

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

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Rhizoctonia* spp. E ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS
MULTILOCOS

ANDREIA KAZUMI NAKATANI

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
Maio - 2006

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

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Rhizoctonia* spp. E ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS
MULTILOCOS

ANDREIA KAZUMI NAKATANI

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
Maio - 2006

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

Nakatani, Andréia Kazumi, 1975-
N163d Diversidade genética de *Rhizoctonia* spp. e análise de
seqüências multilocos / Andréia Kazumi Nakatani. - Botuca-
tu : [s.n.], 2006.
x, 98 f. : il. color., gráfs., tabs.

Tese (Doutorado) -Universidade Estadual Paulista, Fa-
culdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2006
Orientador: Nilton Luiz de Souza
Inclui bibliografia

1. Rhizoctonia. 2. Fungos fitopatogênicos. 3. Amplificação
de genes. 4. Fungos - Genética. I. Souza, Nilton Luiz de.
II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Fi-
lho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômi-
cas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

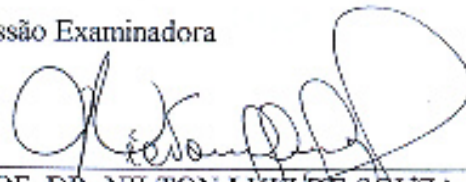
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: **DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Rhizoctonia* spp. E ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS MULTILOCOS.**

ALUNA: ANDRÉIA KAZUMI NAKATANI

ORIENTADOR: PROF. DR. NILTON LUIZ DE SOUZA


Aprovado pela Comissão Examinadora



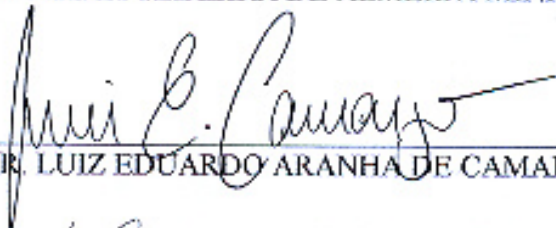
PROF. DR. NILTON LUIZ DE SOUZA



PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO



PROF. DR. MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI



PROF. DR. LUIZ EDUARDO ARANHA DE CAMARGO



DR. EIKO EURIA KURAMAE

Data da Realização: 05 de maio de 2006

A DEUS,
AGRADEÇO

Ao meu namorado, companheiro, cúmplice e amigo *Fábio* pelas doses de amor

OFEREÇO

Aos meus pais Yoshihiro e Hiroko, exemplo de luta e
otimismo
As minhas irmãs Márcia e Kátia, pela amizade e carinho
Aos meus anjinhos e sobrinhos Gabriel, Andressa e
Larissa pela alegria

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Ao CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado no País e no Exterior, em especial ao SEBIE-CNPq (Setor de bolsas individuais no exterior), em particular à Raquel Carneiro, que durante toda a minha estadia na Holanda, não mediu esforços para que tudo corresse bem;
- Ao Professor Dr. Nilton Luiz de Souza, pela orientação, amizade, pelas constantes lições de vida e por nos dar a liberdade de pensar e acreditar que podemos tudo;
- À Professora Dra Eiko Eurya Kuramae, pela orientação, pela amizade, por acreditar no meu potencial, me dando a oportunidade de vivenciar um ano inesquecível na Holanda, proporcionando uma grande lição de vida;
- Aos funcionários da seção de Pós graduação;
- Aos funcionários do Departamento Produção Vegetal-Defesa Fitossanitária;
- Ao meu grupo de trabalho na Holanda Kenneth, Bart, Marjan, Ferry coordenado pelo Dr. Teun Boekhout que não mediram esforços para tornar minha estadia na Holanda o mais agradável possível e pelas valiosas trocas de informações;
- Aos colegas do curso de pós graduação em Agronomia;
- Às amigas Clarissa, Juliana Moraes, Karina Paduan, Luciana e Rodrigo Trigueiro, Michele, Márcia, Rosana, Adimara, pela amizade;
- Ao Daniel Dias Rosa, pela amizade, pelas longas e engraçadas conversas, e pelo auxílio nas análises;
- A Maísa pelas valiosas discussões e pela demonstração de amizade;

-À Paola, pela amizade e pelo auxílio em todas as etapas da elaboração da tese;

-As minhas “irmãs” mais velhas na Holanda, Yorly e Lídia, que me fizeram acreditar que ainda existem amizades verdadeiras, sem esperar nada em troca, vocês serão sempre especiais.
Á vocês meu eterno carinho;

-À toda minha família e ao Fábio, que abriram mão da minha presença, aceitaram e entenderam minha ausência por um ideal, por um sonho, minha eterna gratidão pela demonstração de amor;

-Aos que me fizeram mal, que Deus os perdoe, porque acredito cada dia mais, que Ele existe e que está do meu lado.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| LISTA DE TABELAS..... | VIII |
| LISTA DE FIGURAS..... | IX |
| 1. RESUMO..... | 1 |
| 2. SUMMARY..... | 3 |
| 3. INTRODUÇÃO..... | 5 |
| 4. REVISÃO DE LITERATURA..... | 8 |
| 4.1 Importância de <i>Rhizoctonia solani</i> como patógeno | 8 |
| 4.2 Classificação e caracterização de <i>Rhizoctonia</i> spp. | 9 |
| 4.3 Importância da identificação de grupos de anastomose..... | 12 |
| 4.4 Uso da Biologia molecular em estudos de grupos de anastomose de <i>Rhizoctonia</i> spp. | 14 |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS..... | 18 |
| 5.1 Diversidade genética de <i>Rhizoctonia</i> spp. através do seqüenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 (espaço interno transcrito)..... | 18 |
| 5.1.1 Isolamento do DNA genômico..... | 18 |
| 5.1.2 Reação de polimerase em cadeia (PCR) da região ITS1-5.8S-ITS2..... | 30 |
| 5.1.3 Reação de Seqüenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2..... | 30 |
| 5.1.4 Clonagem da região ITS1-5.8S-ITS2 dos isolados CBS316.84 (<i>Waitea</i> <i>circinata</i>) e CBS569.83 (<i>Ceratobasidium globisporum</i>)..... | 31 |
| 5.1.4.1 Reação de ligação..... | 31 |
| 5.1.4.2 Transformação..... | 32 |
| 5.1.4.3 Miniprep..... | 32 |
| 5.1.4.4 Reação de Seqüenciamento..... | 33 |
| 5.2 Diversidade genética de <i>Rhizoctonia</i> spp. através do seqüenciamento dos genes ATP sintase subunidade 6 mitocondrial (ATP6), fator de alongação 1- alpha, RNA polimerase 2 e a região ITS (espaço interno transcrito). | 33 |

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| 5.2.1 Isolamento do DNA genômico..... | 33 |
| 5.2.2.1 Reação de polimerase em cadeia (PCR) do gene ATP sintase subunidade 6 mitocondrial (ATP6)..... | 36 |
| 5.2.2.2 Reação de polimerase em cadeia (PCR) do gene fator de elongação 1-alpha (EF-1 α)..... | 36 |
| 5.2.2.3 Reação de polimerase em cadeia (PCR) do gene RNA polimerase 2 (RPB2)..... | 37 |
| 5.3 Reação de Sequenciamento..... | 38 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 39 |
| 6.1 Diversidade genética de <i>Rhizoctonia</i> spp. através do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2..... | 39 |
| 6.1.1 Análise dos clones da região ITS1-5.8S-ITS2 gerados dos isolados CBS 316.84 (<i>Waitea circinata</i>) e CBS 569.83 (<i>Ceratobasidium globisporum</i>)..... | 54 |
| 6.2 Diversidade genética de <i>Rhizoctonia</i> spp. através do sequenciamento dos genes ATP sintase subunidade 6 mitocondrial (ATP6), fator de elongação 1-alpha, RNA polimerase 2 e a região ITS (espaço interno transcrito)..... | 60 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 72 |
| 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 73 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> (multinucleadas), <i>Rhizoctonia</i> spp. (binucleada) e os padrões de anastomose, com os respectivos números de acesso NCBI (National Center for Biotechnology information) e dados de origem e hospedeiro, utilizados no estudo da diversidade genética através do seqüenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2..... | 20 |
| 2 | Isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Rhizoctonia</i> spp. e padrões de anastomose utilizados na análise multilocos, com os respectivos números de acesso no NCBI..... | 34 |
| 3 | Porcentagem de identidade e índice de divergência entre as seqüências dos clones do isolado CBS316.84..... | 55 |
| 4 | Porcentagem de identidade e índice de divergência entre as seqüências dos clones do isolado CBS569.83..... | 55 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--------|---|
| 1 | Cladograma gerado pela análise neighbor-joining obtido dos 274 alinhamentos das seqüências ITS ilustrando a principal relação filogenética de isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp. coletados de várias regiões do mundo..... 43 |
| 2 | Fragmento do alinhamento das seqüências dos clones do isolado CBS 316.84..... 56 |
| 3 | Fragmento do alinhamento das seqüências dos clones do isolado CBS 569.83..... 56 |
| 4 | Polimorfismo da seqüência de DNA da região ITS dos clones do isolado CBS316.84..... 57 |
| 5 | Polimorfismo da seqüência de DNA da região ITS dos clones do isolado CBS569.83..... 57 |
| 6 | Cladograma obtido do alinhamento das seqüências da região ITS dos clones do isolado CBS 316.84 (<i>Waitea circinata</i>), gerado com 5.000 bootstrap, através do método de UPGMA e modelo de substituição de Kimura 2..... 59 |
| 7 | Cladograma obtido do alinhamento das seqüências da região ITS dos clones do isolado CBS 569.83 (<i>Ceratobasidium globisporum</i>), gerado com 5000 bootstrap, através do método de UPGMA e modelo de substituição de Kimura 2..... 60 |
| 8 | Padrão de fragmentos gerados pela amplificação dos fragmentos de DNA de <i>Rhizoctonia</i> spp., com os pares de “primers” ATP61 e ATP62, MW-Marcador Molecular smartladder, 1= CBS200.25, 2= ESP3, 3= SJ02, 4= SJ07, 5= TO1, 6= TO4, 7= CBS136.82, 8= CBS438.80, 9= CBS571.83, 10= CBS700.82, 11= AG1-IC, 12= AG5; TEF1-F e TEF1-R, 13= AG2-2IV, 14= AG4-HGIII, 15= AGBa, 16= CBS101.782, 17= CBS207.84, 18= ESP3, 19= SJ07, 20= SJ57, 21= |
| | 61 |

TO4, 22= CBS136.82, 23= CBS189.90, 24= AGK; RPB2-6F e RPB2-7.1R, 25= CBS101.782, 26= SJ34, 27= AG1-IB, 28= AG3, 29= AG5, 30= AG7, 31= CBS101.782, 32= CBS206.84, 33= CBS970.96, 34= TO1, 35= CBS154.35.....

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 9 | Cladograma gerado pela análise “neighbor-joining” obtido dos 44 alinhamentos das seqüências dos gene sintase subunidade 6 mitocondrial (ATP6) de isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp..... | 65 |
| 10 | Cladograma gerado pela análise “neighbor-joining” obtido dos 44 alinhamentos das seqüências dos gene fator de elongação 1-alpha (EF) de isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp..... | 66 |
| 11 | Cladograma gerado pela análise “neighbor-joining” obtido dos 44 alinhamentos das seqüências dos gene RNA polimerase 2 (RPB2) de isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp..... | 70 |
| 12 | Cladograma gerado pela análise “neighbor-joining” obtido dos 44 alinhamentos das seqüências do espaço interno transcrito (ITS) de isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp. | 71 |

1. RESUMO

Rhizoctonia solani Kühn (teleomórfico: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) é um fungo basidiomycota, fitopatógeno anamórfico com uma ampla gama de hospedeiros, incluindo mais de 500 gêneros de plantas. Causam doenças em várias culturas importantes no mundo, infectando sementes, raízes, folhas, hastes e frutos. A diversidade genética de 274 isolados de *Rhizoctonia* spp. coletados, em diversas partes do mundo, foram caracterizados utilizando-se a análise de seqüência da região ITS1-5.8S rDNA-ITS2, para avaliar o grau de variabilidade genética dentro e entre grupos de anastomose (AGs), incluindo os isolados padrões dos respectivos AGs. A árvore filogenética gerada pela análise das seqüências da região ITS foi suportada por 66% “bootstrap” para a separação em nove maiores grupos. De maneira geral, o agrupamento dos isolados de *Rhizoctonia* spp. ocorreu de acordo com os grupos de anastomose já previamente determinados. A similaridade de seqüências entre isolados de mesmo hospedeiro, mas de diferente origem geográfica foi elevada. Por exemplo, isolados de melão do Brasil e Espanha mostraram 97,2% de similaridade na região ITS1 e de 98,6 a 99,3 % na região ITS2. Isolados de batata do Brasil e da Espanha mostram similaridade de seqüência de 94%. Para melhorar a qualidade das seqüências da região ITS1-5.8S rDNA-ITS2 dos isolados CBS316.84 (*Waitea circinata*) e CBS569.83 (*Ceratobasidium globisporum*) foram gerados clones, e a análise das seqüências dos clones apresentaram variação de 94,9 a 100 % de identidade

entre os clones do isolado CBS316.84 e de 91,9 até 100 % para os clones do isolado CBS569.83. Os 44 isolados selecionados previamente, a partir do cladograma gerado da região ITS1-5.8S-ITS2 foram submetidos ao seqüenciamento dos genes ATP sintase subunidade 6 mitocondrial (ATP6), fator de alongação 1-alpha (EF-1 α), RNA polimerase 2 (RPB2) e a região ITS. As árvores filogenéticas baseadas na análise “neighbor-joining” geradas a partir das seqüências desses genes mostraram que os genes EF-1 α e RPB2 tenderam a separar os isolados e os padrões de anastomose em binucleados e multinucleados. Enquanto a árvore filogenética baseada no gene ATP6 e ITS não separou isolados da espécie *Rhizoctonia* em binucleada e multinucleada.

Palavras-chave: *Rhizoctonia* spp, cladograma, diversidade genética, Fungal tree of life, ITS, seqüências multilocos.

GENETIC DIVERSITY OF *Rhizoctonia* spp. AND MULTILOCOS SEQUENCE ANALYSIS Botucatu, 2006. 98p. Tese (Doutorado em Agronomia/ Proteção de Plantas)- Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: ANDREIA KAZUMI NAKATANI

Adviser: NILTON LUIZ DE SOUZA

2. SUMMARY

Rhizoctonia solani Kühn (teleomorph: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) is an anamorphic plant pathogenic basidiomycota fungus with a wide host range, including more than 500 genera of higher plants. Species cause disease in several important crops worldwide by infecting the seeds, roots, leaves, stems and fruits. Two hundred seventy four isolates from plant pathogenic fungus *Rhizoctonia* spp. collected worldwide was characterized using ITS1-5.8S rDNA-ITS2 sequence analysis to assess the degree of genetic variability within and among anastomosis groups (AGs), including tester isolates of the respective AGs. Within the ITS phylogenetic tree, there was support (66% bootstrap value) for the separation into nine major groups. In general the clustering isolates of *Rhizoctonia* species agreed with previously determined anastomosis groups. Nucleotide sequence similarity between isolates from the same host but from different geographic origin was high e.g. isolates from melon from Brazil and Spain showed from 97.2 % similarity in ITS1 region and 98.6 to 99.3 % in ITS2 region. Potato isolates from Brazil and Spain showed a sequence similarity about 94%. Several isolates from the same geographic origin were found closely related to different anastomosis groups such as isolates from potato, tomato, soybeans, beans, sugar beet and have been reported different symptoms around the world. Were generated cloning of ITS region from CBS 316.84 (*Waitea circinata*) and CBS 569.83 (*Ceratobasidium globisporum*) isolates to improve the sequence quality. The clones showed 94.9 to 100% and 91.9 to 100% identity respectively. Fourty four isolates were selected from the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 phylogenetic tree for sequencing using the genes of assembling the Fungal tree of Life (AFTOL) such as ATP

synthase subunit 6 mitochondrial (ATP6), elongation factor 1-alpha (EF-1 α) and RNA polymerase 2 (RPB2). The phylogenetic tree generated by sequences of EF-1 α and RPB2 in general clustered isolates of *Rhizoctonia* species in two main groups: binucleate and multinucleate species. While the phylogenetic trees based on ATP6 and ITS genes did not separate isolates of *Rhizoctonia* species in to binucleate and multinucleate species.

Keywords: *Rhizoctonia* spp., cladogram, genetic diversity, Fungal tree of life, ITS, multilocus sequencing.

3. INTRODUÇÃO

O gênero *Rhizoctonia* spp. (De Candolle, em Carling & Sumner, 1992) é um grande, diversificado e complexo grupo de fungos, comumente presente no solo e que pode causar consideráveis perdas a várias culturas comerciais no Brasil e no mundo. No Brasil foi relatado em culturas como hortaliças (Bolkan & Ribeiro, 1985, Kuramae et al., 2003), seringueira (Campaci & Figueiredo, 1964), soja (Fenille et al., 2002 e 2003, Yorinori, 1998), amendoimzeiro e feijoeiro (Ceresini et al., 1996; Ceresini & Souza, 1997), eucalipto (Silveira et al., 2000) e cafeeiro (Sussel et al., 2001).

Rhizoctonia spp. é um fungo necrotrófico que pode infectar as plantas em qualquer estágio fenológico, em qualquer órgão, principalmente aqueles em contato com o solo, provocando tombamento ou *damping-off*, morte em reboleira, podridão de raízes e de colo com posterior necrose de hastes, brotos e murcha da planta. Dessa forma, *Rhizoctonia* spp. apresenta grande importância econômica para diversas culturas.

Além das características baseadas em ultraestrutura, outros critérios adicionais têm sido utilizados para subdivisão do gênero *Rhizoctonia*, como: patogenicidade, morfologia e coloração da colônia, diâmetro da hifa e número de núcleos por célula (Carling & Sumner, 1992).

A espécie *Rhizoctonia solani* Kühn é multinucleada e corresponde ao teleomórfo *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk, pertence ao Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Classe Basidiomycetes, Ordem Ceratobasidiales, Família Ceratobasidiaceae (Hawksworth et al., 1995). A classificação da espécie baseia-se em critérios morfológicos, genéticos, patológicos e grupos de anastomose (Anderson, 1982; Ogoshi, 1987; Sneh et al., 1991; Vilgalys & Cubeta, 1994).

A importância de se determinar os grupos de anastomose é devido ao fato de que cada grupo pode ser considerado uma unidade evolucionária, pois representam populações geneticamente isoladas e não intercruzáveis (Carling, 1996). Mas podem existir imperfeições na utilização dessa ferramenta, principalmente devido aos fatores ambientais causando erros de interpretação.

Este fungo não é uma espécie homogênea, mas seus grupos de anastomose podem ser definidos por diferentes técnicas como DNA/DNA hibridização (Vilgalys, 1988), reação da polimerase em cadeia (PCR) da região interna transcrita (ITS) (Liu et al., 1993; Boysen et al., 1996; Kunita et al., 1997) e gel de eletroforese em campo pulsado (Keijer et al., 1996) e polimorfismo do comprimento dos fragmentos amplificados (AFLP) (Ceresini et al., 2002).

Desde 1980, estudos de populações genéticas baseados em métodos moleculares têm melhorado a habilidade de se identificar espécies e determinar seu “parentesco” natural (Brasier et al., 1987). O entendimento da sistemática de *Rhizoctonia solani* será de grande auxílio se as relações evolucionárias forem conhecidas. Dessa maneira, a utilização de dados de seqüências de DNA parece fornecer as melhores informações para estabelecer uma relação filogenética no complexo *Rhizoctonia solani* e outras espécies de *Rhizoctonia*.

A identificação de AG ou de grupos intraespecíficos (ISG) dentro de *Rhizoctonia* spp. trouxe grandes contribuições para o estudo da resistência genética de plantas, estudos epidemiológicos e ecológicos de várias doenças, proporcionando um controle mais direcionado (Ogoshi, 1987). A avaliação de germoplasma e identificação de resistência a *Rhizoctonia* tem tido sucesso em outras culturas como beterraba (Bugbee & Campbell, 1990), batata (Leach & Webb, 1993), algodão (Wang & Davis, 1997), oleaginosas e canola (Yang & Verma, 1992).

Após o estabelecimento de AG ou de ISG de *Rhizoctonia* spp. o alvo para o melhoramento e para o controle eficaz tornou-se mais claro e direcionado, uma vez sabido que o patógeno causador de determinada doença numa planta pertence a um AG ou ISG específico. Dada a variabilidade entre espécies e AGs de *Rhizoctonia* em muitas características, como sensibilidade a químicos (Kataria et al., 1991; Smiley et al., 1990) e agentes de controle biológico (Mazzola et al., 1996) o sucesso no manejo da doença requer o entendimento deste agente causal.

A distinção de espécies em meio de cultura muitas vezes é difícil devido à falta de características morfológicas estáveis para suportar a classificação definitiva do gênero *Rhizoctonia*. Dessa forma, a acurácia na distinção do patógeno é também essencial para o sucesso de um programa de melhoramento.

O projeto Fungal Tree of Life (AFTOL) (<http://ocid.nacse.org/research/aftol/>) foi elaborado com o objetivo de entender e elucidar a evolução do reino Fungi, o qual representa um dos maiores clados. Existem cerca de 80.000 espécies de fungos descritas, mas face ao atual conhecimento sobre sua diversidade genética, estima-se em aproximadamente 1,5 milhões de sub-grupamentos. Um melhor entendimento da evolução de fungos faz-se necessário para expandir nossos conhecimentos sobre a história da vida na Terra e a evolução dos ecossistemas. No projeto AFTOL está sendo desenvolvido o banco de dados moleculares e não-moleculares (caracteres morfológicos, culturais, etc) (<http://tolweb.org/tree/>).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi de caracterizar isolados de *Rhizoctonia* spp. coletados de várias regiões do mundo através da análise de nucleotídeos, bem como determinar a diversidade genética existente dentro e entre grupos de anastomose. As seqüências utilizadas neste estudo foram: (i) região ITS1-5.8S-ITS2; (ii) gene sintase subunidade 6 mitocondrial (ATP6); (iii) gene fator de alongação 1 α (EF-1 α); (iv) gene RNA polimerase 2 (RPB2).

