhões de hectares em regiões tropicais e subtropicais (Embrapa Soja, 2001).

O fungo *Rhizoctonia solani* Kühn, teleomorfo *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk, figura como um dos patógenos mais importantes para diversas culturas (Ogoshi, 1996). Apresenta grande variabilidade genética e é composto por 14 grupos de anastomose (AG), subdivididos em grupos intraespecíficos (ISG) dos quais existem atualmente 23 ISGs descritos (Carling, 2000). A caracterização de AG e ISG é fundamental para a definição de estratégias de controle da doença e do patógeno alvo em programas de melhoramento genético (Anderson, 1982; Ogoshi, 1987; Sneh et al., 1991).

A mela da soja é causada por *R. solani* AG1-IA, AG1-IB e somente no Japão pelo AG2-3 (Jones & Belmar, 1989; Yang *et al.*, 1990b; Naito & Kanematsu, 1994; Nelson *et al.*, 1996), ocorrendo em praticamente todas as regiões tropicais e subtropicais que cultivam soja no mundo (Sinclair & Backman, 1989). No Brasil, Fenille (2001) avaliou 62 isolados obtidos da parte aérea em lavouras de Mato Grosso, identificando-os como pertencentes ao AG1-IA.

De acordo com Sinclair & Backman (1989), o índice médio de redução de produtividade causado pela doença no mundo é de 35%. No Brasil foram registradas perdas de 18% a 60%, variando em função das condições ambientais (Meyer & Yorinori, 1995; Meyer & Yorinori, 1999). Em 1994 foram estimadas perdas causadas pela mela de 4.100t no Brasil, 70.000t na Índia e 30.600t nos EUA (Wrather *et al.*, 1997). Yorinori (1998b) relata ainda perdas de 15.000t em 1997 e 14.400t em 1998, no Brasil.

O patógeno apresenta uma ampla gama de hospedeiros, com relatos de 20 espécies de plantas cultivadas e 18 de plantas daninha. (Sinclair & Backman, 1989; Sartorato, 1988; Black *et al.*, 1996; Meyer, 1998).

O controle da doença é mais eficiente quando se adotam medidas integradas, envolvendo práticas culturais, tratamento de sementes com fungicidas recomendados, utilização de sementes de boa qualidade sanitária e fisiológica, e controle químico com fungicidas recomendados (Sartorato, 1988; Sinclair & Backman, 1989; Joye *et al.*, 1990; Yorinori, 1994; Gazzoni & Yorinori, 1995; Hwang *et al.*, 1996, Yorinori, 1998a).

A maioria dos trabalhos de avaliação da eficiência de fungicidas para controle da mela foram realizados em condições de campo e, como a doença é altamente

influenciada pelas condições ambientais, nem sempre são alcançados resultados consistentes e a eficiência do controle químico não apresenta constância em diversas situações.

Nos EUA existem relatos de algumas fontes de resistência genética em soja (Hartwig et al., 1985; Patel, 1989; Harville *et al.*, 1996; Harville *et al.*, 1997), porém no Brasil ainda não houveram avaliações de germoplasma, principalmente em função da falta de metodologia apropriada e do desconhecimento da variabilidade genética do patógeno alvo.

Em função da necessidade de refinamento tecnológico para aumento da produtividade, a redução de danos causados pela mela da soja representa um grande desafio à pesquisa devido à precariedade de conhecimento da doença e do patógeno no Brasil.

Desta forma, este trabalho foi proposto com o objetivo de subsidiar futuras pesquisas, visando:

- a) gerar informações sobre a caracterização do agente causal da mela da soja no Brasil,
- b) desenvolver metodologia de avaliação de germoplasma de soja para resistência à mela,
- c) avaliar variabilidade genética entre genótipos de soja para resistência à doença,
- d) avaliar o efeito de fungicidas e indutores de resistência em plantas sobre o desenvolvimento do patógeno e da doença.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 A cultura da soja

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é a mais importante fonte de proteína e óleo vegetal no mundo, em função da qualidade e baixo custo de produção (Wilcox, 1987). Sua produção mundial na safra 2000/2001 foi de 152,6 milhões de toneladas, sendo o Brasil o segundo maior produtor, responsável por cerca de 20% deste volume, com uma área cultivada de 13,6 milhões de hectares, dos quais, 5,5 milhões de hectares em regiões tropicais e subtropicais (Embrapa Soja, 2001).

A importância da cadeia agro-industrial da soja para a economia brasileira pode ser avaliada pela sua participação de 5,6% do PIB (Produto Interno Bruto) de 1999, representando um valor anual de US\$ 31,20 bilhões (Embrapa Soja, 2000).

A grande expansão de área cultivada no mundo proporcionou um aumento no número e severidade das doenças que afetam a soja, sendo que mais de 100

patógenos já foram reportados, dentre os quais, cerca de 35 são de importância econômica (Sinclair & Backman, 1989, Hartman et al., 1999). Yorinori (1998b) relata que no período de 1970 a 1998, mais de 40 doenças foram identificadas no Brasil, causando perdas anuais de US\$ 1,2 bilhão em 1994, US\$ 1,6 bilhão em 1997 e US\$ 1,8 bilhão em 1998.

4.2 A mela da soja

A mela da soja ocorre em praticamente todas as regiões tropicais e subtropicais que cultivam soja no mundo, apresentando um índice médio de redução de produtividade de 35% (Sinclair & Backman, 1989). No sul dos EUA, foram registradas perdas de 30% (Yang *et al.*, 1990a) a 50% (Muyolo et al., 1993b), sendo responsável por 1% a 2% das perdas anuais na cultura no estado de Louisiana (Joye et al., 1990). Na Índia foram reportadas perdas de 80% a 90% (Hepperly et al., 1982). Em 1994 foram estimadas perdas causadas pela mela de 4.100t no Brasil, 70.000t na Índia e 30.600t nos EUA (Wrather et al., 1997). A doença ocorre ainda no sul da China, Malásia, Austrália, Nova Zelândia, Filipinas, Taiwan, África, México e Porto Rico (Sinclair & Backman, 1989).

Um dos primeiros relatos da doença no mundo foi feito em 1918 nas Filipinas (citado por Sinclair & Backman, 1989). Nos EUA, a doença foi inicialmente constatada na Louisiana em 1951 (Atkins & Lewis, 1954; Stroube, 1954) e passou a ser considerada epidêmica em 1973 (O'Neill et al., 1977).

No Brasil, a primeira constatação de *Rhizoctonia solani* associada à parte aérea da soja foi feita por Bolkan & Ribeiro (1985), no Distrito Federal. A doença foi posteriormente observada e descrita por Meyer & Yorinori (1995) na safra 1992/93 em lavouras do sul do Maranhão. A partir de então, sua incidência aumentou progressivamente nesta região, apresentando reduções de produtividade da ordem de 18% na safra 1994/95 (Meyer & Yorinori, 1995) e 31% na safra 1995/96 (Meyer, 1997a). Perdas de até 60% foram observadas em algumas lavouras no estado de Roraima na safra de 1996 (Meyer, 1997b). No Mato Grosso foram relatadas perdas entre 30% e 40% (Yorinori., 1998a). Yorinori (1998b) estimou perdas de 4.100t em 1994, 15.000t em 1997 e 14.400t em 1998.

4.3 Sintomas da doença

A mela da soja afeta toda a parte aérea da planta, principalmente as folhas dos terços inferior e médio, surgindo inicialmente lesões encharcadas, de coloração pardo-avermelhadas a roxas, evoluindo para marrom escuro a preto (Figuras 1A, 1C, 1D e 1E). As lesões podem ser pequenas manchas ou tomar todo o limbo foliar em forma de murcha ou podridão (Figuras 1C e 1E). Folhas infectadas podem cair ou se aderir a outras folhas ou hastes através de micélio do fungo (Figuras 1A e 1C). Em condições favoráveis ocorre desenvolvimento micelial do patógeno sobre a planta (Figura 2D) (Sinclair & Backman, 1989; McGee, 1992; Yorinori, 1994; Gazzoni & Yorinori, 1995; Meyer & Yorinori, 1995; Hwang et al. 1996; Yorinori, 1998a; Hartman et al., 1999).

Nas hastes, pecíolos e vagens normalmente aparecem manchas castanho-avermelhadas. Em vagens novas, flores e ráceros florais pode ocorrer completa podridão (Figuras 1B, 1E e 2C) (McGee, 1992; Gazzoni & Yorinori, 1995; Meyer & Yorinori, 1995).

É comum haver abundante produção de microescleródios nos tecidos infectados, em condições favoráveis (Figura 1D, 1C, 2A e 2B) (Sinclair & Backman, 1989; McGee, 1992; Gazzoni & Yorinori, 1995; Meyer & Yorinori, 1995; Hwang et al. 1996; Hartman et al., 1999).

Yang et al. (1990c) dividem a mela da soja em dois tipos de acordo com os sintomas, identificada como crestamento aéreo (“aerial blight”) a doença causada pelo AG1-IA, característico por formar macroescleródios (escleródios tipo “sasakii”) nos tecidos infectados, e, como teia micélica (“web blight”) a doença causada pelo AG1-IB, característica pela abundante formação de microescleródios.

Naito et al. (1995) descrevem os sintomas iniciais causados por basidiósporos de *T. cucumeris* como pequenas manchas necróticas arredondadas, pardo-acinzentadas, que evoluem em lesões secundárias maiores, irregulares, semelhantes às descritas anteriormente para os AG1-IA e IB, causadas por hifas oriundas das lesões primárias. Esta descrição refere-se à doença causada pelo AG2-3, observada somente no Japão.

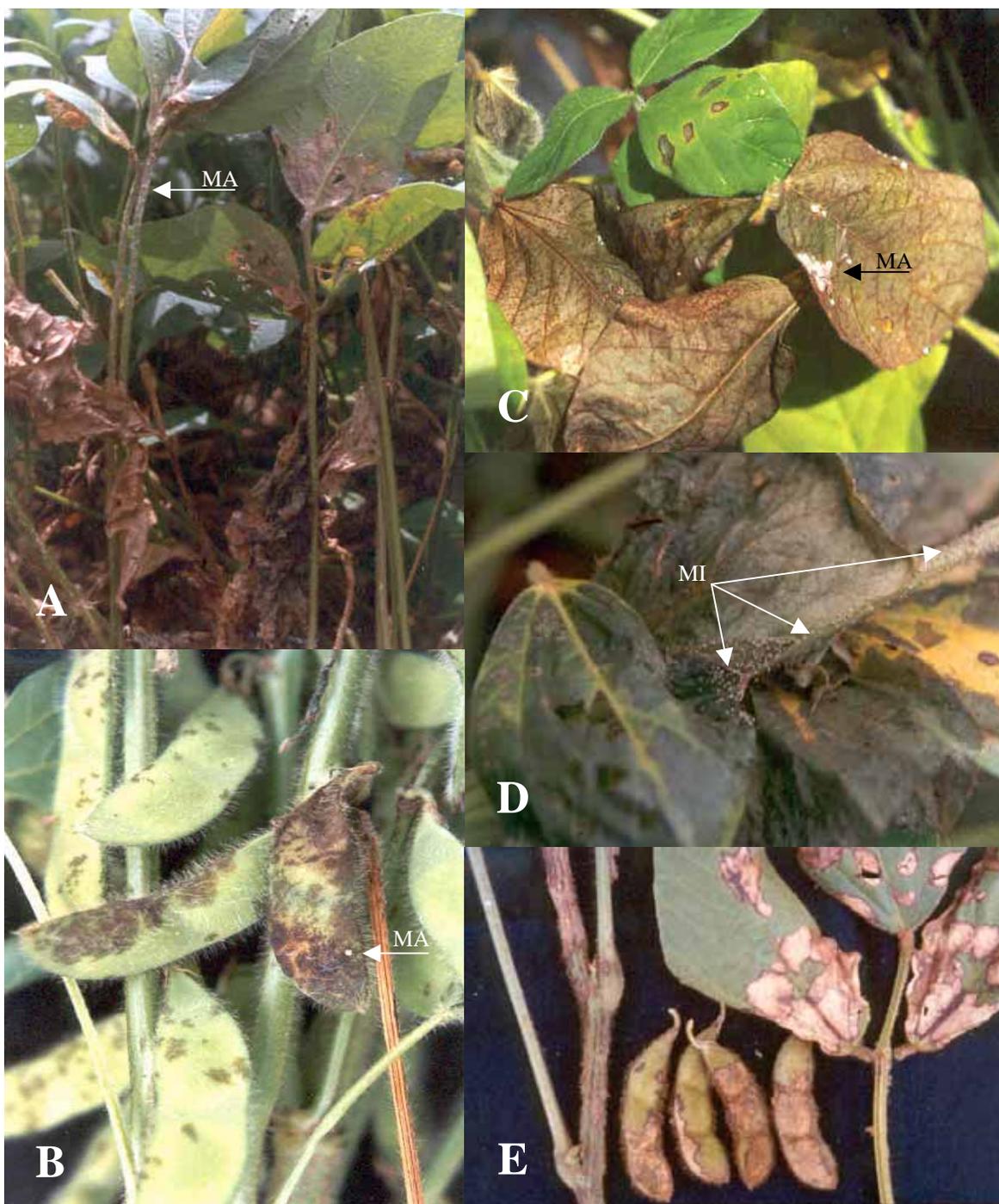


Figura 1. Sintomas de mela em soja: A) aspecto geral de planta infectada com lesões nas folhas e macroescleródios (2 a 7mm de diâmetro) nos pecíolos; B) lesões em vagens; C) folhas com lesões e podridão; D) folhas com podridão e microescleródios; E) lesões em hastes vagens e folhas. MA = macroescleródios, MI = microescleródios.

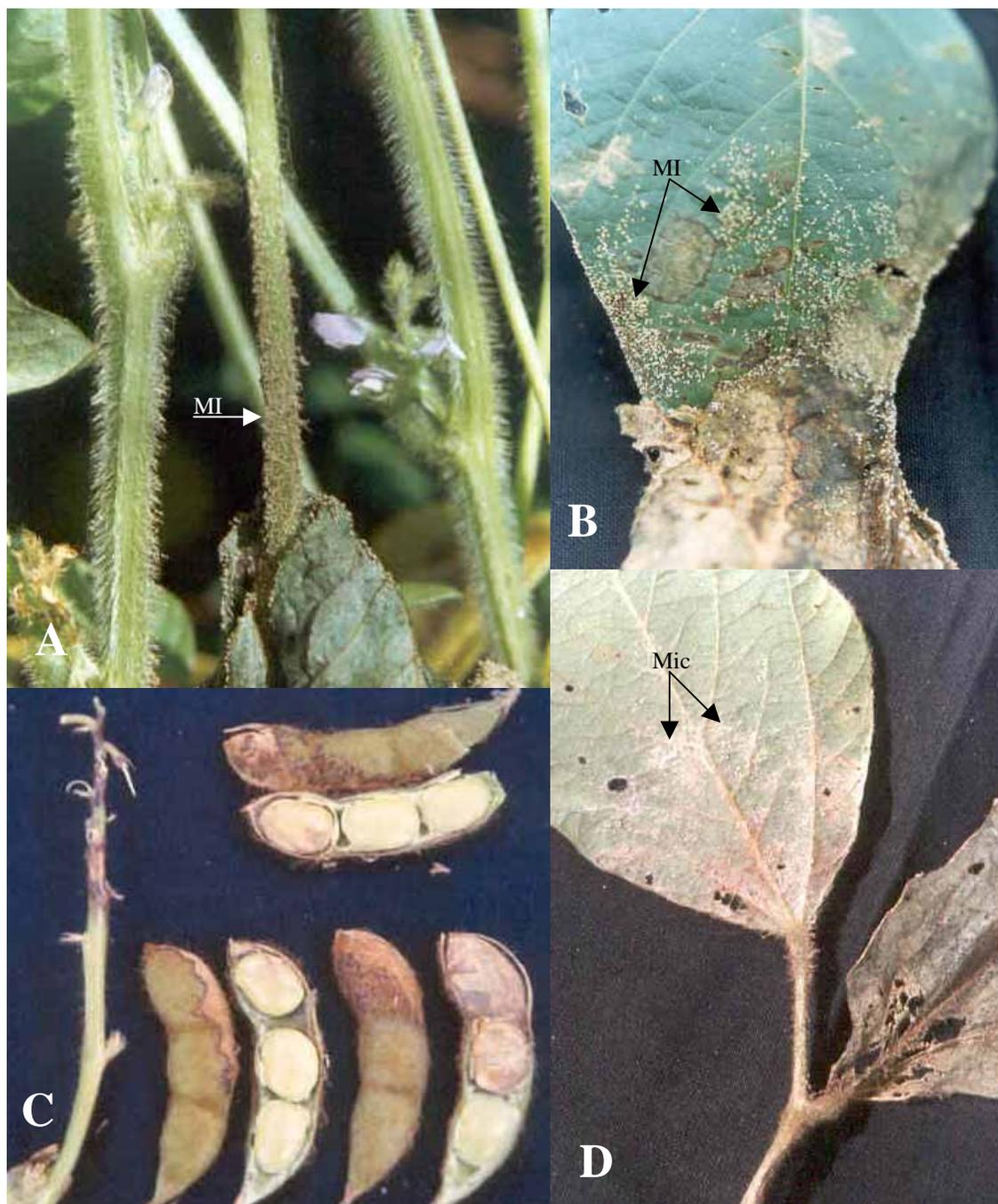


Figura 2. Sintomas de mela em soja: A) microescleródios em pecíolo (0,1 a 0,2mm de diâmetro); B) transmissão por contato do patógeno em folha, apresentando lesões e produção de microescleródios; C) lesões em rácemo, vagens e sementes em formação; D) desenvolvimento micelial de *R. solani* em folha e pecíolo. MI = microescleródios, Mic = micélio.

4.4 O agente causal

A mela da soja é causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kühn, cujo teleomorfo é *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk. Sua classificação taxonômica, de acordo com a fase sexual, é a seguinte (Hawksworth et al., 1995; Stalpers & Andersen, 1996):

Reino:	Fungi
Filo:	Basidiomycota
Classe:	Basidimycetes
Ordem:	Ceratobasidiales
Família:	Ceratobasidiaceae
Gênero:	<i>Thanatephorus</i>
Espécie:	<i>T. cucumeris</i> (anamorfo <i>Rhizoctonia solani</i>).

R. solani que afetam a parte aérea da soja, pertencem aos grupos de anastomose (AG) 1, grupos intraespecíficos IA (AG1-IA) e IB (AG1-IB) e AG2, grupo intraespecífico 3 (AG2-3), sendo este último somente observado no Japão (Yang et al., 1990c; Naito & Kanematsu, 1994; Nelson et al., 1996). No Brasil, Fenille (2001) avaliou 62 isolados obtidos da parte aérea de plantas de soja cultivadas no Mato Grosso, identificando-os como pertencentes ao AG1-IA.

O fungo apresenta células multinucleadas. As hifas novas são amarelo claro e as velhas, amarelo-pardo a marrom claro. As ramificações das hifas são caracteristicamente em ângulo de 90°, com uma ligeira constrição no ponto de origem da ramificação e um septo logo em seguida. Não há produção de conídios, mas apenas células monilióides. Apresenta septos tipo “doliporo”. Tecido esclerodial não diferenciado em

membrana e medula. Ausência de rizomorfos (Parmeter et al., 1969; Parmeter & Whitney, 1970; Ogoshi, 1987; Sneh et al., 1991; Carling & Sumner, 1992; McGee, 1992).

A produção, forma e cor dos escleródios varia de acordo com o isolado e grupamento de anastomose. Microescleródios (0,1mm a 0,2 mm) e macroescleródios ou escleródios tipo “sasakii” (2mm a 7 mm) são formados em meio de cultura e na superfície de plantas infectadas (Hwang et al., 1996). Escleródios produzidos na superfície das plantas normalmente apresentam coloração bege a castanho-escuro (Gazzoni & Yorinori, 1995; Meyer & Yorinori, 1995; Yorinori, 1998a).

Isolados são facilmente cultivados em meio de BDA e podem ser preservados por vários métodos, sendo os mais utilizados o de preservação em grãos de cereais colonizados (arroz, trigo, aveia ou cevada) e em meio de cultura coberto com óleo mineral (Sneh & Adams, 1996).

4.5 Epidemiologia

A mela se desenvolve bem em condições de temperatura entre 25°C e 30°C e umidade relativa do ar acima de 80% (Kousik, et al., 1995; Hwang et al.,1996). Condição de clima chuvoso e a frequência e distribuição das chuvas durante o ciclo da cultura são fatores determinantes para o desenvolvimento da doença (Yang et al., 1990a).

O fungo sobrevive no solo através de escleródios ou saprofiticamente em restos de cultura ou no colo ou raízes de hospedeiros alternativos ou eventuais (Hwang et al.,1996).

A disseminação a partir do inóculo primário ocorre principalmente através de respingos de chuva carreando fragmentos de micélio ou escleródios para as folhas e pecíolos de plantas jovens, antes do fechamento das entre-linhas na lavoura (Yang et al., 1990d; Hwang et al., 1996). Naito et al. (1995) descrevem infecções primárias em folhas de soja através de basidiósporos produzidos pela fase perfeita do AG2-3 em restos de cultura de trigo, em áreas com sucessão trigo-soja, no Japão.

A principal doença causada pelo AG1-IA no mundo é a podridão da bainha do arroz (“sheaf blight”), por isso maior incidência e danos têm sido observados em áreas de rotação ou sucessão soja-arroz (Verma & Thapliyal, 1976; O’Neil et al., 1977; Anderson, 1982).

Em lavouras de soja no sul do Maranhão foram observadas infecções precoces das plantas, favorecidas pelos danos de fitotoxidez de herbicidas pós-emergentes, principalmente Lactofen e Chlorimuron-ethyl, assim como por ataque de lagartas desfolhadoras (M.C. Meyer, dados não publicados).

Inóculo secundário é formado pelo crescimento micelial e formação de microescleródios, com disseminação por contato de folha para folha ou planta para planta (Yang et al., 1990a e 1990c).

O crescimento micelial inicial nos tecidos da planta é caracterizado pela formação de “estruturas de infecção” (“infection cushions”), que consiste numa diferenciação de hifas para aderência do micélio, de onde partem as hifas infectivas. Existe uma correlação positiva entre o número destas estruturas de infecção e a severidade da doença, assim como a inibição da formação dessas estruturas com o grau de resistência genética da cultivar (Kousic et al., 1994).

O patógeno apresenta uma ampla gama de hospedeiros, com relatos de 20 espécies de plantas cultivadas e 18 de plantas daninha. Dentre as cultivadas, destacam-se soja, feijão, caupi, arroz, algodão, sorgo, tomate e curcubitáceas (Sinclair & Backman, 1989; Sartorato, 1988; Black et al., 1996). Algumas das plantas daninhas relatadas como hospedeiras são comumente encontradas em lavouras de soja, tais como *Ipomea hederacea*, *Sida spinosa*, *Cyperus rotundus*, *Senna obtusifolia*, *Amaranthus hybridus*, *Digitaria sanguinalis*, *Echinochloa crus-galli*, *Brachiaria platyphylla*, *Cynodon dactylon* e *Eleusine indica* (Black et al., 1996). No Maranhão foram observadas plantas de *Bidens pilosa* infectadas por *R. solani* (M.C. Meyer, dado não publicado), assim como, no Tocantins, plantas de *Dolichus lablab* (Meyer, 1998).

4.6 Controle

O controle da mela da soja é mais eficiente quando se adotam medidas integradas, envolvendo práticas como semeadura direta, nutrição equilibrada das plantas (principalmente K, S, Zn, Cu, Mn), rotação de culturas não hospedeiras, adequação de população de plantas e espaçamento entre linhas, tratamento de sementes com fungicidas recomendados, utilização de sementes de boa qualidade sanitária e fisiológica, eliminação de plantas daninhas e restivas de soja e controle químico com fungicidas recomendados (Sartorato, 1988; Sinclair & Backman, 1989; Joye et al., 1990; Yorinori, 1994; Gazzoni & Yorinori, 1995; Hwang et al., 1996; Yorinori, 1998a).

A utilização de cobertura morta do solo, através do sistema de semeadura direta, é uma das medidas que tem se mostrado mais eficiente por evitar os

respingos de chuva que levam os propágulos do fungo para as folhas e hastes (Sartorato, 1988).

Hwang et al. (1996) relatam a eficiência de Iprodione, Iprodione + Benomyl e Trifenil Acetato Estanho + Benomyl. Avaliações de fungicidas em condições de campo no Mato Grosso registraram eficiência de Azoxystrobin + óleo mineral, Trifenil Hidróxido Estanho, Tebuconazole + Tiofanato Metílico, Benomyl, Benomyl + Mancozeb + espalhante adesivo, Carbendazim, Carbendazim + Trifenil Hidróxido Estanho, Tiofanato Metílico, Fentin Acetato, Fentin Acetato + Tiofanato Metílico e Difenoconazole (Utimada et al., 1999a, Utimada et al., 1999b, Utimada et al., 2000).

Existem poucos relatos sobre os efeitos de indutores de resistência em plantas de soja. Dann et al. (1998) observaram reduções de severidade de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja com aplicação de Acibenzolar-S-Metil, variando de 20% a 70%, sendo as maiores reduções em cultivares mais suscetíveis.

4.7 Resistência genética

Avaliações em campo nos EUA identificaram algumas fontes de resistência à mistura dos AGs1-IA e IB, nos grupos IV, V, VI e VII de maturação fisiológica, caracterizando-se maior severidade da doença em cultivares do grupo IV, intermediária nos grupos V e VI, e menor no grupo VII. Os genótipos com melhores níveis de resistência à doença foram ‘Buckshot 66’ (grupo VI) e ‘Pioneer 9593’ (grupo V) (Harville et al., 1996; Harville et al., 1997).

Muyolo et al. (1993b) compararam as reações de 15 genótipos de soja, 13 de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e dois de feijão lima (*P. lunatus*) para resistência ao AG1-IB, em condições de casa de vegetação e laboratório, considerando maiores probabilidades de sucesso de seleção em soja, onde nove genótipos apresentaram resistência moderada, com destaque para ‘Gregg’, ‘Bedford’ e ‘RA-606’. Estes mesmos autores encontraram correlação nos resultados obtidos pelas metodologias de avaliação em planta inteira e trifólios destacados para soja, mas não para feijão e feijão lima.

Hartwig et al. (1985) registraram resistência a campo de ‘Leflore’ ao AG1-IA. Patel (1989) relata resistência ao AG1-IB em ‘Gregg’, ‘Centenial’, ‘Hardee’ e ‘RA606’, assim como, suscetibilidade em ‘Davis’ e ‘FFR646’ (citados por Hwang et al., 1996).

Não existem relatos de desenvolvimento de cultivares com resistência genética à mela da soja no Brasil. A utilização das fontes de resistência citadas na literatura em programas de melhoramento no Brasil é viável, sendo primordial o desenvolvimento de metodologias adequadas para avaliação de cultivares à isolados brasileiros, possibilitando identificar variabilidade genética e facilitar estudos dos mecanismos de herança.

Aparentemente, cultivares com menor tamanho de folhas e arquitetura de plantas com menor ângulo de inserção dos ramos laterais na haste principal, apresentam maior tolerância à mela. Este fenótipo permite maior aeração das plantas, evitando a formação de microclima favorável ao desenvolvimento da doença (aumento das condições de umidade e temperatura no terço médio das plantas).

4.8 Importância da identificação do grupamento de anastomose

Anastomose em *R. solani* é a capacidade de fusão entre hifas de diferentes isolados, mas relacionados entre si. O grupo de anastomose (AG) é uma coleção de isolados estritamente relacionados, agrupados com base na capacidade de fazerem anastomose entre si (Anderson, 1982; Carling, 1996).

A importância do conceito de AG à Fitopatologia situa-se no fato de que cada grupo pode ser considerado uma unidade evolucionária, pois representam populações geneticamente isoladas e não intercruzáveis. Os vários AGs normalmente apresentam similaridade morfológica, mas são geneticamente diferentes (Anderson, 1982; Vilgalys & Cubeta, 1994). O insucesso de antigos programas de melhoramento para resistência às doenças se deve principalmente ao fato de se ter considerado *R. solani* como uma simples espécie e não uma coleção de populações distintas que podem ser reconhecidas e manipuladas através do conceito de AG (Anderson, 1982).

A classificação de *R. solani* em AG e ISG trouxe enorme contribuição aos estudos epidemiológicos, ecológicos e de resistência genética em plantas, pois estas divisões e subdivisões caracterizam particularidades em relação à distribuição geográfica e severidade em diferentes hospedeiros (Ogoshi, 1987; Muyolo et al., 1993a).

A distinção do AG1 em três subgrupos (IA, IB e IC) é feita principalmente com base no hospedeiro de origem, sintomas e características culturais *in vitro* (Ogoshi, 1987; Sneh et al, 1991; Liu & Sinclair, 1993).

Segundo Jones & Belmar (1989), a temperatura ótima de crescimento, a sensibilidade a fungicidas e condições favoráveis à sobrevivência de propágulos diferem entre isolados dos subgrupos IA e IB do AG1, portanto, a seleção apropriada de isolados beneficia programas de melhoramento.

A 35°C, isolados do AG1-IA formam maior quantidade de estruturas de infecção (“infection cushions”) em folhas de soja do que isolados do AG1-IB e outros grupos (Kousik et al., 1995).

A diferenciação entre os AGs é uma importante ferramenta nos estudos com *R. solani*, mas existem imperfeições em sua utilização pois alguns grupos e subgrupos podem fazer anastomose entre si e variações de fatores ambientais afetam as reações, podendo frequentemente causar erros de interpretação (Carling, 1996, Toda et al., 1999).

Os subgrupos do AG1 não são distinguíveis pela fusão de hifas, mas de acordo com a formação de escleródios, características culturais e homologia da sequência de bases do DNA (Sneh et al., 1991).

Dentre as técnicas moleculares utilizadas para caracterização de AGs e ISGs estão as de isoenzimas, hibridização DNA/DNA, análises de polimorfismo de tamanho de fragmentos restringidos (RFLP), reação de polimerase em cadeia (PCR), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) e sequenciamento de DNA ribossômico e mitocondrial (Boysen et al., 1996; Cubeta et al., 1996; Kuninaga, 1996; Kuninaga et al., 1997; Toda et al., 1999; Pascual et al., 2000).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleção de isolados do patógeno

Os isolados de *Rhizoctonia solani* causadores da mela da soja foram obtidos de folhas infectadas de plantas adultas de soja e feijoeiro, oriundas de regiões produtoras de soja dos estados do Mato Grosso, Maranhão, Tocantins e Roraima.