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Importância de *Rhizoctonia solani* como patógeno

Rhizoctonia solani Kühn (teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) é um patógeno de planta com uma ampla gama de hospedeiros, incluindo mais de 500 gêneros (McNabb & Talbot, 1973). Este patógeno causa doenças em várias culturas importantes no mundo, infectando sementes, raízes, hastes, frutos, folhas e colo.

No Brasil *Rhizoctonia solani* foi relatada causando doenças em pimentão (*Capsicum annum* L.) (Almeida et al., 1980; Bolkan & Ribeiro, 1985), seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) (Gasparato et al., 1981; Tanaka & Coqueiro, 1981), soja (*Glycine max* (L.) Merr.) (Yori nori, 1998; Meyer & Yorinori, 1999), amendoim (*Arachis hypogea* L.) (Campaci & Figueiredo, 1964; Ceresini et al., 1996; Kuramae et al., 2002), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (Ceresini & Souza, 1997; Godoy-Lutz et al., 2003; Kuramae et al., 2002), eucalypto (*Eucalyptus* spp.) (Silveira et al., 2000), yacon (*Smallanthus sonchifolius*) (Grau & Rea, 1997; Fenille et al., 2005), batata (*Solanum tuberosum*) (Ceresini et al., 2002; Rosa et al., 2005), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Ceresini et al., 2002), cafeeiro (Sussel et al., 2001) melão e algumas hortaliças como alface, brócolis, espinafre, tomate (Kuramae et al., 2003).

4.2 Classificação e caracterização de *Rhizoctonia* spp.

O gênero *Rhizoctonia* (De Candolle, citado por Carling & Sumner (1992) é um grande e diversificado complexo grupo de fungos. Desde a sua constatação, aproximadamente 120 espécies foram registradas.

Algumas características morfológicas devem ser consideradas para o seu enquadramento ao gênero anamorfo *Rhizoctonia*, como: ramificação em ângulo reto, próxima ao septo distal em hifas jovens; presença de um septo na ramificação da hifa próximo do seu ponto de origem; presença de septos do tipo doliporo; ramificações de hifas que são constrictas em sua extremidade basal; ausência de grampos de conexão; ausência de conídios (células monilióides, não são consideradas conídios); córtex e medula (não é necessária a produção de escleródios, mas se presentes, não é diferenciado); ausência de rizomorfos; e como característica adicional, a fase teleomórfica deve pertencer ao Filo Basidiomycota (Parmeter et al., 1969; Parmeter & Whitney, 1970; Ogoshi, 1987; Carling & Sumner, 1992). Outros critérios adicionais têm sido utilizados para a subdivisão do gênero *Rhizoctonia*, como: número de núcleos por célula, coloração e morfologia da colônia, diâmetro da hifa e patogenicidade (Carling & Sumner, 1992).

A maioria dos representantes do gênero *Rhizoctonia* são anamorfos de quatro gêneros de Basidiomycota: *Thanatephorus* Donk., *Ceratobasidium* Rogers, *Waitea* Warcup & Talbot e *Tulasnella* Schröter. *Rhizoctonia solani* Kühn, espécie multinucleada, corresponde ao teleomorfo *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk. *Waitea circinata* Warcup & Talbot é o teleomorfo de *Rhizoctonia zae* Voorhees e *Rhizoctonia oryzae* Ryker e Gooch, espécies também multinucleadas. As espécies de *Rhizoctonia* binucleadas como *Rhizoctonia repens* Bernard e *Rhizoctonia oryzae-sativae* (Sawada) Mordue, associam-se à várias espécies de *Ceratobasidium* como: *C. cornigerum* (Bourdot) D.P. Rogers, *C. gramineum* (Ikata & T. Matsuura) (Oniki et al., 1985) e *C. oryzae-sativae* P.S. Gunnell & R.K. Webster ou ainda, à *Tulasnella* (Ogoshi, 1987; Sneh et al., 1991; Carling & Sumner, 1992).

Segundo Carling (2000), existem 14 AGs para *Rhizoctonia solani*, AG-1 a AG-13 e AG-BI. Além de grupos de anastomose (AG), o conceito de grupos intraespecíficos (ISG), baseado em evidências de reação de anastomose, patogenicidade,

morfologia e outros critérios, permitiu a diferenciação de 23 ISG dentre os AGs de *Rhizoctonia solani* (Carling 2000). Esta separação em ISG é suportada por evidências obtidas em estudos serológicos, análise de ácidos graxos, eletroforese de proteínas e estudos de ácidos nucléicos.

Várias outras características podem ser empregadas para agrupar isolados de *R. solani* em AG e ISG, dentre estas: requerimento de vitaminas, taxa de crescimento micelial, temperatura ótima de crescimento, tipo de escleródios produzidos e gama de hospedeiros (Sneh et al., 1991; Carling & Sumner, 1992).

Atualmente, para *R. solani* são relatados 3 ISG dentro de AG1 (IA, IB, IC), 8 dentro de AG2 (2-1I, 2-1II, 2-1III, 2-2IIIB, 2-2IV, 2-2LP, 2-3 e 2-t), 3 dentro do AG4 (HGI, HGII, HGIII), 2 dentro do AG6 (HGI e GV), 5 dentro AG8 (ZG1-1, ZG1-2, ZG1-3, ZG1-4 e ZG1-5) e 2 dentro do AG9 (TP e TX) (Carling, 2000; Kuninaga & Carling, 2000; MacNish & O' Brien, 2000).

-O grupo AG1 é de distribuição mundial, subdividido em 3 grupos, AG1-IA, AG1-IB e AG1-IC. Os hospedeiros desse grupo são principalmente leguminosas e gramíneas. O grupo AG1-IA é conhecido como tipo “sasaki” (Carling & Sumner, 1992), é um patógeno de parte aérea causador de seca da bainha em arroz (Jones & Belmar, 1989), queima de folhas em milho, sorgo, feijão e soja (Yang et al., 1988) e bronzeamento em gramados (Martin & Lucas, 1984). AG1-IB chamado de tipo 1 ou tipo microesclerocial (Carling & Sumner, 1992) patógeno de parte aérea. AG1-IC é patógeno de solo e causa *damping off* em hospedeiros como: cenoura (Grisham & Anderson, 1983), linho (Garza-Chapa & Anderson, 1966), soja e pinheiro (Parmeter et al., 1969). A clara distinção entre os três subgrupos não é possível através da técnica de anastomose.

-O grupo AG2, é subdividido baseado-se na patogenicidade, no requerimento de vitaminas, análise de seqüências do rDNA em 8 subgrupos: AG2-1(I, II e III), AG2-2 (IIIB, IV e LP), AG2-3 e AG2-t. O grupo AG2-1 é conhecido como culturas de inverno, patógeno de solo, causando *damping off* em crucíferas (Watanabe & Matsuda, 1966), podridão de raiz em rabanete japonês (Homma & Ishii, 1984) e queima de folhas em tulipa (Nakatomi & Kaneko, 1971). O grupo AG2-1I é caracterizado por isolados japoneses e holandeses de culturas de inverno, o tipo AG2-1II, isolados do Alaska e da Austrália e o tipo III por isolados da Itália (Kuninaga & Carling, 2000). O grupo AG2-2IIIB, conhecido

como “rush type”, é patógeno tanto de parte aérea como de solo, causando *damping off* em culturas como beterraba (Watanabe & Matsuda, 1966) e crisântemo (Kajiwara & Sugata, 1971) e bronzeamento em gramados (Hurd & Grisham, 1983) e seca falsa da bainha em arroz (Watanabe & Matsuda, 1966). O AG2-2IV, conhecido como “root rot type” é patógeno, também, de parte aérea e de solo causando queima e podridão de raiz de beterraba, podridão de raiz em inúmeras culturas e seca em gramados (Carling & Sumner, 1992). AG2-2LP é agente causal de “large patch” em gramados (Hyakumachi et al., 1998). O AG2-3 é patógeno causador de queima foliar em soja, constatado no Japão (Naito et al., 1995).

-AG3 é um grupo homogêneo, sem subgrupos conhecidos, denominado como “potato type” (Watanabe & Matsuda, 1966). É patógeno de solo, causando podridão da haste e da raiz de batata (Carling & Sumner, 1992), lesões foliares em tomate (Date et al., 1984), fumo (Meyer et al., 1990) e berinjela (Kodama et al., 1982). Isolados de AG3 são mais tolerantes à baixas temperaturas, em relação a outros isolados de outros AGs de *R. solani*.

-AG4, chamado de “praticola type”, pode ser dividido em 3 subgrupos, AG4-HGI, HGII e HGIII, baseados em diferenças na homologia de DNA (Kuninaga & Yokosawa, 1984), mas não sendo possível a distinção destes pela reação de anastomose. É patógeno de ampla gama de hospedeiros, de parte subterrânea e causa *damping off* e podridão de raiz em várias culturas como cebola (Yamamoto & Uehara, 1972), ervilha (Shehata et al., 1983), batata (Elango, 1986), feijão (Ceresini & Souza, 1997), soja (Muyolo et al., 1993) e amendoim (Ceresini et al., 1996).

-AG5, grupo homogêneo de patógenos de solo, pode induzir podridão do colo e raiz em batata, mas é geralmente menos virulento que o AG3 (Carling & Sumner, 1992). Pode causar, também, bronzeamento em gramados (Martin & Lucas, 1984) e podridão de raiz em feijão e soja (Naiki & Ui, 1981). Ocorre na Europa, Ásia e América do Norte (Carling & Sumner, 1992).

-AG6 não são patogênicos e ocorrem no Japão (Kuninaga et al., 1979). Há dois subgrupos AG6-HGI e AG6-GV, os quais podem ser distintos entre si através da diferença na homologia de DNA (Kuninaga & Yokosawa, 1984) mas não

facilmente diferenciados por reação de anastomose. Alguns isolados podem apresentar-se como micorrizas associados à orquídeas (Uetaka et al., 1988).

-AG7 é um grupo de patógeno de solo que ocorre no Japão e que pode causar danos menores em algumas culturas (Homma et al., 1983).

-AG8 é patógeno de solo, causando “bare patch” em cereais (Neate & Warcup, 1985), podridão de raiz de batata (Carling & Leiner, 1990). Ocorre na Austrália, Nordeste dos EUA (Ogoshi et al., 1990) e Reino Unido (Burton et al., 1988).

-AG9 ocorre no Alaska e Oregon (Carling et al., 1987). É considerado um patógeno fraco de solo, que pode atacar batata, couve flor e linho (Carling et al., 1987). Este AG com base na homologia de DNA, pode ser subdividido em TP e TX (Carling & Kuninaga, 1990).

-AG10 é patógeno de solo (Ogoshi et al., 1990). A patogenicidade é pouco relatada. Ocorre como saprófita no Nordeste do Pacífico, em associação com pequenas culturas de grãos.

-AG11 é relatado no Oeste da Austrália e no Arkansas (USA). É patógeno de solo causando *damping off* em plantas de *Lupinus angustifolius* (Carling et al., 1994; Kumar et al., 2002).

-AG12 refere-se a isolados micorrízicos associados com orquídeas na Austrália (Carling et al., 1999; Pope & Carter 2001).

-AG13 causa podridão de colo e raiz em plantas de algodão (Carling et al., 2002), podendo também infectar couve flor, rabanete e alface (Carling et al., 1999) e milho no Mississippi (Tomaso-Peterson & Trevathan, 2004).

-AGBI este grupo é chamado de “bridging isolate” ocorre no Japão. (Kuninaga et al., 1979). Isolados desse grupo podem formar certos graus de anastomose com isolados dos AG2, AG3, AG6, AG8 e AG11 (Carling & Sumner, 1992; Carling et al., 1994).

4.3 Importância da identificação de grupos de anastomose

A reação de anastomose é o pareamento entre hifas de diferentes isolados pertencentes ao mesmo AG, fruto de uma atração mútua que resulta em

anastomose (Anderson, 1982; Carling, 1996). A caracterização do grupo de anastomose e o grupo intraespecífico (ISG) baseado na morfologia, patologia, anastomose e características moleculares representa um grande avanço na descrição da variação genética dentro de *Thanatephorus*, *Ceratobasidium* e *Waitea*. Diferentes ISG podem variar consideravelmente em seu cruzamento, sua forma de dispersão e patogenicidade (Vilgalys & Cubeta, 1994). Devido à grande importância desse fungo, muitas ferramentas têm sido desenvolvidas para identificar vários grupos de *Rhizoctonia*, baseadas em ultraestruturas, informações de teleomórfos, grupos de anastomose e biologia molecular (Vilgalys & Cubeta, 1994).

A identificação de AG ou de ISG dentro de *Rhizoctonia* spp., trouxe grandes contribuições para o estudo da resistência genética de plantas, estudos epidemiológicos e ecológicos de várias doenças, proporcionando um controle mais direcionado (Ogoshi, 1987). Após o estabelecimento de AG ou de ISG de *Rhizoctonia* spp. o alvo para o melhoramento e para o controle eficaz tornou-se mais claro e direcionado, uma vez que o patógeno causador de determinada doença numa planta pertence a um AG ou ISG específico. Dada à variabilidade entre espécies e AGs de *Rhizoctonia* em muitas características, incluindo sensibilidade a químicos (Kataria et al., 1991; Smiley et al., 1990) e agentes de controle biológico (Mazzola et al., 1996), o sucesso no manejo da doença requer o entendimento do fungo causal.

Como exemplo tanto *Rhizoctonia oryzae* como *Rhizoctonia oryzae-sativae* produzem lesões muito similares na bainha. Conseqüentemente, o diagnóstico visual é extremamente difícil, principalmente nos sintomas iniciais da doença, quando medidas de controle apropriadas poderiam ser implementadas. A distinção de espécies em meio de cultura é difícil devido à falta de distinção nas características morfológicas estáveis para suportar a classificação definitiva do gênero *Rhizoctonia*. Dessa forma a acurácia na distinção do patógeno é também essencial para o sucesso de um programa de melhoramento.

Muyolo et al., (1993) avaliaram o comportamento de cultivares de soja e feijão à *Rhizoctonia*. Para a avaliação do comportamento das cultivares quanto à resistência à podridão de hipocótilo e raiz, utilizaram os isolados do AG-2-IIIB e AG-4 e para a avaliação quanto à resistência a “ web blight” foram utilizadas isolados do AG-IIB. A avaliação de germoplasma e identificação de resistência a outros grupos de *Rhizoctonia*

tem tido sucesso em outras culturas como beterraba (Bugbee & Campbell, 1990), batata (Leach & Webb, 1993), algodão (Wang & Davis, 1997), oleaginosas e canola (Yang & Verma, 1992).

Rhizoctonia solani tem uma extensiva gama de hospedeiro. Dessa forma, a não caracterização correta do AG e ISG incidentes sobre a cultura precedente reduz a efetividade da rotação de cultura empregada para o controle de doenças causadas por *Rhizoctonia* spp.

O conhecimento dos grupos e subgrupos de anastomose tem grande importância na tentativa de elucidar e estabelecer graus de similaridade entre eles, entendendo a distribuição da diversidade genética em escala espacial e fazer inferências com relação a epidemiologia de *R. solani*. Infelizmente, a análise da reação de anastomose em alguns casos torna-se uma difícil ferramenta de identificação.

A importância de se determinar os grupos de anastomose é devido ao fato de que cada grupo pode ser considerado uma unidade evolucionária, pois representam populações geneticamente isoladas e não intercruzáveis. Mas podem existir imperfeições na utilização dessa ferramenta devido principalmente a fatores ambientais causando erros de interpretação (Carling, 1996) e também à elevada variação fenotípica e a dificuldade de cultivar tem desafiado os taxonomistas a definir espécies utilizando o critério convencional de taxonomia.

4.4 Uso da Biologia molecular em estudos de grupos de anastomose de *Rhizoctonia* spp.

O método de anastomose é conveniente mas não um método ideal para classificação de *Rhizoctonia solani* devido a freqüente variação da fusão de hifas levando a erros de identificação. O método não oferece a informação da variação genética ou a relação taxonômica entre e dentro dos grupos de anastomose (Sneh et al., 1991). Entretanto, nos estudos da diversidade genética em *Rhizoctonia* spp. pode-se utilizar técnicas moleculares (Toda et al., 1999).

Este fungo não é uma espécie homogênea, mas seus grupos de anastomose podem ser definidos por diferentes técnicas como DNA/DNA hibridização

(Vilgalys, 1988), reação da polimerase em cadeia (PCR) da região interna transcrita (ITS) (Liu et al., 1993) e posterior seqüenciamento (Boysen et al., 1996; Kuninaga et al., 1997) e gel de eletroforese em campo pulsado (Keijer et al., 1996) e polimorfismo do comprimento dos fragmentos amplificados (AFLP) (Ceresine et al., 2002).

Desde 1980, estudos de populações genéticas baseados em métodos moleculares têm melhorado a habilidade de se identificar espécies e determinar seu “parentesco” natural (Brasier, 1987). O entendimento da sistemática de *Rhizoctonia solani* será de grande auxílio se as relações evolucionárias forem conhecidas. Dessa maneira, a utilização de dados de seqüências de DNA parece fornecer as melhores informações para estabelecer uma relação filogenética no complexo *Rhizoctonia solani* e outras espécies de *Rhizoctonia*. As informações filogenéticas beneficiariam também as pesquisas por sugerirem comparações apropriadas entre “taxa” e por produzirem marcadores para identificação baseada em seqüências.

Com o advento das técnicas moleculares, muitas ferramentas têm-se disponibilizado para avaliar a variação intra e interespecífica do complexo *R. solani* (Cubeta & Vilgalys, 1997). Entre estas tem-se, a análise de seqüências DNA ribossomal (rDNA) para estudar a similaridade genética entre os AGs de *R. solani* (Kuninaga et al., 1997; Gonzales et al., 2001; Kuramae et al., 2003; Fenille et al., 2005). Análise das seqüências das unidades transcritas 18S, 28S e 5.8S e ITS do gene rDNA tem sido utilizada para inferências taxonômicas e filogenéticas entre diferentes AGs de *R. solani* e mais tarde para *Rhizoctonia* spp. (Gonzalez et al., 2001; Carling et al., 2002; Fenille et al., 2005). Boysen et al. (1996) conduziram análises filogenéticas baseadas em ITS1-5.8S-ITS2 por técnica de seqüenciamento de PCR assimétrico e obtiveram três diferentes subgrupos dentro de AG-4, que correlacionaram com a origem e a virulência. Vilgalys & Gonzáles (1990) realizaram análise filogenética utilizando a seqüência parcial do 28S rDNA de dez grupos de anastomose diferentes de *R. solani* e encontraram pequena variação entre eles. Entretanto eles identificaram vários grupos evolucionários, subgrupos do AG-1, que dividiram uma mesma origem evolucionária, como os subgrupos AG-4 e AG-7. Kuninaga et al. (1997) relataram que análise de seqüência da região ITS1-5.8S-ITS2 pode ser uma valiosa ferramenta para identificar subgrupos de *R. solani*. Johanson et al. (1998) utilizaram a região ITS para analisar a variação genética entre espécies de *Rhizoctonia*, responsável

por doenças em arroz tendo gerado “primers” específicos capazes de diferenciar “sheath-blight complex”, causado por *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae* e *R. oryzae-sativae*. Muitos estudos têm descrito seqüência de rDNA ITS para identificar grupos filogenéticos e subgrupos de *Rhizoctonia* (Fenille et al., 2005; Fenille et al., 2003; Kuramae et al., 2003; Otero et al., 2002).

Através de dados de seqüência de rDNA tem sido possível o incremento no entendimento das relações dentro do filo Basidiomycota e tem mostrado que alguns atributos morfológicos previamente enfatizados são bastante subjetivos (Swann & Taylor, 1993; Swann et al. 1999). A vasta maioria de estudos de sistemática molecular em fungos têm utilizado os genes de RNA ribossomal ou os espaços entre eles (Hibbet et al., 1997; Vogler & Bruns, 1998; Lutzoni, 1997). Pesquisas mais recentes têm buscado locos alternativos que podem promover a reconstituição filogenética. Por exemplo, Mehmman et al. (1994) demonstraram a utilidade taxonômica e filogenética de gene específico de fungo quitina sintase entre fungos ectomicorrízicos. Thon & Royse (1999) estudaram a utilidade filogenética da seqüência parcial de β tubulina entre basidiomicetes. Kretzer & Bruns (1999) mostraram que ATP6, uma subunidade mitocondrial ATPase é muito útil na inferência filogenética de Boletales (Basidiomycota). Liu et al. (1999) desenvolveram “primers” específicos para Ascomycota para a “second largest subunit” (RPB2) de RNA polymerase II. O’ Donnell et al. (2001) utilizaram a seqüência de “translation elongation factor-1 α ” em estudos filogenéticos em Mucorales (Zygomycota).

Esta escolha tem sido, em parte, pela disponibilidade de primers universais pela facilidade com que aquelas regiões multi cópias podem ser amplificadas. Entretanto, o rDNA muitas vezes não tem sido capaz de responder algumas questões que tem sido formuladas. Um exemplo de sua limitação tem sido dentro da espécie *Hymenomyces* (Hibbet et al., 1997; Moncalvo et al., 1997).

Os genes mitocondriais apresentam a vantagem da sua independência do locus nuclear rDNA e apresenta maior saturação de alinhamento devido a sua rápida taxa de evolução, reduzindo sua utilidade a elevados níveis taxonômicos (Bruns & Szaro, 1992; Hibbet & Donoghue, 1995). Variação em mtDNA, tem sido extensivamente utilizado para inferências filogenéticas, uma vez que a transmissão do mtDNA na maioria

dos eucariotos é clonal (Birky, 1995). Para muitas ordens de fungos, como Agaricales e Russulales, essa questão permanece ainda não resolvida (Bruns et al., 1998).

Os genes nucleares como "translation elongation factor -1 alpha" (EF-1 α) têm sido utilizados para estudar a similaridade genética entre diferentes isolados de humanos, animais e plantas (Ho et al., 2000; Schillberg et al., 1995; Baayen et al., 2000; Phillips et al., 2002). O gene EF-1 α é altamente conservado e pode ser usado como um marcador para determinar as relações filogenéticas entre eucariotos (Roger et al., 1999). Já o "nuclear RNA polymerase subunits" tem a vantagem de apresentar cópia simples em fungos, fragmentos de tamanho grande, gerando muitas informações convenientemente amplificadas por "primers", seqüências de nucleotídeos facilmente alinháveis e taxa de evolução conveniente para profundos estudos de filogenia (<http://tolweb.org/tree/>).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Diversidade genética de *Rhizoctonia* spp. através do seqüenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2

5.1.1 Isolamento do DNA genômico

Foram utilizadas, seqüências de nucleotídeos dos isolados de *Rhizoctonia solani* e de *Rhizoctonia* spp. (binucleada) e os padrões de anastomose disponíveis na micoteca do Departamento de Produção Vegetal - Setor de Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agronômicas -UNESP, Botucatu-SP e no Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, The Netherlands), totalizando 274 acessos. Os dados adicionais como o número de acesso no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), hospedeiro e origem dos isolados utilizados nesse estudo estão apresentados na Tabela 1. Isolados não identificados, quanto ao grupo de anastomose a que pertencem, estão incluídos para ilustrar a biodiversidade dentro do respectivo agrupamento. Seqüência AY089729.1 do GenBank, *Sistotrema brinkmanni*, foi utilizado como “outgroup”. Dentre os 274 isolados, 126 isolados, aqueles identificados com as iniciais DQ no número de acesso NCBI foram cultivados em meio BDA (Difco laboratories, Detroit, Mich.) mantidos a uma temperatura de 26°C, por 7 dias.

A massa micelial dos isolados foi obtida pelo cultivo em meio líquido de batata (200g), sacarose (29g) e peptona (10g), por 10 dias a 27°C no escuro. Os micélios foram coletados por filtração a vácuo, lavados três vezes com água destilada e esterilizada sendo então, macerados com nitrogênio líquido até a formação de pó fino. A extração do DNA genômico dos isolados seguiu o protocolo descrito por Kuramae-Izioka (1997). Os micélios após a maceração foram ressuspendidos em 700 µL de tampão de extração (100mM Tris, pH 8,0; 50mM EDTA, pH 8,0; 500mM NaCl; 20% dodecil sulfato de sódio). O homogeneizado foi agitado em vortex e incubado por 30 minutos a 65°C, em banho-maria, sob agitação. Em seguida, adicionou-se 500 µL de acetato de potássio 5M às amostras, que foram colocadas em banho de gelo por 30 minutos, sendo realizada a inversão a cada 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 17.000g. O sobrenadante foi extraído com um volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) seguido de agitação e centrifugação por 10 minutos a 17.000g.

O sobrenadante foi transferido para novo tubo e em cada amostra foi adicionado um volume de isopropanol para precipitação do DNA, sendo realizada nova centrifugação por 10 minutos a 17.000g. O DNA precipitado foi lavado com 700 µL de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a 17.000g, e seco a vácuo (SpeedVac) por 10 minutos. O DNA obtido foi dissolvido em 50 µL TE (10mM Tris, pH 8,0; 1mM EDTA) e tratado com 40 µg/ml de RNase DNase-free a 37°C, durante 3 horas. A quantificação do DNA foi feita em GenQuant (Pharmacia, Biotech, San Francisco, CA, EUA), lida à razão A_{260nm}/A_{280nm} de todas as amostras de DNA para que fosse determinada a qualidade. Para verificar a integridade das amostras de DNA, alíquotas de 4 µL foram retiradas dos estoques acrescidas de tampão de carregamento (0,25 % de azul de bromofenol e 40% de sacarose) (Sambrook et al., 1987) e analisadas em gel de agarose 0,8% contendo 10mg/ml de brometo de etídeo em tampão TBE 1X a 5V/cm. Após a corrida, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta, com auxílio de transiluminador UV. Todas as amostras de DNA obtidas foram mantidas a -20°C até o momento das reações de PCR.

Tabela 1. Isolados de *Rhizoctonia solani* (multinucleadas), *Rhizoctonia* spp. (binucleada) e os padrões de anastomose, com os respectivos números de acesso NCBI (National Center for Biotechnology Information) e dados de origem e hospedeiro, utilizados no estudo da diversidade genética através do seqüenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2.

| Isolados | Nº de acesso NCBI | Hospedeiro/Origem |
|-----------------|--------------------------|---|
| 2tR135 | U57881.1 | <i>Tulipa</i> sp., Holanda |
| 2tR002 | U57744.1 | <i>Tulipa</i> sp., Holanda |
| 2tR118 | U57879.1 | <i>Tulipa</i> sp., Holanda |
| 2tR114 | U57878.1 | <i>Tulipa</i> sp., Holanda |
| 2tR128 | U57880.1 | <i>Tulipa</i> sp., Holanda |
| CBS208.84 | DQ279002 | <i>Lupinus usitatissimum</i> , Japão |
| AG-2.1 | AY1543171 | Brasil |
| 0403 | DQ278999 | IRS |
| RS 97 | AF2227961 | <i>Agrostis palustris</i> |
| CBS101763 | DQ279000 | <i>Pisum sativum</i> , Japão |
| CBS198.25 | DQ279001 | <i>Begonia</i> sp., |
| CBS101764 | DQ279004 | <i>Brassica napus</i> , Holanda |
| AF354105 | AF354105 | |
| RT14 | U64100.1 | |
| CBS207.84 | DQ278991 | <i>Beta vulgaris</i> , Japão |
| ATCC76132 | DQ279003 | Japão |
| 021R01 | U57722.1 | <i>Pisum sativum</i> , Japão |
| 021R71 | U57727.1 | <i>Raapsteel</i> , Holanda |
| 021R91 | U57729.1 | <i>Allium porrum</i> , Holanda |
| 021R06 | U57887.1 | <i>Tulipa</i> sp, Japão |
| 021R61 | U57726.1 | <i>Lilium longiflorum</i> , Holanda |
| 021R41 | U57725.1 | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> , Holanda |
| 021R81 | U57728.1 | <i>Lactuca sativa</i> , Holanda |
| 21RF61L | U57730 | |
| AG-9 | AF354109 | |

Tabela 1. (Continuação)

| Isolados | Nº de acesso NCBI | Hospedeiro/Origem |
|-----------------|--------------------------|---------------------------------------|
| 22-04 | DQ279006 | IRS |
| AG-9 | AY154316.1 | |
| AG-9TP | AY154315.1 | |
| 9TX | | |
| CBS970.96 | DQ279005 | Haste de planta de batata, USA |
| 22-03 | DQ278993 | IRS |
| 22-03 | DQ278993 | IRS |
| AG2.4758C | AB054879 | |
| AG-10 | AY154318.1 | |
| AF153800 | AF153800 | Subsolo, Austrália |
| CBS346.84 | DQ278947 | <i>Spinacia oleracea</i> , Holanda |
| T31 | DQ278992 | <i>Solanum tuberosum</i> L, Espanha |
| AF153773 | AF153773 | <i>Solanum nicotiana</i> , USA |
| AF153774 | AF153774 | <i>Solanum nicotiana</i> , USA |
| AY154319.1 | AY154319.1 | |
| 06-01 | DQ278997 | IRS |
| CBS101773 | DQ278996 | <i>Solanum tuberosum</i> L., Japão |
| T13 | AY387527.1 | <i>Solanum tuberosum</i> L., Espanha |
| AF354106 | AF354106 | |
| RIF100 | AY387525.1 | <i>Solanum tuberosum</i> L., Marrocos |
| CBS200.25 | DQ278994 | <i>Solanum tuberosum</i> L., |
| T45 | AY387530.1 | <i>Solanum tuberosum</i> L., Espanha |
| 03-01 | DQ278995 | |
| T36 | AY3875291.1 | <i>Solanum tuberosum</i> L., Espanha |
| T55 | AY387535.1 | <i>Solanum tuberosum</i> L., Espanha |
| AF354107 | AF354107 | |
| AF153771 | AF153771 | <i>Solanum tuberosum</i> L., USA |

Tabela 1. (Continuação)

| Isolados | Nº de acesso NCBI | Hospedeiro/Origem |
|-----------------|--------------------------|--|
| AF153772 | AF153772 | <i>Solanum tuberosum</i> L., Rússia |
| CECT2829 | | Valencia, Espanha |
| AF153797 | AF153797 | Subsolo, Austrália |
| CBS101782 | | <i>Triticum aestivum</i> , Austrália |
| AGBITE24 | | |
| CBS270.84 | | <i>Beta vulgaris</i> , Japão |
| AGBITE24 | AB054873 | |
| AGBI | AF354110 | |
| AF153780 | AF153780 | Japão |
| AF153779 | AF153779 | Solo, Japão |
| AF153783 | AF153783 | Japão |
| AY154306.1 | AY154306.1 | |
| AY154304.1 | AY154304.1 | |
| AY154305.1 | AY154305.1 | |
| AF354101 | AF354101 | |
| AF153789 | AF153789 | <i>Triticum aestivum</i> , África do Sul |
| AF153790 | AF153790 | <i>Triticum aestivum</i> , Tanzânia |
| CBS476.82 | DQ278941 | <i>Glycine max</i> , USA |
| AF153784 | AF153784 | <i>Pterostylis acuminata</i> , Austrália |
| AF153786 | AF153786 | Restos vegetais, Austrália |
| AGF | DQ279014 | |
| CAG5 AGR | AF354082 | |
| EM1865E | DQ279011 | |
| CBS342.84 | DQ279012 | <i>Rubus</i> sp., Holanda |
| CBS974.96 | DQ279010 | <i>Lupinus angustifolius</i> , Austrália |
| AGE | DQ279013 | |
| CBS137.82 | DQ278934 | <i>Erigeron canadensis</i> , USA |
| AY152704.1 | AY152704.1 | <i>Solanum lycopersicum</i> L., Brasil |

Tabela 1 (Continuação)

| Isolados | Nº de acesso NCBI | Hospedeiro/Origem |
|-----------------|--------------------------|---|
| T82 | AY387556.1 | <i>Solanum lycopersicum</i> L., Espanha |
| Batata14 | DQ278954 | <i>Solanum tuberosum</i> L., Brasil |
| T86 | DQ278962 | <i>Solanum tuberosum</i> L., Espanha |
| pinjrs1 | U19958 | <i>Pinus pinaster</i> , Espanha |
| rsa | U19964.1 | <i>Phaseolus vulgaris</i> , Espanha |
| AY154308.1 | AY154308.1 | AG4HGII |
| AG4 | AF153775 | |
| T87 | DQ278966 | <i>Solanum tuberosum</i> L., Espanha |
| AG4 | AF153776 | |
| CBS325.47 | DQ278964 | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> |
| RS95 | DQ278965 | <i>Poa annua</i> |
| CBS141.82 | DQ278963 | <i>Medicago sativa</i> , USA |
| Batata5 | DQ278955 | <i>Solanum tuberosum</i> L., Brasil |
| Batata3 | DQ278953 | <i>Solanum tuberosum</i> L., Brasil |
| AY270002.1 | AY270002.1 | <i>Glycine max</i> , Brasil |
| AY270003.1 | AY270003.1 | <i>Glycine max</i> , Brasil |
| AG4HG-I | AY089956.1 | |
| AG4HG-I | AY089956 | |
| ME-1 | AY152698.1 | <i>Cucumis melo</i> , Brasil |
| TO-1 | AY152701.1 | <i>Solanum lycopersicum</i> L., Brasil |
| Me82 | U19953 | <i>Cucumis melo</i> , Espanha |
| rh13 | U19960 | Solo, Israel |
| AY270001.1 | AY270001.1 | <i>Glycine max</i> , Brasil |
| T67 | AY387543.1 | <i>Solanum tuberosum</i> L., Espanha |
| AG4HG-I | AY154307.1 | |
| T69 | AY387545.1 | <i>Solanum tuberosum</i> L., Espanha |
| Me84 | U19954 | <i>Cucumis melo</i> , Espanha |
| CBS364.82 | DQ278961 | <i>Annona</i> sp., Israel |

Tabela 1 (Continuação)

| Isolados | Nº de acesso NCBI | Hospedeiro/Origem |
|-----------------|--------------------------|--|
| CBS625.77 | DQ278960 | <i>Iris</i> sp., Holanda |
| CBS341.84 | DQ278956 | <i>Fragaria</i> sp., Holanda |
| CBS341.36 | DQ278957 | Plântula de <i>Citrus</i> sp., Argentina |
| CBS319.33 | DQ278958 | Semente de grama |
| AY270005.1 | AY270005.1 | |
| CBS293.31 | DQ278959 | <i>Gossypium</i> sp., Turquia |
| AY154660.1 | AY154660.1 | <i>Spinacia oleracea</i> , Brasil |
| AY152811.1 | AY152811.1 | <i>Brassica oleracea</i> , Brasil |
| AY152813.1 | AY152813.1 | <i>Brassica oleracea</i> , Brasil |
| AY154659.1 | AY154659.1 | <i>Spinacia oleracea</i> , Brasil |
| AG4-HGIII | AY154309.1 | |
| SJ06 | DQ279020 | <i>Glycine max</i> , Brasil |
| CO1 | DQ279021 | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> , Brasil |
| CO3 | DQ279022 | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> , Brasil |
| CAG7AGS | AF354084 | |
| FJ52.1 | DQ279019 | <i>Phaseolus vulgaris</i> , Brasil |
| CBS139.82 | | <i>Pittosporum</i> sp., USA |
| T60 | DQ279017 | <i>Syngonium</i> sp., Barcelone, Espanha |
| CBS136.82 | | <i>Taxus</i> sp., USA, Rhode Island |
| SJ94 | DQ279018 | <i>Glycine max</i> , Brasil |
| CBS138.82 | | <i>Cinnamomum</i> sp., USA |
| IMI369673 | TCAJ202 | |
| CBS135.82 | | <i>Juniperus</i> sp., USA |
| AGU | AB196666 | |
| CBS133.82 | DQ278931 | <i>Pittosporum tobira</i> , USA |
| AGP | DQ279015 | |
| AM71.2 | DQ279016 | <i>Arachis hypogaea</i> ., Brasil |

Tabela 1. (Continuação)

| Isolados | Nº de acesso NCBI | Hospedeiro/Origem |
|-----------------|--------------------------|--|
| CBS101780 | DQ279027 | Solo, Japão |
| AF354098 | AF354098 | AG7 |
| 30982 | DQ279028 | |
| AY154303.1 | AY154303.1 | AG8 |
| AF153806 | AF153806 | Restos vegetais, Austrália |
| 1201 | | AG12 |
| AF153804 | AF153804 | <i>Pterostylis acuminata</i> , Austrália |
| AG13B | DQ279026 | |
| AG13C | DQ279025 | |
| AG13A | DQ279024 | |
| AF153793 | AF153793 | <i>Glycine max</i> USA |
| AF153794 | AF153794 | <i>Citrullus lanatas</i> , USA |
| Fj52.4 | DQ278990 | <i>Phaseolus vulgaris</i> , Brasil |
| UB1 | U57888.1 | <i>Beta vulgaris</i> , Holanda |
| VG1 | U57889.1 | <i>Beta vulgaris</i> , Holanda |
| 22R10 | DQ278988 | <i>Beta vulgaris</i> , Holanda |
| GR1 | U57886.1 | <i>Beta vulgaris</i> , Holanda |
| C306 | DQ278977 | Japão |
| RO231 | DQ278979 | Schneider, J.H.M. |
| 208-01 | DQ278978 | <i>Cynodon dactylon</i> , Espanha |
| 197-01 | DQ278980 | <i>Beta vulgaris L.</i> , Espanha |
| AG2-2IIIB | AY154311.1 | |
| IMI360038 | AJ000201.1 | |
| C-116 | DQ278976 | |
| AG2-2-IIIB | AF354116 | |
| AG2-2IIIB | AY270015.1 | Brasil |

Tabela 1. (Continuação)

| Isolados | Nº de acesso NCBI | Hospedeiro/Origem |
|-------------|-------------------|---------------------------------------|
| 48R_AG2-2LP | AB054866 | |
| 22R25 | U57737.1 | <i>Zoysia matrella</i> (grass), Japão |
| G4 | DQ278986 | Japão |
| AJ-1-10-1 | DQ278987 | Japão, |
| CBS210.84 | DQ278989 | <i>Beta vulgaris</i> , Japão |
| R64 | DQ278984 | Japão |
| AG2-2-IV | AF354117 | |
| AG22IV | AY154310.1 | |
| AG22IV | AY270014.1 | |
| 9215512 | DQ278983 | Japão |
| S2 | DQ278981 | Japão |
| KI | DQ278982 | Japão |
| RGR38 | | |
| AG5 | AF153777 | <i>Beta vulgaris</i> , Japão |
| AG5 | AY154314.1 | |
| WI1 | U57893.1 | <i>Beta vulgaris</i> , Holanda |
| AF153778 | AF153778 | |
| EM1015D | DQ278974 | |
| EM117A | DQ278970 | |
| 123-98 | DQ278969 | Solo, Espanha |
| AG5 | AF354112 | |
| 0801 | | |
| CBS174.84 | DQ278968 | Fezes de pássaro, Venezuela |
| CBS347.84 | DQ278971 | Alemanha |
| CBS212.84 | DQ278972 | <i>Glycine max</i> , Japão |
| CBS293.81 | DQ278975 | <i>Juniperus communis</i> , França |
| 23R01L | U57743 | <i>Glycine max</i> , Japão |
| 23R-01 | U57740.1 | <i>Glycine max</i> , Japão |
| AG2-3 | AY154312.1 | |

Tabela 1. (Continuação)

| Isolados | Nº de acesso NCBI | Hospedeiro/Origem |
|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| AG11 | AF153802 | Subsolo, Austrália |
| AG11 | AF354115 | |
| AG11 | AY154313.1 | |
| CBS973.96 | DQ278967 | <i>Lupinus angustifolius</i> , |
| SJ64 | DQ279029 | <i>Glycine max</i> , Brasil |
| IMI360366 | AJ000199.1 | |
| CBS700.82 | DQ278946 | <i>Eichhornia azurea</i> , Panamá |
| IMI360021 | AJ0002001 | |
| IMI358761 | AJ000197.1 | |
| AG1-IA | AF354097 | |
| AG1-IA | AY154301.1 | |
| AY270011.1 | AY270011.1 | <i>Glycine max</i> , Brasil |
| RV | DQ279030 | <i>Raphanus sativus</i> L., |
| AY270007.1 | AY270007.1 | <i>Glycine max</i> , Brasil |
| AY270008.1 | AY270008.1 | <i>Glycine max</i> , Brasil |
| AY270009.1 | AY270009.1 | <i>Glycine max</i> , Brasil |
| AY270013.1 | AY270013.1 | <i>Glycine max</i> , Brasil |
| CBS178.83 | DQ279031 | <i>Gladiolus sp.</i> , Holanda |
| CBS523.96 | DQ279032 | Canadá |
| AG 1-1C | AY154300.1 | |
| RST | DQ279033 | <i>Fragaria vesca</i> , Espanha |
| AY152694.1 | AY152694.1 | <i>Lactuca sativa</i> , Brasil |
| Rs992 | DQ279037 | <i>Bentgrass</i> , |
| AG1-IB | AY154302.1 | |
| CBS206.84 | DQ279038 | <i>Beta vulgaris</i> , Japão |
| CBS345.36 | DQ279034 | <i>Coleus sp.</i> |
| CBS176.83 | DQ279035 | <i>Daucus carota</i> , Holanda |
| EM1401C | DQ279036 | |
| SJ144 | DQ279039 | <i>Glycine max</i> , Brasil |

Tabela 1. (Continuação)

| Isolados | Nº de acesso NCBI | Hospedeiro/Origem |
|-----------------|--------------------------|---|
| 21WCC | DQ279040 | |
| CHA1 | DQ279041 | Chá |
| AM70.4 | DQ279063 | <i>Arachis hypogaea</i> , Brasil |
| AGI | DQ279064 | |
| AGH | DQ279065 | |
| CBS140.82 | DQ279062 | <i>Glycine max</i> , Canadá |
| CBS148.54 | DQ278937 | França |
| AJ427402 | AJ427402 | <i>Ceratobasidium anceps</i> |
| CBS154.35 | DQ278938 | <i>Coffea sp.</i> , Índia |
| AJ427403 | AJ427403 | |
| CBS569.83 | DQ278942 | <i>Trichoglottis australiensis</i> , Austrália, |
| CBS571.83 | DQ278943 | <i>Pomatocalpa macphersonii</i> , Austrália |
| AJ427401 | AJ427401 | |
| 99125 | AF222793.1 | |
| CBS438.80 | DQ278940 | Haste de <i>Juncus sp.</i> , Japão |
| CBS132.82 | DQ278930 | <i>Festuca sp</i> , USA |
| AGDI | AB196643 | |
| AGD | DQ279060 | |
| CBS223.51 | DQ278939 | <i>Ceratobasidium gramineum</i> , Japão |
| AGQ | DQ279061 | |
| IMI375133 | AJ000194.1 | <i>Ceratobasidium oryzae-sativae</i> |
| AGBb | DQ279058 | |
| AGBa | DQ279059 | |
| AGS | AB196656 | |
| AM8.2 | DQ279050 | <i>Arachis Hypogaea</i> , Brasil |
| SJ08 | DQ279051 | <i>Glycine max</i> , Brasil |
| 09-01 | DQ279054 | |
| RH28155 | U19962 | |
| AGA | AB196640 | |

Tabela 1. (Continuação)

| Isolados | Nº de acesso NCBI | Hospedeiro/Origem |
|-----------------|--------------------------|--|
| MO6 | DQ279053 | <i>Fragaria</i> sp., Brasil |
| AGT | AB196663 | |
| FJ 31.4 | DQ279048 | <i>Phaseolus vulgaris</i> , Brasil |
| CBS758.79 | AJ427404.1 | Folhas de <i>Pittosporum</i> sp., USA |
| AGK | DQ279056 | |
| AGBO | DQ279057 | |
| R35 | DQ279042 | <i>Solanum tuberosum</i> L., Espanha |
| YA18 | DQ279043 | <i>Smallanthus sonchifolius</i> , Brasil |
| MLC1 | DQ279044 | <i>Citrullus lanatus</i> , Brasil |
| AGG | DQ279049 | |
| AGC | DQ279046 | |
| AGL | DQ279047 | |
| FJ 33.1 | DQ279048 | <i>Phaseolus vulgaris</i> , Brasil |
| AGO | DQ279045 | |
| IMI375117 | AJ000195.1 | |
| IMI375119 | AJ000196.1 | |
| CBS273.38 | DQ278950 | |
| CBS316.84 | DQ279067 | <i>Waitea circinata</i> , Holanda |
| AGDI 1DA | DQ278952 | |
| RZ01 | DQ278951 | |
| CBS320.84 | DQ278949 | |
| IMI360314 | DQ278948 | |
| CBS477.82 | | USA |
| CBS189.90 | DQ278944 | <i>Platanthera obtusata</i> , Canadá, |
| CBS572.83 | DQ278945 | <i>Serendipita vermifera</i> , Austrália |
| AY089729.1 | AY089729.1 | <i>Sistotrema brinkmannii</i> |

5.1.2 Reação de Polimerase em cadeia (PCR) da região ITS1-5.8S-ITS2

Após o isolamento do DNA genômico dos 126 isolados (identificados com as iniciais DQ no número de acesso NCBI), apresentados na Tabela 1, eles foram submetidos à amplificação dos fragmentos de DNA, com os pares de “primers” ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')/ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White et al., 1990). A reação foi realizada em tubos de PCR de 200 µL contendo 100 ng de DNA genômico, 1,5mM MgCl₂, 2 U *Taq* polymerase (Invitrogen, Groningen, The Netherland), 0,2mM de cada dNTP, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, e 0,2µM de cada “primer” em 50 µL. No controle, o DNA foi substituído pelo mesmo volume de água ultra pura esterilizada. A amplificação foi realizada em Gene amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Nieuwerkerk aan de Ijssel, The Netherlands) com uma desnaturação inicial de 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 72°C por 2 min e uma extensão final de 72°C por 5 min. Depois da amplificação, 7 µL de reação, misturados com 2 µL de tampão de carregamento (0,25 % de azul de bromofenol e 40% de sacarose) (Sambrook et al., 1987) e 4 µL (200ng) de marcador 100 bp Ladder, também misturados com 2 µL de tampão de carregamento, foram separados em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE 1X, aproximadamente 5V/cm de gel, para visualização dos fragmentos amplificados e determinação dos seus tamanhos, em pares de bases.