Os isolamentos foram feitos a partir de amostras de tecido vegetal infectado, desinfestadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,3% (30'') e posteriormente lavadas duas vezes por imersão em água destilada (30'' cada). Após este procedimento, as amostras foram transferidas para placas de Petri com meio de cultura KHMP (Fenille, 2001) e mantidas a 27°C na ausência de luz. As amostras que apresentaram crescimento micelial característico de *R. solani*, foram repicados sucessivamente para placas de Petri com meio de cultura de batata, dextrose e ágar (BDA), descrito por Tuite, 1969, acrescido de oxitetraciclina na concentração de 50µg/mL (BDAOx), até se obter culturas puras.

Alguns isolamentos também foram feitos a partir de microescleródios, produzidos em folhas, pecíolos ou hastes das plantas, por plaqueamento direto dos mesmos em meio BDAOx e repicagens sucessivas até se obter culturas puras.

Os isolados obtidos foram acrescentados à coleção de *Rhizoctonia* spp. da micoteca do Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, da Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP, Botucatu, SP, mantendo-se o código “SJ” para identificar isolados patogênicos à soja, seguindo-se a seqüência numérica dos isolados pré-existent, cuja relação é apresentada no Quadro 1.

A preservação dos fungos se fez em tubos de cultura com meio BDA e óleo mineral (Tuite, 1969) e em grãos de arroz segundo metodologia de Sneh & Adams (1996), modificado por Fenille (2001).

Os isolados padrões dos grupos de anastomose utilizados também fazem parte da micoteca da UNESP de Botucatu, SP, fornecidos pelo Prof. Dr. Paulo César Ceresini (FEIS – UNESP, Ilha Solteira, SP), que os introduziu no país através da EMBRAPA - Recursos Genéticos (Quadro 2).

5.2 Caracterização citológica

5.2.1 Número médio de núcleos por célula

Esta determinação foi feita por contagem direta do número de núcleos em 20 células jovens de hifas cultivadas em lâminas de vidro para microscopia. Cada lâmina

Quadro 1. Isolados de *Rhizoctonia solani* causando sintomas de mela, acrescentados à coleção da micoteca do Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, da Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP, Botucatu, SP.

Número do isolado	Hospedeira	Procedência	Data do isolamento
SJ 82 e 83	Folhas de feijoeiro	C.E. Embrapa Soja – FAPCEN Balsas, MA	04/99
SJ 89	Folhas de soja	Sérgio Nogueira Nova Mutum, MT	08/99
SJ 92	Folhas de soja	C.E. Embrapa Soja Balsas, MA	08/99
SJ 93	Folhas de soja	PRODECER III Pedro Afonso, TO	08/99
SJ 94	Folhas de soja	C.E. Embrapa RR. Boa Vista, RR	08/99
SJ 113 a 115	Folhas de feijoeiro	Embrapa CPAF-RR Boa Vista, RR	10/99
SJ 116, 117 e 118	Hastes de soja ‘Sambaíba’ com microescleródios	Arlei Sandri / Rio Coco; Balsas, MA	01/00
SJ 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126 e 127	Folhas de soja ‘Sambaíba’	Arlei Sandri / Rio Coco; Balsas, MA	01/00
SJ 128, 129 e 130	Folhas de soja ‘Sambaíba’	Baltazar Rosso / Faz. Corrente; Sucupira do Norte, MA	02/00
SJ 131, 132, 133 e 134	Folhas de soja ‘Xingu’	Fernando Piaia Campo Novo do Parecis, MT	03/00
SJ 135 a 138	Folhas de soja ‘Emgopa 313’	Fernando Piaia Campo Novo do Parecis, MT	03/00
SJ 139 a 141	Folhas de feijoeiro	C.E. Embrapa Soja – FAPCEN Batavo, Gerais de Balsas, MA	10/00
SJ 142 a 148	Folhas de feijoeiro	Embrapa CPAF-RR Boa Vista, RR	10/00

Quadro 2. Isolados padrões dos grupos de anastomose utilizados neste trabalho.

Grupo de Anastomose	Identificação original	Responsável pelo isolamento	Hospedeiro	Procedência	Ano
AG1-IA	H5-519	S. Naito	Milho	Tohoku, Japão	1993
AG1-IB	-	L.J. Herr	Alface	Ohio, EUA	1993
AG1-IC	-	L.J. Herr	Alface	Ohio, EUA	1993
AG2-3	-	S. Naito	Soja	Japão	-
AG4-HGI	-	S. Kuninaga	-	Japão	-
AG4-HGII	-	S. Kuninaga	-	Japão	-
AG4-HGIII	-	M.A. Cubeta	Amendoim	EUA	-

foi acondicionada em placas de Petri de 90 x 20mm, sendo estes conjuntos esterilizados em estufa a 140°C/60'. Com auxílio de uma pipeta, as lâminas foram assepticamente cobertas com ágar-água (AA) a 1%, autoclavado (121°C/20'), formando uma camada de cerca de 1mm de espessura. Após transferir um disco de BDA (5mm) com micélio do isolado a ser observado (cultivado a 27°C/48 horas, no escuro), o conjunto foi incubado a 27°C/36 horas, no escuro.

Após a incubação, foi realizado a coloração dos núcleos de acordo com Bandoni (1979), aplicando-se algumas gotas de solução de Safranina O a 0,03% e, em seguida, algumas gotas de solução aquosa de KOH (0,3%), extraindo-se o excesso de líquido com auxílio de papel absorvente.

As observações foram feitas em microscópio óptico com amplificação de 200X e 400X.

5.2.2 Diâmetro médio de hifas

Foram adotados os mesmos procedimentos descritos no item 5.2.1 para cultivo de micélio e coloração de hifas dos isolados a serem avaliados.

As medições foram feitas através de um micrômetro ocular adaptado a um microscópio binocular, com amplificação de 600X.

Foram realizadas medições em 50 hifas para cada isolado.

5.3 Caracterização quanto ao grupamento de anastomose

Considerando-se relatos bibliográficos a respeito dos grupos de anastomose que infectam a parte aérea de plantas de soja (Fenille, 2001), aspectos culturais das colônias em BDA e características dos escleródios (forma, tamanho e coloração), elegeu-se os subgrupos IA, IB e IC do AG-1 para pareamento com os isolados em estudo.

A anastomose de hifas foi determinada pela técnica da lâmina de vidro para microscopia (Ceresini et al., 1996), conforme descrito no item 5.2.1. Um disco de BDAOx (5mm de diâmetro) obtido das margens de uma cultura nova de um isolado a ser identificado e outro de um dos isolados padrões de *R. solani* AG-1 foram posicionados a 2cm um do outro sobre a lâmina de vidro com fina camada de AA a 1% e pH 8,5. O conjunto foi incubado a 27°C/36 horas, no escuro. Para cada isolado foram realizadas três repetições.

As observações das reações de anastomose foram feitas em microscópio ótico, sob campo claro, a 200 e 400X de aumento (Liu & Sinclair, 1991), quando as hifas dos isolados começaram a se interceptar. A coloração de hifas foi feita com Safranina O a 0,03% e solução aquosa de KOH 0,3%, conforme descrito no item 5.2.1.

A compatibilidade entre hifas dos isolados pareados foi considerada quando observada fusão de parede celular e citoplasma das células, com ou sem morte das células adjacentes (reação de anastomose perfeita ou tipo C3), ou quando observada fusão de parede celular e plasmólise do citoplasma, normalmente apresentando redução do diâmetro das hifas no ponto de contato (reação imperfeita ou tipo C2 e C1). Contato entre hifas sem lise de parede celular no ponto de contato não foi considerado anastomose, mas somente contato entre hifas (reação tipo C0) (Sneh et al., 1991; Carling, 1996).

A frequência de fusão foi calculada segundo Sneh et al. (1991), utilizando-se a fórmula:

$$FF = A (100) / C,$$

onde: FF = frequência de fusão entre hifas (em %);

A = número de anastomoses observadas em 15 campos de observação ao microscópio;

C = número de pontos de contato entre hifas, havendo ou não anastomose, em 15 campos de observação ao microscópio.

De acordo com Sneh et al. (1991), as frequências de fusão de hifas dos isolados em estudo com os padrões do AG1-IA, AG1-IB e AG1-IC e entre estes, foram classificadas como alta (FF > 50%), moderada (FF entre 30% e 50%) e baixa (FF < 30%).

5.4 Caracterização cultural

5.4.1 Aspecto de colônia

A descrição das características de colônias de *R. solani* causadores da mela da soja e dos padrões dos AGs 1 (IA, IB e IC), 2-3 e 4 (HGI, HGII e HGIII) foi realizada por avaliação visual de culturas em meio BDA a 27°C, com 10 dias de idade, na ausência da luz, observando-se o volume e coloração de micélio, tamanho, coloração e distribuição de escleródios na placa. O tamanho de escleródio foi definido como pequeno ou microescleródio (<1mm de diâmetro) e grande, tipo “sasakii” ou macroescleródio (>1mm de diâmetro) (Sumner, 1996).

5.4.2 Taxa de crescimento micelial em função da temperatura

Foram avaliadas as taxas de crescimento radial de micélio/dia dos isolados de *R. solani* em estudo, assim como dos isolados padrões do AG1 (IA, IB e IC), AG2-3 e AG4 (HGI, HGII e HGIII), cultivados em placas de Petri com BDAOx a partir de discos de micélio de culturas em BDAOx a 27°C/48horas no escuro. As placas foram mantidas em estufa biológica na ausência de luz, às temperaturas de 15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C, respectivamente. As medições foram realizadas a intervalos de 24 horas. Cada experimento foi composto de três repetições em delineamento inteiramente casualizado.

5.5 Formulação de micélio de *Rhizoctonia solani* AG1-IA

Foram feitas duas tentativas de formulação de micélio de *R. solani* AG1-IA, isolado SJ-93, com o objetivo de inoculação em plantas para avaliação de resistência genética à doença.

5.5.1 Formulação a partir de grãos de arroz colonizados

Grãos de arroz descascados foram autoclavados em frascos de vidro com tampa de rosca (Duran), a 121°C/1 hora (200g arroz + 100mL H₂O). Para cada frasco, foram transferidos seis discos de micélio provenientes de uma cultura do isolado SJ 93 em meio BDAOx a 27°C/48horas no escuro. Os frascos foram mantidos em estufa incubadora a 27°C no escuro, até a colonização de toda a massa de arroz (quatro a cinco dias).

O arroz colonizado foi espalhado em uma bandeja de alumínio forrada com papel filtro, mantida à temperatura ambiente para secagem.

Após este período, o material foi triturado em um moinho de faca por 20 segundos e passado em uma peneira com malha de 35 mesh (orifícios de $425\mu\text{m}$). O resultado deste peneiramento foi acondicionado em frascos de vidro com tampa de rosca (Duran), armazenados a temperatura ambiente, em geladeira (4°C) e “freezer” (-20°C).

A quantificação da concentração de estruturas viáveis do fungo neste formulado foi feita por plaqueamento de suspensão a 10% e quatro diluições seriadas 1:10, em meio seletivo KHMP (item 5.1).

5.5.2 Formulação em talco

Em frascos Erlenmeyer de 1L, contendo 250mL de meio líquido BSP (extrato de cocção de 200g de batata, 29g sacarose, 10g peptona e H_2O q.s.p. 1000mL) autoclavado a $121^{\circ}\text{C}/30'$, foi cultivado o isolado SJ-93 a partir de discos de micélio de cultura em BDAOx a $27^{\circ}\text{C}/48\text{horas}$ no escuro (seis discos/Erlenmeyer). Estes frascos foram mantidos a temperatura ambiente, sob agitação constante, na ausência de luz, por 6 dias.

O micélio desenvolvido foi drenado e misturado com talco (CaCO_3) na proporção de 2,5:10 (v/v), acondicionado em uma bandeja de alumínio e deixado secar à temperatura ambiente por sete dias. Posteriormente, foi acondicionado em frascos de vidro com tampa de rosca (Duran) e armazenado a temperatura ambiente, em geladeira (4°C) e “freezer” (-20°C).

A quantificação da concentração de estruturas viáveis do fungo neste formulado foi feita por plaqueamento de suspensão a 10% e quatro diluições seriadas 1:10, em meio seletivo KHMP (item 5.1).

5.6 Avaliação de metodologias de inoculação

Foram avaliadas quatro metodologias de inoculação em plantas e em trifólios destacados das cultivares de soja ‘Embrapa 63 (Mirador)’ e ‘MABRS Seridó RCH’ em estágio V6 de desenvolvimento vegetativo (Quadro 3).

As plantas foram cultivadas em vasos de alumínio com 1,2L de solo (três plantas/vaso), sob condição de casa de vegetação ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$). De plantas destinadas para este fim específico, foram coletados o quarto trifólio, acondicionando-os em placas de Petri (um trifólio/placa), tendo a extremidade do pecíolo envolta por algodão embebido em água destilada.

As metodologias avaliadas foram compostas por:

- a) deposição de disco de micélio;
- b) pulverização de suspensão de micélio nas diluições de 1:3, 1:6 e 1:30 (p/v);
- c) pulverização de um formulado de micélio em pó, obtido de grãos de arroz colonizados, ressuscitado em água destilada a 5% (item 5.5.1);
- d) pulverização de um formulado de micélio em talco (CaCO_3), na concentração de 25%, ressuscitado em água destilada a 5% (item 5.5.2).

Quadro 3. Estádios de desenvolvimento da soja (Yorinori et al., 1993).

ESTÁDIO	DESCRIÇÃO
I. Fase Vegetativa	
VC	Da emergência a cotilédones abertos
V1	Primeiro nó: folhas unifolioladas abertas
V2	Segundo nó: primeiro trifólio aberto
V3	Terceiro nó: segundo trifólio aberto
...	
Vn	Enésimo (último) nó com trifólio aberto, antes da floração
II. Fases Reprodutiva (Observações na haste principal)	
R1	Início da floração: até 50% das plantas com uma flor
R2	Floração plena: maioria dos ramos com flores abertas
R3	Final da floração: vagens com até 1,5 cm
R4	Maioria das vagens no terço superior com 2-4 cm
R5.1	Grãos perceptíveis ao tato a 10% da granação
R5.2	Maioria das vagens com granação de 10 a 25%
R5.3	Maioria das vagens entre 25 e 50% de granação
R5.4	Maioria das vagens entre 50 e 75% de granação
R5.5	Maioria das vagens entre 75 e 100% de granação
R6	Vagens com granação de 100% e folhas verdes
R7.1	Início a 50% de amarelecimento de folhas e vagens
R7.2	Entre 50 e 75% de folhas e vagens amarelas
R7.3	Mais de 75% de folhas e vagens amarelas
R8.1	Início a 50% de desfolha
R8.2	Mais de 50% de desfolha à pré-colheita
R9	Ponto de colheita

Os volumes de inoculação para os tratamentos com pulverização foram de 2,5mL/planta e 1,5mL/trifólio.

Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por cinco dias a $28 \pm 6^\circ\text{C}$ e, os trifólios destacados, em câmara de crescimento por dois dias a 27°C e fotoperíodo alternado a intervalos de 12 horas.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, sendo cada tratamento constituído por quatro vasos para avaliação em plantas e três placas para trifólios destacados.

A avaliação da severidade da doença em plantas foi feita com auxílio da escala de notas de 0 a 5 descrita por Harville et al. (1996), sendo 0 = sem sintomas, 1 = até 5% de área foliar infectada (a.f.i.), 2 = 6 a 10% a.f.i., 3 = 11 a 30% a.f.i., 4 = 31 a 50% a.f.i. e 5 = acima de 50% a.f.i. Para trifólio destacado, foi utilizada a escala de notas de 1 a 5 descrita por Muyolo et al. (1993b), onde 1 = sem sintomas, 2 = até 25% a.f.i., 3 = 26 a 50% a.f.i., 4 = 51 a 75% a.f.i. e 5 = acima de 75% a.f.i.

5.7 Patogenicidade e severidade dos isolados à soja

Os testes para determinação da patogenicidade e do grau de severidade dos isolados em estudo e dos padrões AG1 (IA, IB e IC), AG2-3 e AG4 (HGI, HGII e HGIII) foram realizados em plantas e em trifólios destacados de soja.

5.7.1 Avaliação em plantas inteiras

Plantas de soja 'MABRS Seridó RCH' cultivadas em vasos de alumínio com 1,2L de solo (três plantas/vaso), em casa de vegetação ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$), foram inoculadas por deposição de disco de micélio de cada isolado, proveniente de cultura em BDA a $27^{\circ}\text{C}/48$ horas no escuro, em apenas um dos folíolos do terceiro e quarto trifólios de cada planta.

Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por cinco dias ($28\pm 6^{\circ}\text{C}$), borrifando-se água três vezes ao dia para manutenção da umidade nas plantas.

A severidade foi avaliada no folíolo mais afetado, com auxílio da escala de notas de 1 a 5 proposta por Bolkan & Ribeiro (1985), onde

1 = sem sintomas;

2 = até 25% de área do folíolo infectada;

3 = de 26% a 50% de área do folíolo infectada;

4 = de 51% a 75% de área do folíolo infectada;

5 = acima de 75% de área do folíolo infectada.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com quatro repetições.

Foi efetuado o reisolamento do patógeno em uma repetição de cada tratamento para confirmação de sua atuação como agente causal da doença

5.7.2 Avaliação em trifólios destacados

De plantas cultivadas para este fim específico, foram coletados os terceiros e quartos trifólios, acondicionando-os em placas de Petri (um trifólio/placa), tendo a extremidade do pecíolo envolta por algodão embebido em água destilada.

A inoculação foi feita por deposição de um disco de micélio, proveniente de cultura em BDA a 27°C /48 horas no escuro, em apenas um dos folíolos, sendo borrifado água destilada para manutenção de umidade.

As placas foram mantidas em câmara de crescimento por dois dias a 27°C e fotoperíodo alternado a intervalos de 12 horas.

A avaliação da severidade foi feita utilizando-se a escala de notas de 1 a 5, descrita no item 5.7.1.

Foi utilizado o delineamento experimental de blocos casualizados, com três repetições.

5.8 Caracterização dos isolados por marcadores moleculares RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”)

5.8.1 Extração de DNA genômico total

A extração de DNA total dos isolados e dos padrões AG1 (IA, IB e IC), AG2-3 e AG4 (HGI, HGII e HGIII) seguiu o protocolo descrito por Kuramae-Izioka (1997) para *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium oxysporum*, com algumas modificações. Dois discos de micélio de cada isolado, provenientes de culturas em BDAOx a 27°C/três dias na ausência de luz, foram transferidos para tubos 50mL tipo “Falcon”, com 25mL de meio líquido BSP (extrato de cocção de 200g de batata, 29g sacarose, 10g peptona e H₂O q.s.p. para 1000mL) e incubados por 10 dias a 27°C no escuro.

O micélio de cada isolado foi secado em papel absorvente Kimwipes EX-L (Kimberly-Clark Inc., Roswell, GA) e macerado com nitrogênio líquido em tubo “Eppendorf”. A ressuspensão foi feita com 700µL de tampão de extração (100mM Tris-HCl

pH 8,0; 50mM EDTA pH 8,0; 500mM NaCl; 100µL SDS 10%), homogeneizada em aparelho “Vortex” e incubada por 30 minutos a 65°C. Em seguida, foi adicionado 500µL de acetato de potássio 5M e as amostras colocadas em banho de gelo por 30 minutos com agitação por inversão dos tubos a cada cinco minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000g. O sobrenadante foi transferido para novos tubos, acrescentado o mesmo volume de clorofórmio:álcool isoamílico (25:1), seguido de 20 suaves inversões. Após nova centrifugação por 10 minutos a 12.000g, o sobrenadante foi coletado com cuidado para não apanhar a interface. Foi adicionado o mesmo volume de isopropanol, misturando-se gentilmente, permanecendo a -20°C por uma noite, para precipitação do DNA. Nova centrifugação por 10 minutos a 12.000g foi realizada, descartando-se o sobrenadante. O “pellet” foi lavado com 700µL de etanol 70% e centrifugado por cinco minutos a 12.000g. Após descartado o sobrenadante, os tubos foram mantidos a temperatura ambiente, abertos e emborcados em papel absorvente, por cerca de 30 minutos para secagem do “pellet”, que foi ressuscitado em 50µL de TE (10mM Tris, pH 8,0, 1mM EDTA) + RNase (40 µg/mL), incubando-se em banho-maria por uma hora a 37°C. A quantificação foi feita em um espectrofotômetro “Gene Quant” (Pharmacia), determinando-se a razão A_{260nm}/A_{280nm} . As amostras foram armazenadas a -20°C.

5.8.2 Reações de RAPD

As reações RAPD seguiram basicamente o protocolo apresentado por Ferreira & Grattapaglia (1998), empregando-se os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”)

OPG-04, OPG-08, OPG-13, OPP-14, OPP-15 e OPP-17 dos “kits” G e P da Operon (Operon Technologies Inc. Alameda, CA), cujas sequências de bases são apresentadas no quadro 4.

Quadro 4. Sequência de bases dos “primers” usados nas reações de RAPD.

Código – Operon	Sequência de bases (5'-3')
OPG-04	AGCGTGTCTG
OPG-08	TCACGTCCAC
OPG-13	CTCTCCGCCA
OPP-14	CCAGCCGAAC
OPP-15	GGAAGCCAAC
OPP-17	TGACCCGCCT

Foram utilizadas placas flexíveis de PVP com 96 células, depositando-se em cada uma 15,5µL da mistura de reagentes e 4,5µL de DNA genômico a 5ng/µL (Quadro 5), cobertos com 25µL de óleo mineral.

A amplificação de fragmentos polimórficos foi conduzida em um termociclador PTC-100 (MJ Research Inc., Watertown, MA), programado para um ciclo a 96°C/2', seguido de 35 ciclos a 96°C/1', 35°C/1', 72°C/1,5', e um ciclo a 72°C/5'.

Quadro 5. Mistura de reagentes e DNA genômico para análise RAPD.

Reagentes	Quantidade para uma reação
Água destilada autoclavada	3,25µL
Tampão PCR 10X	2,00µL
MgCl ₂ (25mM)	0,60µL
BSA – albumina de soro bovino (10mg/mL)	1,60µL
dNTPs (2,5mM cada)	1,60µL
Primer (5ng/µL)	6,15µL
<i>Taq</i> Polimerase (1U)	0,30µL
DNA genômico (5ng/µL)	4,50µL
TOTAL	20,00µL

Em cada uma das amostras e em alíquotas de 200ng de marcador molecular “Ladder” 1Kb, foram adicionados 4 μ L de tampão de carregamento (40% de sacarose e 0,25% de azul de bromofenol). Os produtos de RAPD e o marcador molecular foram separados em gel de agarose a 1,5% contendo 10mg/mL de brometo de etídio, em uma cuba de eletroforese com tampão TBE (0,1M Tris-HCl, 0,1M ácido bórico, 0,02mM EDTA, pH 8,3) numa voltagem de cerca de 5V/cm de gel. Os registros fotográficos dos géis foram feitos em um aparelho “Eagle Eye II” (Stratagene Inc., La Jolla, CA) e impressos em preto e branco.

As análises do polimorfismo de fragmentos de DNA amplificados ao acaso foram feitas no programa computacional NTSYS-PC 1.8, “Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System” (Rohlf, 1992) e os dados registrados na forma de ausência ou presença de bandas polimórficas de mesmo comprimento e codificados de forma binária (0 para ausência e 1 para presença). A distância genética entre os isolados de *R. solani* causadores da mela da soja e dos padrões dos grupos de anastomose foi determinada pelo coeficiente “Simple Matching” e a matriz transformada em dendrograma pelo método “SAHN Clustering” (“Sequential Agglomerative, Hierarchical and Nested”) sob procedimento UPGMA (“Unweightted Pair-Group Method with Arithmetic Averaging”).

5.9 Sequenciamento genético das regiões ITS e do gene 5,8s do rDNA

Com base nos resultados do RAPD, procedeu-se o sequenciamento das regiões ITS (“Internal Transcribed Spacers”) e do gene 5,8s do rDNA (DNA ribossômico) dos

isolados SJ 89, SJ 92, SJ 93, SJ 94, SJ 115, SJ 121, SJ 127, SJ 133, SJ 134, SJ 136, SJ 140 e SJ 142, assim como dos isolados padrões do AG1 (IA e IB), AG2-1 e AG4 (HGI e HGIII). Foram utilizadas as sequências de nucleotídeos disponibilizadas pelo “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) dos padrões do AG1-IC (acesso AB000035), AG2-2 IIIB (acesso AB 000013), AG2-2 IV (acesso AB 000014), AG2-3 (acesso AB019025) e AG4-HGII (acesso AB000032).

As reações da polimerase em cadeia (PCR - “Polymerase Chain Reaction”) foram realizadas em tiras de PVC flexível com 10 tubos, contendo 50µl da mistura de reagentes para PCR e DNA genômico por tubo (Quadro 6) (White *et al.*, 1990).

Quadro 6. Mistura de reagentes e DNA genômico para reação PCR.

Reagentes	Quantidade para uma reação
Água destilada autoclavada	27,2µL
Tampão PCR 10X	5,0µL
MgCl ₂ (25mM)	1,5µL
dNTPs (2,5mM cada)	4,0µL
Primer ITS-4 (5pM/µL)	5,0µL
Primer ITS-5 (5pM/µL)	5,0µL
<i>Taq</i> Polimerase (1U)	0,8µL
DNA genômico (50ng/µL)	1,5µL
TOTAL	50,0µL

A amplificação foi conduzida em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc., Watertown, MA), programado para um ciclo a 94°C/2’, seguido de 35 ciclos a 94°C/1’, 55°C/1’, 72°C/2’, e um ciclo a 72°C/5’, sendo confirmada através de eletroforese (4µl/amostra mais 4µl/tampão de carregamento) em gel de agarose 1% acrescido de brometo de etídio (10mg/mL) (Sambrook *et al.*, 1987).

Os produtos PCR foram purificados em coluna “MicroSpin S-400 HR” conforme instruções do fabricante (Amersham Pharmacia) e quantificados em gel de agarose 1% com 10mg/mL de brometo de etídio (4µl/amostra mais 4µl/tampão de carregamento), comparando-se o tamanho das bandas das amostras com as formadas por PGEN nas concentrações de 1µl, 2µl e 4µl.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se 50ng do produto de PCR purificado e 1µM de cada “primer”, seguindo-se o protocolo para “Amersham Premix Terminator (Amersham Pharmacia)”. O sequenciamento foi realizado em sequenciador “Perkin-Elmer Applied Biosystems” modelo “377 DNA Sequencer”, de acordo com as instruções do fabricante.

As seqüências obtidas pelos “primers” para cada isolado, foram analisadas por “phred/phrap/consed” (Gordon *et al.*, 1998), onde todos os “consensus” tiveram qualidade “Phred” maior que 20. As seqüências das regiões ITS-5,8s rDNA de todos os isolados foram alinhadas utilizando o programa computacional “ClustalX” (Thompson *et al.*, 1997), gerando uma árvore filogenética entre os isolados através do método “Neighbor-joining” com valores de 1000 “bootstrap”.

5.10 Avaliação de germoplasma de soja para resistência à mela

Foram avaliados 337 genótipos de soja (linhas puras), provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Soja de Londrina, PR, pelos métodos de plantas inteiras e trifólios destacados .

5.10.1 Avaliação em plantas inteiras

Este experimento foi conduzido em casa de vegetação ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$), seguindo-se a metodologia descrita por Muyolo et al. (1993b) com modificações. As plantas foram cultivadas em vasos de alumínio com 1,2L de solo (quatro plantas/vaso). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com quatro repetições.

A inoculação foi realizada quando as plantas atingiram o estágio V6 de desenvolvimento vegetativo (Quadro 3), através de três pulverizações de suspensão de fragmentos de micélio e escleródios, a intervalos de 48 horas, com auxílio de um pulverizador manual. O inóculo foi preparado com isolados de *R. solani* cultivados em placas de Petri com BDA, a $27^{\circ}\text{C}/10$ dias no escuro, triturados em liquidificador por 30 segundos com água destilada na proporção de 100mL/placa. Compuseram o inóculo, em partes iguais, oito isolados da micoteca da UNESP/FCA de Botucatu e os isolados padrões do AG1-IA e AG1-IB (Quadro 7), a fim de manter a diversidade genética do patógeno.

Quadro 7. Composição do inóculo de *Rhizoctonia solani* para avaliação de resistência em soja.

Isolado	Origem	Grupo de anastomose
AG1-IA (padrão)	Tohoku, Japão	AG1-IA
AG1-IB (padrão)	Ohio, EUA	AG1-IB
SJ-19	Lucas do Rio Verde, MT	AG1-IA
SJ-70	Lucas do Rio Verde, MT	AG1-IA
SJ-83	Balsas, MA	AG1-IA
SJ-94	Boa Vista, RR	(?)
SJ-121	Balsas, MA	AG1-IA
SJ-133	Campo Novo do Parecis, MT	AG1-IA
SJ-140	Balsas, MA	AG1-IA
SJ-144	Boa Vista, RR	AG1-IB

A partir da primeira pulverização, as plantas foram mantidas sob câmara úmida ($28\pm 6^{\circ}\text{C}$) e borrifadas com água três a quatro vezes ao dia para garantir saturação da umidade do ar e a presença de água livre nas folhas.

A avaliação da severidade da doença foi feita aos cinco e 10 dias após a última inoculação, utilizando-se uma escala de notas de 0 a 5, onde 0 = sem sintomas; 1 = <5% de área foliar infectada (a.f.i.); 2 = 6% a 10% de a.f.i.; 3 = 11% a 30% de a.f.i.; 4 = 31% a 50% de a.f.i.; 5 = >50% de a.f.i. (Harville et al., 1996).

A classificação das respostas de resistência foram feitas em função da escala de notas de 0 a 5, de acordo com o seguinte critério: resistente (R) = 0 a 1,99; moderadamente resistente (MR) = 2,0 a 2,99; moderadamente suscetível (MS) = 3,0 a 3,99; suscetível (S) = 4,0 a 4,99 e altamente suscetível (AS) = 5.

Devido à limitação de espaço físico, o experimento foi conduzido em quatro etapas, tendo em todas elas o cultivar 'MABRS Seridó RCH' como padrão comum.