5.1.3 Reação de Seqüenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2

Cada produto de PCR foi purificado utilizando GFXTM PCR DNA gel band purification kit (Amersham Biosciences, Roosendaal, The Netherlands) de acordo com as instruções do fabricante. Os isolados foram seqüenciados utilizando a fita dupla de DNA de cada produto de PCR (20ng) 5 pmol de cada “primers” ITS4 ou ITS5 de acordo com o manual do fabricante, Big DyeTM v3.1 kit (Applied Biosystems, Nieuwerkerk aan de Ijssel, The Netherlands) e acrescida de água para um volume final de 10 µL. A reação de seqüenciamento foi conduzida em termociclador Gene amp PCR system 9700 (Applied Biosystems Nieuwerkerk aan de Ijssel, The Netherlands) com desnaturação do molde de 1 min a 95°C; e

30 ciclos de 95°C por 10 seg., e o anelamento do primer a 50 °C por 5 seg., e a extensão final a 60°C por 4 min. O produto da reação foi purificado com Sephadex filtration (G-50 fine, Amersham Biosciences, Roosendaal, The Netherlands) e o seqüenciamento foi conduzido em ABI3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Nieuwerkerk aan de Ijssel, The Netherlands).

Os fragmentos seqüenciados gerados pelos dois “primers” de cada isolado foram montados utilizando o programa computacional SeqMan version 5.03 (DNASTar, Madison, WI, U.S.A) e corrigidos manualmente. As seqüências consenso foram alinhadas pelo programa clustal X 1.83 (Thompson et al., 1994). O cladograma mostrando a relação filogenética entre isolados e os padrões foram construídos com base na matriz de distância pelo método “neighbor-joining” com 1000 “bootstraps” e utilizando o modelo de substituição “uncorrected p” como melhor critério para os dados gerados. As análises computacionais geraram um cladograma filogenético entre representantes dos AGs e os isolados utilizando o programa computacional PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 4.0) (Swofford, 2001) com "heuristic search, 50 replicates and tree-bisection-reconnection (TBR) as the branch-swapping algorithm”.

5.1.4 Clonagem da região ITS1-5.8S-ITS2 dos isolados CBS316.84 (*Waitea circinata*) e CBS569.83 (*Ceratobasidium globisporum*)

Dentre os 126 isolados, dois isolados apresentaram dificuldades na obtenção de seqüências de nucleotídeos de qualidade, os isolados CBS 316.84 (*Waitea circinata*) e CBS 569.83 (*Ceratobasidium globisporum*). Optou-se então, pela clonagem da região ITS1-5.8S-ITS2 desses isolados na tentativa de obter seqüências de nucleotídeos de qualidade.

5.1.4.1 Reação de ligação

A partir da reação de PCR do gene ITS1-5.8S-ITS2 dos isolados CBS 316.84 e CBS 569.83, foi utilizada uma alíquota de 3 µL de cada reação de PCR, 5 µL de 2X Rapid ligation Buffer, 1 µL T4 ligase, pGem^R-T easy Vector e 1 µL de T4 DNA ligase,

totalizando 10 μL . Segundo orientação do fabricante, a incubação da reação de ligação por 12 horas a 4°C gera um maior número de transformantes.

5.1.4.2 Transformação

A partir de 3 μL da reação de ligação foi realizada a transformação em 100 μL de células competente DH5 α tratadas com cloreto de cálcio (Sambrook et al., 1987). Incubou-se uma hora no gelo e em seguida submeteu-se a choque térmico a 42°C por 90 segundos. Adicionou-se 900 μL de meio SOC (1g Triptona, 0,25g extrato de levedura, 0,03g NaCl, 0,0093g KCl, completar para 45 mL de água e acrescentar 5 mL (MgCl₂ 1M e Mg SO₄ 1M) e 0,5 mL de glicose 2M) e incubadas a 37°C a 200 rpm por 1 hora e 30 minutos. Cada 100 μL desta suspensão bacteriana foi plaqueada em meio Luria Bertani (LB) (5,0g de Peptona, 2,5g de extrato de levedura; 5,0g de NaCl e 7,0g de ágar. Adicionar 400 mL de água destilada e acertar o pH para 7,0 com NaOH 5N e completar para 500 mL) contendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina acrescidas de 4 μL IPTG (200mg/mL) (isopropylthio-B-D-galactoside) e 40 μL de Xgal (20mg/mL) (5 bromo-4chloro-3-indolyl-B-D-galactoside) e incubadas a 37°C por 12 horas. As células transformadas (colônias brancas) foram então transferidas para meio LB líquido contendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina e incubadas durante 12 horas sob agitação.

5.1.4.3 Miniprep

A extração do DNA da bactéria foi realizada utilizando o kit Rapid Plasmid Systems (Marligen Bioscience, Ijamsville, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Para verificar a integridade das amostras de DNA e o tamanho dos insertos, alíquotas de 4 μL foram retiradas dos estoques, acrescidas de tampão de carregamento (0,25 % de azul de bromofenol e 40% de sacarose) (Sambrook et al., 1987) e analisadas em gel de agarose 0,8% contendo 10mg/mL de brometo de etídeo em tampão TBE 1X a 5V/cm. Após a corrida, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta, com auxílio de transiluminador UV.

5.1.4.4 Reação de Sequenciamento

Após a extração do DNA, foram selecionados os insertos maiores e diferentes, os quais foram submetidos à reação de sequenciamento conforme descrito no item 5.1.3., ressaltando que, para esse sequenciamento, foi utilizado o “primer” do vetor SP6 (5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG 3').

Após o sequenciamento, as seqüências obtidas foram submetidas a análise de qualidade de bases utilizando o padrão de phrap \leq 20 do pacote computacional do programa Phred/Phrap/Consed (Ewing et al., 1998) As seqüências obtidas após esta etapa foram alinhadas no programa clustal X 1.83 (Thompson et al., 1994). O alinhamento obtido foi submetido ao programa DNAsp (Rozas et al., 2003) que analisa o polimorfismo de DNA. As análises filogenéticas foram efetuadas utilizando o método UPGMA, através do programa computacional MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004) com teste de “bootstrap” de 5000 replicas e método de substituição de Kimura 2 (Kimura, 1980).

5.2 Diversidade genética de *Rhizoctonia* spp. através do sequenciamento dos genes ATP sintase subunidade 6 mitocondrial (ATP6), fator de alongação 1-alpha, RNA polimerase 2 e a região ITS (espaço interno transcrito)

5.2.1 Isolamento do DNA genômico

Com base no cladograma gerado através das seqüências da região ITS dos 274 isolados de *Rhizoctonia solani* e *Rhizoctonia* spp. e dos padrões de anastomose, foram selecionados isolados representantes de cada agrupamento, totalizando 44 isolados e procedeu-se o isolamento de acordo com o descrito no item 5.1.1. Os isolados representantes de cada agrupamento e os respectivos números de acesso no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizados nesse estudo estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Isolados de *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia* spp. e padrões de anastomose utilizados na análise multilocos, com os respectivos números de acesso no NCBI (National Center for Biotechnology Information).

| Isolados | Nº de acesso | Nº de acesso | Nº de acesso | Nº de acesso |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | NCBI ATP6 | NCBI EF | NCBI RPB2 | NCBI ITS |
| AGA | DQ301565 | DQ301631 | DQ301695 | AB196640 |
| AGBa | DQ301566 | DQ301632 | DQ301696 | DQ279059 |
| AGBO | DQ301567 | DQ301633 | DQ301697 | DQ279057 |
| AGE | DQ301569 | DQ301635 | DQ301699 | DQ279013 |
| AGG | DQ301570 | DQ301636 | DQ301701 | DQ279049 |
| AGO | DQ301572 | DQ301639 | DQ301704 | DQ279045 |
| AGP | DQ301573 | DQ301640 | DQ301705 | DQ279015 |
| AGQ | DQ301574 | DQ301641 | DQ301706 | DQ279061 |
| CBS132.82 | DQ301576 | DQ301645 | DQ301707 | DQ278930 |
| CBS133.82 | DQ301577 | DQ301646 | DQ301708 | DQ278931 |
| CBS135.82 | DQ301578 | DQ301647 | DQ301709 | DQ78932 |
| CBS136.82 | DQ301579 | DQ301648 | DQ301710 | DQ78933 |
| CBS137.82 | DQ301580 | DQ301649 | DQ301711 | DQ278934 |
| CBS139.82 | DQ301581 | DQ301650 | DQ301713 | DQ278936 |
| CBS148.54 | DQ301582 | DQ301651 | DQ301714 | DQ278937 |
| CBS154.35 | DQ301584 | DQ301653 | DQ301715 | DQ278938 |
| CBS189.90 | DQ301585 | DQ301654 | DQ301716 | DQ278944 |
| CBS438.80 | DQ301589 | DQ301656 | DQ301719 | DQ278940 |
| CBS477.82 | DQ301590 | DQ301657 | DQ301721 | AJ427405 |
| CBS569.83 | DQ301592 | | DQ301723 | DQ278942 |
| CBS572.83 | DQ301595 | DQ301659 | DQ301726 | DQ278945 |
| CBS700.82 | DQ301596 | DQ301660 | DQ301727 | DQ278946 |
| AG1_IB | DQ301599 | DQ301663 | DQ301733 | AY154302.1 |
| AG1_IC | DQ301600 | DQ301664 | DQ301731 | AY154300.1 |
| AG22_IV | DQ301602 | DQ301666 | DQ301734 | AY154310.1 |

Tabela 2. (Continuação)

| Isolados | Nº de acesso | Nº de acesso | Nº de acesso | Nº de acesso |
|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | NCBI ATP6 | NCBI EF | NCBI RPB2 | NCBI ITS |
| AG3 | DQ301603 | DQ301667 | DQ301735 | AY154319.1 |
| AG4HGI | DQ301604 | DQ301668 | DQ301736 | AY154307.1 |
| AG4HGII | DQ301605 | DQ301669 | DQ301737 | AY154308.1 |
| AG6HGI | DQ301608 | DQ301672 | DQ301740 | AY154306 |
| AG7 | DQ301609 | DQ301673 | DQ301741 | AF354098 |
| AG9 | DQ301610 | DQ301674 | DQ301742 | AY154316.1 |
| CBS101.782 | DQ301612 | DQ301676 | DQ301744 | DQ279008 |
| CBS140.82 | DQ301613 | DQ301677 | DQ301730 | DQ279062 |
| CBS200.25 | DQ301615 | DQ301679 | DQ301746 | DQ278994 |
| CBS207.84 | DQ301617 | DQ301681 | DQ301748 | DQ278991 |
| CBS208.84 | DQ301618 | DQ301682 | DQ301749 | DQ279002 |
| CBS293.31 | DQ301619 | DQ301683 | DQ301729 | DQ278959 |
| CBS523.96 | DQ301621 | DQ301685 | DQ301751 | DQ279032 |
| CBS970.96 | DQ301622 | DQ301686 | DQ301752 | DQ279005 |
| SJ02 | DQ301624 | DQ301688 | DQ301754 | AY270003 |
| SJ07 | DQ301625 | DQ301689 | DQ301755 | AY270015 |
| SJ57 | DQ301628 | DQ301692 | DQ301757 | AY270012 |
| TO1 | DQ301629 | DQ301693 | DQ301758 | AY152701 |
| TO4 | DQ301630 | DQ301694 | DQ301759 | AY152704 |

5.2.2.1 Reação de polimerase em cadeia (PCR) do gene ATP sintase subunidade 6 mitocondrial (ATP6)

Após o isolamento do DNA genômico, todos os isolados selecionados, foram submetidos à amplificação dos fragmentos de DNA, com o par de “primers” ATP61(5'-ATTAATTSWCCWTTAGAWCAATT-3') e ATP62 (5'-TAATTCTANWGCATCTTTAATRTA-3'). A reação foi realizada em tubos de PCR de 200 µL contendo 100 ng de DNA genômico, 1.5mM MgCl₂, 2 U *Taq* polymerase (Invitrogen, Groningen, The Netherlands), 0,2mM de cada dNTP, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, e 0,2uM de cada “primer” em 50µL. No controle, o DNA foi substituído pelo mesmo volume de água ultra pura esterilizada. A amplificação foi realizada em Gene amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Nieuwerkerk aan de Ijssel, The Netherlands) com uma desnaturação inicial de 94°C for 2 min, seguido por 35 ciclos de 35 seg. a 94°C, 55 seg. a 37°C e 72°C por 1min. e mais 30 ciclos de 35 seg. a 94 °C, 55 seg. a 45 °C e 1 min a 72 °C e acrescentados 4 seg. em cada ciclo. Depois da amplificação, 7 µL da reação, misturados com 2 µL de tampão de carregamento (0,25 % de azul de bromofenol e 40% de sacarose) (Sambrook et al., 1987) e 4 µL (200 ng) de marcador 100 bp Ladder, também misturados com 2 µL de tampão de carregamento, foram separados em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE 1X, aproximadamente 5V/cm de gel, para visualização dos fragmentos amplificados e determinação dos seus tamanhos, em pares de bases.

5.2.2.2 Reação de polimerase em cadeia (PCR) do gene fator de alongação 1-alpha (EF-1α)

Após o isolamento do DNA genômico, procedeu-se a amplificação dos fragmentos de DNA com o par de primers “TEF1-F (5'-AATCGTCAAGGAGACCAACG-3') e TEF1-R (5'-CGTCACCAGACTTGACGAAC-3') .A reação foi realizada em tubos de PCR de 200 µL contendo 100 ng de DNA genômico, 1,5mM MgCl₂, 2 U *Taq* polymerase (Invitrogen, Groningen, The Netherlands), 0,2mM de cada dNTP, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, e 0,2uM of cada “primer” em 50 µL. No controle, o DNA

foi substituído pelo mesmo volume de água ultra pura esterilizada. A amplificação foi realizada em Gene amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, The Netherlands) com uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min., 35 ciclos a 94 °C por 1 min., 60 °C por 1 min., 72 °C por 2 min. e uma extensão final de 72 °C por 7 min. Depois da amplificação, 7 µL da reação acrescidos de 2 µL de tampão de carregamento (0,25 % de azul de bromofenol e 40% de sacarose) (Sambrook et al., 1987) e 4 µL (200 ng) de marcador 100 bp Ladder e também misturados com 2 µL de tampão de carregamento, foram separados em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE 1X, aproximadamente 5V/cm de gel, para visualização dos fragmentos amplificados e determinação dos seus tamanhos, em pares de bases.

5.2.2.3 Reação de polimerase em cadeia (PCR) do gene RNA polimerase 2 (RPB2)

O DNA genômico dos isolados selecionados foi submetido a amplificação com o par de “primers” RPB2-6F (5'-TGGGGYATGGNTTGYCCYGC-3') e RPB2- 7.1R (5'CCCATRGCYTGYYTTCAT-3'). A reação foi realizada em tubos de PCR de 200 µL contendo 100 ng de DNA genômico, 1 µL de 50X Universal Buffer (1250 µl 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM EDTA), 5 µL de 10X PCR Buffer #4 (500 µL 100mM Tris-HCl, pH 8.3, 35mM MgCl₂, 750mM KCl), 2 U *Taq* polymerase (Invitrogen, Groningen, The Netherlands), 0,2mM de cada dNTP e 0,2µM de cada “primer” em 50 µL. No controle, o DNA foi substituído pelo mesmo volume de água ultra pura esterilizada. A amplificação foi realizada em Gene amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, The Netherlands) com uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min., 35 ciclos de 94 °C por 1 min., 60 °C por 1 min. 72 °C por 2 min. e uma extensão final de 72 °C por 7 min. Depois da amplificação, 7 µL de reação, misturados com 2 µL de tampão de carregamento (0,25 % de azul de bromofenol e 40% de sacarose) (Sambrook et al., 1987) e 4 µL (200ng) de marcador 100 bp Ladder, também, misturados com 2 µL de tampão de carregamento, foram separados em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE 1X, aproximadamente 5V/cm de gel, para visualização dos fragmentos amplificados e determinação dos seus tamanhos, em pares de bases.

5.3 Reação de Seqüenciamento

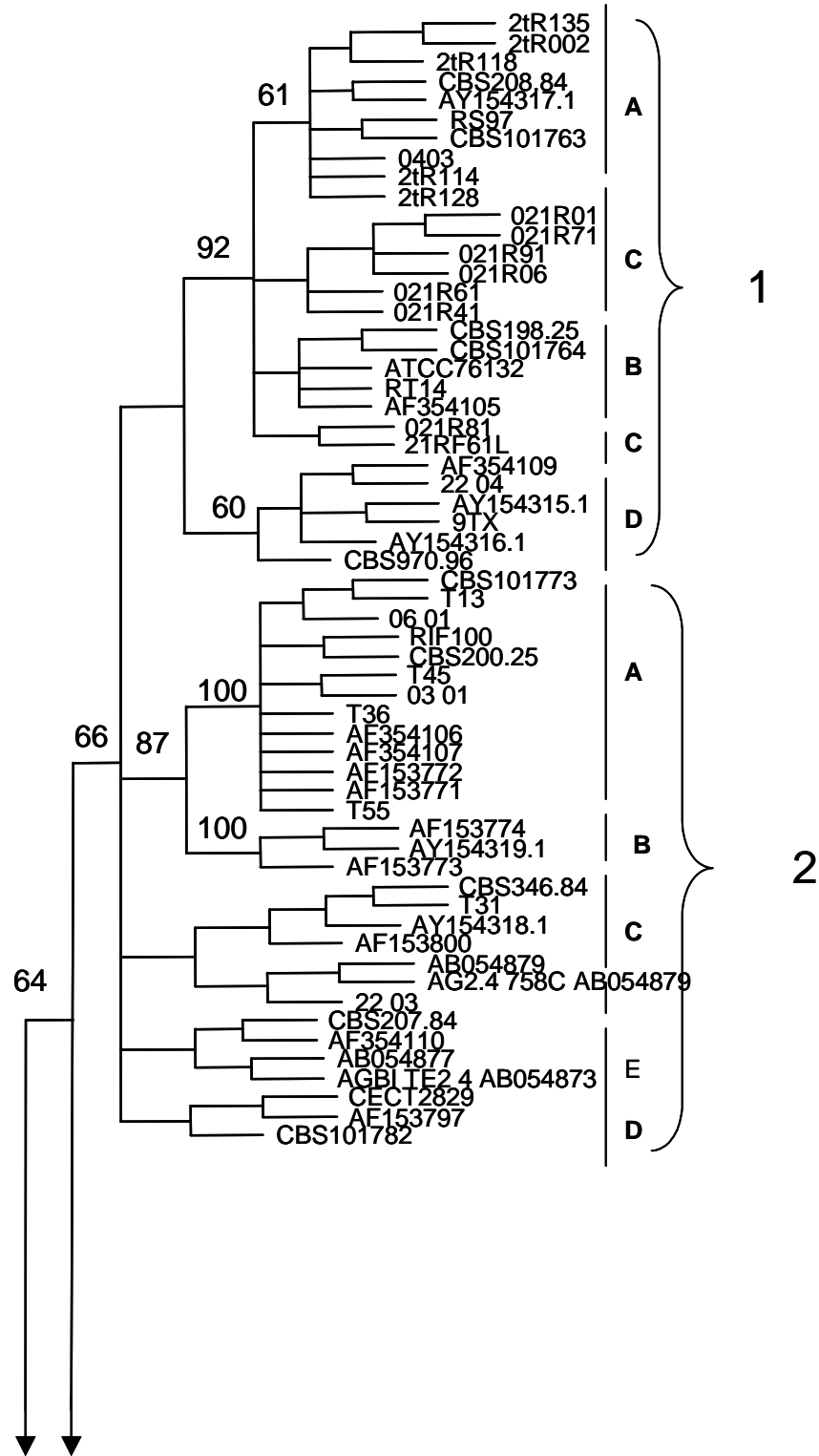
Cada produto de PCR foi purificado utilizando GFXTM PCR DNA gel band purification kit (Amersham Biosciences, Roosendaal, The Netherlands) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de PCR foram seqüenciados utilizando a fita dupla de DNA de cada produto de PCR (20ng), 5 pmol de cada “primer” de acordo com o manual do fabricante, Big DyeTM v3.1 kit (Applied Biosystems, Nieuwerkerk aan de Ijssel, The Netherlands) e acrescida de água para um volume final de 10 µL. A reação de seqüenciamento foi conduzida em termociclador Gene amp PCR system 9700 (Applied Biosystems Nieuwerkerk aan de Ijssel, The Netherlands) com desnaturação do molde de 1 min a 95°C, 30 ciclos de 95°C por 10 seg. e o anelamento do primer a 50 °C por 5 seg., e a extensão final a 60°C por 4 min. O produto da reação foi purificado com Sephadex filtration (G-50 fine, Amersham Biosciences, Roosendaal, The Netherlands) e o seqüenciamento foi conduzido em ABI3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Nieuwerkerk aan de Ijssel, The Netherlands).

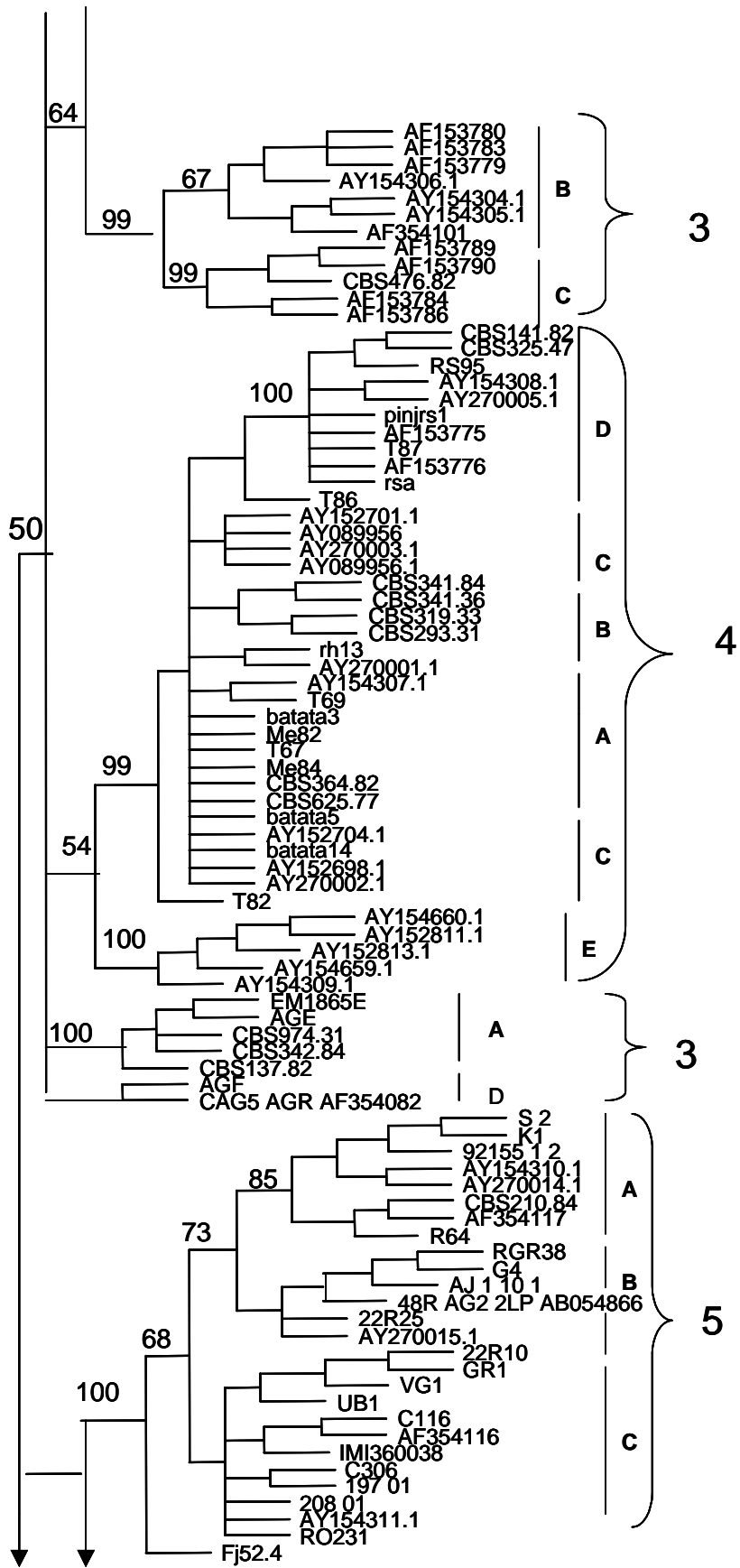
A partir dos fragmentos gerados pelos dois “primers” de cada isolado, obteve-se as seqüências consenso, utilizando o programa computacional SeqMan version 5.03 (DNASar, Madison, WI, U.S.A) e as seqüências quando necessárias foram corrigidas manualmente. As seqüências consenso foram alinhadas pelo programa clustal X 1.83 (Thompson et al., 1994). O cladograma mostrando a relação filogenética entre isolados e os padrões foi construído com base na matriz de distância pelo método “neighbor-joining” com 1000 “bootstraps” e utilizando o modelo de substituição “uncorrected p” como melhor critério para os dados gerados. As análises computacionais geraram um cladograma filogenético entre representantes dos AGs e os isolados utilizando o programa computacional PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 4.0) (Swofford, 2001) com "heuristic search, 50 replicates and tree-bisection-reconnection (TBR) as the branch-swapping algorithm”.

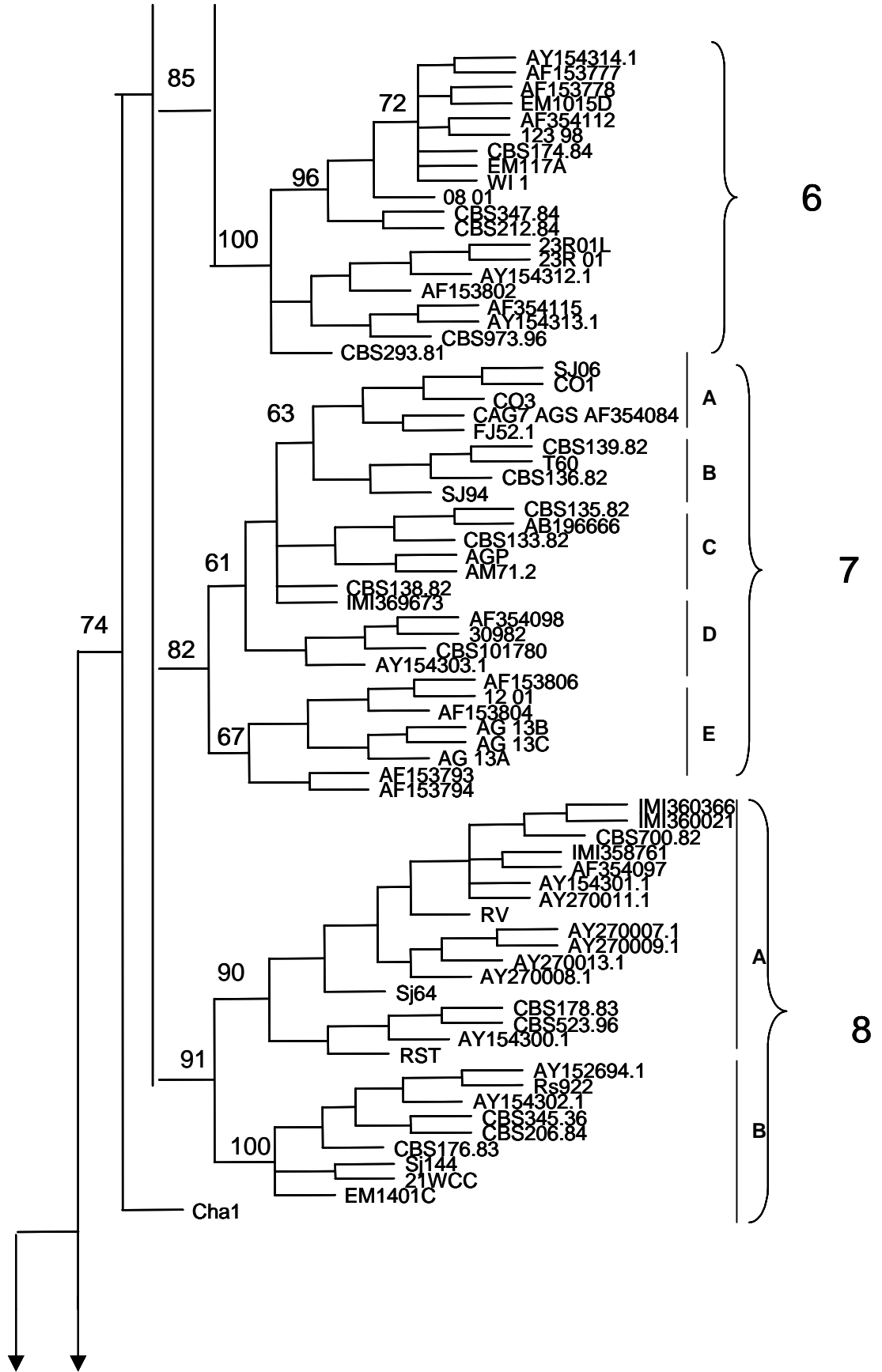
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Diversidade genética de *Rhizoctonia* spp. através do seqüenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2

O cladograma gerado pela matriz de similaridade está representado na
Figura 1.







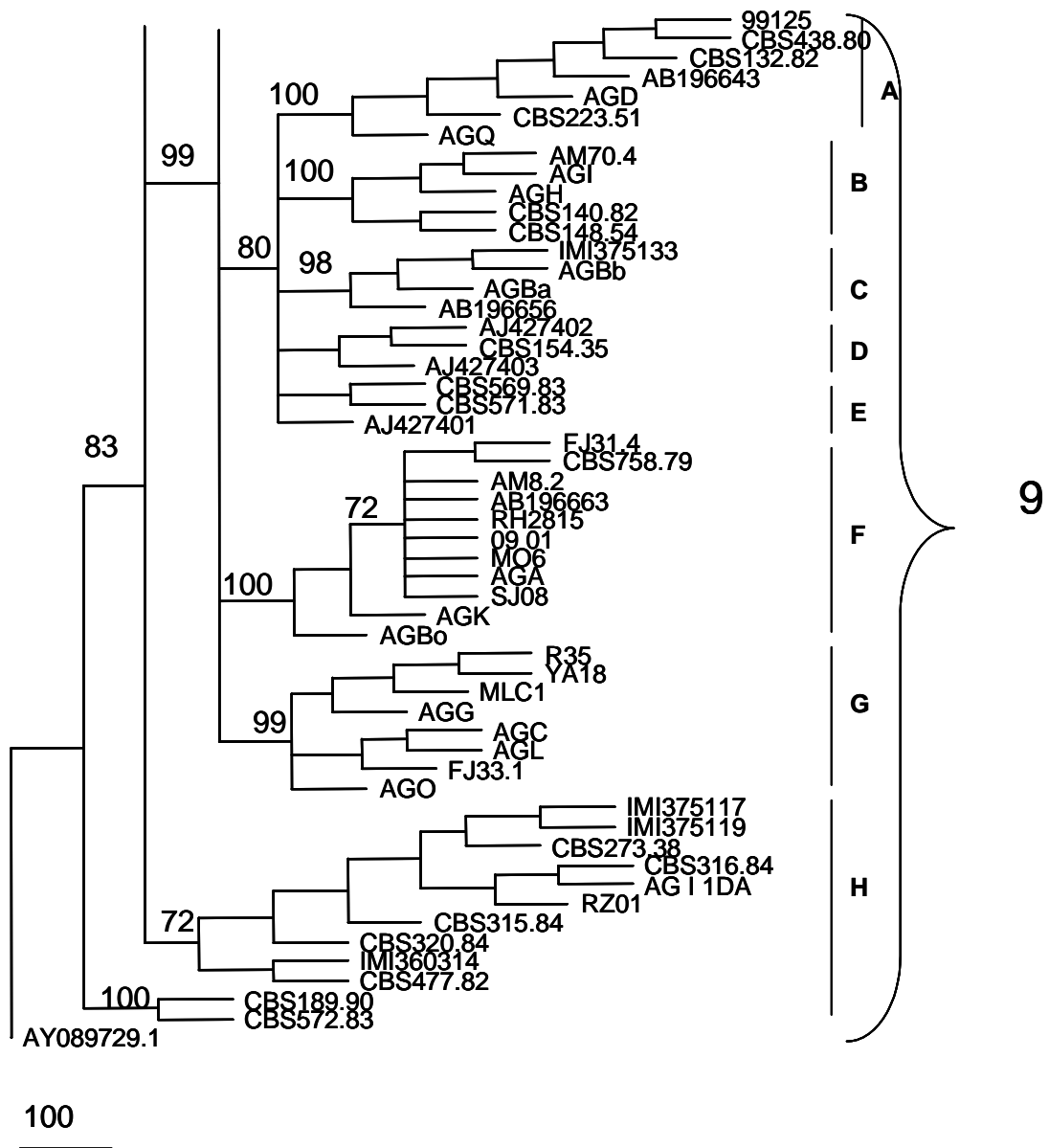


Figure 1. Cladograma gerado pela análise “neighbor-joining” obtido dos 274 alinhamentos das seqüências ITS ilustrando a principal relação filogenética de isolados de *Rhizoctonia* spp. coletados de várias regiões do mundo.

Clado 1: Nesse clado foi possível distinguir 4 grupos: 1A, 1B, 1C, 1D. O grupo 1A compreende isolados de várias espécies, mas principalmente de plantas ornamentais *Tulipa* sp. (Holanda), *Agrostis palustris*, *Lupinus usitatissimum* (Japão) e inclui o padrão de anastomose AG2-1 (AY154317.1). No grupo 1B estão os isolados de *Begonia* sp. de origem desconhecida, *Brassica napus* (Holanda), *Pisum sativum* (Japão). O grupo 1C compreende isolados de *Raapsteel* (Holanda), *Allium porrum* (Holanda), *Tulipa* sp (Japão), *Pisum sativum* (Japão), *Lactuca sativa* (Holanda), *Brassica oleracea* var. *botrytis* (Holanda), *Lilium longiflorum* (Holanda). O Grupo 1D inclui isolados de batata (Alaska) e os padrões AG9 (AF354109, AY154316.1), AG9TP (AY154315.1) e 9TX. Este é um agrupamento bastante interessante, onde se encontra a maioria dos isolados de plantas ornamentais e juntamente com o padrão AG2-1. Os isolados de tulipa do Japão (clado 1B) e da Holanda (clado 1A) não se agruparam, mas ambos foram similares ao padrão AG2-1 (AY1543171), entretanto, Schneider et al., (1999) classificaram alguns isolados homeogêneos de tulipas da Holanda como AG-2t e não como AG2-1. De acordo com Sneh et al. (1991) AG2 é sem dúvida o grupo mais heterogêneo. Membros deste AG são caracterizados por causar *damping off* em crucíferas (Watanabe & Matsuda, 1966), podridão de raiz em rabanete (Homma & Ishii, 1984) e queima foliar em tulipas (Nakatomi & Kaneko, 1971). A similaridade entre isolados de tulipas do Japão (021R06) e da Holanda (2tR114, 2tR128, 2tR135, 2tR002) foi de 93,5%. A seqüência de similaridade de nucleotídeos entre isolados desse clado foi de 92-100% e na região ITS1 foi de 89-100% e de 91-100% na região ITS2.

Clado 2: Pela análise da variação da seqüência da região ITS1-5.8S-ITS2 foi possível identificar pelo menos cinco bem definidos grupos de *Rhizoctonia* spp.: 2A, 2B, 2C, 2D, 2E. No grupo 2A inclui isolados de *Solanum tuberosum* (EUA, Rússia, Espanha, Marrocos, Japão). No grupo 2B agruparam-se os isolados de *Solanum nicotiana* (EUA) e o padrão AG-3 (AY154319.1). O grupo 2C compreende isolados de *Spinacia oleracea*, (Holanda), *Solanum tuberosum* (Espanha), subsolo (Austrália) e os padrões AG-10 (AY154318.1) e AG2.4 758C (AB054879). O grupo 2D agrupou isolados de subsolo (Austrália), *Triticum aestivum* (Austrália). O grupo 2E compreende isolados de *Beta vulgaris* (Japão) e inclui o isolado padrão AGBI (AB054873, AF354110). Os agrupamentos 2A e 2B apresentaram maior similaridade com o isolado padrão AG-3 (AY154319.1). *Rhizoctonia solani* Kühn grupo de

anastomose 3 correspondendo a doenças associadas com batata e tabaco. Tradicionalmente, AG-3 foi considerado um grupo homogêneo de hospedeiro específico (Anderson, 1982; Ceresini et al., 2002), causando cancos em raiz e brotos em batatas. Truter & Wehner (2004) encontraram 39 isolados de haste e raiz sintomática em plantas de batata, 32 pertencentes ao grupo AG-3, cinco ao grupo AG-4 e dois ao grupo AG-5. Recentemente Rosa et al. (2005) relataram isolados de batata originário do Brasil com elevado grau de similaridade ao grupo padrão AG-4HGI e 4HGII, causando *damping-off*. O AG-3 é denominado “potato type” (Watanabe & Matsuda, 1966), o qual é mais tolerante a baixas temperaturas em relação a outros AGs e é muito importante causando podridão de raiz e tubérculo de batata (Carling & Summer, 1992) e mancha alvo em folhas de tomate (Date et al., 1984), tabaco (Meyer et al., 1990) e berinjela (Kodama et al., 1982). A seqüência de nucleotídeos da região ITS mostrou elevado nível de similaridade entre isolados pertencentes ao clado (2A a 2E) em torno de 94-100%. A análise filogenética das seqüências dividiu isolados de *Rhizoctonia* de batata dentro de um bem suportado clado AG-3 (2A) correspondendo com o agrupamento de hospedeiros da Espanha, Marrocos, EUA, Rússia, Japão e agrupou separadamente isolados de tabaco (2B). A similaridade na região do ITS1 foi de 90-100% e na região do ITS2 de 91-100% entre os isolados desse clado 2.

Clado 3: Este clado apresenta quatro sub grupos 3A, 3B, 3C e 3D. O grupo 3A apresenta isolados de *Rubus* sp. (Holanda), *Lupinus angustifolius* (Austrália), *Ceratobasidium cornigerum* (EUA) e inclui o isolado padrão AGE (DQ279013). O grupo 3B inclui isolados desconhecidos do Japão (AF153780, AF153783), de solo (Japão) e os isolados padrão AG6HGI (AY154306.1), AG6GV (AY154304.1, AF354101) e AG7 (AY154305.1). O grupo 3C contém isolados de *Triticum aestivum* (África do Sul, Tanzânia), *Glycine max.* (EUA), *Pterostylis acuminata* (Austrália), restos vegetais (Austrália). O grupo 3D apresenta os isolados padrão AGF (DQ279014) e CAG5 AGR (AF354082). Usualmente *Rhizoctonia solani* Kühn AG-8 é o agente causal de uma doença limitante nos campos de cereais, no sistema de plantio direto, principalmente em trigo causando podridão de raiz, “sunken lesion”, podridão do córtex (Gill et al., 2002), mas nesse estudo os isolados de *Triticum aestivum* foram similares ao isolado padrão AG-6GV. Os fungos deste grupo AG-6GV são considerados não

patogênicos e ocorrem no Japão (Kuninaga et al., 1979) e alguns isolados deste grupo formam associação com orquídeas (Uetake et al., 1988). *Rhizoctonia solani* AG-8 foi relatado em Lupine na Austrália (Sweetingham et al., 1990) entretanto Chang et al., (2005) fizeram o primeiro relato de *Rhizoctonia solani* AG-4 e AG-22 causando doenças em plantas de *Lupinus angustifolius* no Canadá causando danos e constricção no colo da planta, folhas jovens encarquilham e deformam-se e tombamento das plântulas tombam. A similaridade das seqüências de nucleotídeos entre isolados neste cluster foi entre 99,85-100% e de 99,95% na região ITS1 e 99,99% na região ITS2.