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo programa computacional SAS 6.12 (SAS Institute, Cary, NC), utilizando-se o teste de Tukey para médias individuais e média de mínimos quadrados ("LSMeans") para análise conjunta dos ensaios, sendo as mesmas ajustadas com base na testemunha comum 'MABRS Seridó RCH'.

5.10.2 Avaliação em trifólios destacados

Este experimento foi conduzido de forma semelhante à descrita no item 5.7.2, utilizando apenas o quarto trifólio visivelmente sadio de plantas em estágio V6, em etapas concomitantes às do item 5.10.1.

Foi empregado o mesmo inóculo da avaliação em plantas inteiras (item 5.10.1), com inoculação por aspersão de aproximadamente 0,5mL da suspensão de micélio e escleródios por trifólio.

As placas com os trifólios foram mantidas em câmara de crescimento por três dias a 27° C, com alternância de fotoperíodos de 12 horas.

A severidade foi avaliada no folíolo mais afetado, com auxílio da escala de notas de 0 a 5 descrita no item 5.10.1.

O delineamento experimental e a análise estatística dos resultados seguiram a mesma metodologia do item 5.10.1.

5.11 Avaliação da eficiência de fungicidas no controle da mela da soja

Foram conduzidos dois experimentos visando avaliar fungicidas quanto aos efeitos inibidor do desenvolvimento *in vitro* do patógeno, e protetor e curativo em plantas de soja, respectivamente. Em todos os testes foram utilizados o isolado SJ 121 de *R. solani* AG1-IA. A lista de fungicidas utilizados é apresentada no Quadro 8.

5.11.1 Efeito de fungicidas no desenvolvimento *in vitro* do patógeno

Discos de micélio (5mm) do isolado SJ 121, cultivado em BDA a 27°C/48 horas no escuro, foram transferidos para o centro de placas de Petri com 10mL de BDA acrescido dos fungicidas (Quadro 8), nas concentrações de 0,1, 1,0, 10,0 e 100,0mg i.a./L.

Quadro 8. Fungicidas utilizados nos experimentos de controle químico da mela da soja.

Fungicidas		Modo de Ação	Dose (g i.a./ha)
Ingrediente ativo	Nome comercial		
Clorotalonil	Bravonil 500 SC	Contato	750
Fluazinam	Frownicide 500 SC	Contato	750
Fludioxonil	Maxim 25 SC	Contato	5
Mancozeb	Manzate 800 PM	Contato	1600
Trifenil Hidróx. Estanho	Mertin 400 SC	Contato	200
Benomyl	Benlate 500 PM	Sistêmico	250
Bromuconazole	Condor 200 SC	Sistêmico	60
Carbendazin	Derosal 500 SC	Sistêmico	250
Difenoconazole	Score 250 CE	Sistêmico	50
Iprodione	Rovral 500 SC	Sistêmico	750
Procimidone	Sialex 500 PM	Sistêmico	750
Tebuconazole	Folicur 200 CE	Sistêmico	200
Thiabendazole	Tecto 600 PM	Sistêmico	300
Tiofanato Metílico	Cercobin 500 SC	Sistêmico	250
Azoxystrobin	Priori 250 SC	Sistêmico/translaminar	50
Kresoxim-Metil	Stroby 500 SC	Sistêmico/translaminar	100
Pyraclostrobin	F 500	Sistêmico/translaminar	100
Pyraclostrobin + PE 110 F	PE 116 01 F	Sistêmico/translaminar	75

Placas de BDA sem fungicida foram cultivadas como referência de padrão de crescimento micelial.

Num delineamento experimental de blocos casualizados com cinco repetições, as placas foram mantidas em câmara de crescimento a 27°C no escuro. As medições do crescimento radial do micélio foram feitas quando as colônias das testemunhas sem fungicida alcançaram a borda das placas.

Os dados das taxas de crescimento radial foram submetidos a análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do programa computacional ESTAT 2.0 – Sistema para Análises Estatísticas (UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP).

A Concentração Letal para inibição de 50% e 90% de crescimento radial de micélio (CL50 e CL90) foram calculadas através do programa computacional POLO-PC “Probit or Logit Analysis” (POLO-PC, 1987).

5.11.2 Efeito de fungicidas no controle da doença

Este experimento foi conduzido em casa de vegetação a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, utilizando plantas de soja ‘MABRS Seridó RCH’ cultivadas em vasos de alumínio com 1,2L de solo (quatro plantas/vaso), com o objetivo de avaliar os efeitos protetor e curativo dos fungicidas constantes do Quadro 8.

Os fungicidas foram pulverizados sobre as plantas com auxílio de um pulverizador costal pressurizado com CO_2 , calibrado para uma vazão de 180 L/ha, com bico cônico Jacto Albus série vermelha. As doses estão apresentadas no Quadro 8.

Para avaliar o efeito protetor, as plantas foram pulverizadas entre os estádios V5 e V6 de desenvolvimento vegetativo (Quadro 3).

A inoculação foi feita após três dias das pulverizações para efeito protetor, através três pulverizações de suspensão de micélio e escleródios do isolado SJ 121, conforme descrito no item 5.10.1.

O efeito curativo dos fungicidas foi avaliado em plantas pulverizadas três dias após a última inoculação.

Como referência para comparação dos tratamentos, foram mantidas sob as mesmas condições plantas inoculadas com o patógeno e não tratadas com fungicidas (testemunha +) e plantas não inoculadas e não tratadas com fungicidas (testemunha -).

Após a inoculação, as plantas foram mantidas sob câmara úmida ($28\pm 6^{\circ}\text{C}$) e borrifadas com água três vezes ao dia para assegurar alta umidade relativa do ar e presença de água livre nas folhas.

Foi avaliado o grau de severidade da doença aos cinco e 10 dias após a última aplicação de fungicidas, através de uma escala de notas de 0 a 11 (Horsfall & Barratt, 1945), onde:

0= 0% de área foliar infectada (a.f.i);	6= 51% a 75% a.f.i;
1= 1% a 3% a.f.i;	7= 76% a 87% a.f.i;
2= 4% a 6% a.f.i;	8= 88% a 93% a.f.i;
3= 7% a 12% a.f.i;	9= 94% a 97% a.f.i;
4= 13% a 25% a.f.i;	10= 98% a 99% a.f.i;
5= 26% a 50% a.f.i;	11= 100% a.f.i.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com sete repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do programa computacional ESTAT 2.0 – Sistema para Análises Estatísticas (UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP).

5.12 Avaliação de indutores de resistência no controle da doença

Foram avaliados os efeitos dos indutores de resistência Acibenzolar-S-metil (ASM - Bion 50 WG[®]) e ácido salicílico (AS) no desenvolvimento *in vitro* do isolado SJ 121 AG1-IA e no controle da doença.

5.12.1 Efeito de indutores de resistência no desenvolvimento *in vitro* do patógeno

Este experimento foi conduzido da mesma forma como do item 5.11.1, com concentrações de 0,1, 1,0, 10,0 e 100,0mg de cada indutor de resistência por litro de meio BDA.

Não foram calculadas as CL50 e CL90.

5.12.2 Efeito de indutores de resistência no controle da doença

Este experimento foi conduzido em casa de vegetação (28±2°C), seguindo a metodologia descrita no item 5.11.2, em plantas de soja ‘Embrapa 63 (Mirador)’ (quatro plantas/vaso).

Os indutores de resistência foram aplicados nas plantas com um pulverizador manual, dispensando-se 0,625mL de calda por planta (2,5mL/vaso).

Os tratamentos são apresentados no Quadro 9.

Foi empregado delineamento experimental de blocos casualizados com cinco repetições.

A inoculação, a avaliação do grau de severidade da doença aos cinco e 10 dias após a inoculação e a análise estatística dos resultados foram feitos da mesma forma como no item 5.11.2.

Como referência para comparação dos tratamentos, foram mantidas sob as mesmas condições plantas inoculadas com o patógeno e não tratadas com indutores de resistência (testemunha +) e plantas não inoculadas e não tratadas com indutores de resistência (testemunha -).

Quadro 9. Tratamentos utilizados no experimento de avaliação de indutores de resistência em plantas no desenvolvimento da mela da soja.

Tratamento	Indutor de resistência	Dose	Época aplicação/Estádio da planta
B 1 20	Acibenzolar-S-Metil	12,5mg i.a./L	20 dias antes da inoculação / V3
B 1 15	Acibenzolar-S-Metil	12,5mg i.a./L	15 dias antes da inoculação / V4
B 1 10	Acibenzolar-S-Metil	12,5mg i.a./L	10 dias antes da inoculação / V5
B 1 5	Acibenzolar-S-Metil	12,5mg i.a./L	5 dias antes da inoculação / V6
B 1 0	Acibenzolar-S-Metil	12,5mg i.a./L	No dia da inoculação / V7-R1
B 2 20	Acibenzolar-S-Metil	25mg i.a./L	20 dias antes da inoculação / V3
B 2 15	Acibenzolar-S-Metil	25mg i.a./L	15 dias antes da inoculação / V4
B 2 10	Acibenzolar-S-Metil	25mg i.a./L	10 dias antes da inoculação / V5
B 2 5	Acibenzolar-S-Metil	25mg i.a./L	5 dias antes da inoculação / V6
B 2 0	Acibenzolar-S-Metil	25mg i.a./L	No dia da inoculação / V7-R1
AS 1 20	Ácido Salicílico	2,5mM	20 dias antes da inoculação / V3
AS 1 15	Ácido Salicílico	2,5mM	15 dias antes da inoculação / V4
AS 1 10	Ácido Salicílico	2,5mM	10 dias antes da inoculação / V5
AS 1 5	Ácido Salicílico	2,5mM	5 dias antes da inoculação / V6
AS 1 0	Ácido Salicílico	2,5mM	No dia da inoculação / V7-R1
AS 2 20	Ácido Salicílico	5,0mM	20 dias antes da inoculação / V3
AS 2 15	Ácido Salicílico	5,0mM	15 dias antes da inoculação / V4
AS 2 10	Ácido Salicílico	5,0mM	10 dias antes da inoculação / V5
AS 2 5	Ácido Salicílico	5,0mM	5 dias antes da inoculação / V6
AS 2 0	Ácido Salicílico	5,0mM	No dia da inoculação / V7-R1
Testemunha +	-	-	Inoculada / V7-R1
Testemunha -	-	-	Não inoculada

6 RESULTADOS

6.1 Coleção de isolados do patógeno

Aos 62 isolados de *Rhizoctonia solani* causadores da mela da soja, oriundos de Lucas do Rio Verde, MT, existentes na coleção do Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, da FCA – UNESP de Botucatu, foram incorporados mais 21 isolados provenientes do Maranhão, nove do Mato Grosso, 11 de Roraima e um do Tocantins (Quadro 1).

6.2 Caracterização citológica

6.2.1 Número médio de núcleos por célula

Rhizoctonia solani caracteriza-se como uma espécie multinucleada (Sneh et al., 1991), e essa condição foi observada nos isolados avaliados, os quais

apresentaram média geral de 9,5 núcleos por célula, assemelhando-se aos padrões do AG1 (Quadro 10). A média de núcleos por célula dos isolados variou de 3,9 do SJ 94 até 16,8 do SJ 126 (Quadro 10). O isolado SJ 89, foi o único que apresentou característica de *Rhizoctonia* binucleada, com média de 2,4 núcleos por célula (Quadro 10), sendo observado 2 núcleos na maioria das células examinadas.

Analisando os isolados em função do estado de origem, foram observadas médias de núcleos por célula de 9,2 para os provenientes de Mato Grosso, 11,2 para os do Maranhão, 8,5 para os de Roraima e 11,5 para o de Tocantins, além do isolado SJ 89 que se comportou como binucleado (Quadro 11).

6.2.2 Diâmetro médio de hifas

O diâmetro médio de hifas dos isolados de *R. solani* variou de 5,9 μ m (SJ 145) a 10,0 μ m (SJ 83). As médias dos isolados padrões foram de 8,5 μ m para o AG1-IA, 8,0 μ m para o AG1-IC, 7,4 μ m para o AG1-IB, 7,2 μ m para o AG4-HGII, 6,5 μ m para o AG4-HGI, 5,9 μ m para o AG4-HGIII e 4,6 μ m para o AG2-3 (Quadro 12).

Quadro 10. Condição nuclear dos isolados de *Rhizoctonia solani* causadores da mela da soja e dos padrões dos AGs 1, 2-3 e 4.

Isolado	Proc ¹	Núcleos/célula		Variação (min-max)	Isolado	Proc ¹	Núcleos/célula		Variação (min-max)
		Média ²	Desvio ³				Média ²	Desvio ³	
SJ 13	MT	10,1	1,9	7-14	SJ 61	MT	7,6	1,2	6-10
SJ 14	MT	6,3	1,6	4-10	SJ 62	MT	12,0	2,1	9-17
SJ 15	MT	8,0	1,3	5-10	SJ 63	MT	7,2	1,4	5-10
SJ 16	MT	11,3	2,0	8-15	SJ 64	MT	9,5	1,4	8-12
SJ 19	MT	7,6	1,2	5-10	SJ 65	MT	7,2	1,1	6-9
SJ 20	MT	6,3	1,6	4-10	SJ 66	MT	8,1	1,4	6-11
SJ 21	MT	10,1	1,7	7-14	SJ 67	MT	11,6	3,3	7-18
SJ 22	MT	7,2	1,3	5-10	SJ 68	MT	8,0	1,3	6-11
SJ 23	MT	9,0	1,8	6-12	SJ 69	MT	13,3	2,5	10-18
SJ 24	MT	9,5	1,6	8-14	SJ 70	MT	6,5	2,0	5-12
SJ 26	MT	10,0	1,9	7-14	SJ 71	MT	8,7	1,6	7-14
SJ 27	MT	9,3	2,0	7-14	SJ 72	MT	12,1	2,6	8-17
SJ 28	MT	6,4	1,2	5-9	SJ 73	MT	6,8	1,3	5-9
SJ 29	MT	12,2	2,0	9-15	SJ 74	MT	6,3	1,8	5-10
SJ 31	MT	6,6	1,5	4-10	SJ 76	MT	10,8	1,9	8-14
SJ 33	MT	10,2	1,4	8-13	SJ 77	MT	5,3	1,3	3-8
SJ 34	MT	7,1	1,6	6-10	SJ 78	MT	8,6	1,6	6-12
SJ 36	MT	10,0	1,8	8-14	SJ 79	MT	4,4	0,8	3-6
SJ 37	MT	10,4	1,9	8-14	SJ 80	MT	9,0	1,6	7-12
SJ 38	MT	6,2	1,6	4-9	SJ 82	MA	5,4	1,2	4-8
SJ 39	MT	5,9	1,1	4-7	SJ 83	MA	6,6	1,1	5-9
SJ 40	MT	5,9	1,7	3-10	SJ 89	MT	2,4	0,5	2-3
SJ 41	MT	12,8	3,3	8-18	SJ 92	MA	6,8	1,9	4-10
SJ 43	MT	8,1	2,3	5-12	SJ 93	TO	11,5	2,3	8-16
SJ 44	MT	7,2	1,6	5-11	SJ 94	RR	3,9	1,0	3-7
SJ 45	MT	7,9	2,6	5-13	SJ 113	RR	9,6	1,5	7-12
SJ 46	MT	6,2	1,6	4-10	SJ 114	RR	9,0	1,7	6-12
SJ 47	MT	6,2	1,5	4-9	SJ 115	RR	7,1	1,5	5-10
SJ 48	MT	10,8	2,2	7-14	SJ 116	MA	9,6	2,0	6-14
SJ 49	MT	9,8	2,3	7-15	SJ 117	MA	16,9	3,3	12-24
SJ 50	MT	9,3	1,4	8-12	SJ 118	MA	9,2	1,5	6-12
SJ 51	MT	10,6	2,0	8-14	SJ 119	MA	10,1	2,7	7-17
SJ 53	MT	9,5	1,9	7-13	SJ 120	MA	8,8	2,0	6-13
SJ 54	MT	12,1	2,5	9-17	SJ 121	MA	15,9	4,1	10-23
SJ 56	MT	10,7	2,0	7-15	SJ 122	MA	11,0	2,8	7-16
SJ 57	MT	10,9	1,8	8-16	SJ 123	MA	11,4	2,2	8-16
SJ 58	MT	8,1	3,2	4-15	SJ 124	MA	14,3	2,7	10-21
SJ 59	MT	7,6	1,5	6-11	SJ 125	MA	13,6	2,3	10-19
SJ 60	MT	12,1	1,8	9-16	SJ 126	MA	16,8	3,9	10-24

¹ Procedência do isolado; ² Média de 20 células; ³ Desvio padrão da média.

(continua...)

Quadro 10. Condição nuclear dos isolados de *Rhizoctonia solani* causadores da mela da soja e dos padrões dos AGs 1, 2-3 e 4. (Continuação)

Isolado	Proc ¹	Núcleos/célula		Variação (min-max)	Isolado	Proc ¹	Núcleos/célula		Variação (min-max)
		Média ²	Desvio ³				Média ²	Desvio ³	
SJ 127	MA	14,2	3,6	7-19	SJ 142	RR	9,9	1,3	8-12
SJ 128	MA	15,7	3,2	10-20	SJ 143	RR	12,9	1,8	9-16
SJ 129	MA	13,3	2,4	10-18	SJ 144	RR	7,6	1,6	5-10
SJ 130	MA	11,1	1,9	9-16	SJ 145	RR	10,5	1,6	8-14
SJ 131	MT	12,0	2,3	8-16	SJ 146	RR	8,2	1,5	6-11
SJ 132	MT	12,8	1,8	10-17	SJ 147	RR	8,1	1,7	5-12
SJ 133	MT	10,6	1,5	8-14	SJ 148	RR	7,2	1,6	5-10
SJ 134	MT	13,1	1,8	9-16	<u>Padrões:</u>				
SJ 135	MT	10,7	2,0	8-14	AG1-IA	Japão	8,0	1,3	5-10
SJ 136	MT	13,9	1,9	10-18	AG1-IB	EUA	9,5	2,0	7-14
SJ 137	MT	11,3	1,7	8-16	AG1-IC	EUA	9,6	1,6	7-12
SJ 138	MT	16,1	1,6	14-19	AG2-3	Japão	11,7	2,0	9-15
SJ 139	MA	9,1	1,8	7-13	AG4-HGI	Japão	3,8	0,7	3-5
SJ 140	MA	9,0	1,1	7-11	AG4-HGII	Japão	3,9	0,5	3-5
SJ 141	MA	6,8	2,0	5-12	AG4-HGIII	EUA	5,2	1,4	4-8

¹ Procedência do isolado; ² Média de 20 células; ³ Desvio padrão da média.

Quadro 11. Condição nuclear dos isolados de *Rhizoctonia solani* causadores da mela da soja por estado de origem.

Estado de origem	Nº de isolados	Núcleos / célula	
		Média ¹	Desvio ²
MT	66	9,2	2,4
MA	21	11,2	3,5
RR	11	8,5	2,2
TO	1 (SJ 93)	11,5	2,3
MT	1 (SJ 89)	2,4	0,5

¹ Média das médias dos isolados; ² Desvio padrão da média.

Quadro 12. Diâmetro médio de hifas dos isolados de *Rhizoctonia solani* causadores da mela da soja, e dos isolados padrões dos AGs 1, 2-3 e 4.

Isolado	Proced. ¹	Diâmetro (µm) ²	Isolado	Proced. ¹	Diâmetro (µm) ²
SJ 83	MA	10,0	AG1-IB	EUA	7,4 klmno
SJ 130	MA	9,5 a	SJ 115	RR	7,4 klmno
SJ 124	MA	9,4 a	SJ 138	MT	7,4 lmnop
SJ 82	MA	9,2 ab	SJ 143	RR	7,3 lmnop
SJ 129	MA	9,2 ab	SJ 146	RR	7,3 mnopq
SJ 120	MA	9,1 abc	SJ 144	RR	7,2 nopq
SJ 125	MA	8,9 bcd	AG4-HGII	Japão	7,2 nopq
SJ 119	MA	8,9 bcde	SJ 134	MT	7,2 nopq
SJ 128	MA	8,8 bcde	SJ 135	MT	7,2 nopq
SJ 126	MA	8,6 cdef	SJ 142	RR	7,1 nopq
SJ 132	MT	8,6 cdef	SJ 147	RR	7,1 nopqr
SJ 133	MT	8,6 cdef	SJ 113	RR	7,1 nopqr
AG1-IA	Japão	8,5 defg	SJ 136	MT	7,0 opqrs
SJ 127	MA	8,4 efgh	SJ 140	MA	6,9 pqrst
SJ 141	MA	8,4 efgh	SJ 118	MA	6,8 qrst
SJ 93	TO	8,3 fgh	SJ 92	MA	6,6 rst
SJ 116	MA	8,2 fgghi	SJ 148	RR	6,6 st
SJ 139	MA	8,2 fgghi	SJ 94	RR	6,5 t
SJ 117	MA	8,1 fgghi	AG4-HGI	Japão	6,5 t
SJ 131	MT	8,0 ghij	SJ 89	MT	6,5 t
AG1-IC	EUA	8,0 hijk	AG4-HGIII	EUA	5,9 u
SJ 123	MA	7,8 ijkl	SJ 145	RR	5,9 u
SJ 121	MA	7,8 ijklm	AG2-3	Japão	4,6
SJ 122	MA	7,6 jklmn			

¹ Estado brasileiro ou país de procedência do isolado. ² Diâmetro de hifas em µm, média de 50 repetições. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan.

6.3 Caracterização quanto ao grupamento de anastomose

Com exceção dos isolados SJ 89, 92, 94, 113, 139, 142 e 143, todos os demais apresentaram reação positiva de anastomose com os três ISGs do AG1 (Quadro 13, Figura 3), não sendo possível a classificação em grupos intraespecíficos com base apenas na capacidade de fusão de hifas.

Quadro 13. Reação de anastomose e frequência de fusão de hifas de isolados de *Rhizoctonia solani* causadores da mela da soja com os padrões do AG1.

Isolado	Proc ¹	AG1-IA			AG1-IB			AG1-IC		
		Nº	F.F.		Nº	F.F.		Nº	F.F.	
			Anast. ²	(%) ³		Nível ⁴	Anast. ²		(%) ³	Nível ⁴
SJ 82	MA	27	57,4	Alto	9	37,5	Moder.	24	54,5	Alto
SJ 83	MA	25	43,1	Moder.	5	16,1	Baixo	14	42,4	Moder.
SJ 89	MT	0	0	-	0	0	-	0	0	-
SJ 92	MA	0	0	-	0	0	-	0	0	-
SJ 93	TO	28	57,1	Alto	5	27,8	Baixo	21	41,2	Moder.
SJ 94	RR	0	0	-	0	0	-	0	0	-
SJ 113	RR	3	9,1	Baixo	4	9,8	Baixo	0	0	-
SJ 115	RR	5	14,7	Baixo	13	26,5	Baixo	4	14,3	Baixo
SJ 116	MA	16	39,0	Moder.	7	30,4	Moder.	2	8,7	Baixo
SJ 117	MA	15	41,7	Moder.	3	14,3	Baixo	3	12,5	Baixo
SJ 118	MA	68	73,9	Alto	18	43,9	Moder.	36	56,2	Alto
SJ 119	MA	21	51,2	Alto	2	9,1	Baixo	8	28,6	Baixo
SJ 120	MA	26	60,5	Alto	9	40,9	Moder.	21	45,6	Moder.
SJ 121	MA	19	63,3	Alto	16	42,1	Moder.	24	53,3	Alto
SJ 122	MA	23	54,8	Alto	9	31,0	Moder.	21	52,5	Alto
SJ 123	MA	26	60,5	Alto	10	43,5	Moder.	26	53,0	Alto
SJ 124	MA	25	64,1	Alto	11	39,3	Moder.	18	46,1	Moder.
SJ 125	MA	26	57,8	Alto	10	34,5	Moder.	20	42,5	Moder.
SJ 126	MA	37	63,8	Alto	12	36,4	Moder.	17	41,5	Moder.
SJ 127	MA	38	61,3	Alto	4	20,0	Baixo	15	39,5	Moder.
SJ 128	MA	36	65,4	Alto	7	33,3	Moder.	16	64,0	Alto
SJ 129	MA	33	60,0	Alto	11	32,3	Moder.	30	58,8	Alto
SJ 130	MA	38	70,4	Alto	8	33,3	Moder.	11	36,7	Moder.
SJ 131	MT	50	73,5	Alto	11	25,0	Baixo	26	43,3	Moder.
SJ 132	MT	54	79,4	Alto	14	35,0	Moder.	23	44,2	Moder.
SJ 133	MT	47	69,1	Alto	17	38,6	Moder.	28	45,9	Moder.
SJ 134	MT	50	57,5	Alto	26	43,3	Moder.	31	44,9	Moder.
SJ 135	MT	70	56,9	Alto	42	51,8	Alto	36	55,4	Alto
SJ 136	MT	77	56,2	Alto	38	52,0	Alto	50	48,1	Moder.
SJ 138	MT	66	60,5	Alto	21	43,7	Moder.	35	41,7	Moder.
SJ 139	MA	41	58,6	Alto	0	0	-	11	23,9	Baixo

(continua...)

¹ País ou estado brasileiro de procedência do isolado;

² Número de pares de hifas em anastomose em 45 campos de observação ao microscópio;

³ Frequência de fusão de hifas em %, dada pela fórmula $FF = A (100) / C$, onde FF = Frequência de Fusão, A = número de anastomoses observadas e C = número de pontos de contato entre hifas (Sneh et al., 1991);

⁴ Nível de frequência de fusão de hifas considerando-se alto para $FF > 50\%$, moderado para FF entre 30% e 50% e baixo para $FF < 30\%$ (Sneh et al., 1991).

Quadro 13. Reação de anastomose e frequência de fusão de hifas de isolados de *Rhizoctonia solani* causadores da mela da soja com os padrões do AG1. (Continuação)

Isolado	Proc ¹	AG1-IA			AG1-IB			AG1-IC		
		Nº Anast. ²	F.F. (%) ³	Nível ⁴	Nº Anast. ²	F.F. (%) ³	Nível ⁴	Nº Anast. ²	F.F. (%) ³	Nível ⁴
SJ 140	MA	24	49,0	Moder.	3	11,1	Baixo	10	27,0	Baixo
SJ 141	MA	56	67,5	Alto	3	33,3	Moder.	24	45,3	Moder.
SJ 142	RR	0	0	-	9	36,0	Moder.	12	33,3	Moder.
SJ 143	RR	4	8,2	Baixo	0	0	-	22	29,7	Baixo
SJ 144	RR	14	20,0	Baixo	9	23,7	Baixo	17	28,3	Baixo
SJ 145	RR	7	29,2	Baixo	5	27,8	Baixo	19	55,9	Alto
SJ 146	RR	1	1,9	Baixo	3	4,7	Baixo	13	41,9	Moder.
SJ 147	RR	10	19,2	Baixo	14	63,6	Alto	13	28,3	Baixo
SJ 148	RR	4	16,0	Baixo	1	1,5	Baixo	15	55,5	Alto
<u>Padrões:</u>										
AG1-IA	Japão				7	23,3	Baixo	10	34,5	Moder.
AG1-IB	EUA							10	28,6	Baixo
AG1-IC	EUA									

¹ País ou estado brasileiro de procedência do isolado;

² Número de pares de hifas em anastomose em 45 campos de observação ao microscópio;

³ Frequência de fusão de hifas em %, dada pela fórmula $FF = A (100) / C$, onde FF = Frequência de Fusão, A = número de anastomoses observadas e C = número de pontos de contato entre hifas (Sneh et al., 1991);

⁴ Nível de frequência de fusão de hifas considerando-se alto para $FF > 50\%$, moderado para FF entre 30% e 50% e baixo para $FF < 30\%$ (Sneh et al., 1991).

Adotando-se como critério os níveis mais elevados de frequência de fusão de hifas (FF) pode-se inferir que os isolados provenientes do Maranhão, Mato Grosso e Tocantins assemelham-se ao AG1-IA. Quanto aos isolados provenientes de Roraima, a FF não permitiu diferenciações (Quadro 13).

Os isolados SJ 89, 92 e 94 apresentaram reações negativas de anastomose com os três ISGs testados (Quadro 13).

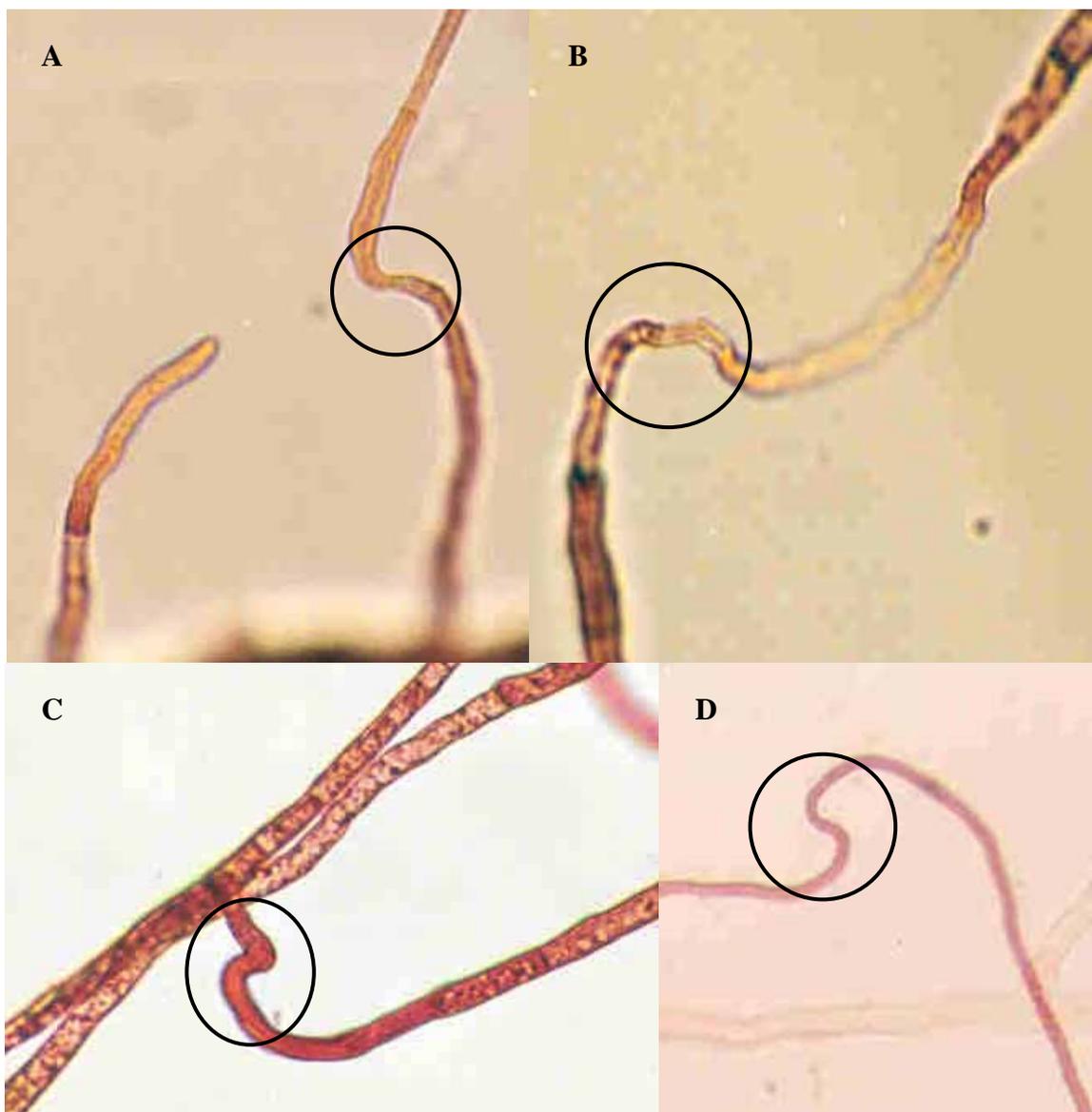


Figura 3. Anastomose de hifas (região circundada) entre isolados de *Rhizoctonia solani* causadores da mela da soja e isolados padrões dos grupos de anastomose: A= SJ 117 x AG1-IC (200X); B= SJ 119 x AG1-IA (200X); C= SJ 120 x AG1-IB (200X); D= SJ 94 x SJ 94 (100X).