Clado 4: No clado 4, há cinco grupos distinguíveis: 4A, 4B, 4C, 4D e 4E. O grupo 4A compreende isolados de *Iris* sp. (Holanda), *Annona* sp.(Israel), *Cucumis melo* (Espanha), *Solanum tuberosum* (Espanha), Solo (Israel), *Glycine max* (Brasil) e o isolado padrão AG-4HGI (AY154307.1). O grupo 4B compreende isolados de *Fragaria* sp. (Holanda), *Citrus* sp. (Argentina), semente de grama, *Gossypium* sp. (Turquia). O agrupamento 4C inclui isolados de *Solanum lycopersicum* (Brasil), *Glycine max* (Brasil), *Cucumis melo* (Brasil), *Solanum tuberosum* (Brasil) e o isolado padrão AG-4HGI (AY089956.1, AY089956). O agrupamento 4D compreende isolados de *Poa annua*, *Medicago sativa* (EUA), *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Solanum tuberosum* (Espanha), *Phaseolus vulgaris*, (Espanha), *Pinus pinaster* (Espanha) e o isolado padrão AG-4HGII (AY154308.1). O grupo 4E contém isolados de *Spinacia oleracea* (Brasil), *Brassica oleracea* (Brasil) e o isolado padrão AG-4HGIII (AY154309.1). Isolados de batata da Espanha agruparam no 4A e 4D e foram similares com os isolados padrão AG-4HGI e AG-4HGII, respectivamente. Isolados de batata no Brasil agruparam no 4C e foram similares com o isolado padrão AG-4HGI. Os isolados de batata agruparam separadamente de acordo com a origem, mas alta similaridade foi observada nas seqüências de nucleotídeos de isolados de batata do Brasil e Espanha em torno de 94%. Truter & Wehner (2004) encontraram isolados em hastes sintomáticas e em raízes de batata e foram identificados como AG-4 e recentemente resultados de Rosa et al., (2005) confirmaram a presença de isolados de *Rhizoctonia solani* em batata com sintomas de necrose na haste, causando *damping-off* e constataram que todos os isolados patogênicos apresentaram maior similaridade com os isolados padrão AG4-HGI e II no Brasil. Nos isolados de batata da Espanha não foi possível determinar o grupo de anastomose a que pertencem previamente mas

de acordo com este trabalho, eles foram similares aos isolados padrão AG4-HGI e II. Isolados de *Rhizoctonia solani* em batata e tabaco são frequentemente associados com AG-3 (Anderson 1982; Ogoshi, 1987; Carling et al., 1989), causando cancrios em raízes e brotos, mas de acordo com os resultados desse trabalho, os isolados de batata e tomate do Brasil e da Espanha foram mais similares com os isolados padrão AG4 HG-I e AG4 HG-II. Tal fato pode ser explicado pelos diferentes sintomas que provocam em plantas de batata. Dentro desse agrupamento, o mais elevado nível de similaridade foi entre isolados de tomate do Brasil (AY152704.1) e da Espanha (T82) com 99% de similaridade, através do bem suportado *cluster* de acordo com o hospedeiro. Isolados de tomate, em acordo com Kuramae et al. (2003), podem apresentar reação positiva com os isolados padrão AG4HG-I, HG-II e HG-III. A similaridade das seqüências de nucleotídeos entre isolados pertencentes a esses grupos foi de 91 a 100% e de 87 a 97% na região ITS1 e de 87 a 97% na região ITS2. No agrupamento 4C, os isolados de soja (*Glycine max*) do Brasil (AY270001.1, AY270002.1, AY270003.1) e isolados de melão (*Cucumis melo*) do Brasil (AY152698.1) e da Espanha (Me82 e Me84) agruparam-se com o isolado padrão AG-4HGI. Este resultado corrobora com os resultados previamente apresentados por Fenille et al.(2003), Kuramae et al (2003), Boysen et al.(1996) em soja e melão. Yang et al., (2005) reportaram isolados de *Rhizoctonia* AG-A na China patogênicos a plântulas de soja. A similaridade das seqüências entre isolados do mesmo hospedeiro, mas de diferentes origens geográficas como exemplo os isolados de melão do Brasil e da Espanha foi em torno de 97,18 a 97,24% na região ITS1 e 98,6 a 99,28% na região do ITS2. As seqüências dos isolados de melão utilizadas por Boysen et al. (1996) (Me82 e Me84) também foram incluídas nas presentes análises e mostraram elevada similaridade com os isolados de melão do Brasil (AY152698.1) com 99% de similaridade e agruparam com o AG-4HGI. Embora eles tenham sido identificados como pertencentes ao mesmo AG e com elevada similaridade mas, isolados do Brasil causam podridão do hipocótilo e da raiz, enquanto isolados da Espanha causam *damping off*. Pequena variação foi observada nas seqüências de nucleotídeos de isolados pertencentes a este agrupamento e a similaridade das seqüências foi de 95 a 99%. A similaridade de seqüências de nucleotídeos entre os isolados do agrupamento 4A e 4C foi de 90 a 100% na seqüência da região ITS1 e de 92 a 100% na da ITS2. O grupo 4E compreende isolados de *Spinacia oleracea* (Brasil), *Brassica oleracea* (Brasil) e agruparam com o isolado padrão AG-4HGIII (AY154309.1). Kuramae et al. (2003) relataram pela primeira vez a

ocorrência de *Rhizoctonia solani* AG-4HGIII em brócolis e espinafre no Brasil e o teste de patogenicidade de todos os isolados mostraram sintomas de podridão do hipocótilo e da raiz. Na China foram relatados isolados de *Rhizoctonia solani* causando queima foliar em *Brassica rapa* spp e pertencentes ao AG-4 (Yang et al., 2004). Membros desse AGs são caracterizados por infectar a porção subterrânea da planta e causar *damping-off* e podridão de raiz. Além disso, AG4 e AG5 também têm sido relatados causando *damping-off* em espinafre no Japão (Akashi et al., 1986). Isolados pertencentes ao subgrupo AG-4 foram relatados causando *damping-off* e podridão de raiz em várias culturas importantes, como a cebola (Yamamoto & Uehara 1972), ervilha (Shehata et al., 1983), batata (Elango, 1986), feijão (Ceresini & Souza, 1997), soja (Muyolo et al., 1993) e amendoim (Ceresini et al., 1996). A similaridade de seqüências dentro desse *cluster* 1A foi de 98 a 100% e na seqüência da região ITS1 foi de 100% e de 96 a 100% na região ITS2. Todos os isolados deste agrupamento são do Brasil, o que era de se esperar, uma vez que apresentam elevados níveis de similaridade entre eles.

Clado 5: A análise “neighbor Joining” de distância genética derivada do alinhamento das seqüências, foi capaz de separar em três grupos 5A, 5B e 5C. O grupo 5A compreende isolados de *Rhizoctonia solani* (Japão) e *Beta vulgaris* (Japão) e os isolados padrão AG2-2IV (AY154310.1, AY270014.1, AF354117). O grupo 5B inclui isolados de *Rhizoctonia solani* (Japão), *Zoysia matrella* (grama) (Japão) e o isolado padrão 48R AG2 2LP (AB054866). O agrupamento 5C apresenta isolados de *Phaseolus vulgaris* (Brasil), *Beta vulgaris* (Holanda, Espanha), *Cynodon dactylon* (Espanha) e o isolado padrão AG2-2IIIB (AY270015.1, AF354116, AY154311.1). Nos grupos 5A e 5B agruparam todos os isolados de *Rhizoctonia solani* do Japão e foram mais similares com os isolados padrão AG2-2IV e 48R AG2 2LP respectivamente. No agrupamento 5C, o isolado de feijão (Fj52.4) foi mais similar ao padrão AG2-2IIIB que concorda com Kuramae et al.(2002) causando *damping-off* em plantas de feijão. Membros desse grupo de anastomose usualmente infectam as raízes e parte aérea causando *damping-off* em beterraba (Watanabe & Matsuda, 1966) e crisântemo (Kajiwara & Sugata, 1971), queima foliar em grama (Hurd & Grisham, 1983) e queima foliar em arroz (Watanabe & Matsuda, 1966). Os isolados de *Beta vulgaris* da Holanda (UB1, VG1, 22R10) e Espanha (19701) foram mais similares ao isolado padrão AG2-2IIIB. Estes isolados de *Beta vulgaris* agruparam-se de acordo com as áreas geográficas, demonstrando um padrão de

subdivisão geográfica na estrutura genética de *Rhizoctonia solani* para aqueles isolados, onde isolados do Japão agruparam-se separadamente dos isolados da Holanda e da Espanha. A similaridade das seqüências de nucleotídeos entre isolados deste grupo 5 foi de 95 a 100% e na seqüência da região ITS1 e 2 foi de 90-100% e 92-100% respectivamente.

Clado 6: Um grande e único grupo compreende isolados de *Beta vulgaris* (Holanda), solo (Espanha), fezes de pássaro (Venezuela), *Glycine max* (Japão), *Juniperus communis* (França), subsolo (Austrália), *Lupinus angustifolius* e os isolados padrão AG-5 (AY154314.1, AF354112), AG2-3 (AY154312.1) e AG-11 (AY154313.1). Isolados de *Glycine max* do Japão (23R01L), (CBS212.84) agruparam com os isolados padrão AG2-3 e AG5, respectivamente. De acordo com Naito et al. (1995), membros do grupo AG2-3 causam queima foliar em soja, enquanto AG5 causa podridão de raiz em soja, feijão e bronzeamento em folhas de gramados (Naiki & Ui, 1981). Isolados de *Beta vulgaris* foi mais similar ao isolado padrão AG-5 (AY154314.1), mas não há relatos de AG-5 em *Beta vulgaris*; este grupo de anastomose é homogêneo e patógeno de solo causando podridão de raiz em tubérculo de batata. De acordo com os resultados aqui obtidos, isolados de *Lupinus angustifolius* (CBS973.96) foram mais similar ao isolado padrão AG-11 (AY154313.1). Kumar et al. (2002) relataram *Rhizoctonia solani* AG-11 causando *damping-off* e podridão severa do hipocótilo de *Lupinus angustifolius* na Austrália entretanto, há relatos de *Rhizoctonia solani* AG-4 e AG-2 em *Lupinus angustifolius* no Canadá (Chang et al., 2005). A similaridade de seqüências de nucleotídeos entre isolados pertencentes a este clado foi de 69-99,7% e de 61,7-99,5% na região da seqüência do ITS1 e de 66,4-99,6% na região do ITS2.

Clado7. Este clado compreende cinco grupos 7A, 7B, 7C, 7D e 7E. O grupo 7A contém isolados de *Glycine Max* (Brasil), *Brassica oleracea* var. *acephala* (Brasil), *Phaseolus vulgaris* (Brasil) e o padrão CAG7 (AF354084). No grupo 7B constam isolados de *Pittosporum tobira* (EUA), *Taxus* sp. (EUA), *Syngonium* sp. (Espanha), *Glycine Max* (Brasil), *Cinnamomum* sp. (EUA). O agrupamento 7C inclui isolados de *Juniperus* sp. (EUA), *Pittosporum tobira* (EUA), *Arachis hypogaea* (Brasil) e os isolados padrão AGU (AB196666) e AGP (DQ279015). O grupo 7D contém isolados de solo (Japão) e os isolados padrão AG7 (AF354098) e AG-8 (AY154303.1). O agrupamento 7E compreende isolados de *Glycine max*

(EUA), *Citrius lanatus*, restos vegetais (Austrália), *Pterostylis acuminata* (Austrália) e os isolados padrão AG12 (1201), AG13A, AG13B e AG13C. Os grupos de anastomose AG-IIA, 1-IB, 1-IC, 2, 2-2, 3, 4, 5 e 7 são relatados como patogênicos a soja (Nelson et al., 1996; Sneh et al., 1991; Yang, 1999; Pope & Carter, 2001). Em soja, o patógeno causa *damping off*, podridão de raiz, podridão de haste, queima foliar e pode causar perdas substanciais no campo (Tachibana et al., 1971). O isolado de soja agrupou com o isolado padrão AG-8 (AY154303.1); causa podridão de raiz em cereais, é caracterizado por desenvolver manchas circulares ou ovais e ou plantas cloróticas que produzem pequenos ou nenhum grão. *Rhizoctonia* spp., isolado de melancia, nesse trabalho agrupou com o padrão AG-8, embora isolados dos EUA tenham sido identificados como AG-7 (Pope & Carter, 2001); entretanto, isolados do Brasil agruparam com AGG (clado9) explicação para tal fato, pode estar nos diferentes sintomas em melancia. Neste grupo 7E, isolados de *Pterostylis acuminata* e restos vegetais, ambos da Austrália, foram similares ao isolado padrão AG-12. Neste grupo de anastomose, a maioria das espécies de *Rhizoctonia* conhecidas participam de relações com orquídeas e são binucleadas tendo o gênero *Ceratobasidium* como teleomórfo. De qualquer modo, comparativamente não freqüente, *Rhizoctonia* multinucleada também tem sido isolado de orquídeas micorrízica (Currah, 1987; Warcup & Talbot, 1967). Isolados micorrízicos de AG-12 provocaram pequenos danos em plântulas de batata e cevada, danos moderados em alface e extensivos danos em plântulas de couve-flor e rabanete (Carling et al., 1999). Isolados de *Juniperus* sp e *Pittosporum tobira* foram mais similares ao isolado padrão AGU (AB196666) e eles são relatados como pertencentes ao AGE (CAG-3) e AGS (CAG-7), respectivamente (González et al., 2000). AGU foi caracterizado como causando podridão de colo e raiz em mini rosas, enquanto que isolados de *Pittosporum tobira* causam queima foliar. Isolado de amendoim foi mais similar ao padrão AGP, mas doenças induzidas por *Rhizoctonia* AG-4 em amendoim incluem podridão de sementes, *damping -off* pré e pós-emergência, necrose do hipocótilo e da raiz, podridão da vagem e queima foliar em plantas maduras. Isolados de soja, couve e feijão foram mais similares com o isolado padrão AGS (AF354084) no caso da soja, foi relatado *Rhizoctonia* AG-A binucleado na China (Yang et al., 2005). Kuramae (dados não publicados) encontrou isolados de couve filogeneticamente mais similar ao isolado padrão CAG 7 (AF354084), com similaridade de 96,8 a 97%. Balali & Kowsari (2004) obtiveram cultura pura de *Rhizoctonia solani* isolada de feijão e foi identificada como

AG-4. Entretanto, Kuramae et al. (2002) relataram isolados de *Rhizoctonia* binucleada causando *damping-off* em feijão, embora o grupo de anastomose não foi relatado. No clado 7B, isolados de *Pittosporum*, *Taxus* sp, *Syngonium* sp., *Glycine max* foram mais similares ao isolado padrão CAG7. González et al. (2000), relataram isolados de *Pittosporum*, *Taxus*, *Juniperus* pertencentes ao grupo CAG-7, CAG-5 e CAG-3, respectivamente. A similaridade de seqüência dentro do agrupamento foi de 85 a 100% e na seqüência da região ITS1 foi de 74,7-100% e de 88,6-93,7% no ITS2.

Clado 8: Análise “neighbor Joining” de distância genética derivado do alinhamento foi capaz de agrupar os isolados em dois grupos 8A e 8B. O grupo 8A compreende isolados de *Glycine max* (Brasil), *Raphanus sativus* L, *Eichhornia azurea* (Panamá), *Gladiolus* sp (Holanda), *Fragaria vesca* (Espanha) e os isolados padrão AG1-IA (AY154301.1) e AG-1-IC (AY154300.1). A maioria dos isolados de soja se agrupou e foi mais similar ao AG1-IA. Este resultado está de acordo com Atkins & Lewis (1954) e Fenille et al. (2003), que identificaram isolados de *Rhizoctonia solani* de Lousiana e do Brasil causando queima foliar como AG1-IA. Membros deste AG são caracterizados por infectar parte aérea causando queima foliar em plantas de arroz, bronzeamento em folhas de milho, sorgo e soja (Yang et al., 1988). Entretanto, Yang et al. (2005) relataram também AG-A *Rhizoctonia* binucleada patogênica a soja na China. Isolados de *Gladiolus* sp. e *Fragaria vesca* foram mais similares ao isolado padrão AG1-IC. Não há relatos de *Rhizoctonia solani* associado à *Fragaria vesca*; acredita-se que o complexo AGs –A, -G e I (Martin, 2000) esteja associado com doenças do morango. As seqüências de nucleotídeos da região ITS mostraram elevada similaridade entre isolados pertencentes a este *cluster*, em torno de 95-100%. Análise filogenética da seqüência do ITS dividiram os isolados de *Rhizoctonia* de soja dentro de um bem suportado grupo correspondendo com os isolados de soja do Brasil e a similaridade da seqüência de nucleotídeos da região ITS1 foi de 86-100% e de 98-100% no ITS2 entre aqueles isolados. O clado 8B compreende isolados de *Lactuca sativa* (Brasil), *bentgrass*, *Beta vulgaris* (Japão), *Coleus* sp, *Daucus carota*, (Holanda), *Glycine max* (Brasil) e o isolado padrão AG1-IB (AY154302.1). Kuramae et al. (2003), e Grosch et al. (2004), relataram, no Brasil e na Alemanha a ocorrência de AG1-IB causando podridão de colo em alface. Na Alemanha, *R. solani* em alface tem sido um problema crescente, 19 maiores áreas produtoras tem sido

severamente infectadas (Kofoet et al., 2001). Membros deste grupo são caracterizados por infecção aérea, causando queima foliar em plantas de arroz, feijão e soja (Jones & Belmar, 1989) e alface (Ozawa, 1977). Isolados obtidos de grama (*Agrostis stolonifera*) foram relatados desenvolvendo anéis marrons em plantas afetadas por *Waitea circinata* var. *circinata*. Considerável variação foi observada na seqüência de nucleotídeos de isolados pertencentes a este grupo 8B, a similaridade foi de 87-98% e a similaridade de seqüências de nucleotídeos da região ITS1 foi de 77-99% e de 91-98% na região do ITS2.

Clado 9: Neste clado, há sete grupos distinguíveis: 9A, 9B, 9C, 9D, 9E, 9F e 9G. O grupo 9A compreende isolados de *Ceratobasidium gramineum* (Japão), *Ceratobasidium cornigerum* (Austrália) e os isolados padrão AGD (DQ279060) e AGDI (AB196643). O grupo 9B contém isolados de *Arachis hypogea* (Brasil), *Glycine max* (Canadá) e os padrões AGI (DQ279064) e AGH (DQ279065). De acordo com esse estudo, isolados de amendoim do Brasil foram mais similares aos isolados padrão AGH e AGI. Embora Ceresini et al. (1996) determinaram previamente, isolados de amendoim como binucleados, mas não caracterizaram o grupo de anastomose a que pertencem mas determinaram a patogenicidade daqueles isolados, mas relataram causando sintomas de podridão de vagem, dessa maneira, possivelmente esses isolados podem pertencer ao grupo de anastomose AGH ou AGI. De acordo com Sneh et al. (1991) o grupo de anastomose AGH, tem sido relatada como doenças não específicas e membros do grupo AGI são caracterizados por causar podridão de raiz em morango (Ogoshi et al., 1979) e sendo que alguns isolados deste grupo formam associação micorrízicas com orquídeas. Seqüências de nucleotídeos da região ITS apresentaram similaridade entre os isolados pertencentes a este *cluster* de 67-98%. A similaridade da seqüência da região ITS1 foi de 30-96% e 42-100% na região ITS2 entre os isolados pertencentes a esse agrupamento. O agrupamento 9C inclui isolados de *Oryzae-sativa* e os isolados padrão AGBb (DQ279058), AGBa (DQ279059) e AGS(AB196656). O agrupamento 9D compreende isolados de *Ceratobasidium noxium*- *Coffea* sp. (Índia), *Ceratobasidium pseudocornigerum*-*Pterostylis mutica* (Austrália), *Ceratobasidium anceps*-*Pteridium aquilinum*. O grupo 9E inclui isolados de *Ceratobasidium cornigerum*-*Sarcochilus dilatatus* (Austrália), *Ceratobasidium globisporum*-*Trichoglottis australiensis* (Austrália), *Ceratobasidium sphaerosporum*-*Pomatocalpa macphersonii* (Austrália). O grupo 9F contém isolados de *Phaseolus vulgaris*

(Brasil), *Ceratobasidium cornigerum* (USA), *Arachis hypogea* L. (Brasil), *Thanatephorus cucumeris*, *Glycine max* (Brasil), *Fragaria* sp. (Brasil), *Phaseolus vulgaris* (Brasil) e os isolados padrão AGBo (DQ279057), AGA (AB196640), AGT (AB196663) e AGK (DQ279056). Isolados de amendoim e soja, feijão do Brasil foram mais similares com os padrões AGK e AGBo, respectivamente. Aqueles isolados foram caracterizados como *Rhizoctonia* spp. binucleado, mas não se determinou o grupo de anastomose a que pertencem (Kuramae et al. 2002; Ceresini et al., 1996). Membros deste AGK usualmente são isolados de plântulas de beterraba (Uchino et al., 1983), rabanete, tomate, cenoura e cebola (Ichielevich-Auster et al., 1985) e cereais (Roberts & Sivasithamparam, 1986), causando podridão de vagem de amendoim (Ceresini et al., 1996). O AGBo é caracterizado por causar manchas agregadas da bainha de arroz (Hashioka, 1970) e queima da bainha do arroz (Oniki et al., 1985). Isolados de morango do Brasil foram caracterizados por Nakatani et al. (2004) como mais similares aos isolados padrão AGA e AGBo, causando podridão da raiz em plantas de morango. Recentemente, foram incluídos mais isolados padrão de anastomose que estavam disponíveis no GenBank e estes isolados agruparam-se com o isolado AGT. Foi relatado AGT causando podridão de raiz em flores de corte e mini rosas (Hyakumachi et al., 2005). *Rhizoctonia* spp. binucleada foi também recuperada de raiz de plantas de morango desenvolvidas em solos não fumigados na região da costa central da Califórnia e acredita-se estar associado com o complexo da doença AGs-A, -G, e -I causando podridão negra da raiz (Martin, 2000). A similaridade de seqüências entre isolados desse agrupamento foi de 86-99% e foi observado 75 a 99% de similaridade nas seqüências de nucleotídeos da região ITS1 e 85-99% na região do ITS2. O clado 9G compreende isolados de *Solanum tuberosum* (Espanha), *Smallanthus sonchifolius* (Brasil), *Citrullus lanatus* (thunb.) Matsum & Nakai, Brasil, *Phaseolus vulgaris* (Brasil) e os isolados padrão AGG (DQ279049), AGC (DQ279046), AGL (DQ279047) e AGO (DQ279045). Isolados de melancia, batata e yacon foram mais similares ao isolado padrão AGO. Isolados de *Rhizoctonia* spp. de melancia foram caracterizados causando podridão aquosa em frutos e a análise das seqüências mostraram maior similaridade com os isolados padrão AGG e AGO (Ambrosio et al., 2005) no Brasil, entretanto isolados dos EUA foram identificados como pertencentes ao grupo AG-7. Fenille et al. (2005), identificaram isolados de *Rhizoctonia* de raiz de yacon e confirmaram por teste de patogenicidade como sendo agente causal da podridão do tubérculo. Isolados de batata da

Espanha agruparam-se com o isolado padrão AGO, este é o primeiro relato de *Rhizoctonia* binucleada causando doença na cultura da batata, mas este trabalho não inclui o teste de patogenicidade deste isolados para relatar o sintoma na planta. Análise filogenética da seqüência de nucleotídeos da região ITS revelou similaridade de 94-98% e dentro da região ITS1 as seqüências de similaridade foi de 92-99% e de 92-98% na região ITS2. O grupo 9H contém isolados de *Waitea circinata*, *Ceratobasidium oryzae*, *Rhizoctonia zea*, *Ceratobasidium stevensii*, *Epulorhiza anaticula*, *Serendipita vermifera* e *Sistotrema brinkmanni* (“out group”). Todos os isolados desse agrupamento são binucleados.