Também foram observadas ausência de reações de anastomose nos pareamentos SJ 113 X AG1-IC, SJ 139 X AG1-IB, SJ 142 X AG1-IA e SJ 143 X AG1-IB (Quadro 13).

Todos os pareamentos entre os isolados padrões apresentaram reações positivas de anastomose, com frequência de fusão de hifas moderada entre AG1-IA X AG1-IC e baixa para o AG1-IA X AG1-IB e AG1-IB X AG1-IC (Quadro 13).

6.4 Caracterização cultural

6.4.1 Aspecto de colônia

Os aspectos de colônias de alguns isolados de *R. solani* e dos AGs 1, 2-3 e 4, em meio BDA a 27°C por 10 dias na ausência de luz, estão ilustrados na Figura 4.

Os isolados SJ 82, 83, 116, 119, 120, 124, 125, 126, 127, 131, 132, 133, 134, 136, 135, 138 e 139 apresentam micélio ralo, rasteiro, coloração variando tons de marrom claro a escuro, formando escleródios grandes ou tipo “sasakii” (> 2mm de diâmetro) marrom escuro e distribuídos de forma aleatória na placa, semelhantes ao aspecto de colônia do padrão AG1-IA (Figura 4) . Os isolados SJ 93, 117, 118, 121, 122, 123, 128, 129 e 130 apresentam micélio ralo, rasteiro, coloração bege a marrom claro (aspecto hialino), com abundante formação de escleródios pequenos (<1mm de diâmetro) que se aglomeram normalmente no centro da placa, formando uma crosta marrom. Os isolados SJ 113, 115, 142, 143, 144, 145, 146, 147 e 148 apresentam micélio marrom, mais cotonoso e aéreo que dos outros isolados, formando escleródios pequenos, concentrados junto às bordas das placas e,

eventualmente, alguns escleródios grandes, assemelhando-se ao padrão AG1-IB. Os isolados SJ 89, 92 e 94 formam micélio marrom amarelado cotonoso e mais aéreo que os demais, formando eventualmente pequenos escleródios dispersos (Figura 4).

6.4.2 Taxa de crescimento micelial em função da temperatura

As taxas de crescimento micelial dos isolados de *R. solani* causadores da mela da soja e dos isolados padrões do AG1 (IA, IB e IC), AG2-3 e AG4 (HGI, HGII e HGIII) são apresentadas no Quadro 14.

Os isolados em estudo apresentaram maior desenvolvimento micelial com as temperaturas de 25°C e 30°C, assemelhando-se ao comportamento dos AG1. O isolado de crescimento micelial mais lento foi o SJ 93, e, dentre os padrões, o AG4-HGII. Os de crescimento mais rápido foram os SJ 132 e o AG1-IA, respectivamente (Quadro 14).

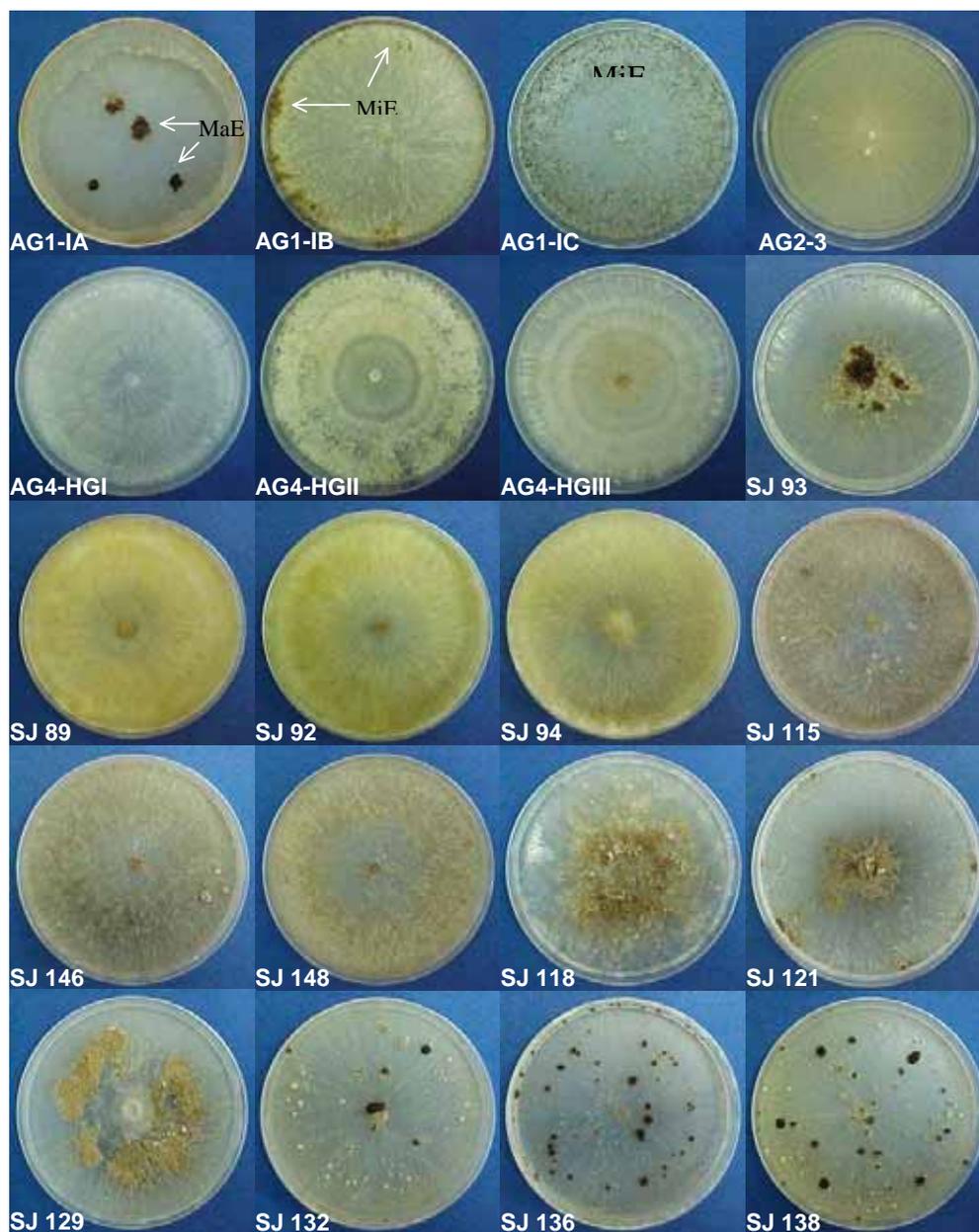


Figura 4. Aspecto de colônias de alguns isolados de *Rhizoctonia solani* causadores da mela da soja e dos AGs 1, 2-3 e 4, em meio BDA a 27°C por 10 dias na ausência de luz. MaE = macroescleródios; MiE = microescleródios.

Quadro 14. Taxas de crescimento micelial dos isolados de *Rhizoctonia solani* causadores da mela da soja, e dos isolados padrões dos AGs 1, 2-3 e 4, em função da temperatura.

Isolado	Crescimento micelial ¹					Isolado	Crescimento micelial ¹				
	(mm/dia)						(mm/dia)				
	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C		15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
SJ 82	9,38	16,84	24,48	16,22	0,80	SJ 132	11,05	18,84	27,68	30,60	7,00
SJ 83	9,26	19,50	22,27	15,22	1,10	SJ 133	9,90	16,63	27,58	31,40	5,85
SJ 89	6,42	11,17	12,50	17,22	5,80	SJ 134	9,88	17,34	27,68	21,41	3,50
SJ 92	6,42	10,92	16,38	19,50	7,30	SJ 135	10,54	19,25	26,62	30,80	6,95
SJ 93	1,01	8,31	12,84	11,39	1,05	SJ 136	10,83	18,00	27,78	21,55	3,75
SJ 94	6,69	10,93	17,50	17,22	7,85	SJ 138	10,39	19,34	27,20	30,40	7,00
SJ 113	5,77	16,75	22,90	22,20	6,40	SJ 139	7,35	17,22	24,39	18,96	0,85
SJ 115	5,26	17,63	23,21	22,40	2,00	SJ 140	8,88	18,92	24,68	16,89	1,10
SJ 116	8,21	17,88	24,63	17,22	2,40	SJ 141	1,79	16,61	25,07	16,45	1,05
SJ 117	6,65	15,50	24,16	20,46	0,45	SJ 142	6,22	16,07	22,74	21,55	4,90
SJ 118	8,75	15,75	24,20	17,22	2,65	SJ 143	5,17	16,61	23,37	21,41	6,30
SJ 119	8,72	16,00	22,74	17,22	0,50	SJ 144	6,14	15,86	25,07	24,00	1,60
SJ 120	7,02	15,75	24,63	21,27	0,40	SJ 145	6,14	13,72	24,87	20,73	1,35
SJ 121	7,63	16,13	23,52	18,68	0,65	SJ 146	5,64	14,79	24,78	19,64	1,70
SJ 122	7,11	14,88	24,20	18,82	0,60	SJ 147	4,63	16,29	25,07	22,80	5,70
SJ 123	8,66	15,38	24,79	19,64	0,55	SJ 148	3,52	17,09	25,16	23,80	1,90
SJ 124	8,15	19,25	20,69	19,64	1,55	Padrões					
SJ 125	7,93	19,00	23,42	21,14	0,00	AG1-IA	8,42	18,75	26,23	26,60	6,25
SJ 126	7,42	18,50	22,74	20,18	0,30	AG1-IB	10,41	19,13	21,95	20,87	0,60
SJ 127	7,98	17,50	23,13	19,91	0,45	AG1-IC	7,20	12,63	14,52	17,15	0,70
SJ 128	8,32	18,13	24,86	21,27	0,60	AG2-3	7,77	12,00	12,34	4,66	0,00
SJ 129	10,83	19,25	24,78	21,55	0,90	AG4-HGI	5,00	10,20	13,74	12,97	1,25
SJ 130	9,88	19,25	25,84	21,00	1,00	AG4-HGII	4,80	7,56	10,54	8,18	2,75
SJ 131	9,39	17,00	27,39	30,24	6,70	AG4-HGIII	5,68	10,13	15,00	15,22	7,65

¹ Média de 3 repetições.

O comportamento do crescimento micelial dos isolados padrões dos AGs 1, 2-3 e 4 em função da temperatura foi comparado com as médias dos isolados definidos como pertencentes aos AG1-IA e AG1-IB pela caracterização molecular (item 6.8), e também dos SJ 89, 92 e 94, constatando-se diferenças marcantes em relação ao padrão AG1-IA apenas deste último grupo (Figura 5).

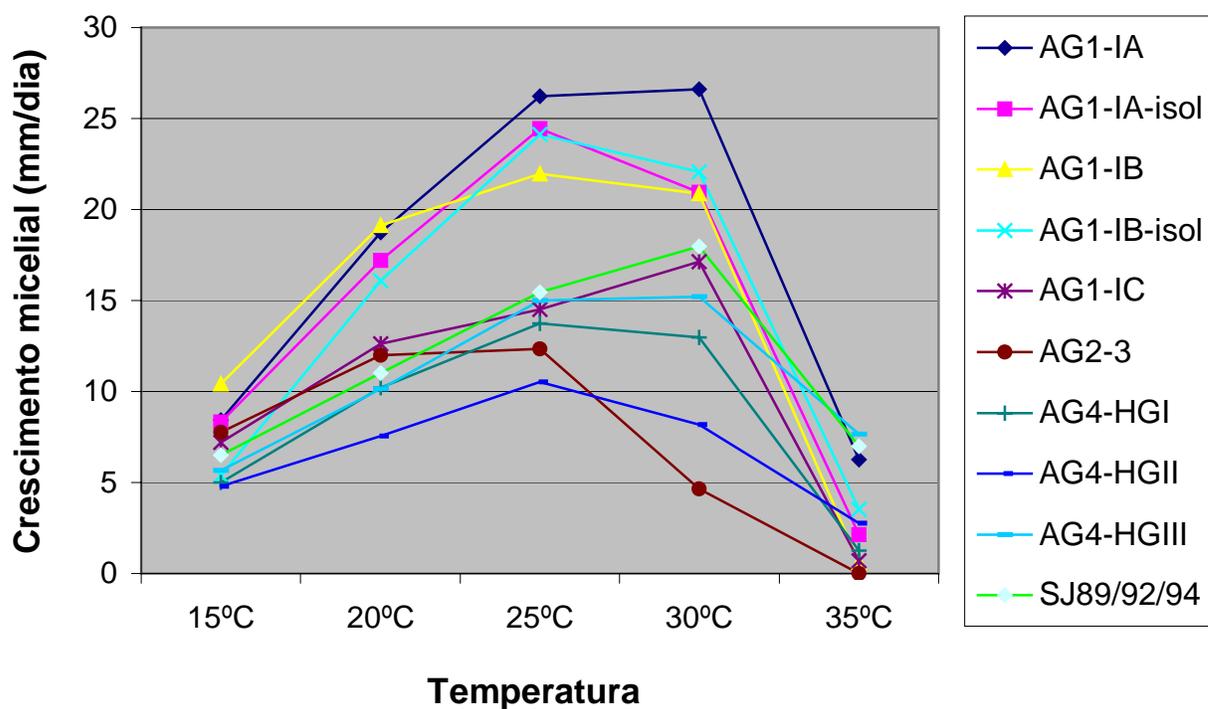


Figura 5. Taxa de crescimento micelial de isolados padrões de *Rhizoctonia solani*, médias dos isolados definidos como pertencentes aos AG1-IA e AG1-IB pela caracterização molecular (item 6.8), e dos SJ 89, 92 e 94, em função da temperatura.

6.5 Formulação de micélio de *R. solani* AG1-IA

6.5.1 Formulação a partir de grãos de arroz colonizados

Foi observada elevada manutenção da viabilidade das estruturas fúngicas até os 30 dias, nas três condições de armazenamento, destacando-se o maior número de unidades formadoras de colônias (UFC) para a condição de -20°C (Quadro 15).

6.5.2 Formulação em talco

Não houve manutenção satisfatória da viabilidade das estruturas fúngicas no formulado a base de talco desde a avaliação inicial (Quadro 15).

6.6 Avaliação de metodologias de inoculação

Inoculações por deposição de disco de micélio e pulverização de suspensão de micélio apresentaram os maiores níveis de severidade, para plantas inteiras nas cultivares ‘MABRS Seridó RCH’ e ‘Embrapa 63 (Mirador)’, e somente em ‘MABRS Seridó RCH’ para trifólios destacados (Quadro 16).

As formulações de *R. solani* causaram baixos índices de severidade da doença, não diferindo da testemunha na maioria dos casos (Quadro 16).

Foi observado o desenvolvimento de fungos saprófitas sobre fragmentos de arroz, nos tratamentos com pulverização do formulado de *R. solani* em grãos colonizados.

A Figura 6 ilustra os sintomas observados nos diferentes tratamentos.

Quadro 15. Quantificação de estruturas fúngicas viáveis de formulados de *Rhizoctonia solani* AG1-IA em grãos de arroz colonizados e talco, armazenados em três ambientes.

Diluição	Quantificação (UFC) ¹					
	Formulado em arroz			Formulado em talco		
	T. ambiente	4°C	-20°C	T. ambiente	4°C	-20°C
<u>Inicial</u>						
10 ⁻¹	nc ³			26		
10 ⁻²	312			3		
10 ⁻³	36			0		
10 ⁻⁴	3			0		
10 ⁻⁵	0			0		
Testem. ²	0			0		
<u>30 dias</u>						
10 ⁻¹	nc	nc	nc	8	5	7
10 ⁻²	273	164	331	1	4	3
10 ⁻³	24	6	34	0	0	0
10 ⁻⁴	2	1	2	0	0	0
10 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0
Testem.	0	0	0	0	0	0
<u>60 dias</u>						
10 ⁻¹	2	58	63	0	0	0
10 ⁻²	0	9	7	0	0	0
10 ⁻³	0	1	1	0	0	0
10 ⁻⁴	0	1	1	0	0	0
10 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0
Testem.	0	0	0	0	0	0

¹ Quantificação por contagem direta do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Média de três repetições.

² Testemunhas compostas por suspensões 10⁻¹ de talco e arroz triturado, não colonizados pelo fungo.

³ nc= Inviabilidade de contagem devido ao elevado número de UFCs.

Quadro 16. Médias de severidade da mela da soja entre diferentes metodologias de inoculação em plantas inteiras e trifólios destacados, em duas cultivares.

Método de inoculação	Severidade da doença				
	Planta inteira ¹		Trifólio destacado ²		
	Seridó RCH	Mirador	Seridó RCH	Mirador	
Disco de micélio	4,3 a	3,6 a	2,5 ab	1,8 cd	
Suspensão de micélio 1:3	2,9 b	3,4 a	2,4 ab	2,9 a	
Suspensão de micélio 1:6	2,4 b	2,2 b	2,9 a	2,5 ab	
Suspensão de micélio 1:30	1,1 c	1,1 c	2,0 b	2,1 bc	
Micélio formulado em talco	0,7 c	0,6 cd	1,0 c	1,0 e	
Micélio formulado em arroz	0,5 cd	0,4 d	1,3 c	1,1 de	
Testemunha	0,0 d	0,0 d	1,0 c	1,0 e	
	CV	37,3	33,9	24,3	29,9
	DMS	0,68	0,58	0,77	0,66

¹ Severidade da doença avaliada em plantas inteiras dos cultivares ‘MABRS Seridó RCH’ e ‘Embrapa 63 (Mirador)’, pela escala de notas de 0 a 5, onde 0 = sem sintomas, 1 = até 5% de área foliar infectada (a.f.i.), 2 = 6 a 10% a.f.i., 3 = 11 a 30% a.f.i., 4 = 31 a 50% a.f.i. e 5 = acima de 50% a.f.i. Média de 16 repetições.

² Severidade da doença avaliada em trifólios destacados pela escala de notas de 1 a 5, onde 1 = sem sintomas, 2 = até 25% a.f.i., 3 = 26 a 50% a.f.i., 4 = 51 a 75% a.f.i. e 5 = acima de 75% a.f.i. Média de 9 repetições.

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

6.7 Patogenicidade e severidade dos isolados à soja

Não foi observada patogenicidade na parte aérea de soja ‘MABRS Seridó RCH’ dos isolados SJ 89, SJ 137 e do padrão do AG4-HGI. Os demais isolados apresentaram-se patogênicos, inclusive os AGs 4 HGII e HGIII, característicos por infectarem colo e raízes (Quadro 17).

O nível médio de severidade da doença causado pelos isolados foi de 3,19, correspondendo a 3,01 nas avaliações em plantas inteiras e 3,37 em trifólios destacados (Quadro 18). Dentre os padrões, o AG1-IA foi o mais severo (Quadros 17 e 18).

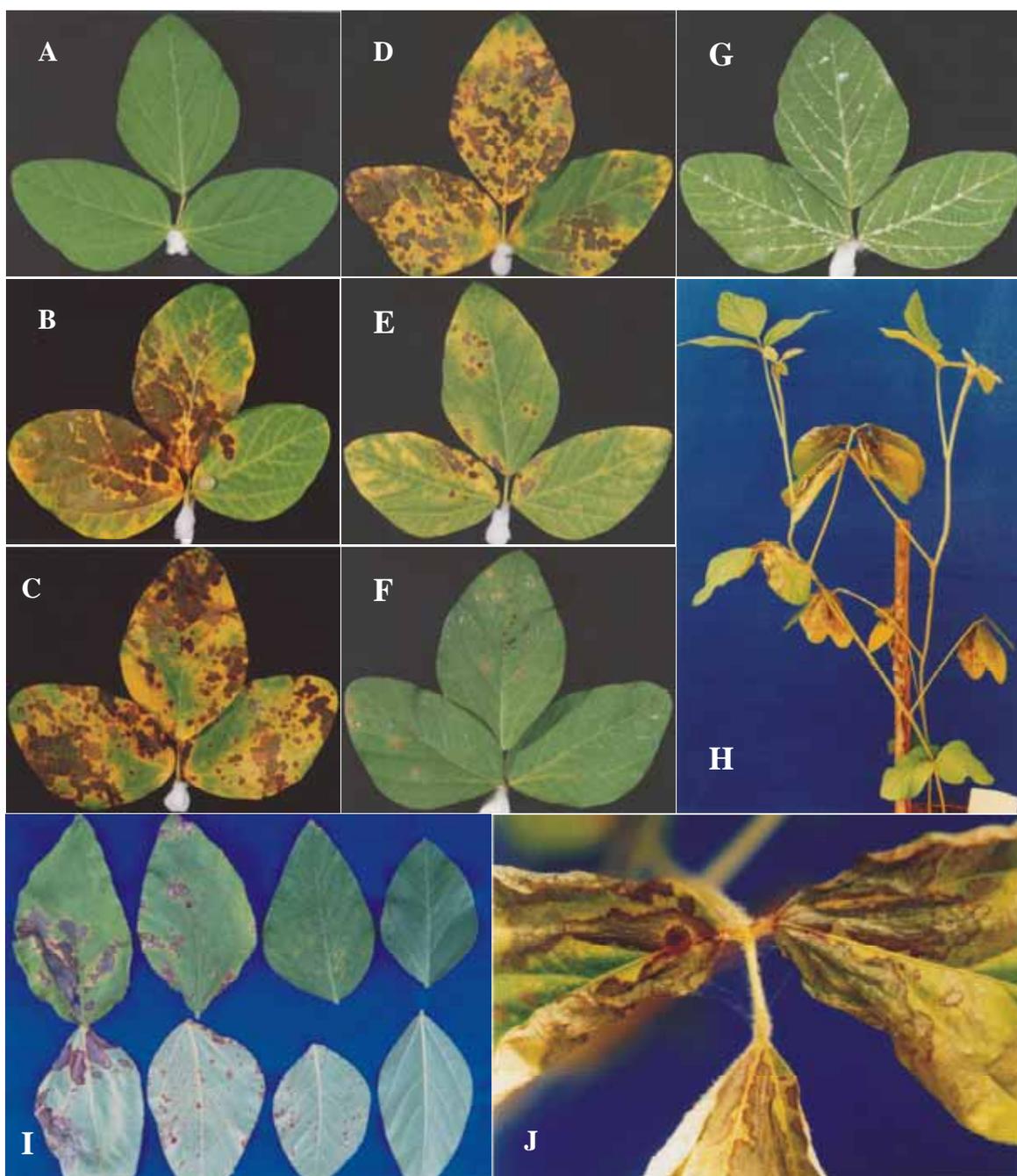


Figura 6. A) Trifólio sadio. Fotos B a G representam metodologias de inoculação em trifólios destacados: B) disco de micélio, C) pulverização de suspensão de micélio nas diluições de 1:3, D) 1:6 e E) 1:30, F) pulverização de micélio formulado em arroz, G) pulverização de micélio formulado em talco, H) aspecto geral de planta inoculada com disco de micélio, I) da esquerda para a direita: folíolos inoculados por disco de micélio, suspensão de micélio 1:3, 1:6 e testemunha, J) teia de micélio do patógeno em folha inoculada por disco de micélio.

Quadro 17. Severidade da doença causada por isolados de *Rhizoctonia solani* e por isolados padrões dos AGs 1, 2-3, e 4, em soja 'MABRS Seridó RCH'.

Isolado	Proc. ¹	Severidade da doença ²			Pat. ⁵
		Planta Inteira ³	Trifólio Destacado ⁴	Média	
SJ 133	MT	4,87 a	5,00 a	4,94	+
SJ 138	MT	4,75 ab	4,50 abcd	4,63	+
SJ 128	MA	4,50 abc	3,33 cdefghijk	3,92	+
SJ 132	MT	4,50 abc	5,00 a	4,75	+
SJ 129	MA	4,37 abcd	3,50 bcdefghij	3,94	+
SJ 26	MT	4,12 abcde	4,16 abcdef	4,14	+
SJ 27	MT	4,12 abcde	3,50 bcdefghij	3,81	+
SJ 58	MT	4,12 abcde	2,16 jklmno	3,14	+
SJ 50	MT	4,00 abcdef	4,16 abcdef	4,08	+
SJ 135	MT	4,00 abcdef	4,50 abcd	4,25	+
SJ 142	RR	4,00 abcdef	2,33 ijklmno	3,17	+
SJ 144	RR	4,00 abcdef	5,00 a	4,50	+
SJ 53	MT	3,87 abcdefg	4,33 abcde	4,10	+
SJ 16	MT	3,75 abcdefgh	4,33 abcde	4,04	+
SJ 33	MT	3,75 abcdefgh	3,66 abcdefghi	3,71	+
SJ 80	MT	3,75 abcdefgh	3,50 bcdefghij	3,63	+
SJ 131	MT	3,75 abcdefgh	4,33 abcde	4,04	+
SJ 147	RR	3,75 abcdefgh	2,00 klmno	2,88	+
SJ 48	MT	3,62 abcdefghi	3,83 abcdefgh	3,73	+
SJ 59	MT	3,62 abcdefghi	3,33 cdefghijk	3,48	+
SJ 74	MT	3,62 abcdefghi	4,16 abcdef	3,89	+
SJ 79	MT	3,62 abcdefghi	4,16 abcdef	3,89	+
SJ 21	MT	3,50 bcdefghij	3,66 abcdefghi	3,58	+
SJ 24	MT	3,50 bcdefghij	2,83 fghijklm	3,17	+
SJ 38	MT	3,50 bcdefghij	4,33 abcde	3,92	+
SJ 49	MT	3,50 bcdefghij	4,33 abcde	3,92	+
SJ 78	MT	3,50 bcdefghij	4,16 abcdef	3,83	+
SJ 121	MA	3,50 bcdefghij	4,00 abcdefg	3,75	+
SJ 130	MA	3,50 bcdefghij	2,00 klmno	2,75	+
SJ 139	MA	3,50 bcdefghij	1,33 no	2,42	+
SJ 143	RR	3,50 bcdefghij	4,33 abcde	3,92	+

(continua...)

¹ País ou estado brasileiro de origem do isolado.

² Severidade da doença avaliada pela escala de notas de 1 a 5, onde 1 = sem sintomas, 2 = até 25% de área do folíolo infectada (a.f.i.), 3 = de 26 a 50% de a.f.i., 4 = de 51 a 75% de a.f.i. e 5 = acima de 75% de a.f.i.

³ Média de quatro repetições.

⁴ Média de três repetições.

⁵ Patogenicidade do isolado: (+) = patogênico e (-) = não Patogênico.

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Quadro 17. Severidade da doença causada por isolados de *Rhizoctonia solani* e por isolados padrões dos AGs 1, 2-3, e 4, em soja 'MABRS Seridó RCH'. (Continuação)

Isolado	Proc. ¹	Severidade da doença ²				Média	Pat. ⁵
		Planta Inteira ³		Trifólio Destacado ⁴			
SJ 145	RR	3,50	bcdefghij	4,66	abc	4,08	+
SJ 148	RR	3,50	bcdefghij	2,66	ghijklmn	3,08	+
SJ 63	MT	3,37	cdefghijk	3,83	abcdefgh	3,60	+
SJ 65	MT	3,37	cdefghijk	4,83	ab	4,10	+
SJ 69	MT	3,37	cdefghijk	4,16	abcdef	3,77	+
SJ 125	MA	3,37	cdefghijk	2,16	jklmno	2,77	+
AG1-IA	Japão	3,25	cdefghijkl	4,66	abc	3,96	+
SJ 37	MT	3,25	cdefghijkl	3,50	bcdefghij	3,38	+
SJ 44	MT	3,25	cdefghijkl	3,33	cdefghijk	3,29	+
SJ 45	MT	3,25	cdefghijkl	2,83	fghijklm	3,04	+
SJ 47	MT	3,25	cdefghijkl	4,16	abcdef	3,71	+
SJ 70	MT	3,25	cdefghijkl	4,50	abcd	3,88	+
SJ 136	MT	3,25	cdefghijkl	4,16	abcdef	3,71	+
SJ 140	MA	3,25	cdefghijkl	4,33	abcde	3,79	+
SJ 146	RR	3,25	cdefghijkl	4,00	abcdefg	3,63	+
AG1-IB	EUA	3,12	defghijkl	1,33	no	2,23	+
SJ 29	MT	3,12	defghijkl	4,50	abcd	3,81	+
SJ 68	MT	3,12	defghijkl	2,00	klmno	2,56	+
SJ 76	MT	3,12	defghijkl	3,66	abcdefghi	3,39	+
SJ 83	MA	3,12	defghijkl	3,50	bcdefghij	3,31	+
SJ 134	MT	3,12	defghijkl	3,00	efghijklm	3,06	+
SJ 34	MT	3,00	efghijkl	3,83	abcdefgh	3,42	+
SJ 64	MT	3,00	efghijkl	3,00	efghijklm	3,00	+
SJ 73	MT	3,00	efghijkl	4,50	abcd	3,75	+
SJ 141	MA	3,00	efghijkl	1,00	o	2,00	+
SJ 22	MT	2,87	efghijklm	3,16	defghijkl	3,02	+
SJ 31	MT	2,87	efghijklm	3,83	abcdefgh	3,35	+
SJ 66	MT	2,87	efghijklm	4,16	abcdef	3,52	+
SJ 15	MT	2,75	fghijklm	2,50	hijklmn	2,63	+
SJ 46	MT	2,75	fghijklm	2,83	fghijklm	2,79	+

(continua...)

¹ País ou estado brasileiro de origem do isolado.

² Severidade da doença avaliada pela escala de notas de 1 a 5, onde 1 = sem sintomas, 2 = até 25% de área do folíolo infectada (a.f.i.), 3 = de 26 a 50% de a.f.i., 4 = de 51 a 75% de a.f.i. e 5 = acima de 75% de a.f.i.

³ Média de quatro repetições.

⁴ Média de três repetições.

⁵ Patogenicidade do isolado: (+) = patogênico e (-) = não Patogênico.

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Quadro 17. Severidade da doença causada por isolados de *Rhizoctonia solani* e por isolados padrões dos AGs 1, 2-3, e 4, em soja 'MABRS Seridó RCH'. (Continuação)

Isolado	Proc. ¹	Severidade da doença ²			Pat. ⁵	
		Planta Inteira ³	Trifólio Destacado ⁴	Média		
SJ 56	MT	2,75	fghijklm	4,00 abcdefg	3,38	+
SJ 62	MT	2,75	fghijklm	3,83 abcdefgh	3,29	+
SJ 67	MT	2,75	fghijklm	3,66 abcdefghi	3,21	+
SJ 117	MA	2,75	fghijklm	1,83 lmno	2,29	+
AG4-HGIII	MT	2,62	ghijklmn	1,66 mno	2,14	+
SJ 14	MT	2,62	ghijklmn	3,00 efghijklm	2,81	+
SJ 19	MT	2,62	ghijklmn	4,16 abcdef	3,39	+
SJ 20	MT	2,62	ghijklmn	3,66 abcdefghi	3,14	+
SJ 36	MT	2,62	ghijklmn	3,83 abcdefgh	3,23	+
SJ 54	MT	2,62	ghijklmn	3,33 cdefghijk	2,98	+
SJ 124	MA	2,62	ghijklmn	3,00 efghijklm	2,81	+
SJ 40	MT	2,50	hijklmno	4,50 abcd	3,50	+
SJ 41	MT	2,50	hijklmno	4,50 abcd	3,50	+
SJ 43	MT	2,50	hijklmno	2,33 ijklmno	2,42	+
SJ 71	MT	2,50	hijklmno	3,50 bcdefghij	3,00	+
SJ 77	MT	2,50	hijklmno	3,33 cdefghijk	2,92	+
SJ 127	MA	2,50	hijklmno	2,66 ghijklmn	2,58	+
SJ 39	MT	2,37	ijklmno	3,33 cdefghijk	2,85	+
SJ 60	MT	2,37	ijklmno	4,33 abcde	3,35	+
SJ 61	MT	2,37	ijklmno	3,33 cdefghijk	2,85	+
SJ 72	MT	2,37	ijklmno	2,00 klmno	2,19	+
SJ 82	MA	2,37	ijklmno	3,66 abcdefghi	3,02	+
SJ 119	MA	2,37	ijklmno	2,50 hijklmn	2,44	+
SJ 126	MA	2,37	ijklmno	4,83 ab	3,60	+
SJ 57	MT	2,25	jklmnop	3,00 efghijklm	2,63	+
SJ 116	MA	2,25	jklmnop	2,83 fghijklm	2,54	+
SJ 122	MA	2,25	jklmnop	3,33 cdefghijk	2,79	+
SJ 13	MT	2,12	klmnop	2,33 ijklmno	2,23	+
SJ 94	RR	2,12	klmnop	1,33 no	1,73	+
SJ 118	MA	2,12	klmnop	2,66 ghijklmn	2,39	+

(continua...)

¹ País ou estado brasileiro de origem do isolado.

² Severidade da doença avaliada pela escala de notas de 1 a 5, onde 1 = sem sintomas, 2 = até 25% de área do folíolo infectada (a.f.i.), 3 = de 26 a 50% de a.f.i., 4 = de 51 a 75% de a.f.i. e 5 = acima de 75% de a.f.i.

³ Média de quatro repetições.

⁴ Média de três repetições.

⁵ Patogenicidade do isolado: (+) = patogênico e (-) = não Patogênico.

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Quadro 17. Severidade da doença causada por isolados de *Rhizoctonia solani* e por isolados padrões dos AGs 1, 2-3, e 4, em soja 'MABRS Seridó RCH'. (Continuação)

Isolado	Proc. ¹	Severidade da doença ²				Pat. ⁵	
		Planta Inteira ³		Trifólio Destacado ⁴			Média
SJ 120	MA	2,12	klmnop	2,66	ghijklmn	2,39	+
AG4-HGII	Japão	2,00	lmnop	1,00	o	1,50	+
SJ 23	MT	2,00	lmnop	2,83	fghijklm	2,42	+
SJ 28	MT	2,00	lmnop	3,66	abcdefghijkl	2,83	+
SJ 51	MT	2,00	lmnop	3,50	bcdefghij	2,75	+
SJ 92	MA	2,00	lmnop	2,66	ghijklmn	2,33	+
SJ 93	TO	2,00	lmnop	3,16	defghijkl	2,58	+
SJ 115	RR	2,00	lmnop	2,16	jklmno	2,08	+
SJ 123	MA	2,00	lmnop	3,00	efghijklm	2,50	+
SJ 114	RR	1,62	mnop	1,83	lmno	1,73	+
SJ 113	RR	1,37	nop	1,00	o	1,19	+
AG1-IC	EUA	1,25	op	1,00	o	1,13	+
AG2-3	Japão	1,00	p	1,66	mno	1,33	+
AG 4-HGI	Japão	1,00	p	1,00	o	1,00	-
SJ 89	MT	1,00	p	1,00	o	1,00	-
SJ 137	MT	1,00	p	1,00	o	1,00	-
Testemunha	-	1,00	p	1,00	o	1,00	-
CV		23,13%		20,63%			
DMS		1,3745		1,3727			

¹ País ou estado brasileiro de origem do isolado.

² Severidade da doença avaliada pela escala de notas de 1 a 5, onde 1 = sem sintomas, 2 = até 25% de área do folíolo infectada (a.f.i.), 3 = de 26 a 50% de a.f.i., 4 = de 51 a 75% de a.f.i. e 5 = acima de 75% de a.f.i.

³ Média de quatro repetições.

⁴ Média de três repetições.

⁵ Patogenicidade do isolado: (+) = patogênico e (-) = não patogênico.

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Quadro 18. Média dos níveis de severidade dos isolados de *Rhizoctonia solani* causadores da mela e dos isolados padrões dos AGs 1, 2-3, e 4, em soja ‘MABRS Seridó RCH’.

Isolado	Grau de Severidade ¹		
	Planta Inteira	Trifólio Destacado	Média
Isolados (média)	3,01	3,37	3,19
AG1-IA	3,25	4,66	3,96
AG1-IB	3,12	1,33	2,23
AG1-IC	1,25	1,00	1,13
AG2-3	1,00	1,66	1,33
AG4-HGI	1,00	1,00	1,00
AG4-HGII	2,00	1,00	1,50
AG4-HGIII	2,62	1,66	2,14

¹ Severidade avaliada por uma escala de notas de 1 a 5, onde 1 = sem sintomas, 2 = até 25% de área foliar infectada (a.f.i.), 3 = de 26 a 50% de a.f.i., 4 = de 51 a 75% de a.f.i. e 5 = acima de 75% de a.f.i.

Dos 100 isolados avaliados, 50 apresentaram graus de severidade acima de 3 (>26% de área foliar infectada) nas avaliações em plantas inteiras e 64 em trifólios destacados (Quadro 19).

Quadro 19. Distribuição dos isolados de *Rhizoctonia solani* causadores da mela da soja em função do grau de severidade da doença sobre ‘MABRS Seridó RCH’.

Intervalo do grau de severidade da doença ¹	Número de isolados	
	Plantas Inteiras	Trifólios Destacados
1,00 – 2,00	11	12
2,01 – 3,00	39	24
3,01 – 4,00	42	33
4,01 – 5,00	8	31

¹ Severidade avaliada por uma escala de notas de 1 a 5, onde 1 = sem sintomas, 2 = até 25% de área foliar infectada (a.f.i.), 3 = de 26 a 50% de a.f.i., 4 = de 51 a 75% de a.f.i. e 5 = acima de 75% de a.f.i.

6.8 Caracterização dos isolados por marcadores moleculares RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”)

6.8.1 Extração de DNA genômico total

Por ocasião da quantificação de DNA genômico total em espectrofotômetro, foram observados valores da razão $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ variando entre 1,695 e 1,788, caracterizando boa qualidade de DNA e ausência de proteínas e carboidratos. O grau de pureza em todas as amostras foi superior a 95%.

6.8.2 Reações de RAPD

A similaridade genética dos isolados de *R. solani* causadores da mela foi comparada por RAPD juntamente com os isolados padrões que também infectam soja AG1 (IA, IB e IC), AG2-3 e AG4 (HGI, HGII e HGIII).

Os seis “primers” revelaram polimorfismo entre as amostras (Figura 7), sendo analisadas 46 bandas polimórficas. O dendrograma (Figura 8) gerado pelo agrupamento UPGMA separou dois grupos geneticamente distintos (G1 e G2). No primeiro constam o padrão AG1-IA e praticamente todos os isolados provenientes do Maranhão, Mato Grosso e Tocantins, com similaridade genética variando de 63% a 74%. O segundo grupo aparece subdividido em dois sub-grupos, dos quais um engloba os padrões do AG1-IC, 2-3 e 4, assim como todos os isolados oriundos de Roraima e, o outro, os isolados SJ 89, SJ 92 e SJ94, distantes geneticamente dos demais. O AG1-IB não se agrupou com nenhum isolado de *R.*

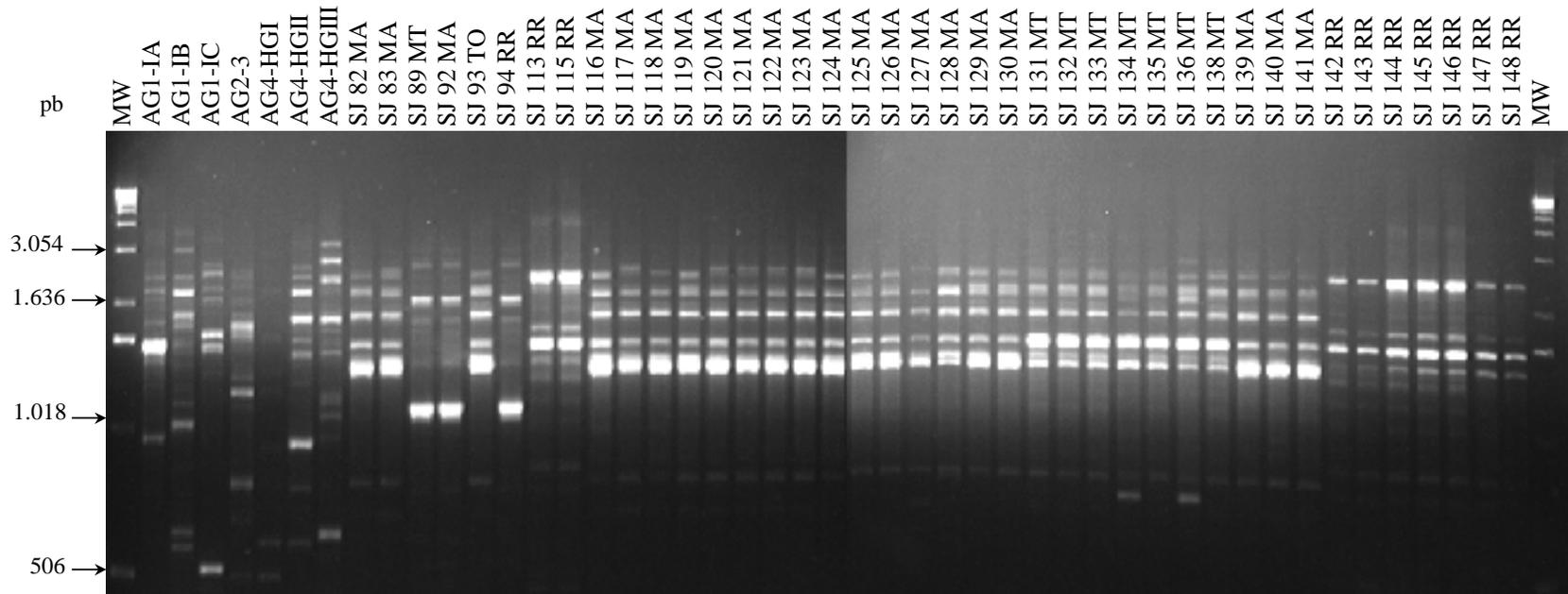


Figura 7. Padrão de bandas de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), com o “primer” OPP-14, de isolados de *R. solani* causadores da mela da soja e dos padrões AG1 (IA, IB e IC), AG2-3 e AG4 (HGI, HGII e HGIII). MW = marcador molecular Ladder 1kb.

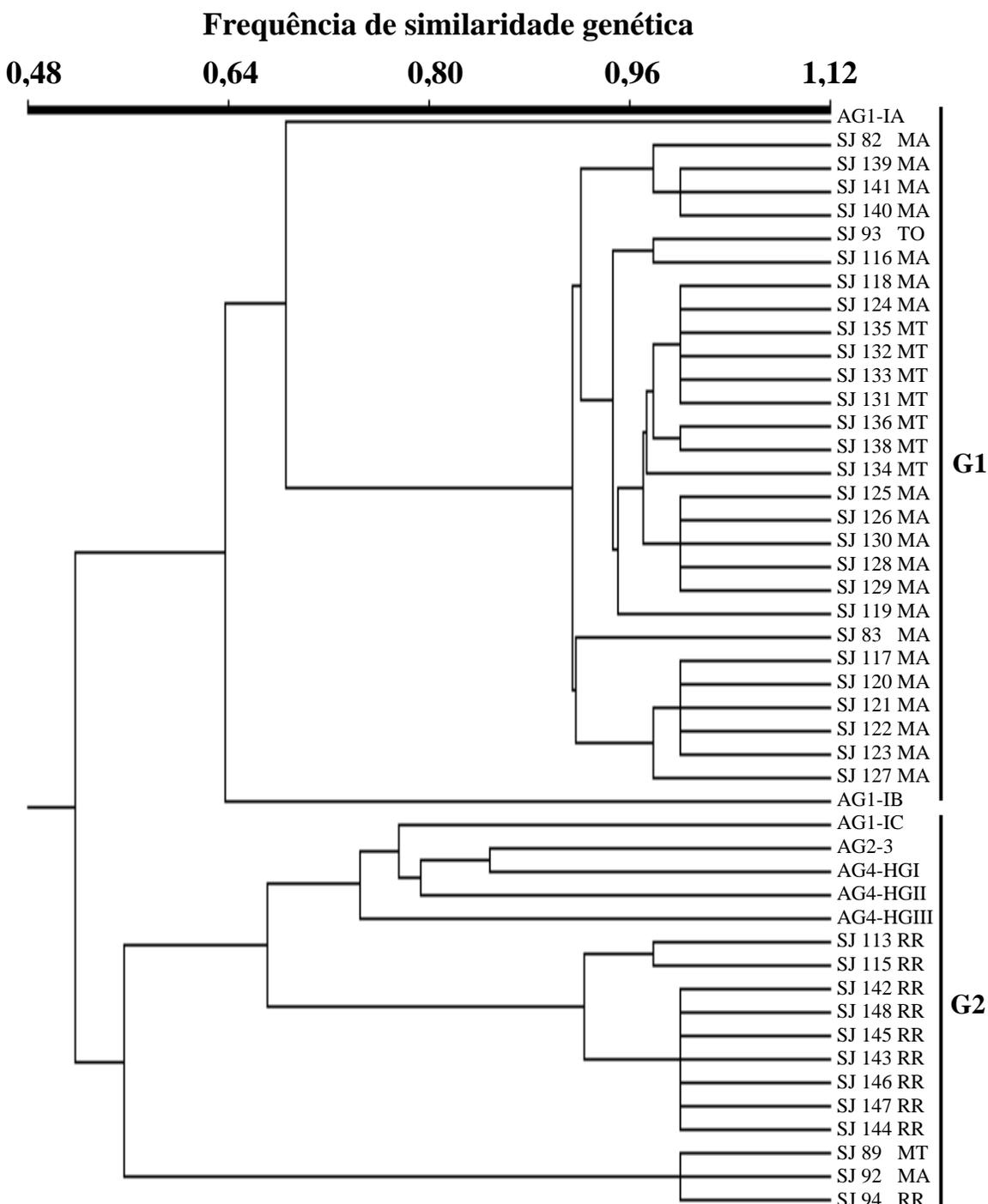


Figura 8. Dendrograma gerado por UPGMA, baseado no coeficiente “Simple Matching”, a partir de bandas polimórficas obtidas por RAPD de amostras de DNA genômico de isolados de *R. solani* causadores da mela da soja e dos padrões AG1 (IA, IB e IC), AG2-3 e AG4 (HGI, HGII e HGIII). Junto à designação dos isolados foi acrescentada a sigla do estado de origem.

solani de soja, mas ficou na mesma ramificação que o padrão do AG1-IA, com similaridade genética de 59%.

6.9 Sequenciamento genético das regiões ITS e do gene 5,8s do rDNA

Foi observada a mesma sequência do gene 5,8s, com 155pb (Quadro 20), em todos os isolados e nos padrões dos grupos de anastomose, caracterizando-se como uma região altamente conservada no genoma do patógeno.

As regiões ITS1 e ITS2 variaram em tamanho entre os isolados e padrões (Quadro 20). Os isolados SJ 93, 121, 127, 133, 134 e 140, provenientes do Maranhão, Mato Grosso e Tocantins, apresentaram 205pb na ITS1 e 281pb a 283pb na ITS2, caracterizando-se como pertencentes ao AG1-IA, cujo isolado padrão apresentou 212pb na ITS1 e 281pb na ITS2 (Quadro 20). A homologia de sequência de nucleotídeos das regiões ITS e 5,8s entre estes isolados e o padrão AG1-IA variou de 96,5% a 97,2% (Quadro 21) e seu agrupamento foi determinado com base no valor “bootstrap” de 99,5% (Figura 9).

Os isolados SJ 115 e 142, originários de Roraima, assemelharam-se ao AG1-IB, com 237pb na ITS1 e 277pb e 283pb na ITS2, respectivamente, tendo o isolado padrão apresentado 227pb e 275pb (Quadro 20). A similaridade de nucleotídeos entre eles foi de 93,3% (Quadro 21).

O tamanho das regiões ITS dos isolados SJ 89, 92 e 94 aproximou-se dos observados para o AG2-1 e AG4-HGII, não havendo condições de distinções mais evidentes com base nesta característica (Quadro 20). Estes três isolados apresentaram maior proximidade ao padrão AG1-IC quanto à sequência de nucleotídeos, variando de 90,0% a

91,3% (Quadro 21), mas, conforme apresentado na Figura 9, não ocorreu agrupamento à nenhum dos padrões analisados, ficando geneticamente distantes dos mesmos.

Quadro 20. Tamanho das sequências de nucleotídeos das regiões ITS1, ITS2 e do gene 5,8s de isolados de *Rhizoctonia solani* causadores da mela da soja e de padrões de grupos de anastomose.

Isolado	AG/ISG ¹	Hospedeiro/Origem	Tamanho da região (pb)		
			ITS1	5,8s	ITS2
H5-526	AG1-IA	Milho / Japão	212	155	281
SJ 93	AG1-IA	Soja / Brasil, TO	205	155	283
SJ 121	AG1-IA	Soja / Brasil, MA	205	155	281
SJ 127	AG1-IA	Soja / Brasil, MA	205	155	281
SJ 133	AG1-IA	Soja / Brasil, MT	205	155	282
SJ 134	AG1-IA	Soja / Brasil, MT	205	155	282
SJ 140	AG1-IA	Soja / Brasil, MA	205	155	283
-	AG1-IB	Alface / EUA	227	155	275
SJ 115	AG1-IB	Soja / Brasil, RR	237	155	277
SJ 142	AG1-IB	Soja / Brasil, RR	237	155	283
RH-28	AG1-IC	Beterraba açucareira / Japão	198	155	276
SJ 92	?	Soja / Brasil, MA	220	155	275
SJ 94	?	Soja / Brasil, RR	220	155	275
SJ 89	?	Soja / Brasil, MT	220	155	278
PS-4	AG2-1	Ervilha / Japão	224	155	270
B 60	AG 2-2 IIIB	Junco / Japão	231	155	284
BC-10	AG2-2 IV	Beterraba açucareira / Japão	237	155	287
237258	AG2-3	Soja / Japão	213	155	273
AH-1	AG4-HGI	Amendoim / Japão	218	155	281
Rh-131	AG4-HGII	Beterraba açucareira / Japão	221	155	280
-	AG4-HGIII	Amendoim / EUA	216	155	297

¹ Grupo de anastomose (AG) e respectivo grupo intra-específico (ISG).

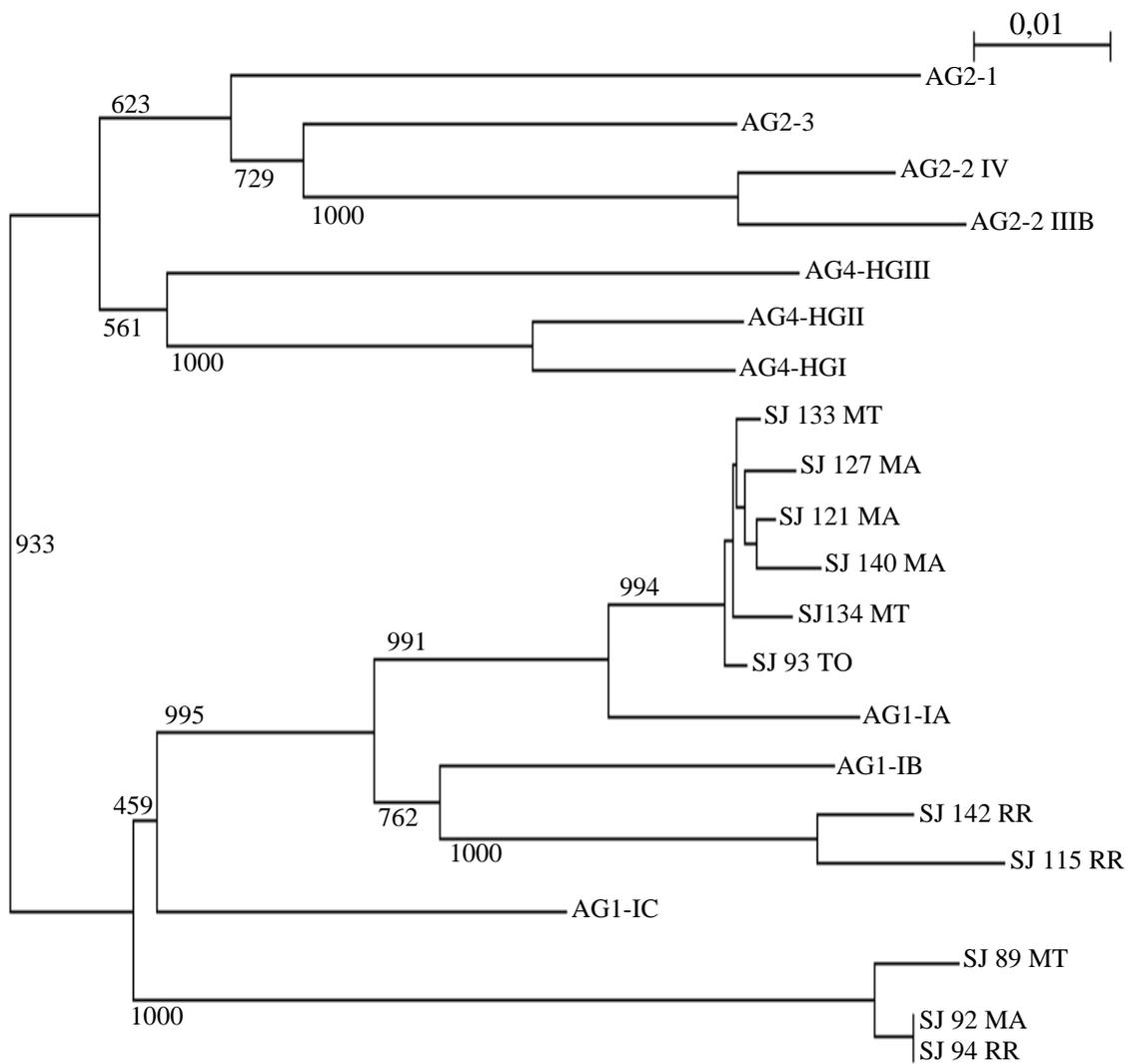


Figura 9. Dendrograma gerado por “Neighbor-joining” ilustrando a homologia nas seqüências de nucleotídeos das regiões ITS1, ITS2 e do gene 5,8s do rDNA de isolados de *Rhizoctonia solani* causadores da mela da soja e de padrões do AG1 (IA, IB e IC), AG2 (1, 2 IIB, 2 IV e 3) e AG4 (HGI, HGII, HGIII). O número nas ramificações representa o valor de “bootstrap”. Junto à designação dos isolados foi acrescentada a sigla do estado de origem.

6.10 Avaliação de germoplasma de soja para resistência à mela

Foram avaliados 337 genótipos de soja quanto à reação de resistência à mela, causada por *R. solani* AG1-IA e AG1-IB (Quadro 22).

As avaliações em plantas inteiras (PI) e trifólios destacados (TD) não apresentaram correlação estatística positiva entre si (Quadro 22), portanto não foram consideradas as TDs na análise das reações dos genótipos.

Na grande maioria dos casos, houve progressão do grau de severidade entre as avaliações em PI aos cinco (PI 5) e 10 (PI 10) dias após a inoculação, sendo consideradas as médias aos 10 dias para avaliação da resistência.

Nenhum genótipo apresentou-se resistente. Destacaram-se 'IAC-8' com médias de severidade de 1,38 para PI 5 e 2,13 para PI 10, seguidas de 'FT-16' e 'Leflore', com 1,63 e 1,88 para PI 5 e 2,63 em ambas para PI 10, respectivamente. Além destas, figuraram entre a classe de moderadamente resistentes também os cultivares 'UFV-9 (Sucupira)', 'BRSMA Boa Vista', 'BRSGO Jataí', 'BR-36', 'CEP-20 (Guajuvira)', 'IAC-16', 'Padre', 'MSoy 7101', 'MSoy 7201' e 'MSoy 8720' (Quadro 22).

Foram observados 81 genótipos com reação moderadamente suscetível, 231 suscetível e 12 altamente suscetível (Quadro 22).

As plantas inoculadas apresentaram sintomas característicos da mela, havendo desenvolvimento de micélio, macro e microescleródios nos tecidos vegetais (Figura 10). Reisolamentos do patógeno foram realizados para confirmação de sua atuação como agente causal.

Quadro 22. Reação de genótipos de soja à mela causada por *Rhizoctonia solani* AG1-IA e AG1-IB.

Genótipo	Severidade da doença ¹				Reação ²
	PI 5	PI 10	TD 4	TD 8	
IAC-8	1,38	2,13	1,10	1,19	MR
FT-16	1,63	2,63	0,43	0,86	MR
Leflore	1,88	2,63	2,77	4,52	MR
UFV-9 (Sucupira)	2,63	2,63	3,43	3,86	MR
BRSMA BoaVista	2,68	2,66	2,50	3,95	MR
BRSGO Jatai	2,52	2,81	0,82	1,39	MR
BR-36	2,38	2,88	5,10	5,19	MR
CEP-20 (Guajuvira)	2,63	2,88	2,43	3,86	MR
IAC-16	2,63	2,88	3,77	3,86	MR
Padre	2,63	2,88	1,10	3,86	MR
MSoy7101	2,26	2,98	2,92	2,80	MR
MSoy7201	3,26	2,98	2,92	2,80	MR
MSoy8720	2,59	2,98	2,59	3,80	MR
BRSMT Tucunaré	2,02	3,06	1,48	2,39	MS
BR-1	2,13	3,13	2,77	4,52	MS
BR-11 (Carajás)	2,13	3,13	3,10	3,86	MS
FT Cristal	2,88	3,13	2,77	3,86	MS
FT Morena	2,88	3,13	3,77	3,86	MS
IAC-100	2,13	3,13	1,10	3,19	MS
IAC-12	2,63	3,13	4,43	5,19	MS
IAC-14	2,38	3,13	2,43	2,52	MS
BRSMT Jiripoca	2,43	3,16	2,83	4,95	MS
MT/BR45 (Paiaguás)	3,18	3,16	3,16	4,28	MS
BRSMT Pintado	3,02	3,31	0,82	0,73	MS
MSoy8550	3,26	3,32	1,59	2,47	MS
FT Cristalina	2,63	3,38	2,10	2,52	MS
FT-10 (Princesa)	3,13	3,38	3,43	5,19	MS
FT-2	2,88	3,38	4,43	5,19	MS
FT-2000	2,88	3,38	4,10	5,19	MS
FT Manacá	2,63	3,38	3,77	3,86	MS
Gordon	2,88	3,38	2,43	2,86	MS

(continua...)

¹ Severidade da doença avaliada em plantas inteiras aos 5 (PI 5) e 10 (PI 10) dias após a inoculação e em trifólios destacados aos 4 (TD 4) e 8 (TD 8) dias após a inoculação. Foi utilizada a escala de notas de 0 a 5 descrita por Harville et al. (1996), onde 0 = sem sintomas, 1 = menos que 5% de área do folíolo infectada (a.f.i.), 2 = 6% a 10% de a.f.i., 3 = 11% a 30% de a.f.i., 4 = 31% a 50% de a.f.i. e 5 = acima de 50% de a.f.i. Médias de mínimos quadrados (LSMeans) ajustadas com base na testemunha comum 'BRSMA Seridó RCH'.