6.1.1 Análise dos clones da região ITS1-5.8S-ITS2 gerados dos isolados CBS316.84 (*Waitea circinata*) e CBS569.83 (*Ceratobasidium globisporum*)

A análise das seqüências dos clones da região ITS1-5.8S-ITS2 gerados dos isolados CBS 316.84 e CBS 569.83 demonstraram a existência de variação na região ITS das seqüências desses clones. Eles apresentaram uma identidade em porcentagem, de 94,9 a 100 % entre os clones do isolado CBS 316.84 e de 91,9 até 100 % para os clones do isolado CBS569.83 (Tabela 3 e 4). Os números de 1 a 10 da tabela três representam os 10 clones (1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12, 13, 15) utilizados nesse estudo e acrescidos da terminação SP6 que representa o “primer” utilizado. Os números de 1 a 9 da tabela quatro representam os 10 clones (21, 22, 23, 24, 25, 27, 33, 34, 35) utilizados nesse estudo e acrescidos da terminação SP6, que foi o “primer” utilizado.

Tabela 3. Porcentagem de identidade e índice de divergência entre as seqüências dos clones do isolado CBS316.84.

| | | Percent Identity | | | | | | | | | | | |
|------------|-----------|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| Divergence | 1 | █ | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 99.7 | 98.7 | 98.1 | 98.1 | 98.1 | 94.9 | 1 | 15SP6 |
| | 2 | 0.0 | █ | 100.0 | 100.0 | 99.7 | 98.7 | 98.1 | 98.1 | 98.1 | 94.9 | 2 | 11SP6 |
| | 3 | 0.0 | 0.0 | █ | 100.0 | 99.7 | 98.7 | 98.1 | 98.1 | 98.1 | 94.9 | 3 | 12SP6 |
| | 4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | █ | 99.7 | 98.7 | 98.1 | 98.1 | 98.1 | 94.9 | 4 | 3SP6 |
| | 5 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | █ | 98.4 | 97.8 | 97.8 | 97.8 | 94.9 | 5 | 1SP6 |
| | 6 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 1.0 | █ | 98.7 | 98.7 | 98.7 | 95.5 | 6 | 2SP6 |
| | 7 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.3 | 1.0 | █ | 100.0 | 100.0 | 96.8 | 7 | 10SP6 |
| | 8 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.3 | 1.0 | 0.0 | █ | 100.0 | 96.8 | 8 | 13SP6 |
| | 9 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.3 | 1.0 | 0.0 | 0.0 | █ | 96.8 | 9 | 5SP6 |
| | 10 | 3.7 | 3.7 | 3.7 | 3.7 | 3.7 | 3.6 | 2.6 | 2.6 | 2.6 | █ | 10 | 4SP6 |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |

Tabela 4. Porcentagem de identidade e índice de divergência entre as seqüências dos clones do isolado CBS569.83.

| | | Percent Identity | | | | | | | | | | |
|------------|----------|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | | |
| Divergence | 1 | █ | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 91.9 | 91.9 | 91.9 | 91.9 | 98.6 | 1 | 22SP6 |
| | 2 | 0.0 | █ | 100.0 | 100.0 | 91.9 | 91.9 | 91.9 | 91.9 | 98.6 | 2 | 33SP6 |
| | 3 | 0.0 | 0.0 | █ | 100.0 | 91.9 | 91.9 | 91.9 | 91.9 | 98.6 | 3 | 23SP6 |
| | 4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | █ | 91.9 | 91.9 | 91.9 | 91.9 | 98.6 | 4 | 21SP6 |
| | 5 | 7.6 | 7.6 | 7.6 | 7.6 | █ | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 93.2 | 5 | 27SP6 |
| | 6 | 7.6 | 7.6 | 7.6 | 7.6 | 0.0 | █ | 100.0 | 100.0 | 93.2 | 6 | 34SP6 |
| | 7 | 7.6 | 7.6 | 7.6 | 7.6 | 0.0 | 0.0 | █ | 100.0 | 93.2 | 7 | 24SP6 |
| | 8 | 7.6 | 7.6 | 7.6 | 7.6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | █ | 93.2 | 8 | 25SP6 |
| | 9 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 6.5 | 6.5 | 6.5 | 6.5 | █ | 9 | 35SP6 |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | | |

Esta variação de identidade pode ser melhor entendida, observando-se alguns pontos no alinhamento, onde se encontra polimorfismos de único nucleotídeo, inserções e deleções de um ou mais nucleotídeos (Figura 2 e 3).

```

*****
15SP6 TGGATAATGAGAGAAAAGTTAGTCTTTCACCTCTGTT--GAAACCGGTTTACTATGTTTTTTTATACACACACA--ATAGTCATTGAATG
12SP6 TGGATAATGAGAGAAAAGTTAGTCTTTCACCTCTGTT--GAAACCGGTTTACTATGTTTTTTTATACACACACA--ATAGTCATTGAATG
3SP6 TGGATAATGAGAGAAAAGTTAGTCTTTCACCTCTGTT--GAAACCGGTTTACTATGTTTTTTTATACACACACA--ATAGTCATTGAATG
11SP6 TGGATAATGAGAGAAAAGTTAGTCTTTCACCTCTGTT--GAAACCGGTTTACTATGTTTTTTTATACACACACA--ATAGTCATTGAATG
1SP6 TGGATAATGAGAGAAAAGTTAGTCTTTCACCTCTGTT--GAAACCGGTTTACTATGTTTTTTTATACACACACA--ATAGTCATTGAATG
2SP6 TGGATAATGAGAGAAAAGTTACTCTTTCACCTCTGTT--GAAACCGGTTTACTACGTTTTTTTATACACACACA--ATAGTCATTGAATG
13SP6 TGGATAATGAGAGAAAAGTTAGTCTTTCACCTCTGTT--GAAACCGGTTTACTACGTTTTTTTATACACACACA--ATAGTCATTGAATG
10SP6 TGGATAATGAGAGAAAAGTTAGTCTTTCACCTCTGTT--GAAACCGGTTTACTACGTTTTTTTATACACACACA--ATAGTCATTGAATG
5SP6 TGGATAATGAGAGAAAAGTTAGTCTTTCACCTCTGTT--GAAACCGGTTTACTACGTTTTTTTATACACACACA--ATAGTCATTGAATG
4SP6 TGGATAATGAGAGAAAAGTTAGTCTTTCACCTCTGTT--GAAACCGGTTTACTACGTTTTTTTATACACACACA--ATAGTCATTGAATG

```

Figura 2. Fragmento do alinhamento das seqüências dos clones do isolado CBS316.84.

```

*****
22SP6 CACTTGTTAGATGGAGACCTTTGTAGACTCTCTCTTCCCTTGGAGAGGAGTCGGTCTCCGTCTGCCATCACAC
33SP6 CACTTGTTAGATGGAGACCTTTGTAGACTCTCTCTTCCCTTGGAGAGGAGTCGGTCTCCGTCTGCCATCACAC
23SP6 CACTTGTTAGATGGAGACCTTTGTAGACTCTCTCTTCCCTTGGAGAGGAGTCGGTCTCCGTCTGCCATCACAC
21SP6 CACTTGTTAGATGGAGACCTTTGTAGACTCTCTCTTCCCTTGGAGAGGAGTCGGTCTCCGTCTGCCATCACAC
27SP6 CACTTGTTAGATGGAGGCCCTTGTAGGCTCATCTCTTTGAGGAGAGGGGCTGGTCTCCGTCTGCCATCACAC
34SP6 CACTTGTTAGATGGAGGCCCTTGTAGGCTCATCTCTTTGAGGAGAGGGGCTGGTCTCCGTCTGCCATCACAC
24SP6 CACTTGTTAGATGGAGGCCCTTGTAGGCTCATCTCTTTGAGGAGAGGGGCTGGTCTCCGTCTGCCATCACAC
25SP6 CACTTGTTAGATGGAGGCCCTTGTAGGCTCATCTCTTTGAGGAGAGGGGCTGGTCTCCGTCTGCCATCACAC
35SP6 CACTTGTTAGATGGAGACCTTTGTAGACTCTCTCTTCCCTTGGAGAGGAGTCGGTCTCCGTCTGCCATCACAC

```

Figura 3. Fragmento do alinhamento das seqüências dos clones do isolado CBS569.83.

Analisando o polimorfismo das seqüências de DNA da região ITS foram encontrados em determinados sítios de polimorfismo de até 7% para os clones do isolado CBS316.84 (Figura 4) e um polimorfismo de até 4 % para os clones do isolado CBS569.83 (Figura 5).

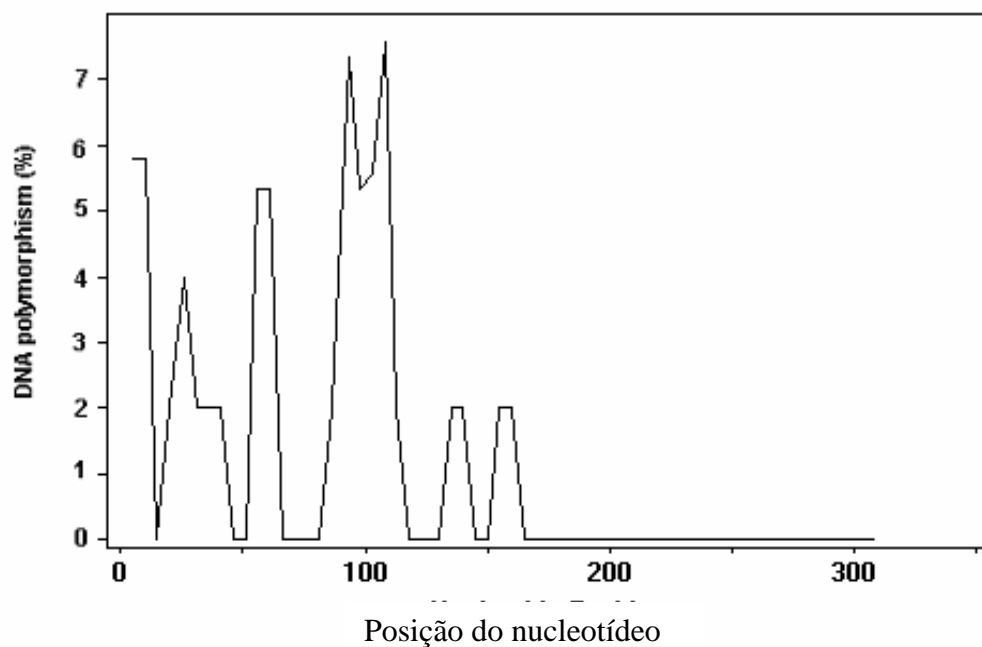


Figura 4. Polimorfismo da seqüência de DNA da região ITS dos clones do isolado CBS316.84

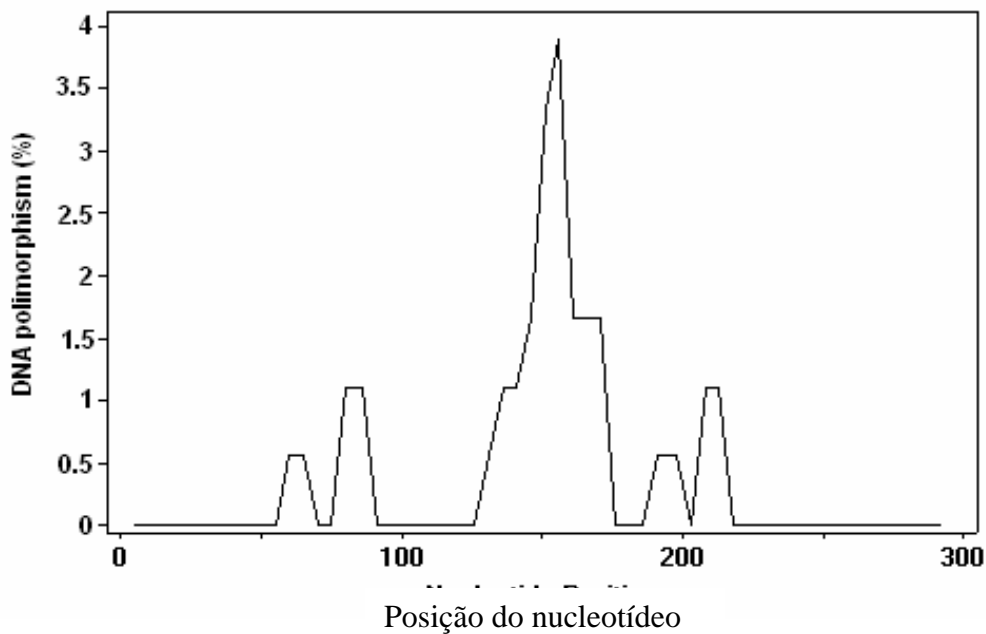


Figura 5. Polimorfismo da seqüência de DNA da região ITS dos clones do isolado CBS569.83

Na análise da árvore filogenética dos clones do isolado CBS316.84, observa-se à formação de 5 clados distintos, onde no primeiro clado estão agrupados os clones 11SP6, 3SP6, 15SP6 e 12SP6 (Figura 6) os quais possuem identidade de 100% entre elas (Tabela 3). No segundo e terceiro clado encontram-se os clones 1SP6 e 2SP6 que possuem 99,7 e 98,7% de identidade com o clado anterior, respectivamente. No quarto clado encontram-se os clones 10SP6, 13SP6 e 5SP6, ambos com 100% de identidade entre si, e com 98,5% de identidades, media, com os clados anteriores. O clone 4SP6 do isolado CBS316.84 apresentou-se distante filogeneticamente. Por se tratar de um clone do isolado CBS316.84 esperava-se uma maior similaridade, visto que sua identidade variou de 94,9 a 96,8%, variação aceita quando se trata de isolados distintos da mesma espécie (González et al., 2001). Embora não era esperado uma variação em seqüências obtidas de um mesmo isolado, demonstrando a existência de uma heterogeneidade para a região ITS. A heterogeneidade encontrada, pode estar correlacionada com a heterogeneidade do conteúdo genético dos núcleos encontrados em cada célula. Toda et al. (2005) compararam um isolado de *Rhizoctonia* spp. de grama que exibiu um sintoma diferente, com *Waitea circinata* var. *oryzae*, var. *zeae*, var. *circinata* e este agruparam com o *Waitea circinata* var. *circinata* e foi relatado como causador da nova doença em grammas, oque demonstra uma grande variação do agente causal.

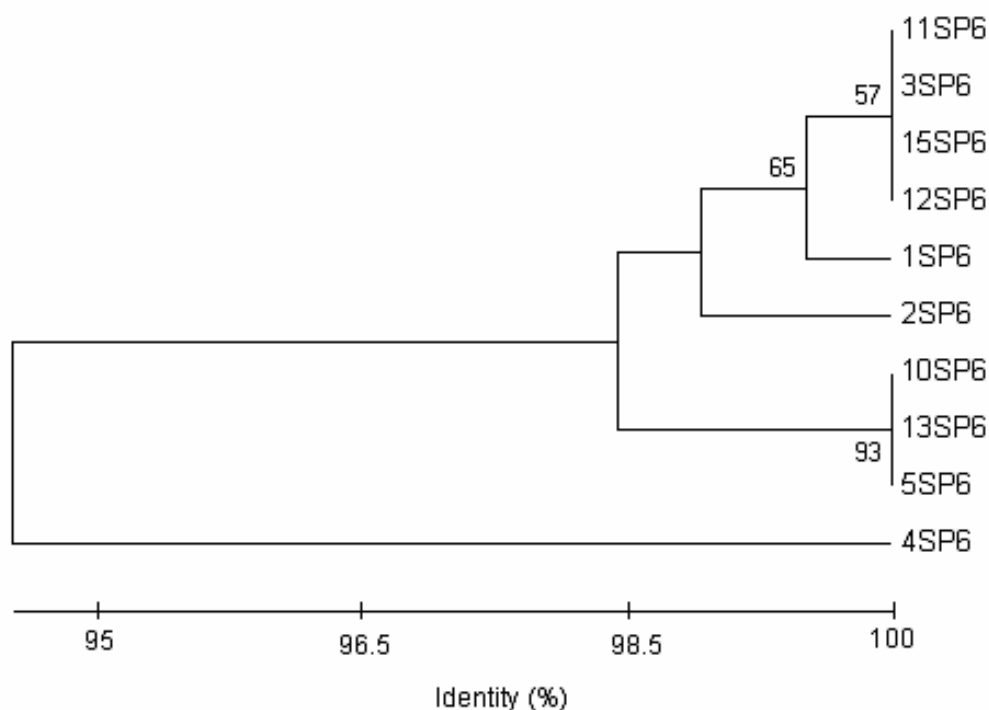


Figura 6. Cladograma obtido do alinhamento das seqüências da região ITS dos clones do isolado CBS316.84 (*Waitea circinata*), gerado com 5000 "bootstrap", através do método de UPGMA e modelo de substituição de Kimura 2.

Na análise dos clones do isolado CBS569.83 podemos observar a formação de três clados (Figura 7), considerando uma linha imaginária em 98% de identidade temos a formação de dois clados distintos, sendo que o primeiro com os isolados 22SP6, 33SP6, 23SP6, 21SP6 e 35SP6, com similaridade entre estes variando de 98,6 a 100%. Já no segundo clado agruparam-se os isolados 27SP6, 34SP6, 24SP6 e 25SP6 com uma identidade de 100%. Na análise entre os dois clados temos que a similaridade foi de 91,9%, o que evidencia novamente a heterogeneidade desta região para um indivíduo que apresenta 2 núcleos distintos, podendo-se apresentar a hipótese que cada núcleo possa pertencer a um grupo de anastomose distinto.

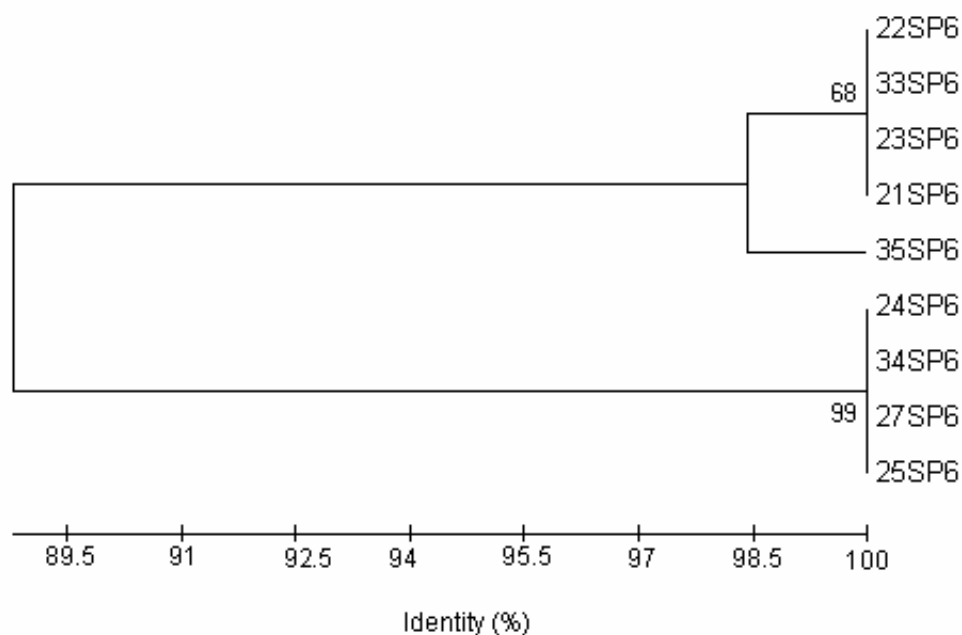


Figura 7. Cladograma obtido do alinhamento das seqüências da região ITS dos clones do isolado CBS569.83 (*Ceratobasidium globisporum*), gerado com 5000 "bootstrap", através do método de UPGMA e modelo de substituição de Kimura 2.

6.2 Diversidade genética de *Rhizoctonia* spp. através do seqüenciamento dos genes ATP sintase subunidade 6 mitocondrial (ATP6), fator de alongação 1-alpha, RNA polimerase 2 e a região ITS (espaço interno transcrito).

Os 44 isolados selecionados previamente, no cladograma gerado pelo gene ITS1-5.8S-ITS2 foram certificados quanto a amplificação dos fragmentos de DNA, com os pares de "primers" ATP6, EF-1 α , RPB2 e ITS, algumas dessas amplificações estão apresentadas na Figura 8. Os produtos das amplificações tinham em média: 800pb, 500pb, 800pb, 700 gerados com os "primers" ATP6, EF-1 α , RPB2 e ITS respectivamente. Após a amplificação dos fragmentos de DNA, estes foram submetidos a reação de seqüenciamento.

Os fragmentos gerados pelos respectivos pares de "primers" de cada isolado foram unidos e obtida as seqüências consenso, utilizando o programa computacional SeqMan version 5.03 (DNASStar, Madison, WI, U.S.A) e quando necessários corrigidos

manualmente. As seqüências consenso foram alinhadas pelo programa Clustal W (Thompson et al., 1994).