² Reação de resistência do genótipo, onde R = resistente (grau de severidade de 0 a 1,99), MR = moderadamente resistente (2,0 a 2,99), MS = moderadamente suscetível (3,0 a 3,99), S = suscetível (4,0 a 4,99) e AS = altamente suscetível ($\geq 5,0$).

Quadro 22. Reação de genótipos de soja à mela causada por *Rhizoctonia solani* AG1-IA e AG1-IB. (Continuação)

Genótipo	Severidade da doença ¹				Reação ²
	PI 5	PI 10	TD 4	TD 8	
Invicta	2,88	3,38	3,43	5,19	MS
KI-S 602 RCH	3,13	3,38	2,77	3,35	MS
MS/BR-21 (Buriti)	3,13	3,38	3,10	3,86	MS
Numbaira	2,88	3,38	3,77	4,52	MS
RS-9 (Itaúba)	3,13	3,38	3,10	4,86	MS
MT/BR-52 (Curió)	3,43	3,41	3,16	4,61	MS
CS-301	3,02	3,56	4,15	4,39	MS
DM339	2,02	3,56	2,82	4,39	MS
Embrapa 34 (Teresina RCH)	3,02	3,56	2,48	1,73	MS
BRSMG Nova Fronteira	3,02	3,56	4,82	4,73	MS
BR-16	3,13	3,63	4,10	5,19	MS
BR-30	2,88	3,63	3,10	5,19	MS
BR-9 (Savana)	3,13	3,63	3,10	4,86	MS
Dourados	3,13	3,63	5,10	5,19	MS
FT Canarana	3,38	3,63	5,10	5,19	MS
FT Seriema	3,13	3,63	3,10	3,52	MS
IAC-18	3,13	3,63	3,43	3,86	MS
KI-S 601	3,38	3,63	4,43	5,19	MS
MS/BR-20 (Ipê)	3,13	3,63	2,43	5,19	MS
MSoy7901	3,38	3,63	3,43	5,19	MS
Suprema	2,88	3,63	3,43	4,52	MS
Tiaraju	3,63	3,63	4,10	5,19	MS
FT-105	3,26	3,65	4,25	3,80	MS
MSoy7203	3,26	3,65	1,92	2,47	MS
MSoy7302	2,93	3,65	1,59	1,80	MS
MSoy9010	3,93	3,65	4,25	4,14	MS
MSoy9350	3,26	3,65	2,59	2,47	MS
Embrapa1 (IAS-5 RC)	3,43	3,66	1,83	4,28	MS
Emgopa-313 (Anhanguera)	3,43	3,66	3,16	4,28	MS
Emgopa-316	3,68	3,66	2,16	4,28	MS

(continua...)

¹ Severidade da doença avaliada em plantas inteiras aos 5 (PI 5) e 10 (PI 10) dias após a inoculação e em trifólios destacados aos 4 (TD 4) e 8 (TD 8) dias após a inoculação. Foi utilizada a escala de notas de 0 a 5 descrita por Harville et al. (1996), onde 0 = sem sintomas, 1 = menos que 5% de área do folíolo infectada (a.f.i.), 2 = 6 % a 10% de a.f.i., 3 = 11% a 30% de a.f.i., 4 = 31% a 50% de a.f.i. e 5 = acima de 50% de a.f.i. Médias de mínimos quadrados (LSMeans) ajustadas com base na testemunha comum 'BR SMA Seridó RCH'.

² Reação de resistência do genótipo, onde R = resistente (grau de severidade de 0 a 1,99), MR = moderadamente resistente (2,0 a 2,99), MS = moderadamente suscetível (3,0 a 3,99), S = suscetível (4,0 a 4,99) e AS = altamente suscetível ($\geq 5,0$).

Quadro 22. Reação de genótipos de soja à mela causada por *Rhizoctonia solani* AG1-IA e AG1-IB. (Continuação)

Genótipo	Severidade da doença ¹				Reação ²
	PI 5	PI 10	TD 4	TD 8	
BRSMT Tambaqui	3,18	3,66	3,16	4,61	MS
BRSMA Babaçu	3,52	3,81	1,48	2,39	MS
DM 247	2,77	3,81	2,82	4,06	MS
FT-103	3,27	3,81	3,15	4,39	MS
OCEPAR 18	3,02	3,81	3,48	4,39	MS
BR-13 (Maravilha)	3,38	3,88	3,77	3,86	MS
BR-15 (Mato Grosso)	3,13	3,88	4,10	5,19	MS
Bedford	3,38	3,88	2,77	3,19	MS
Colquitt (PI 536009)	3,63	3,88	3,10	3,52	MS
Embrapa 19	3,38	3,88	2,43	2,86	MS
Emgopa 308	3,63	3,88	5,10	5,19	MS
Essex	3,63	3,88	4,43	5,19	MS
FT-15	3,38	3,88	2,77	3,86	MS
FT-18 (Xavante)	3,13	3,88	5,10	5,19	MS
FT-19 (Macachá)	3,63	3,88	4,43	5,19	MS
FT-5 (Formosa)	3,63	3,88	4,43	5,19	MS
FT Bahia	3,38	3,88	3,77	5,19	MS
FT Guairá	3,38	3,88	3,77	5,19	MS
IAC-17	3,63	3,88	4,43	5,19	MS
OCEPAR 10	3,38	3,88	2,77	2,86	MS
Tarheel Black (PI 14952)	3,38	3,88	4,10	5,19	MS
Santa Rosa	3,63	3,88	3,43	4,86	MS
UFV-15 (Uberlândia)	3,38	3,88	2,43	3,86	MS
Embrapa 2	3,68	3,91	4,50	4,95	MS
Embrapa 32 (Itaquí)	3,68	3,91	4,16	4,61	MS
Embrapa 47	3,68	3,91	0,83	2,95	MS
Embrapa 63 (Mirador)	3,43	3,91	4,50	4,95	MS
Emgopa 303	3,18	3,91	3,16	3,95	MS
BR/Emgopa-312 (Potiguar)	3,68	3,91	4,16	4,61	MS
BRSMG Renascença	2,68	3,91	1,83	4,28	MS

(continua...)

¹ Severidade da doença avaliada em plantas inteiras aos 5 (PI 5) e 10 (PI 10) dias após a inoculação e em trifólios destacados aos 4 (TD 4) e 8 (TD 8) dias após a inoculação. Foi utilizada a escala de notas de 0 a 5 descrita por Harville et al. (1996), onde 0 = sem sintomas, 1 = menos que 5% de área do folíolo infectada (a.f.i.), 2 = 6 % a 10% de a.f.i., 3 = 11% a 30% de a.f.i., 4 = 31% a 50% de a.f.i. e 5 = acima de 50% de a.f.i. Médias de mínimos quadrados (LSMeans) ajustadas com base na testemunha comum 'BRSMA Seridó RCH'.

² Reação de resistência do genótipo, onde R = resistente (grau de severidade de 0 a 1,99), MR = moderadamente resistente (2,0 a 2,99), MS = moderadamente suscetível (3,0 a 3,99), S= suscetível (4,0 a 4,99) e AS= altamente suscetível (≥5,0).

Quadro 22. Reação de genótipos de soja à mela causada por *Rhizoctonia solani* AG1-IA e AG1-IB. (Continuação)

Genótipo	Severidade da doença ¹				Reação ²
	PI 5	PI 10	TD 4	TD 8	
BRSMA Sambaiba	4,18	3,91	3,50	4,61	MS
MSoy8411	3,59	3,98	5,59	5,14	MS
MSoy6302	3,59	3,98	5,25	5,14	MS
BRSRO Aurora	4,02	4,06	4,82	4,73	S
BRS-136	3,27	4,06	3,48	4,39	S
BRS-156	3,02	4,06	3,15	4,39	S
DM Soberana	3,27	4,06	3,48	4,39	S
IAC / Holambra Stewart-1	3,52	4,06	2,82	4,39	S
BRSRO Seleta	3,52	4,06	4,82	4,73	S
UFV-16 (Capinópolis)	3,02	4,06	2,82	4,39	S
UFV-20 (Florestal)	3,27	4,06	4,48	4,73	S
FT Estrela	3,45	4,09	2,46	3,29	S
BR-14 (Modelo)	3,63	4,13	4,43	5,19	S
Embrap 9 (Bays)	3,88	4,13	5,10	5,19	S
Campos Gerais	3,38	4,13	3,77	3,86	S
Emgopa 306 (Chapada)	3,88	4,13	4,43	5,19	S
FT Abyara	3,13	4,13	3,10	5,19	S
FT Jatoba	3,63	4,13	3,77	3,86	S
FT Maracaju	4,13	4,13	5,10	5,19	S
Forrest	3,88	4,13	3,77	5,19	S
IAC-4	3,13	4,13	2,77	3,86	S
Ipagro 20	3,88	4,13	3,77	5,19	S
Ivorá	3,63	4,13	4,10	5,19	S
OCEPAR 3 (Primavera)	3,88	4,13	2,43	3,52	S
BRSMT Apiakas	3,93	4,16	2,50	3,95	S
BR-40 (Itiquira)	4,18	4,16	4,50	4,95	S
CAC-1	4,18	4,16	4,50	4,95	S
Embrapa 46	3,93	4,16	3,50	4,61	S
Emgopa 309	3,93	4,16	4,50	4,95	S
FT-104	3,43	4,16	4,50	4,95	S

(continua...)

¹ Severidade da doença avaliada em plantas inteiras aos 5 (PI 5) e 10 (PI 10) dias após a inoculação e em trifólios destacados aos 4 (TD 4) e 8 (TD 8) dias após a inoculação. Foi utilizada a escala de notas de 0 a 5 descrita por Harville et al. (1996), onde 0 = sem sintomas, 1 = menos que 5% de área do folíolo infectada (a.f.i.), 2 = 6 % a 10% de a.f.i., 3 = 11% a 30% de a.f.i., 4 = 31% a 50% de a.f.i. e 5 = acima de 50% de a.f.i. Médias de mínimos quadrados (LSMeans) ajustadas com base na testemunha comum 'BRSMA Seridó RCH'.

² Reação de resistência do genótipo, onde R = resistente (grau de severidade de 0 a 1,99), MR = moderadamente resistente (2,0 a 2,99), MS = moderadamente suscetível (3,0 a 3,99), S= suscetível (4,0 a 4,99) e AS= altamente suscetível (≥5,0).

Quadro 22. Reação de genótipos de soja à mela causada por *Rhizoctonia solani* AG1-IA e AG1-IB. (Continuação)

Genótipo	Severidade da doença ¹				Reação ²
	PI 5	PI 10	TD 4	TD 8	
FT Lider	3,93	4,16	4,16	4,95	S
Paranaíba	3,93	4,16	3,50	4,28	S
BRSMT Uirapuru	3,93	4,16	3,16	4,28	S
BRSMS Acará	4,02	4,31	3,82	4,73	S
BR/IAC-21	4,02	4,31	4,48	4,73	S
BRS-134	4,27	4,31	2,15	3,06	S
BRSMG 68	4,02	4,31	4,48	4,73	S
CD 203	3,77	4,31	4,15	4,73	S
CS 305	3,77	4,31	3,82	4,73	S
Embrapa 20 (Doko RC)	2,52	4,31	2,82	4,39	S
Embrapa 61	3,52	4,31	3,15	4,39	S
IAC-19	3,52	4,31	4,48	4,73	S
IAC-8-2	4,02	4,31	2,48	4,06	S
OCEPAR 17	4,27	4,31	3,82	4,06	S
BRSMS Piapara	3,77	4,31	4,15	4,73	S
BRSMS Piraputanga	3,77	4,31	2,15	4,06	S
BRSMS Taquari	3,27	4,31	3,82	4,39	S
UFV-17 (Minas Gerais)	3,77	4,31	4,15	4,73	S
UFV-19 (Triângulo)	4,02	4,31	4,15	4,39	S
MSoy6350	3,26	4,32	2,92	4,47	S
MSoy7204	4,26	4,32	5,59	5,14	S
MSoy7602	3,59	4,32	2,59	2,47	S
MSoy8015	3,93	4,32	4,59	4,47	S
MSoy8914	4,93	4,32	3,92	3,80	S
FT-17 (Bandeirantes)	3,38	4,38	2,43	3,19	S
IAC-13	3,38	4,38	3,77	3,86	S
IAC-15	3,63	4,38	4,10	5,19	S
IAC-15-1	3,88	4,38	1,77	4,19	S
IAC Foscarin 31	3,63	4,38	3,77	3,86	S
MS/BR-18 (Guavira)	4,13	4,38	4,43	5,19	S

(continua...)

¹ Severidade da doença avaliada em plantas inteiras aos 5 (PI 5) e 10 (PI 10) dias após a inoculação e em trifólios destacados aos 4 (TD 4) e 8 (TD 8) dias após a inoculação. Foi utilizada a escala de notas de 0 a 5 descrita por Harville et al. (1996), onde 0 = sem sintomas, 1 = menos que 5% de área do folíolo infectada (a.f.i.), 2 = 6 % a 10% de a.f.i., 3 = 11% a 30% de a.f.i., 4 = 31% a 50% de a.f.i. e 5 = acima de 50% de a.f.i. Médias de mínimos quadrados (LSMeans) ajustadas com base na testemunha comum 'BR SMA Seridó RCH'.

² Reação de resistência do genótipo, onde R = resistente (grau de severidade de 0 a 1,99), MR = moderadamente resistente (2,0 a 2,99), MS = moderadamente suscetível (3,0 a 3,99), S= suscetível (4,0 a 4,99) e AS= altamente suscetível (≥5,0).

Quadro 22. Reação de genótipos de soja à mela causada por *Rhizoctonia solani* AG1-IA e AG1-IB. (Continuação)

Genótipo	Severidade da doença ¹				Reação ²
	PI 5	PI 10	TD 4	TD 8	
OCEPAR 13	3,63	4,38	2,43	4,19	S
OCEPAR 9	3,88	4,38	2,43	4,52	S
UFV-10 (Uberaba)	3,13	4,38	3,77	3,86	S
Woods Yellow	4,13	4,38	5,10	5,19	S
BRSMT Bororó	4,18	4,41	2,83	3,61	S
CS-201	4,43	4,41	2,50	4,28	S
BRS Carla	4,18	4,41	3,50	4,61	S
Cordell	3,43	4,41	3,83	4,61	S
Embrapa 58	4,18	4,41	3,50	4,61	S
Embrapa 59	4,18	4,41	2,83	4,28	S
Embrapa 62	3,93	4,41	3,83	4,61	S
Emgopa 307	3,68	4,41	1,83	3,28	S
FT-102	4,43	4,41	4,50	4,95	S
FT Saray	3,43	4,41	2,83	3,95	S
GO/BR-25 (Aruanã)	3,68	4,41	3,83	4,95	S
MG/BR-42 (Kage)	3,93	4,41	3,16	4,61	S
MS/BR-39 (Chapadão)	3,93	4,41	3,16	4,28	S
MT/BR-49 (Pioneira)	4,18	4,41	3,50	4,95	S
MT/BR-50 (Parecis)	3,68	4,41	4,16	4,95	S
BRS Milena	3,68	4,41	2,83	4,95	S
RS-5 (Esmeralda)	3,93	4,41	3,16	4,95	S
BRSMT Anhumas	3,52	4,56	3,48	4,06	S
BRSMS Apaiari	4,27	4,56	4,82	4,73	S
BRSMT Arara Azul	4,52	4,56	4,15	4,73	S
BRS-132	4,27	4,56	4,82	4,73	S
BRS-133	4,52	4,56	4,15	4,39	S
BRS-154	4,02	4,56	4,48	4,73	S
BRS-155	4,52	4,56	4,82	4,73	S
BRS-157	4,27	4,56	3,82	4,39	S
BRS-181	4,02	4,56	3,48	4,39	S

(continua...)

¹ Severidade da doença avaliada em plantas inteiras aos 5 (PI 5) e 10 (PI 10) dias após a inoculação e em trifólios destacados aos 4 (TD 4) e 8 (TD 8) dias após a inoculação. Foi utilizada a escala de notas de 0 a 5 descrita por Harville et al. (1996), onde 0 = sem sintomas, 1 = menos que 5% de área do folíolo infectada (a.f.i.), 2 = 6 % a 10% de a.f.i., 3 = 11% a 30% de a.f.i., 4 = 31% a 50% de a.f.i. e 5 = acima de 50% de a.f.i. Médias de mínimos quadrados (LSMeans) ajustadas com base na testemunha comum 'BRSMA Seridó RCH'.

² Reação de resistência do genótipo, onde R = resistente (grau de severidade de 0 a 1,99), MR = moderadamente resistente (2,0 a 2,99), MS = moderadamente suscetível (3,0 a 3,99), S= suscetível (4,0 a 4,99) e AS= altamente suscetível ($\geq 5,0$).

Quadro 22. Reação de genótipos de soja à mela causada por *Rhizoctonia solani* AG1-IA e AG1-IB. (Continuação)

Genótipo	Severidade da doença ¹				Reação ²
	PI 5	PI 10	TD 4	TD 8	
BRS-182	3,52	4,56	3,48	4,39	S
BRS-183	4,52	4,56	3,82	4,73	S
BRS-184	4,27	4,56	4,15	4,73	S
BRS Flora	3,52	4,56	4,15	4,39	S
BRSGO Bela Vista	3,77	4,56	4,48	4,73	S
CD 201	4,27	4,56	3,48	4,39	S
CD 202	4,27	4,56	3,48	4,73	S
CD 204	4,52	4,56	3,82	4,39	S
CD 205	4,52	4,56	3,82	4,39	S
CD 206	4,52	4,56	3,48	4,73	S
CD 207	4,27	4,56	2,82	4,73	S
CS-110	4,52	4,56	3,82	4,06	S
BRSMS Caranda	3,77	4,56	3,82	4,73	S
BRSGO Catalão	4,27	4,56	4,48	4,73	S
BRSMG Confiança	4,52	4,56	3,82	4,73	S
BRSMS Curimbatá	4,02	4,56	4,48	4,73	S
DM 118	4,02	4,56	3,82	4,39	S
DM Nobre	4,52	4,56	3,48	4,39	S
DM Rainha	4,52	4,56	4,48	4,73	S
DM Vitória	4,52	4,56	4,48	4,73	S
Doko	3,27	4,56	2,15	3,39	S
Embrapa 33 (Cariri RC)	4,52	4,56	4,48	4,73	S
Emgopa 310	4,27	4,56	3,15	4,06	S
FT-106	4,27	4,56	3,82	4,06	S
FT 2002	4,02	4,56	2,82	4,39	S
FUNDACEP 33	4,27	4,56	2,82	4,39	S
GO/BR-26 (Tocantins)	4,52	4,56	3,15	4,39	S
IAC-20	3,27	4,56	2,48	3,73	S
KI-S 702	3,77	4,56	3,82	4,39	S
KI-S 801	4,52	4,56	2,48	4,06	S

(continua...)

¹ Severidade da doença avaliada em plantas inteiras aos 5 (PI 5) e 10 (PI 10) dias após a inoculação e em trifólios destacados aos 4 (TD 4) e 8 (TD 8) dias após a inoculação. Foi utilizada a escala de notas de 0 a 5 descrita por Harville et al. (1996), onde 0 = sem sintomas, 1 = menos que 5% de área do folíolo infectada (a.f.i.), 2 = 6 % a 10% de a.f.i., 3 = 11% a 30% de a.f.i., 4 = 31% a 50% de a.f.i. e 5 = acima de 50% de a.f.i. Médias de mínimos quadrados (LSMeans) ajustadas com base na testemunha comum 'BR SMA Seridó RCH'.

² Reação de resistência do genótipo, onde R = resistente (grau de severidade de 0 a 1,99), MR = moderadamente resistente (2,0 a 2,99), MS = moderadamente suscetível (3,0 a 3,99), S= suscetível (4,0 a 4,99) e AS= altamente suscetível ($\geq 5,0$).

Quadro 22. Reação de genótipos de soja à mela causada por *Rhizoctonia solani* AG1-IA e AG1-IB. (Continuação)

Genótipo	Severidade da doença ¹				Reação ²
	PI 5	PI 10	TD 4	TD 8	
MG/BR-48 (Garimpo RCH)	4,52	4,56	2,82	4,06	S
MT/BR-53 (Tucano)	4,02	4,56	3,48	4,73	S
MS/BR-19 (Pequi)	4,27	4,56	2,82	3,73	S
MS/BR-34 (EMPAER 10)	3,77	4,56	3,15	4,39	S
MT/BR-51 (Xingú)	3,77	4,56	2,82	4,06	S
BRSMS Mandi	4,52	4,56	3,48	4,06	S
OCEPAR 14	4,02	4,56	4,82	4,73	S
OCEPAR 19	4,52	4,56	4,48	4,73	S
BRSMA Pati	4,02	4,56	3,48	4,39	S
BRSMS Piracanjuba	3,77	4,56	4,15	4,73	S
BRSMT Piraiba	4,52	4,56	3,82	4,39	S
RB 501	4,52	4,56	4,48	4,73	S
RB 502	4,52	4,56	4,82	4,73	S
RB 603	4,52	4,56	4,82	4,73	S
RB 604	4,52	4,56	3,82	4,73	S
RB 605	4,02	4,56	4,82	4,73	S
FEPAGRO-RS 10	4,02	4,56	3,82	4,06	S
FEPAGRO-RS 10	4,52	4,56	4,48	4,73	S
BRSMG Segurança	4,52	4,56	4,82	4,73	S
BRSMS Surubi	4,02	4,56	3,82	4,39	S
BRSMA Tracajá	4,52	4,56	3,48	4,73	S
BRSMS Tuiuiú	4,52	4,56	4,48	4,73	S
UFV-18 (Patos de Minas)	3,77	4,56	4,82	4,73	S
BR-35 (Rio Balsas)	4,13	4,63	5,10	5,19	S
BR-5	3,38	4,63	3,43	4,86	S
Bragg	3,13	4,63	4,77	5,19	S
Embrapa 26	4,13	4,63	3,43	5,19	S
Embrapa 4 (BR-4 RC)	3,88	4,63	3,43	4,86	S
Emgopa 302	4,13	4,63	4,43	5,19	S
FT-11 (Alvorada)	3,63	4,63	2,77	5,19	S

(continua...)

¹ Severidade da doença avaliada em plantas inteiras aos 5 (PI 5) e 10 (PI 10) dias após a inoculação e em trifólios destacados aos 4 (TD 4) e 8 (TD 8) dias após a inoculação. Foi utilizada a escala de notas de 0 a 5 descrita por Harville et al. (1996), onde 0 = sem sintomas, 1 = menos que 5% de área do folíolo infectada (a.f.i.), 2 = 6 % a 10% de a.f.i., 3 = 11% a 30% de a.f.i., 4 = 31% a 50% de a.f.i. e 5 = acima de 50% de a.f.i. Médias de mínimos quadrados (LSMeans) ajustadas com base na testemunha comum 'BRSMA Seridó RCH'.

² Reação de resistência do genótipo, onde R = resistente (grau de severidade de 0 a 1,99), MR = moderadamente resistente (2,0 a 2,99), MS = moderadamente suscetível (3,0 a 3,99), S= suscetível (4,0 a 4,99) e AS= altamente suscetível ($\geq 5,0$).

Quadro 22. Reação de genótipos de soja à mela causada por *Rhizoctonia solani* AG1-IA e AG1-IB. (Continuação)

Genótipo	Severidade da doença ¹				Reação ²
	PI 5	PI 10	TD 4	TD 8	
FT-14 (Piracema)	4,13	4,63	4,10	5,19	S
IAC-11	4,13	4,63	3,77	5,19	S
Yamaguchi Shiro 1 (PI 228065)	4,13	4,63	5,10	5,19	S
Paranagoiana	3,88	4,63	3,77	5,19	S
RS-6 (Guassupi)	3,88	4,63	3,77	5,19	S
Timbira	4,13	4,63	4,77	5,19	S
UFV Araguaia	4,13	4,63	3,10	3,86	S
MSoy7501	3,75	4,64	4,01	4,33	S
FT-112	4,59	4,65	2,59	3,47	S
MSoy6401	3,26	4,65	4,92	4,80	S
MSoy8110	3,59	4,65	3,92	5,14	S
MSoy8400	3,26	4,65	4,25	3,80	S
MSoy8800	4,26	4,65	4,25	4,80	S
BR-24	4,43	4,66	4,50	4,95	S
BR-37	4,68	4,66	2,83	3,95	S
BRS-137	4,18	4,66	3,83	4,95	S
BRSMS Bacuri	3,93	4,66	2,16	3,28	S
BRSMT Beija-Flor	4,43	4,66	3,16	3,61	S
CEP-12 (Cambará)	4,68	4,66	4,16	4,95	S
BRS Celeste	4,68	4,66	3,16	4,95	S
Embrapa 25	3,93	4,66	3,50	4,28	S
Embrapa 31 (Mina)	4,18	4,66	3,16	4,61	S
Embrapa 48	4,43	4,66	1,16	3,28	S
Embrapa 60	4,68	4,66	4,50	4,95	S
Embrapa 65 (Itapoty)	4,43	4,66	4,16	4,95	S
Emgopa 305 (Caraíba)	3,68	4,66	4,50	4,95	S
BR/Emgopa-314 (Garça Branca)	4,18	4,66	3,16	4,95	S
Emgopa 315	4,43	4,66	3,16	4,28	S
FT-7 (Tarobá)	4,43	4,66	3,16	4,61	S
FT Iramaia	4,18	4,66	2,16	4,28	S

(continua...)

¹ Severidade da doença avaliada em plantas inteiras aos 5 (PI 5) e 10 (PI 10) dias após a inoculação e em trifólios destacados aos 4 (TD 4) e 8 (TD 8) dias após a inoculação. Foi utilizada a escala de notas de 0 a 5 descrita por Harville et al. (1996), onde 0 = sem sintomas, 1 = menos que 5% de área do folíolo infectada (a.f.i.), 2 = 6 % a 10% de a.f.i., 3 = 11% a 30% de a.f.i., 4 = 31% a 50% de a.f.i. e 5 = acima de 50% de a.f.i. Médias de mínimos quadrados (LSMeans) ajustadas com base na testemunha comum 'BRSMA Seridó RCH'.

² Reação de resistência do genótipo, onde R = resistente (grau de severidade de 0 a 1,99), MR = moderadamente resistente (2,0 a 2,99), MS = moderadamente suscetível (3,0 a 3,99), S= suscetível (4,0 a 4,99) e AS= altamente suscetível ($\geq 5,0$).

Quadro 22. Reação de genótipos de soja à mela causada por *Rhizoctonia solani* AG1-IA e AG1-IB. (Continuação)

Genótipo	Severidade da doença ¹				Reação ²
	PI 5	PI 10	TD 4	TD 8	
GO/BR33 (Javaés)	4,68	4,66	3,50	4,61	S
BRSMG Garantia	4,18	4,66	2,83	4,95	S
BRSGO Goiatuba	4,68	4,66	3,50	4,61	S
Govan	4,68	4,66	3,16	4,61	S
Ipagro 21	3,68	4,66	0,83	2,95	S
Wright (L2172)	4,68	4,66	2,83	4,28	S
BRSMS Lambari	4,68	4,66	3,83	4,95	S
MG/BR-46 (Conquista)	4,68	4,66	4,50	4,95	S
MS/BR-17 (São Gabriel)	3,93	4,66	4,16	4,95	S
BRSMT Matrinxã	4,43	4,66	4,50	4,95	S
Amakusa Daizu (PI 200451)	4,68	4,66	4,16	4,95	S
PI 230973	3,93	4,66	3,83	4,95	S
RS-7 (Jacuí)	4,68	4,66	2,83	4,61	S
Ransom (TG-51)	3,68	4,66	3,16	4,61	S
BRSMS Saua	4,43	4,66	3,83	4,95	S
BRSMa Seridó RCH	4,43	4,66	4,50	4,95	S
CEP-10	4,13	4,88	3,10	5,19	S
Charlee (PI 71663)	4,63	4,88	5,10	5,19	S
Emgopa 304 (Campeira)	4,38	4,88	4,43	5,19	S
FT-100	4,38	4,88	4,10	5,19	S
FT-9 (Inaê)	4,63	4,88	1,43	2,52	S
IAC PL-1	4,38	4,88	2,77	3,52	S
BR-23	4,93	4,91	3,83	4,95	S
BR-32	4,18	4,91	4,50	4,95	S
BRS-135	4,93	4,91	3,50	4,61	S
BRS-138	4,93	4,91	4,16	4,61	S
BRS-153	4,68	4,91	4,16	4,95	S
BRSGO 204	4,68	4,91	3,83	4,61	S
CEP-16 (Timbó)	4,93	4,91	4,16	4,95	S
CEP-26 (Umbú)	4,68	4,91	1,50	3,61	S

(continua...)

¹ Severidade da doença avaliada em plantas inteiras aos 5 (PI 5) e 10 (PI 10) dias após a inoculação e em trifólios destacados aos 4 (TD 4) e 8 (TD 8) dias após a inoculação. Foi utilizada a escala de notas de 0 a 5 descrita por Harville et al. (1996), onde 0 = sem sintomas, 1 = menos que 5% de área do folíolo infectada (a.f.i.), 2 = 6 % a 10% de a.f.i., 3 = 11% a 30% de a.f.i., 4 = 31% a 50% de a.f.i. e 5 = acima de 50% de a.f.i. Médias de mínimos quadrados (LSMeans) ajustadas com base na testemunha comum 'BRSMa Seridó RCH'.

² Reação de resistência do genótipo, onde R = resistente (grau de severidade de 0 a 1,99), MR = moderadamente resistente (2,0 a 2,99), MS = moderadamente suscetível (3,0 a 3,99), S= suscetível (4,0 a 4,99) e AS= altamente suscetível ($\geq 5,0$).

Quadro 22. Reação de genótipos de soja à mela causada por *Rhizoctonia solani* AG1-IA e AG1-IB. (Continuação)

Genótipo	Severidade da doença ¹				Reação ²
	PI 5	PI 10	TD 4	TD 8	
BRSMT Cachara	4,18	4,91	2,50	4,28	S
Columbus (CA 62-7221)	4,68	4,91	4,50	4,95	S
BRSMT Crixás	4,68	4,91	4,16	4,95	S
BRSMT Curicaca	4,43	4,91	3,50	4,28	S
Embrapa 3	4,68	4,91	3,16	4,28	S
Embrapa 30 (Vale do Rio Doce)	4,93	4,91	4,16	4,61	S
Embrapa 5	4,43	4,91	3,16	4,61	S
Embrapa 64 (Teresina RC)	4,93	4,91	4,50	4,95	S
Embrapa 66	4,68	4,91	3,83	4,95	S
FT-101	4,18	4,91	2,50	4,61	S
Ivaí	4,93	4,91	4,16	4,95	S
BRSMA Juçara	4,43	4,91	4,16	4,95	S
BRSMG Liderança	4,93	4,91	4,16	4,95	S
MT/BR-47 (Canário)	4,68	4,91	3,16	3,95	S
PI 159095	4,68	4,91	3,16	4,95	S
Hong Kong Ga-Soy 17 (PI 22406)	4,68	4,91	4,50	4,95	S
Howgyoko (PI 224270)	4,93	4,91	3,16	4,95	S
Mumei (PI 417166)	4,68	4,91	3,83	4,95	S
PI 88816S	4,68	4,91	4,16	4,95	S
BRSMA Parnaíba	4,93	4,91	3,50	4,61	S
BRSRO Pirarara	4,68	4,91	4,50	4,95	S
BRSMG Virtuosa	4,68	4,91	3,50	4,28	S
MSoy7001	4,59	4,98	1,92	2,47	S
MSoy8001	4,26	4,98	5,59	5,14	S
FT-108	5,26	5,32	4,59	4,14	AS
MSoy109	5,26	5,32	4,25	3,80	AS
MSoy8200	4,26	5,32	4,59	4,80	AS
MSoy8757	3,93	5,32	1,59	1,14	AS
MSoy9001	4,93	5,32	3,25	3,14	AS
FT-107	4,93	5,65	4,92	5,14	AS

(continua...)

¹ Severidade da doença avaliada em plantas inteiras aos 5 (PI 5) e 10 (PI 10) dias após a inoculação e em trifólios destacados aos 4 (TD 4) e 8 (TD 8) dias após a inoculação. Foi utilizada a escala de notas de 0 a 5 descrita por Harville et al. (1996), onde 0 = sem sintomas, 1 = menos que 5% de área do folíolo infectada (a.f.i.), 2 = 6 % a 10% de a.f.i., 3 = 11% a 30% de a.f.i., 4 = 31% a 50% de a.f.i. e 5 = acima de 50% de a.f.i. Médias de mínimos quadrados (LSMeans) ajustadas com base na testemunha comum 'BRSMA Seridó RCH'.

² Reação de resistência do genótipo, onde R = resistente (grau de severidade de 0 a 1,99), MR = moderadamente resistente (2,0 a 2,99), MS = moderadamente suscetível (3,0 a 3,99), S = suscetível (4,0 a 4,99) e AS = altamente suscetível ($\geq 5,0$).

Quadro 22. Reação de genótipos de soja à mela causada por *Rhizoctonia solani* AG1-IA e AG1-IB. (Continuação)

Genótipo	Severidade da doença ¹				Reação ²
	PI 5	PI 10	TD 4	TD 8	
MSoy5826	5,59	5,65	3,59	4,80	AS
MSoy5942	4,93	5,65	5,25	5,14	AS
MSoy6101	5,59	5,65	4,59	5,14	AS
MSoy7603	3,59	5,65	5,59	5,14	AS
MSoy8998	4,59	5,65	2,92	3,80	AS
MSoy9030	5,26	5,65	2,92	4,80	AS
		PI 10	TD 4	TD 8	
Correlação ³ PI 5 x		0,85	0,32	0,33	
Correlação PI 10 x			0,30	0,32	
Correlação TD 4 x				0,73	

¹ Severidade da doença avaliada em plantas inteiras aos 5 (PI 5) e 10 (PI 10) dias após a inoculação e em trifólios destacados aos 4 (TD 4) e 8 (TD 8) dias após a inoculação. Foi utilizada a escala de notas de 0 a 5 descrita por Harville et al. (1996), onde 0 = sem sintomas, 1 = menos que 5% de área do folíolo infectada (a.f.i.), 2 = 6 % a 10% de a.f.i., 3 = 11% a 30% de a.f.i., 4 = 31% a 50% de a.f.i. e 5 = acima de 50% de a.f.i. Médias de mínimos quadrados (LSMeans) ajustadas com base na testemunha comum 'BRSMA Seridó RCH'.

² Reação de resistência do genótipo, onde R = resistente (grau de severidade de 0 a 1,99), MR = moderadamente resistente (2,0 a 2,99), MS = moderadamente suscetível (3,0 a 3,99), S= suscetível (4,0 a 4,99) e AS= altamente suscetível ($\geq 5,0$).

³ Correlação estatística entre as formas de avaliação (PI e TD) e suas épocas.

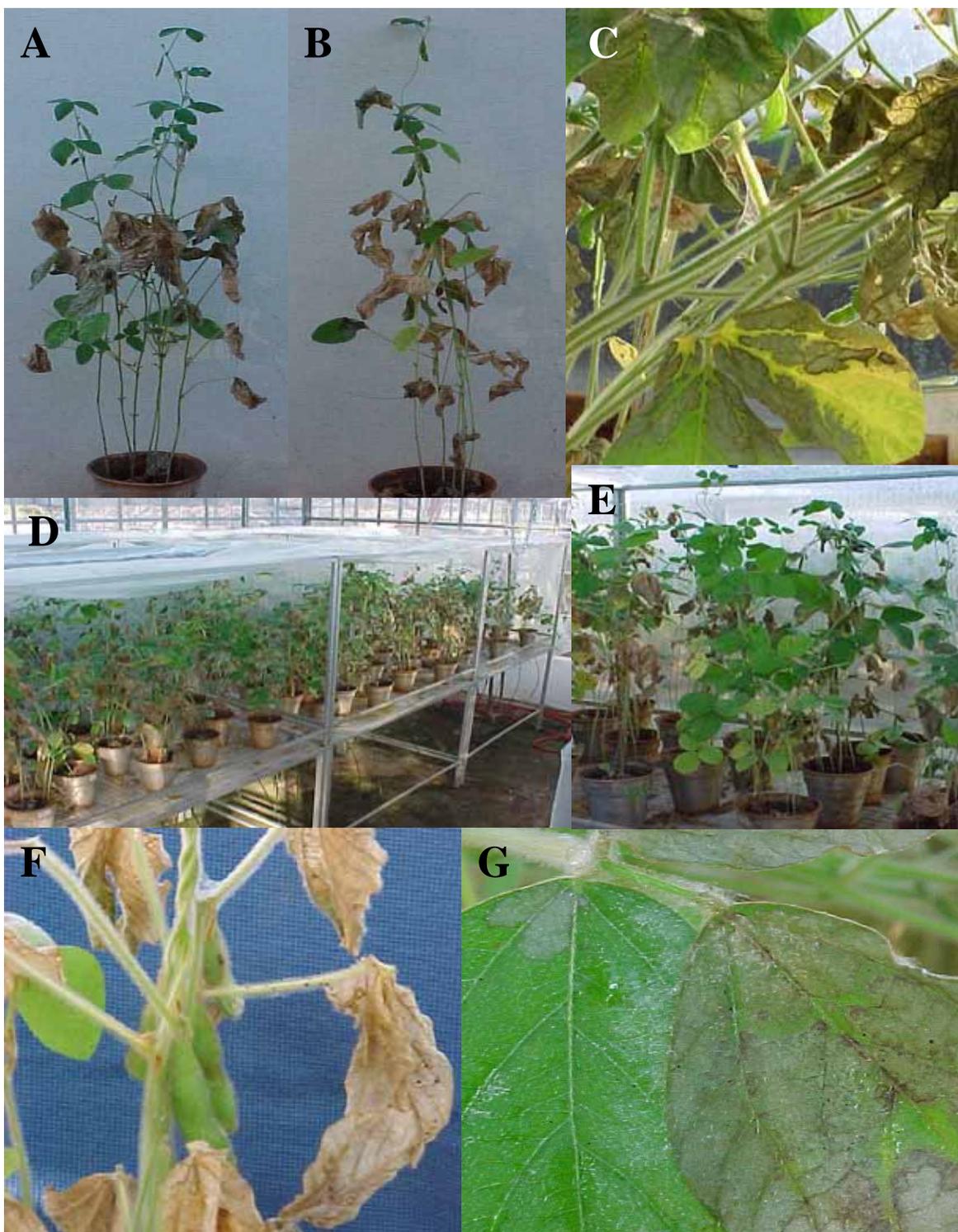


Figura 10. Avaliação de genótipos de soja para resistência à mela, em planta inteira inoculada por aspersão de suspensão de fragmentos de micélio e escleródios. A e B= aspecto da doença na planta; D e E= distribuição das plantas na câmara úmida; C e G= lesões e crescimento micelial nas folhas; F= sintomas nas folhas, desenvolvimento micelial nas hastes e escleródios.

6.11 Avaliação da eficiência de fungicidas no controle da mela da soja

6.11.1 Efeito de fungicidas sobre o desenvolvimento *in vitro* do patógeno

Os fungicidas que apresentaram os melhores efeitos de inibição *in vitro* sobre o crescimento micelial do isolado SJ 121 foram o Fludioxonil e o Pyraclostrobin+PE110F, apresentando CL50 de 0,003mg/L e 0,002mg/L e CL90 de 0,161mg/L e 0,125mg/L, respectivamente (Quadro 23).

As estrobirulinas Kresoxim Metil e Azoxystrobin proporcionaram as menores inibições de desenvolvimento do patógeno na concentração mais elevada (Quadro 23).

6.11.2 Efeito de fungicidas sobre o desenvolvimento da doença

Na avaliação do efeito protetor dos fungicidas, foi observada melhor eficiência dos ingredientes ativos (i.a.) Fluazinam, Azoxystrobin, Pyraclostrobin e Pyraclostrobin + PE110F (Quadro 24).

Quanto ao efeito curativo, os melhores resultados foram conseguidos com Pyraclostrobin + PE110F, Pyraclostrobin e Azoxystrobin (Quadro 24).

A figura 11 ilustra as diferenças observadas entre tratamentos para avaliação dos efeitos protetor e curativo.

Foram constatados sintomas de fitotoxidez nos tratamentos com Tebuconazole (Figura 11).

Quadro 23. Inibição do crescimento micelial *in vitro* e concentração letal de fungicidas no meio de cultura suficiente para reduzir o desenvolvimento do isolado SJ 121 de *Rhizoctonia solani* AG1-IA em 50% e 90%.

Fungicida (i.ã.)	Crescimento radial de micélio (mm) ¹				Conc. Letal (mg/L) ²	
	0,1 mg/L	1,0 mg/L	10mg/L	100mg/L	CL50	CL90
Fludioxonil	7,1 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,003	0,161
Pyraclostrobin + PE110F	5,9 a	0,3 a	0,0 a	0,0 a	0,002	0,125
Carbendazin	39,0 gh	1,5 ab	0,0 a	0,0 a	0,170	8,410
Difenoconazole	6,6 a	5,0 bc	2,7 abc	1,5 b	0,023	1,129
Fluazinam	9,1 a	5,1 bc	4,3 cd	3,4 c	0,046	2,275
Iprodione	39,0 gh	5,5 c	0,0 a	0,0 a	0,237	11,764
Thiabendazole	36,1 g	7,3 cd	0,0 a	0,0 a	0,220	10,903
Tebuconazole	13,5 b	7,6 cd	3,3 bc	0,0 a	0,049	2,417
Pyraclostrobin	17,8 cd	8,1 cd	5,4 cde	0,0 a	0,094	4,675
Bromuconazole	17,9 d	8,2 cd	3,6 cd	0,7 ab	0,097	4,809
Benomyl	38,8 gh	9,6 d	0,0 a	0,0 a	0,352	17,432
Trif. Hidrox. Estanho	14,1 bc	10,6 d	6,4 def	1,0 ab	0,112	5,546
Azoxystrobin	15,2 bcd	16,0 e	13,1 g	10,3 d	0,668	33,069
Procimidone	37,2 gh	17,6 e	1,2 ab	0,6 ab	0,651	32,243
Clorotalonil	30,0 f	19,3 e	7,6 ef	4,7 c	0,998	49,425
Kresoxim-Metil	26,0 e	26,9 f	25,1 i	22,0 e	9,902	490,350
Mancozeb	39,1 gh	32,1 g	9,0 f	0,1 a	3,130	155,004
Tiofanato Metílico	39,6 gh	36,7 h	20,8 h	0,4 ab	10,842	536,920
Testemunha	40,0 h	40,0 h	40,0 j	40,0 f	-	-
CV	6,55%	12,03%	16,33%	13,22%		
DMS	3,7560	3,7631	2,8286	1,3607		

¹ Crescimento radial de micélio de *R. solani* AG1-IA em meio BDA acrescido das concentrações dos ingredientes ativos de fungicidas na ordem de 0,1mg/L, 1,0mg/L, 10 mg/L e 100mg/L, respectivamente. Médias de 5 repetições. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

² Concentração Letal do ingrediente ativo no meio de cultura, necessário para inibir 50% (CL50) e 90% (CL90) do crescimento micelial.

Quadro 24. Efeito protetor e curativo de fungicidas sobre a mela da soja, avaliado na cv. 'MABRS Seridó RCH' inoculada com o isolado SJ 121 de *Rhizoctonia solani* AG1-IA.

Fungicida (i.a.)	Dosagem (g i.a./ha)	Severidade da doença ¹			
		Efeito Protetor		Efeito Curativo	
		5 d.a.i. ²	10 d.a.i.	5 d.a.i.	10 d.a.i.
Fluazinam	750	1,00 ab	1,15 a	2,10 ab	2,26 abcd
Azoxystrobin	50	1,05 abc	1,17 a	1,79 ab	1,86 ab
Pyraclostrobin	100	1,13 abc	1,24 a	1,83 ab	1,79 ab
Pyraclostrobin + PE110F	75	0,91 a	1,31 a	1,65 a	1,63 a
Carbendazim	250	1,34 abc	1,54 ab	2,25 b	2,51 cd
Clorotalonil	750	1,27 abc	1,63 ab	2,17 b	2,52 cd
Kresoxim-Metil	100	1,29 abc	1,65 ab	2,04 ab	1,93 abc
Procimidone	750	1,41 abcd	1,71 abc	1,88 ab	2,02 abc
Benomyl	250	1,16 abc	1,73 abc	1,98 ab	2,11 abcd
Tiofanato Metílico	250	1,29 abc	1,74 abc	1,77 ab	2,14 abcd
Tebuconazole	200	1,15 abc	1,84 abcd	1,86 ab	2,12 abcd
Mancozeb	1600	1,82 cde	1,96 abcd	1,99 ab	2,36 bcd
Bromuconazole	60	1,61 abcde	1,96 abcd	1,78 ab	2,04 abc
Thiabendazole	300	1,43 abcde	1,97 abcd	1,81 ab	2,24 abcd
Difenoconazole	50	1,77 bcde	2,22 bcde	1,82 ab	1,99 abc
Iprodione	750	1,72 bcde	2,55 cdef	2,08 ab	2,27 abcd
Trifenil Hidrox. Estanho	200	2,22 e	2,64 def	2,18 b	2,51 cd
Fludioxonil	5	2,18 de	3,02 ef	2,20 b	2,69 de
Testemunha ³	-	3,03 f	3,37 f	2,91 c	3,26 e
	CV	27,10%	24,01%	12,16%	15,15%
	DMS	0,7990	0,8903	0,4755	0,6531

¹ Severidade da doença avaliada pela escala de notas de 0 a 11, onde 0= sem sintomas, 1=1 a 3% de área do folíolo infectada (a.f.i.), 3=7 a 12% de a.f.i., 5=26 a 50% de a.f.i., 7=76 a 87% de a.f.i., 9=94 a 97% de a.f.i. e 11=100% de a.f.i. Média de 7 repetições. Dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$, cujas médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

² d.a.i. = dias após a inoculação.

³ Testemunha não tratada com fungicida, somente inoculada com o patógeno.

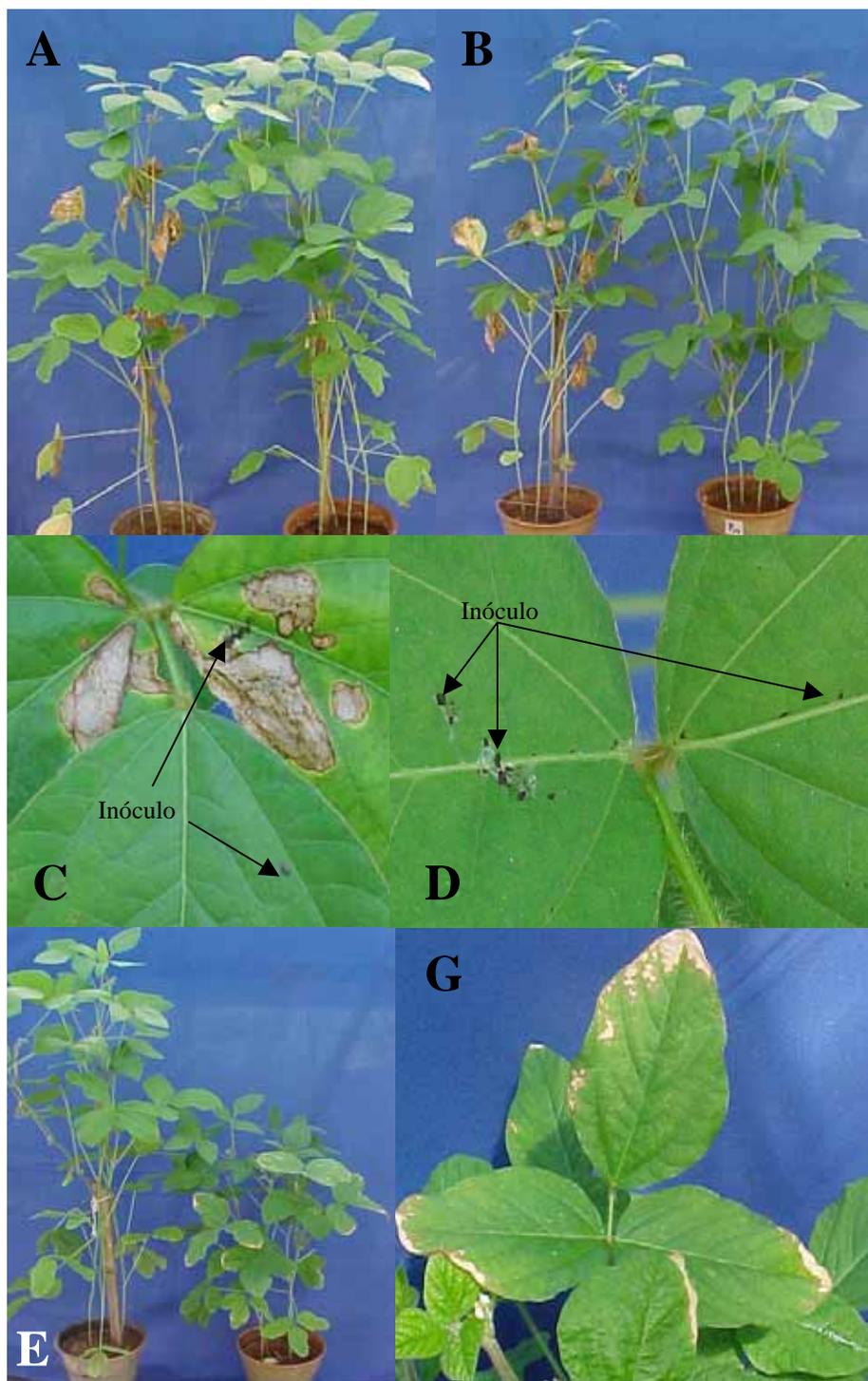


Figura 11. Efeito de fungicidas no controle da mela da soja. A= testemunha (esquerda) x Azoxystrobin preventivo. B= testemunha (esquerda) x Pyraclostrobin preventivo. Progressão da infecção em planta com tratamento curativo (C) e preventivo (D). Fitotoxidez causada por Tebuconazole: nanismo (F) e queima foliar (G).

6.12 Avaliação de indutores de resistência no controle da doença

6.12.1 Efeito de indutores de resistência sobre o desenvolvimento *in vitro* do patógeno

Foram observadas reduções do crescimento radial de micélio do isolado SJ 121 de *R. solani* AG1-IA em meio de cultura BDA com as concentrações de 10mg/L e 100mg/L de Acibenzolar-S-Metil (ASM), na ordem de 19% e 55,2%, respectivamente. As menores concentrações de ASM, bem como todas as de ácido salicílico (AS) não apresentaram efeito inibitório sobre o desenvolvimento *in vitro* do fungo (Quadro 25).

Quadro 25. Efeito de quatro concentrações de Acibenzolar-S-Metil (ASM) e ácido salicílico (AS) no meio de cultura sobre o crescimento micelial *in vitro* do isolado SJ 121 de *Rhizoctonia solani* AG1-IA.

Indutor de Resistência	Crescimento radial de micélio (mm) ¹							
	0,1mg/L	Δ^2	1,0mg/L	Δ	10mg/L	Δ	100mg/L	Δ
ASM	40,0	0	40,0	0	32,4 a	19,0%	17,9 a	55,2%
AS	40,0	0	40,0	0	40,0 b	0	40,0 b	0
Testemunha	40,0	0	40,0	0	40,0 b	0	40,0 b	0
CV	-				1,39%		1,80%	
DMS	-				1,0338		1,2399	

¹ Crescimento radial de micélio de *R. solani* AG1-IA em meio BDA acrescido das concentrações de Acibenzolar-S-Metil e ácido salicílico na ordem de 0,1mg/L, 1,0mg/L, 10 mg/L e 100mg/L, respectivamente. Médias de 5 repetições. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

² Δ = Percentual de redução do crescimento micelial em relação à testemunha.

6.12.2 Efeito de indutores de resistência sobre o desenvolvimento da doença

O Acibenzolar-S-Metil (ASM) apresentou redução significativa de severidade da doença com a concentração de 12,5 mg i.a./L nas avaliações feitas aos 5 e 10 dias após a inoculação, quando pulverizado nas plantas aos 10 dias antes da inoculação. Na concentração de 25 mg i.a./L, foi observada redução do grau de severidade com a pulverização aos cinco dias antes da inoculação, somente na avaliação aos 10 dias (Quadro 26).

Com relação ao ácido salicílico (AS) diferenças entre os tratamentos foram constatadas apenas com a concentração de 2,5mM, sendo significativa e de efeito mais prolongado a pulverização aos 20 dias antes da inoculação (Quadro 26).

Quadro 26. Efeito dos indutores de resistência Acibenzolar-S-Metil (ASM) e ácido salicílico (AS) sobre a mela da soja, avaliado na cv. 'MABRS Seridó RCH' inoculada com o isolado SJ 121 de *Rhizoctonia solani* AG1-IA.

Época de aplicação		Severidade da doença ¹			
Dias antes da inoculação	Estádio ²	12,5mg i.a./L		25 mg i.a./L	
		5 d.a.i. ³	10 d.a.i.	5 d.a.i.	10 d.a.i.
ASM:					
20	V3	3,2 ab	6,6 ab	3,2 a	6,2 ab
15	V4	3,0 a	6,4 ab	3,0 a	7,6 b
10	V5	3,0 a	4,8 a	3,4 a	6,4 ab
5	V6	3,8 ab	5,4 ab	4,2 a	4,6 a
0	V7	4,2 ab	5,2 ab	3,6 a	5,4 ab
Testemunha ⁴	-	4,4 b	7,4 b	4,4 a	7,4 ab
	CV	19,04%	19,81%	21,08%	22,74%
	DMS	1,3643	2,3519	1,5243	2,8355
AS:					
		2,5mM		5,0mM	
20	V3	3,0 a	4,4 a	3,5 a	6,2 a
15	V4	3,2 ab	5,2 ab	3,8 a	6,4 a
10	V5	3,0 a	5,8 ab	4,4 a	6,8 a
5	V6	3,8 ab	5,6 ab	3,4 a	5,6 a
0	V7	3,6 ab	5,2 ab	3,5 a	5,4 a
Testemunha	-	4,4 b	7,4 b	4,4 a	7,4 a
	CV	19,86%	23,33%	16,35%	24,06%
	DMS	1,3836	2,5999	1,2587	3,0159

¹ Severidade da doença avaliada pela escala de notas de 0 a 11, onde 0= sem sintomas, 1=1 a 3% de área do folíolo infectada (a.f.i.), 3=7 a 12% de a.f.i., 5=26 a 50% de a.f.i., 7=76 a 87% de a.f.i., 9=94 a 97% de a.f.i. e 11=100% de a.f.i. Média de 7 repetições. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

² Estádio de desenvolvimento fisiológico da soja: V3= terceiro nó, ..., V7= sétimo nó (Quadro 3).

³ d.a.i. = dias após a inoculação.

⁴ Testemunha não tratada, somente inoculada com o patógeno.

7 DISCUSSÃO

O estabelecimento da coleção de isolados de *Rhizoctonia solani* que infectam parte aérea de soja e feijoeiro e a verificação da patogenicidade destes à soja permitiram verificar que o mesmo agente causal é responsável pelas doenças nas duas culturas, fato importante a ser considerado na definição de estratégias de controle.

A variação de 3,9 a 16,8 núcleos por célula observada nos isolados (Quadro 10) assemelha-se com a descrita para o gênero *Rhizoctonia*, de 4 a 15 (Stalpers & Andersen, 1996). Apenas o isolado SJ 89 foi caracterizado como binucleado. *Rhizoctonia solani* é uma espécie multinucleada (Sneh et al., 1991; Stalpers & Andersen, 1996), portanto o SJ 89 não se caracteriza como tal.

Em comparação com os números médios de núcleos observados nos padrões de grupos de anastomose (Quadro 10), os isolados aproximaram-se do AG1.

O diâmetro médio de hifas dos isolados de *R. solani* variou de 5,9 μ m (SJ 145) a 10,0 μ m (SJ 83), tendo a maioria deles apresentado valores semelhantes aos dos

ISGs do AG1 (Quadro 12). *Rhizoctonia solani* pode variar de 3 a 17 μ m e as espécies binucleadas normalmente têm hifas mais finas (Sheh et al.,1991).

Os resultados positivos de fusão de hifas dos isolados com os padrões dos três ISGs e destes últimos entre si (Quadro 13), mostram a dificuldade de utilização desta técnica para definição dos sub-grupamentos de anastomose, reforçando a hipótese de pertencerem ao AG1 (Sneh et al., 1991). Os índices de frequência de fusão de hifas auxiliam na inferência dos isolados provenientes do Maranhão, Mato Grosso e Tocantins pertencerem ao AG1-IA. Aqueles oriundos de Roraima não puderam ser definidos com base nos resultados obtidos. Quanto aos isolados SJ 89, SJ 92 e SJ 94, pode-se afirmar que não pertencem ao AG1.

O aspecto de colônia revelou semelhança de 17 isolados provenientes do Maranhão e Mato Grosso com o AG1-IA, permanecendo duvidoso o agrupamento de outros 8 e do proveniente de Tocantins, principalmente pelas características de escleródios. Os isolados de Roraima assemelharam-se ao AG1-IB e os SJ 89, 92 e 94 apresentaram características de colônia diferentes dos padrões comparados. Estes resultados concordam em parte com os descritos por Yang et al. (1990c), onde isolados do AG1-IA somente produziram escleródios tipo “sasakii” e isolados do AG1-IB produziram microescleródios em meio BDA (Figura 4).

Os resultados de velocidade de crescimento micelial em função da temperatura mostraram que o comportamento dos isolados foi semelhante ao dos padrões AG1-IA e IB, continuando como exceção os SJ 89, 92 e 94 (Quadro 14 e Figura 5). Analisando-se as médias de crescimento dos isolados enquadrados pelos métodos moleculares como AG1-IA e AG1-IB, em relação aos respectivos padrões, não foi possível distinguí-los

em conjunto (Figura 5). A faixa de temperatura de maior crescimento para os AGs1- IA e IB situou-se entre 25°C e 30°C, corroborando os dados de Sneh et al. (1991) e Fenille (2001).

O grau de severidade dos isolados avaliado em plantas inteiras foi semelhante ao dos padrões do AG1-IA e IB, onde 50% deles apresentaram índices médios iguais ou superiores aos dos padrões (Quadros 18 e 19). Os resultados deste trabalho reforçam a caracterização dos isolados como pertencentes aos subgrupos IA e IB do AG1, visto que o AG1-IC e demais padrões são relatados como pouco ou não agressivo à parte aérea da soja (Yang et al., 1990; Sneh et al., 1991; Kousik et al., 1995; Fenille, 2001).

O uso de marcadores moleculares RAPD proporcionou o agrupamento dos isolados provenientes do Maranhão, Mato Grosso e Tocantins com o padrão do AG1-IA (Figura 8, G1). O padrão do AG1-IB também ficou na mesma ramificação. O segundo agrupamento (Figura 8, G2) engloba os padrões dos AGs 1-IC, 2-3 e 4-HGI, -HGII e -HGIII, assim como os isolados procedentes de Roraima. Os isolados SJ 89, 92 e 94 são geneticamente distantes de todos os demais.

Devido à não caracterização dos isolados de Roraima e do comportamento dos SJ 89, 92 e 94 em relação aos padrões dos grupos de anastomose, procedeu-se o sequenciamento das regiões ITS1, ITS2 e do gene 5,8s do rDNA, para comparação da homologia das sequências de nucleotídeos destas regiões.

Através desta técnica, foi possível distinguir claramente os padrões dos AGs, confirmando o resultado do RAPD quanto ao enquadramento dos isolados com o AG1-IA e definindo os isolados de Roraima como pertencentes ao AG1-IB. Os isolados SJ 89, 92 e 94 caracterizaram-se como não pertencentes a nenhum dos AGs avaliados (Quadro 21; Figura 9).

Os graus de similaridade genética obtidos por RAPD entre isolados e os padrões dos ISGs do AG1 foram semelhantes aos conseguidos por Toda et al. (1999), Pascual et al. (2000) e Fenille (2001).

Os resultados de tamanho das regiões ITS e do gene 5,8s (Quadro 20) coincidem com os obtidos por Kuninaga et al. (1997), apresentando alta homologia das sequências de nucleotídeos das regiões ITS entre isolados do mesmo ISG e baixa entre isolados de ISGs diferentes, concluindo também que esta técnica é a mais eficiente para diferenciação dos subgrupos do AG1. A região ITS1 é a que apresenta menor homologia entre os ISGs (Kuninaga et al., 1997).

Segundo Kuninaga et al. (1997), Toda et al. (1999) e Pascual et al. (2000), dentro dos mesmos ISGs do AG1 há uma tendência de formação de sub-agrupamentos em função da mesma localização geográfica e do grau de virulência do isolado, fato também observado no presente trabalho.

A caracterização dos isolados de *R. solani* causadores da mela da soja por sequenciamento genético é reforçada principalmente pelos resultados de marcadores moleculares RAPD, patogenicidade e severidade e de caracterização cultural. Estes referenciais também foram encontrados por outros autores, como Yang et al. (1990c), Sneh et al. (1991), Kousik et al. (1995), Cubeta et al. (1996), Mordue et al. (1996).

A formulação de *R. solani* em grãos de arroz e em talco não apresentou resultado satisfatório (Quadro 16), provavelmente devido à inviabilização dos propágulos pela trituração dos grãos de arroz e à possível desidratação do micélio pelo talco, proporcionando baixos índices de infecção quando inoculados às folhas de soja.

A metodologia de inoculação mais apropriada e prática visando avaliação de germoplasma para resistência à doença foi a pulverização de suspensão de micélio (Quadro 16), por apresentar bons índices de infecção e facilitar a avaliação de grande número de genótipos ao mesmo tempo. A inoculação por deposição de discos de micélio além de ser mais trabalhosa, causa condições mais drásticas de infecção às plantas, dificultando a percepção de níveis de resistência entre os genótipos.

No decorrer dos trabalhos, foi constatado que o melhor estabelecimento da doença era conseguido com três pulverizações de suspensão de fragmentos de micélio e escleródios, a intervalos de 48 horas, e que o desenvolvimento inicial da doença ocorria principalmente a partir dos fragmentos de escleródios.

A manutenção das condições de alta umidade e presença de água livre nos tecidos das plantas também foi condição determinante para o sucesso do estabelecimento homogêneo da doença a fim de avaliar germoplasma. De acordo com Yang et al. (1990a e 1990d) quanto mais prolongado o período de molhamento das plantas, maiores os índices da doença.

O controle da temperatura na câmara úmida também foi importante para o estabelecimento e progresso da doença, obtendo-se bons resultados com médias de 28°C a 30°C, onde as mínimas variaram entre 20°C e 22°C e as máximas entre 36° e 38°. Estes dados estão em conformidade com os de Kousik et al. (1995) que observaram significativa maior formação de estruturas de infecção do AG1 (IA, IB e IC), AG4 e AG5 nas folhas de soja às temperaturas de 25°C e 30°C. Estes autores observaram também que a 35°C os isolados AG1-IA formaram mais estruturas de infecção e causaram maiores índices de severidade que os AG1-IB.

Foi observada variabilidade para resistência à mela entre os genótipos avaliados, cujas reações variaram de moderadamente resistente (até 10% de área foliar infectada) a altamente suscetível (mais de 51% de área foliar infectada) (Quadro 22). O referencial de avaliação considerado para o estabelecimento dos níveis de resistência foi a média da severidade em plantas inteiras aos 10 dias após a inoculação, pois houveram diferentes proporções de aumento de severidade entre os genótipos nas avaliações aos cinco e 10 dias.

Não foram observadas correlações entre as metodologias de inoculação em plantas inteiras e trifólios destacados, sugerindo-se então não se adotar esta última em avaliações de germoplasma para resistência à doença (Quadro 22). Estes dados concordam com os de Fenille (2001). Muyolo et al. (1993b) encontraram correlação positiva entre as duas metodologias em avaliações de genótipos de soja e feijão para resistência ao AG1-IB.

Harville et al. (1996) avaliaram 64 cultivares a campo, em três locais na Louisiana, EUA, encontrando melhores níveis de resistência em ‘Buckshot 66’ e ‘Pioneer 9593’, e observaram significativas correlações negativas entre severidade da doença e produtividade.

Harville et al. (1997) avaliaram 4500 genótipos a campo, identificando 46 genótipos com nível de resistência promissor (até 10% de área foliar infectada), dentre os quais apenas o cultivar ‘Kahala’ se comportou como resistente (menos que 5% de área foliar infectada). Neste trabalho também foi observado que 52% dos genótipos selecionados pertenciam ao grupo americano de maturação VII, sugerindo a possibilidade de seleção

indireta pelo fato destas linhagens terem sido desenvolvidas em regiões onde a doença provocou redução de produtividade.

Comparando-se os resultados do presente trabalho com os de Harville et al. (1997), apenas os cultivares ‘Leflore’ e ‘Padre’ apresentaram a mesma reação (MR). Os demais genótipos MR de Harville et al. (1997) apresentaram reação de maior suscetibilidade.

A existência de variabilidade genética para resistência à mela indica a possibilidade de utilização dos genótipos promissores em programas de melhoramento genético com a finalidade de estudar os mecanismos de resistência e desenvolvimento de cultivares resistentes.

O cultivar ‘Davis’, parental em cruzamentos que deram origem a grande número de cultivares brasileiros, é altamente suscetível à mela (Hepperly et al., 1982, Hwang et al., 1996).

Estudos da herança de resistência à *R. solani* em culturas como feijão, algodão, arroz, batata, tomate, linho, e beterraba açucareira têm demonstrado controle poligênico (Panella & Ruppel, 1996). Silva & Hartmann (1982) determinaram que a resistência à mela do feijoeiro é controlada por três genes com ação de gene aditivo. Estes fatos, aliados ao comportamento de germoplasma quanto a reação à doença, induzem à hipótese de herança poligênico também na soja.

Montoya et al. (1997) sugerem que além da incorporação de resistência fisiológica em feijoeiro, características como arquitetura favorável à melhor aeração das plantas também devem ser combinadas. Estas considerações também devem ser estendidas para a soja.

Cornelissen et al. (1996) acreditam na viabilidade de produção de plantas transgênicas, modificadas para a expressão de genes que codifiquem a produção de proteínas relacionadas à patogenicidade (proteínas PR), como quitinases, glucanases e da proteína de inativação ribossômica encontrada na cevada. Esta condição já foi demonstrada em fumo (Jach et al., 1995) e arroz (Datta et al., 2001).

O controle químico da mela da soja é a única alternativa nas situações de avançada incidência da doença, mas seus efeitos têm se apresentado variáveis em função da cultura e condições ambientais (Kataria et al., 1991, Kataria & Gisi, 1996).

Os resultados do efeito de fungicidas no desenvolvimento *in vitro* de *R. solani* AG1-IA (Quadro 23) demonstram a ação direta que estes exercem sobre o patógeno, não refletindo sua eficiência no controle da doença em função de alterações sofridas após serem metabolizados pela planta.

Segundo Carling et al. (1990), existe variação de sensibilidade *in vitro* a fungicidas entre *Rhizoctonia* spp. e seus grupos de anastomose, podendo este critério auxiliar na distinção dos mesmos.

O emprego de fungicidas de forma preventiva apresentou os melhores resultados na diminuição da severidade da doença em comparação ao uso como curativo (Quadro 24). A dificuldade do uso de fungicidas para prevenir a instalação da mela situa-se no fato da pouca previsibilidade da incidência da doença em função da dificuldade de previsão das condições de clima com bastante antecedência e da quantificação do inóculo, assim como do conhecimento do período de proteção oferecido pelos fungicidas.

Os resultados da avaliação do efeito curativo de fungicidas apontam para a maior eficiência das estrobirulinas, seguida dos triazóis (Quadro 24), concordando em

parte com resultados a campo apresentados por Utimada et al. (1999a, 1999b e 2000), que, além destas classes, relataram também eficiência de benzimidazóis.

Outro importante aspecto a ser considerado é a possibilidade de desenvolvimento de resistência do patógeno aos fungicidas, pois todas as classes avaliadas apresentam esse risco (Dekker, 1995, Venâncio et al., 1999, Gullino et al., 2000). O emprego de fungicidas deve ser parte integrante de estratégias de controle da mela da soja, devendo-se prever a diversificação e rotação de produtos com diferentes modos de ação sobre o fungo (Brent, 1995, Dekker, 1995).

A indução de resistência a doenças em plantas tem sido bastante estudada, representando uma importante alternativa para diminuição do uso de produtos tóxicos ao homem e meio ambiente (Karban & Kuc, 2000). Ativadores de resistência normalmente promovem a expressão de genes que codificam a síntese de proteínas PR, sendo o ácido salicílico (AS) um desses ativadores (Yamaguchi, 1998, Hammerschmidt & Smith-Becker, 2000, Venâncio et al. 2000). O Acibenzolar-S-Metil (ASM) é um derivado do ácido salicílico e é comercializado atualmente com o nome de Bion[®] (Hammerschmidt & Smith-Becker, 2000, Venâncio et al., 2000).

Os resultados obtidos mostram que houve diminuição da severidade da mela da soja tanto com AS como com ASM, nas menores doses testadas, em aplicações com 10 dias de antecedência da inoculação do patógeno (Quadro 26). Estes resultados não suportam a possibilidade do uso destes produtos individualmente, mas indicam a possibilidade de melhoria da eficiência de controle se aplicado em conjunto com um fungicida.

O efeito apresentado pelo ASM sobre o crescimento micelial *in vitro* (Quadro 25) pode ter sido provocado por ingredientes utilizados na formulação comercial.

8. CONCLUSÕES

A mela da soja no Brasil é causada por *Rhizoctonia solani* AG1-IA e AG1-IB, prevalecendo o AG1-IA nas regiões produtoras do Maranhão, Tocantins e Mato Grosso, e AG1-IB em Roraima.

A distinção dos grupos intra-específicos do AG1 somente é possível após análise de homologia da seqüência de nucleotídeos das regiões ITS1, ITS2 e gene 5,8s do rDNA.

É possível avaliar a agressividade do patógeno tanto em plantas inteiras como em trifólios destacados.

A metodologia de trifólios destacados não se apresenta eficiente na avaliação de germoplasma para resistência à doença.

A metodologia de plantas inteiras é eficiente para avaliação de germoplasma de soja para resistência à mela.

Inoculação por aspersão de suspensão de fragmentos de micélio e escleródios, três vezes a intervalos de 48 horas, é o melhor método para avaliação de germoplasma e controle químico da mela da soja.

Existe variabilidade genética em soja para resistência à mela e é possível selecionar genótipos resistentes.

O controle preventivo da doença com fungicidas é mais eficiente que o curativo.

As estrobirulinas são mais eficientes no controle curativo da doença.

Ácido salicílico e Acibenzolar-S-Metil têm efeito de indução de resistência da soja à mela.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, N.A. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v.20, p.329-74, 1982.

ATKINS Jr., G., LEWIS, W.D. *Rhizoctonia* aerial blight of soybean in Louisiana. *Phytopathology*, v.44, p.215-8, 1954.

BANDONI, R.J. Safranin O as a rapid nuclear stain for fungi. *Mycologia*, v.71. p.873-874, 1979.

BLACK, B.D., GRIFFIN, J.L., RUSSIN, J.S., SNOW, J.P. Weed host for *Rhizoctonia solani*, causal agent for *Rhizoctonia* foliar blight of soybean (*Glycine max*). *Weed Technol.*, v.10, p.865-869, 1996.

BOLKAN, H.A., RIBEIRO, W.R.C. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. *Plant Dis.*, v.69, p.599-601, 1985.

BOYSEN, M., BORJA, M., MORAL, C., del, SALAZAR, O., RUBIO, V. Identification at strain level of *Rhizoctonia solani* AG4 isolates by direct sequence of asymmetric PCR products of the ITS regions. *Curr. Genet.*, v.29, p.174-181, 1996.

BRENT, K.J. *Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?* Brussels: GIFAP – International Group of National Associations of Manufacturers of Agrochemical Products, 1995. 49p.

CERESINI, P.C., FENILLE, R.C., SOUZA, N.L. de. Associação de *Rhizoctonia* spp. binucleadas e de *R. solani* Kühn GA 4 HGI à vagens de amendoineiro (*Arachis hypogaea*) no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathol.*, v.22, p.145-55, 1996.

CARLING, D.E. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis interactions. In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S., DIJST, G. (Eds.). *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.37-47.

CARLING, D.E. Anastomosis groups and subsets of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RHIZOCTONIA, 3, Taichung, 2000. *Abstracts...* Taichung, ISR, 2000. p. 14.

- CARLING, D.E., HELM, D.J., LEINER, R.H. In vitro sensitivity of *Rhizoctonia solani* and other multinucleate and binucleate *Rhizoctonia* to selected fungicides. *Plant Dis.*, v.74, p.860-863, 1990.
- CARLING, D.E., SUMNER, D.R. *Rhizoctonia*. In: SINGLETON, L.L., MIHAIL, J.D., RUSH, C.M. (Eds.). *Methods of research on soilborn phytopathogenic fungi*. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1992. p.157-65.
- CORNELISSEN, B.J.C., DOES, M.P., MELCHERS, L.S. Strategies for molecular resistance breeding (& transgenic plants). In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S., DIJST, G. (Eds.). *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.529-536.
- CUBETA, M.A., VILGALYS, R., GONZALES, R. Molecular analysis of ribosomal RNA genes in *Rhizoctonia solani* fungi. In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S., DIJST, G. (Eds.). *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.81-86.
- DANN, E., DIERS, B., BYRUM, J., HAMMERSCHMIDT, R. Effect of treating soybean with 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) and benzothiadiazole (BTH) on seed yields and the level of disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in field and greenhouse studies. *European J. Plant Pathol.*, v.104, p.271-278, 1998.

DATTA, K., TU, J., OLIVA, N., ONA, I., VELAZHAHAN, R., MEW, T.W.,

MUTHUKRISHNAN, S., DATTA, S.K. Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Sci.*, v.160, p.405-414, 2001.

DEKKER, J. Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance.

In: LYR, H. *Modern selective fungicides – properties, applications, mechanisms of action*. Jena: Gustav Fisher Verlag, 1995. p.23-38.

EMBRAPA SOJA. Recomendações técnicas para a cultura da soja na região central do Brasil

- 2000/2001. Londrina: Embrapa Soja / Fundação MT, 2000. 245p. (Embrapa Soja. Documentos, 146).

EMBRAPA SOJA. Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil - 2001/2002.

Londrina: Embrapa Soja, 2001. 267p. (Embrapa Soja. Documentos, 167)

FENILLE, R.C. *Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de*

Rhizoctonia solani Kühn associado à soja no Brasil. Botucatu, 2001. 136p. Tese

(Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas,

Universidade Estadual Paulista.

- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3^a ed. Brasília: Embrapa - CENARGEN, 1998. 220p.
- GAZONI, D.L., YORINORI, J.T. *Manual de identificação de pragas e doenças da soja*. Brasília: Embrapa SPI, 1995. 128p.
- GORDON, D., ABAJIAN, C., GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, v.8, p.195-202, 1998.
- GULLINO, M.L., LEROUX, P., SMITH, C.M. Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. *Crop Protection*, v.19, p.1-11.
- HAMMERSCHMIDT, R., SMITH-BECKER, J.A. The role of salicylic acid in disease resistance. In: AGRAWAL, A.A., TUZUN, S., BENT, E. (Eds.). *Induced plant defense against pathogens and herbivores – biochemistry, ecology, and agriculture*. St. Paul: APS Press, 2000. p. 37-53.
- HARTMAN, G.L., SINCLAIR, J.B., RUPE, J.C. (Eds.). *Compendium of soybean diseases*. 4th ed. Saint Paul: The American Phytopathological Society. 1999. 100p.
- HARVILLE, B.G., RUSSIN, J.S., HABETZ, R.J. Rhizoctonia foliar blight and seed yields in soybeans. *Crop Sci.*, v.36, p. 563-566, 1996.

- HARVILLE, B.G., RUSSIN, J.S., KILEN, T.C. Rhizoctonia foliar blight reactions in soybean. *Soybean Gen. Newsletter*, v.24, p.188-189, 1997.
- HAWKSWORTH, D.L., KIRK, P.M., SUTTON, B.C., PEGLER, D.N. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi*. New York: CAB International, 1995. 616p.
- HARTWIG, E.E., YOUNG, L.D, EDWARDS, C.J., Jr. Registration of "Leflore" soybean. *Crop Sci.*, v.25, p.1985, 1985.
- HEPPERLY, P.R., MIGNUCCI, J.S., SINCLAIR, J.B., SMITH, R.S., JUDY, W.H.
Rhizoctonia web blight of soybean in Puerto Rico. *Plant Dis.*, v.66, p.256-257, 1982.
- HORSFALL, J.G., BARRATT, R.W. An improved grading system for measuring plant diseases. *Phytopathology*, v.35, p.655. 1945. (Abstr.).
- HWANG, S.F., HOWARD, R.J., CHANG, K.F. Forage and oil seed legume diseases incited by *Rhizoctonia solani* species. In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S., DIJST, G. (Eds.). *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.289-301.
- JACH, G., GRÖNHARDT, B., MUNDY, J., LOGEMANN, J., PINSDORF, E., LEAH, R., ECHELL, J., MAAS, C. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.*, v.8, p.97-109, 1995.

JONES, R.K., BELMAR, S.B. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolated from rice, soybean and other crops grown in rotation with rice in Texas. *Plant Dis.*, v.73, p.1004-10, 1989.

JOYE, G.F., BERGGREN, G.T., BERNER, D.K. Effects of row spacing and within-row plant population on *Rhizoctonia* aerial blight of soybean and soybean yield. *Plant Dis.*, v.74, p.158-160, 1990.

KARBAN, R., KUC, J. Induced resistance against pathogens and herbivores: an overview. In: AGRAWAL, A.A., TUZUN, S., BENT, E. (Eds.). *Induced plant defense against pathogens and herbivores – biochemistry, ecology, and agriculture*. St. Paul: APS Press, 2000. p. 1-16.

KATARIA, H.R., HUGELSHOFER, U., GISI, U. Sensitivity of *Rhizoctonia* species to different fungicides. *Plant Pathol.*, v.40, p.203-211, 1991.

KATARIA, H.R., GISI, U. Chemical control of *Rhizoctonia* species. In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S., DIJST, G. (Eds.). *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.537-547.

- KOUSIK, C.S., SNOW, J.P., BERGGREN, G.T. Factors affecting infection cushion development by *Rhizoctonia solani* AG-1 IA and IB on soybean leaves. *Plant Pathol.*, v.43, p.237-44, 1994.
- KOUSIK, C.S., SNOW, J.P., BERGGREN, G.T., HARVILLE, B.G. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* on soybean leaves and seedlings. *Plant Pathol.*, v.44, p.580-6, 1995.
- KUNINAGA, S. DNA base sequence complementary analysis. In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S., DIJST, G. (Eds.). *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.73-80.
- KUNINAGA, S., NATSUAKI, T., TAKEUCHI, T., YOKOSAWA, R. Sequence variation of the rDNA ITS region within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. *Curr. Genet.*, v.32, p.237-243, 1997.
- KURAMAE-IZIOKA, E.E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. *Rev. UNIMAR*, v.19, p.683-689, 1997.

- LIU, Z., SINCLAIR, J.B. Molecular differentiation of intraspecific groups within anastomosis group 1 of *Rhizoctonia solani*. *Can. J. Plant Pathol.*, v.15, p.272-80, 1993.
- McGEE, D.C. *Soybean diseases – a reference source for seed technologists*. Saint Paul: The American Phytopathological Society. 1992. p.89-91.
- MEYER, M.C. Acompanhamento da incidência de doenças de soja no norte do cerrado brasileiro. In: Relatório de andamento de subprojeto – Sistema Embrapa de Pesquisa. Londrina: Embrapa Soja, 1996. 9p.
- MEYER, M.C. Acompanhamento da incidência de doenças da soja no norte do cerrado brasileiro – safra 1995/96. In: XVIII REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 18, Uberlândia, 1996. *Ata e Resumos...* Uberlândia: UFU/DEAGO, 1997a. p.304.
- MEYER, M.C. Controle integrado de doenças da soja no norte do cerrado brasileiro. In: EMBRAPA. *Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja 1996*. Londrina: Embrapa Soja, 1997b. p.112-113. (Embrapa Soja. Documentos, 104).
- MEYER, M.C. Controle integrado de doenças da soja no norte do cerrado brasileiro. In: EMBRAPA. *Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja 1997*. Londrina: Embrapa Soja, 1998. p.119-120. (Embrapa Soja. Documentos, 118).

- MEYER, M.C., YORINORI, J.T. Ocorrência da mela ou requeima da soja no sul do Maranhão, causada por *Thanatephorus cucumeris*. *Fitopatol. Bras.*, v.20, p.332, 1995. (Res.).
- MEYER, M.C., YORINORI, J.T. Incidência de doenças da soja em regiões tropicais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, Londrina, 1999. *Anais...* Londrina, Embrapa Soja, 1999. p.457. (Embrapa Soja. Documentos, 124).
- MONTOYA, C.A., BEAVER, J.S., RODRÍGUEZ, R., MIKLAS, P.N., GODOY-LUTZ, G. Heritability of resistance to web blight in five common bean populations. *Crop Sci.* v.37, p.780-783, 1997.
- MORDUE, J.E.M., BANNIZA, S., BRIDGE, P.D., RUTHERFORD, M.A., HOLDERNESS, M. Integrated biochemical, cultural and numerical methods. In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S., DIJST, G. (Eds.). *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.87-98.
- MUYOLO, N.G., LIPPS, P.E., SCHMITTHENNER, A.F. Anastomosis grouping and variation in virulence among isolates of *Rhizoctonia solani* associated with dry bean and soybean in Ohio and Zaire. *Phytopathology*, v.83, p.438-44, 1993a.

- MUYOLO, N.G., LIPPS, P.E., SCHMITTHENNER, A.F. Reaction of dry bean, lima bean and soybean cultivars to *Rhizoctonia* root and hypocotyl rot and web blight. *Plant Dis.*, v.77, p.234-8, 1993b.
- NAITO, S., KANEMATSU, S. Characterization and pathology of a new anastomosis subgroup AG-2-3 of *Rhizoctonia solani* Kühn isolated from leaves of soybean. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, v.60, p.681-90, 1994.
- NAITO, S., MOCHIDA, H., NAKAJIMA, T., OHTO, Y. Infection with basidiospores of *Thanatephorus cucumeris* (AG-2-3 of *Rhizoctonia solani*) and development of soybean foliar blight lesions. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, v.61, p.362-8, 1995.
- NELSON, B., HELMS, T., CHRISTIANSON, T., KURAL, I. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* from soybean. *Plant Dis.*, v.80, p.74-80, 1996.
- O'NEILL, N.R., RUSH, M.C., HORN, N.L., CARVER, R.B. Aerial blight of soybeans caused by *Rhizoctonia solani*. *Plant Dis.*, v.61, p.713-7, 1977.
- OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v.25, p.125-43, 1987.

- OGOSHI, A. Introduction - The genus *Rhizoctonia*. In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S., DIJST, G. (Eds.). *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.1-9.
- PANELLA, L., RUPPEL, E.G. Availability of germplasm for resistance against *Rhizoctonia* spp. In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S., DIJST, G. (Eds.). *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.515-527.
- PARMETER, J.R., Jr., SHERWOOD, R.T., PLATT, W.D. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology*, v.59, p.1270-78, 1969.
- PARMETER, J.R., Jr., WHITNEY, H.S. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. In: PARMETER, J.R., Jr., (Ed.). *Rhizoctonia solani: biology and pathology*. Berkeley: University of California Press, 1970. p.7-19.
- PASCUAL, C.B., TODA, T., RAYMONDO, A.D., HYAKUMACHI, M. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. *Plant Pathol.*, v.48, p.108-118, 2000.

PATEL, M.V. Soybean disease reaction. *Plant Disease Views and Reviews*, Mississippi Cooperative Extension Service, Mississippi State University, 1989.

POLO-PC. *A user's guide to the probit or logit analysis*. Berkeley: LeOra Software, 1987. 20p.

ROHLF, F.J. *NTSYS-PC version 1.7 numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Setauket: Exeter Software Publ., 1992.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987.

SARTORATO, A. Mela ou murcha da teia micélica. In: ZIMMERMANN, M.J.O., ROCHA, M., YAMADA, T. (Eds.). *Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba: POTAFOS, 1988. p.503-520.

SILVA, G.H., HARTMANN, R.W. Inheritance of resistance to *Rhizoctonia solani* Kühn in snap beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, v.107, p.653-657, 1982.

SINCLAIR, J.B., BACKMAN, P.A. (Eds.). *Compendium of soybean diseases*. 3rd ed. Saint Paul: The American Phytopathological Society. 1989. 106p.

SNEH, B., BURPEE, L., OGOSHI, A. *Identification of Rhizoctonia species*. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1991. 133p.

SNEH, B., ADAMS, G.C. Culture preservation methods for maintaining genetic integrity of *Rhizoctonia* spp isolates. In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S., DIJST, G. (Eds.). *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.139-46.

STALPERS, J.A., ANDERSEN, T.F. A synopsis of the taxonomy of teleomorphs connected with *Rhizoctonia* s.l. In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S., DIJST, G. (Eds.). *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.49-63.

STROUBE, W.H. Host range of *Rhizoctonia* aerial blight fungus in Louisiana. *Plant Dis. Rep.*, v.38, p.789-90, 1954.

SUMNER, D.R. Sclerotia formation by *Rhizoctonia* species and their survival. In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S., DIJST, G. (Eds.). *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.207-215.

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G.

The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuclei Acids Research*, v.25, p.4876-82, 1997.

TODA, T., HYAKUMACHI, M., ARORA, D.K. Genetic relatedness among and within different *Rhizoctonia solani* anastomosis groups as assessed by RAPD, ERIC and REP-PCR. *Microbiol. Res.*, v.154, p.247-58, 1999.

TUITE, J. *Plant pathological methods: fungi and bacteria*. Mineapolis: Burguess, 1969. 239p.

UTIMADA, C.M., OLIVEIRA, L.C., SATO, L.N. Eficiência de fungicidas no controle de mela e mancha alvo na cultura da soja – Lucas do Rio Verde, MT. In: XXI REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 21, Dourados, 1999. *Resumos...* Londrina: Embrapa Soja, 1999a. p.79-80. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 7; Embrapa Soja. Documentos, 134).

UTIMADA, C.M., OLIVEIRA, L.C., SATO, L.N., CAMARGO, T.V. Eficiência de fungicidas no controle de mela e mancha foliar de *Myrothecium* na cultura da soja – Rondonópolis, MT. In: XXI REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 21, Dourados, 1999. *Resumos...* Londrina: Embrapa Soja, 1999b. p.80. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 7; Embrapa Soja. Documentos, 134).

- UTIMADA, C.M., SATO, L.N., OLIVEIRA, L.C., LOPES, J. da C. Eficiência de fungicidas em aplicação foliar, no controle da mela (*Thanatephorus cucumeris/Rhizoctonia solani*), na cultura da soja. In: XXII REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 22, Cuibá, 2000. *Resumos...* Londrina: Embrapa Soja, 2000. p.80. (Embrapa Soja. Documentos, 144)
- VENÂNCIO, W.S., ZAGONEL, J., FURTADO, E.L., SOUZA, N.L. Novos fungicidas. I- produtos naturais e derivados sintéticos: estrobirulinas e fenilpirroles. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v.7. p.103-155, 1999.
- VENÂNCIO, W.S., ZAGONEL, J., FURTADO, E.L., SOUZA, N.L., PERES, N.A.R. Novos fungicidas. II- Famoxadone e indutores de resistência. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v.8. p.59-92, 2000.
- VERMA, H.S., THAPLIYAL, P.N. Rhizoctonia aerial blight of soybean. *Indian Phytopathol.*, v.29, p.389-91, 1976.
- VILGALYS, R., CUBETA, M.A. Molecular systemics and population biology of *Rhizoctonia*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v.32, p.135-55, 1994.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J. & WHITE. T.J. (Eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego, CA, USA: Academic Press, 1990. p.315-22.

WILCOX, J.R. Soybeans: Improvement, Production and Uses. Madison: Agronomy, 1987.

888p.

WRATHER, J.A., ANDERSON, T.R., ARSYAD, D.M., GAI, J., PLOPER, L.D., PORTA-

PUGLIA, A., RAM, H.H., YORINORI, J.T. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. *Plant Dis.*, v.81, p.107-110, 1997.

YAMAGUCHI, I. Activators of Systemic Acquired Resistance. In: HUTSON, D.,

MIYAMOTO, J. (Eds.). *Fungicidal activity: chemical and biological approaches to plant protection*. Chichester: John Wiley & Sons, 1998. p.193-219.

YANG, X.B., BERGGREN, G.T., SNOW, J.P. Effect of free moisture and soybean growth

stage on focus expansion of *Rhizoctonia* aerial blight. *Phytopathology*, v.80, p.497-503, 1990a.

YANG, X.B., BERGGREN, G.T., SNOW, J.P. Seedling infection of soybean by isolates of

Rhizoctonia solani AG-1, causal agent of aerial blight and web blight of soybean. *Plant Dis.*, v.74, p.485-488, 1990b.

YANG, X.B., BERGGREN, G.T., SNOW, J.P. Types of *Rhizoctonia* foliar blight on soybean

in Louisiana. *Plant Dis.*, v.74, p.501-504, 1990c.

- YANG, X.B., SNOW, J.P., BERGGREN, G.T. Analysis of epidemics of *Rhizoctonia aerial blight* of soybean in Louisiana. *Phytopathology*, v.80, p.386-92, 1990d.
- YORINORI, J.T., CHARCHAR, M.J.D'A., NASSER, L.C.B., HENNING, A.A. Doenças da soja e seu controle. In: ARANTES, N.E., SOUZA, P.I.M. (Eds.). *Cultura da soja nos cerrados*. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p.333-397.
- YORINORI, J.T. Fungal diseases. In: *Tropical soybean: improvement and production*. Rome: FAO, 1994, p.37-60. (FAO Plant Production and Protection Series, 27).
- YORINORI, J.T. Controle integrado das principais doenças da soja. In: CÂMARA, G.M.S. (Ed.). *Soja – tecnologia de produção*. Piracicaba: ESALQ / USP, 1998a. p. 139-192.
- YORINORI, J.T. Estratégias de controle das doenças da soja. *Correio Agrícola*, n.2, p.8-12, 1998b.