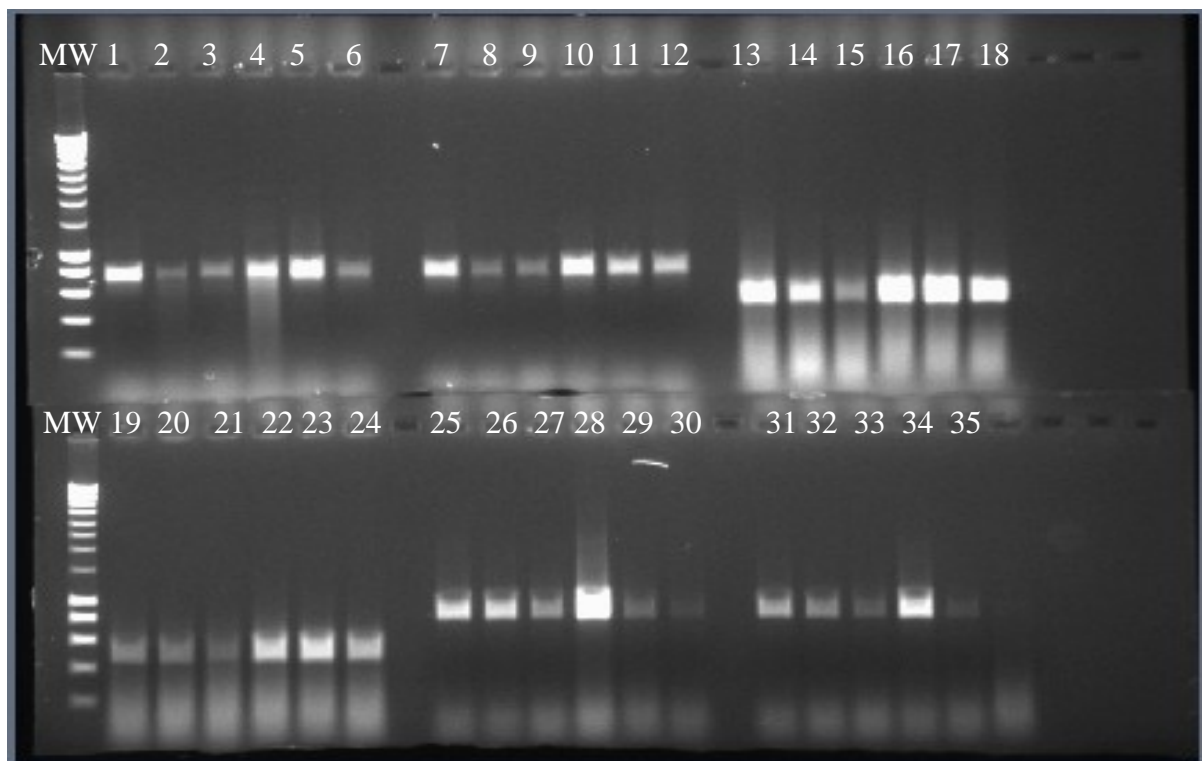


Figura 8. Padrão de fragmentos gerados pela amplificação dos fragmentos de DNA de *Rhizoctonia* spp., com os pares de “primers” ATP61 e ATP62, MW-Marcador Molecular smartladder (10 kb), 1= CBS200.25, 2= ESP3, 3= SJ02, 4= SJ07, 5= TO1, 6= TO4, 7= CBS136.82, 8= CBS438.80, 9= CBS571.83, 10= CBS700.82, 11= AG1-IC, 12= AG5; TEF1-F e TEF1-R, 13= AG2-2IV, 14= AG4-HGIII, 15= AGBa, 16= CBS101.782, 17= CBS207.84, 18= ESP3, 19= SJ07, 20= SJ57, 21= TO4, 22= CBS136.82, 23= CBS189.90, 24= AGK; RPB2-6F e RPB2- 7.1R, 25= CBS101.782, 26= SJ34, 27= AG1-IB, 28= AG3, 29= AG5, 30= AG7, 31= CBS101.782, 32= CBS206.84, 33= CBS970.96, 34= TO1, 35= CBS154.35.

A árvore filogenética baseada na análise “neighbor-joining” gerada a partir das seqüências do gene ATP sintase subunidade 6 mitocondrial (ATP6) foi capaz de agrupar os 44 isolados em três clados (Figura 9). No **clado 1A** agruparam isolados de brasel (USA), pau-incenso (USA), algodão (Turquia) e os padrões AG6-HGI, AG7 e AG4-HGII. Há relatos de isolados de pau incenso como pertencente ao grupo CAG-7 (AGR) (González et al., 2000). O **clado 1B** compreende isolados de soja (Brasil) e o padrão de anastomose AG2-2IV. O **clado 1C** inclui isolados de margaridinha do campo (USA) e os padrões de anastomose AGE e AG1-IB. O **clado 1D** compreende isolados de *Pittosporum tobira* (planta ornamental) (USA), junipero (USA) e o padrão de anastomose AGP. O **clado 1E** apresenta isolados de soja (Brasil), tomate, trigo (Austrália) e o padrão de anastomose AG-4HGI, confirmando os resultados encontrados por Fenille et al. (2003) e Kuramae et al. (2003) nas culturas de soja e tomate causando podridão do hipocótilo. Esse grupo de anastomose é patógeno de ampla gama de hospedeiros, de parte subterrânea e causa *damping off* e podridão de raiz em várias culturas. O **clado 2A** compreende isolados de orquídea (Austrália, Canadá), aguapé, *Serendipita vermifera* (Austrália), maçã (USA), cafeeiro (Índia) e o padrão de anastomose AGO. Isolados de plantas de café foram relatados os grupos de anastomose AG-4HGI (Sussel et al., 2001) e AG-1-ID (Priyatmojo et al., 2001). O **clado 2C** inclui isolado de haste de planta de batata (USA), tremoço azul (Japão) e raiz de batata e os padrões de anastomose AG9, AG3, AGA e AGBO. O isolado da haste de planta de batata (CBS970.96) agrupou com o padrão AG9 enquanto o isolado de batata de raiz (CBS200.25) agrupou com o padrão de anastomose AG3. Tradicionalmente, AG3 é considerado um grupo homogêneo de hospedeiro específico (Anderson, 1982; Ceresini et al., 2002) causando cancrios em raiz e brotos em batatas. No **clado 3** agruparam isolados de soja (Brasil, Canadá) e os padrões AGG e AG1-IC. Os isolados de soja SJ57 e CBS 140.82 desse clado foram mais similares ao padrão AGG. Há relatos na literatura de AGA binucleado de *Rhizoctonia* patogênico em soja, na China (Yang et al., 2005).

Com base na matriz de similaridade das seqüências do gene fator de alongação 1-alpha (EF-1 α) foi possível agrupar os isolados em cinco clados (Figura 10). No **clado 1** agruparam isolados de orquídea (Canadá), brasel (USA), *Juncus* sp. (Japão), haste de plantas de batata (USA), margaridinha do campo (USA), cafeeiro (India), aguapé

(Panamá) e os padrões de anastomose AGO, AGQ, AGG, AGA, AGBO. Foram relatados isolados de *Rhizoctonia* AGD, causando podridão da haste em *Juncus effusus* L. var. *decipiens* Buch (Ikata & Yoshida, 1940). Rosa et al. (2005) relataram isolados de batata com elevado grau de similaridade ao grupo AG4-HGI e II, causando danos na haste e provocando *damping off*. Em plantas de café foram relatados isolados do subgrupo AG4-HGI causando lesões no colo da plântula que podem evoluir e causar o estrangulamento e posterior morte da planta (Sussel et al., 2001). Também foi relatado *Rhizoctonia solani*, AG1-ID em folhas de café com sintomas de manchas circulares ou irregulares e áreas com manchas necróticas (Priyatmojo et al., 2001). No **clado 2** encontram-se isolados de soja (Canadá, Brasil), orquídea (Austrália), maçã (USA), tremoço azul (Japão) e os padrões AG1-IB, AG1-IC e AG-9. Isolados do subgrupo AG1-IC são caracterizados como patógenos de solo e causam *damping off* em hospedeiros como cenoura (Grisham & Anderson, 1983), linho (Garza-Chapa & Anderson, 1966), soja e pinheiro (Parmeter et al., 1969). Fenille et al. (2003) identificaram isolados de *Rhizoctonia solani* causando queima foliar em soja como pertencentes ao subgrupo AG1-IA e causando podridão de hipocótilo o subgrupo AG4-HGI. O **clado 3** compreende isolados de soja (Brasil), pau-incenso (USA), teixo (USA), algodão (Turquia), raiz de batata, trigo (Austrália), *Serendipita vermifera* (Austrália) e os padrões AG2-2IV, AGBa, AG3. González et al.(2000) relataram isolados de pau-incenso e teixo, pertencentes ao grupo CAG-7 (AGR) e CAG-5 (AGS), respectivamente. *Rhizoctonia solani* Kühn grupo de anastomose 3 correspondendo a doenças associadas com batata e tabaco. No **clado 4** encontram-se isolados de tomate (Brasil), soja (Brasil) e os padrões de anastomose AG4-HGII, AG4-HGI, AG6-HGI e AG7. Isolados de tomate em acordo com Kuramae et al.(2003) podem apresentar reação positiva com os isolados padrão AG4-HGI, HGII e HGIII. Os grupos de anastomose AG1-IA, 1-IB, 1-IC, 2, 2-2, 3, 4, 5 e 7 são relatados como patogênicos a soja (Nelson et al., 1996; Sneh et al., 1991; Yang, 1999; Pope & Carter, 2001). O subgrupo AG4-HGI em soja é caracterizado como causador de podridão do hipocótilo (Fenille et al., 2003). O **clado 5** inclui isolados de *Pittosporum tobira* (USA, ornamental), junipero (USA) e os padrões de anastomose binucleados AGE e AGP. Isolados de junipero e *Pittosporum tobira* são relatados como pertencentes ao AGE (CAG-3) e AGS (CAG-7), respectivamente (González et al., 2000).

No cladograma gerado pela análise “neighbor-joining”, obtido dos 44 alinhamentos das seqüências dos gene fator de alongação 1-alpha (EF) (Figura 10), nos cladogramas 3, 4 e 5 foi possível observar os agrupamentos de acordo com os respectivos grupos de anastomose descritos na literatura como o isolado de soja AG2-2IV (clado3), isolados de tomate e soja AG4-HGI (clado 4) e isolados de junipero AGE (clado 5). De acordo com este agrupamento, alguns isolados não foram descritos como pertencentes aos respectivos grupos de anastomose, sendo necessário o aumento no número daqueles isolados para a confirmação do grupo de anastomose. Na análise geral desse gene, observou-se que os isolados e os padrões de anastomose tenderam a separar em binucleados e multinucleados com exceção ao padrão de anastomose AGBa que agrupou com padrões multinucleados (clado 3). Através de cladogramas baseados em seqüências de EF-1 α e mtSSU rDNA foi possível resolver cinco linhagens distintas de *Fusarium oxysporum* f sp. *gladioli* (Baayen et al., 2000).

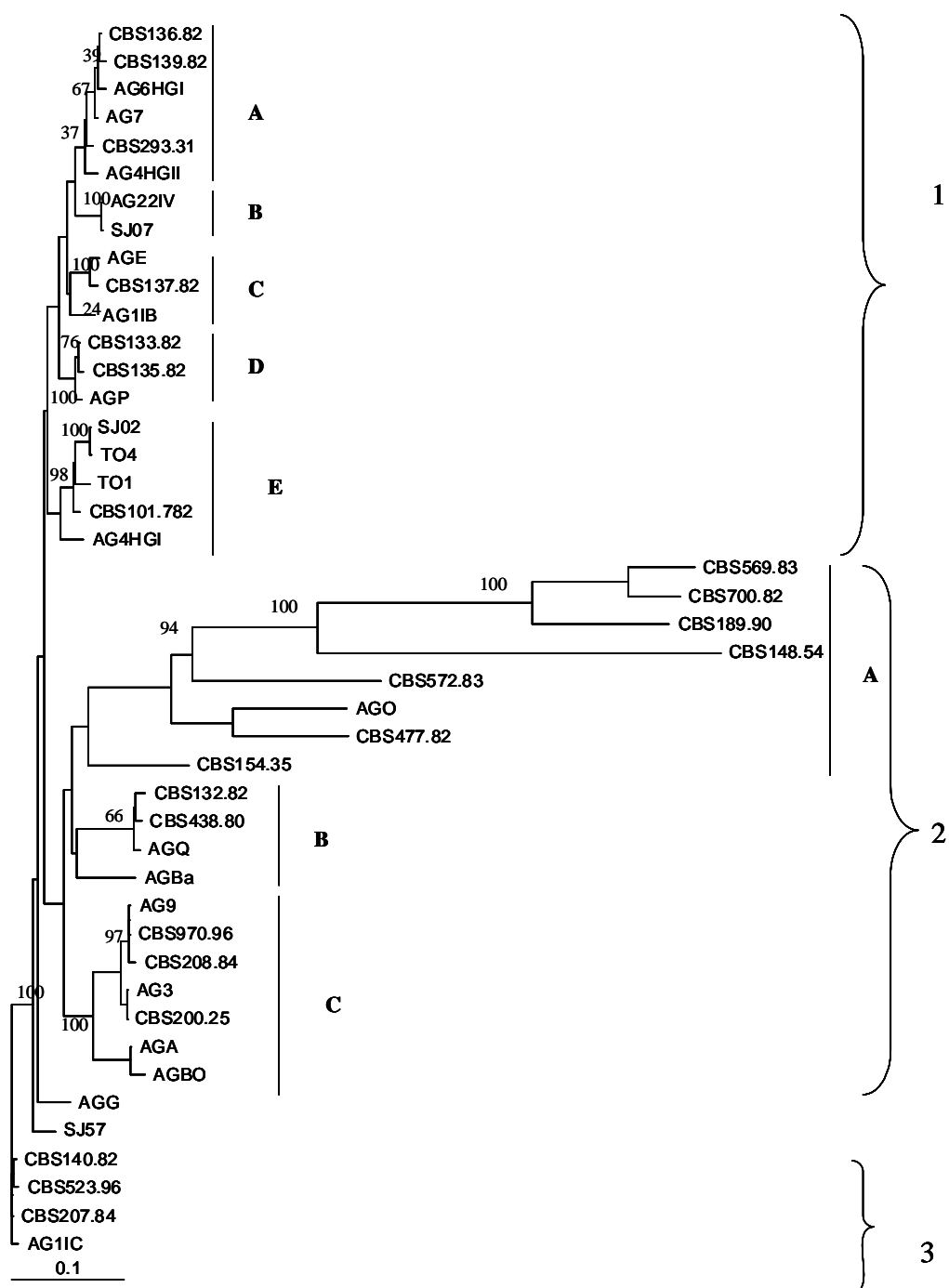


Figura 9. Cladograma gerado pela análise “neighbor-joining” obtido dos 44 alinhamentos das seqüências dos gene sintase subunidade 6 mitocondrial (ATP6) de isolados de *Rhizoctonia* spp.

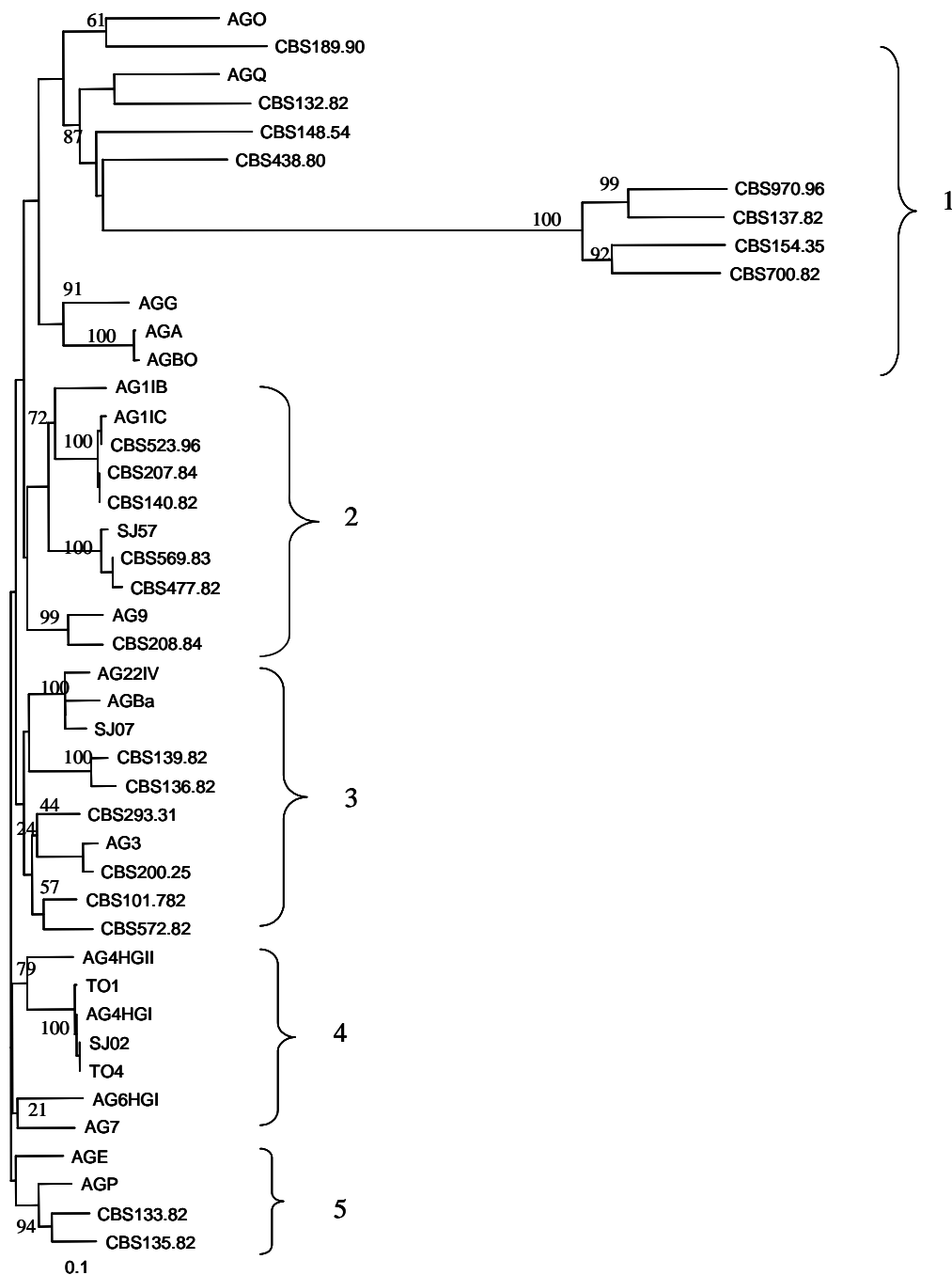


Figura 10. Cladograma gerado pela análise “neighbor-joining” obtido dos 44 alinhamentos das seqüências dos gene fator de alongação 1- α (EF) de isolados de *Rhizoctonia* spp.

A árvore filogenética gerada a partir das seqüências do gene RNA polimerase 2 (RPB2) agrupou os 44 isolados de *Rhizoctonia* spp. e os padrões de anastomose em oito clados (Figura 11). O **clado 1** compreende isolados de margaridinha do campo (USA), tremoço azul (Japão), soja (Brasil, Canadá), aguapé (Panamá), trigo (Austrália), *Juncus* sp. (Japão), orquídea (Austrália, Canada), algodão (Turquia) e os padrões de anastomose AGE, AGP, AGA e AGG. Em *Lupinus angustifolius* L. tem sido relatado *Rhizoctonia solani* AG-11 causando *damping-off* e podridão de hipocótilo nessa leguminosa (Kumar et al., 2002). Isolados de *Ceratobasidium* de *Juncus* sp. (CBS438.80) e orquídea (CBS569.83, CBS189.90) agruparam com os padrões binucleados AGA e AGG. Foi relatado isolados de *Rhizoctonia* AG-D, causando podridão da haste em *Juncus effusus* L. var. *decipiens* Buch (Ikata & Yoshida, 1940). O **clado 2** inclui isolados de maçã (USA), *Serendipita vermifera* (Australia) e o padrão de anastomose AGO. O **clado 3** apresenta isolados de brasel (USA), cafeeiro (Índia) e os padrões de anastomose AGQ, AGBa e AGBO. Em plântulas de café foram relatados isolados de *Rhizoctonia solani* do subgrupo AG-4HGI causando lesões no colo (Sussel et al., 2001) e o AG1-ID em folhas de café com sintomas de manchas circulares ou irregulares e áreas com manchas necróticas (Priyatmojo et al., 2001) mas não há relatos de *Rhizoctonia* binucleada isoladas de plantas de café. No **clado 4** agruparam isolados de hospedeiros desconhecidos (CBS523.96; CBS207.84) e os padrões AG1-IC e AG1-IB. O **clado 5** compreende isolados de teixo (USA) e pau-incenso (USA). O **clado 6** apresenta isolados de *Pittosporum tobira* (USA, ornamental), junipero (USA) e os padrões de anastomose AG7 e AG6-HGI. González et al.(2000) relataram isolados de *Pittosporum* pertencentes ao grupo CAG-7 (AGR). O **clado 7** inclui isolados de raiz de batata, haste de planta de batata (USA), soja (Brasil) e os padrões AG3, AG9, AG2-2IV. Como no gene ATP6 o isolado da haste de planta de batata (CBS970.96) agrupou com o padrão AG9 enquanto o isolado de raiz de batata (CBS200.25) agrupou com o padrão de anastomose AG3. Tradicionalmente, AG3 é considerado um grupo homogêneo de hospedeiro específico (Anderson 1982; Ceresini et al., 2002) causando cancos em raiz e brotos em batatas. O grupo AG9, por sua vez, é considerado um patógeno fraco de parte subterrânea que pode atacar batata, couve flor e linho (Carling et al., 1987). No **clado 8** agruparam isolados de tomate (Brasil) e os padrões AG4-HGI e AG4-HGII, mas esses

isolados foram mais similares ao padrão AG4-HGI, como relatado por Kuramae et al. (2003).

Através da análise desse gene foi possível separar os isolados de *Rhizoctonia* spp. e os padrões de anastomose em binucleados (clados 1, 2 e 3) e multinucleados (clados 4, 5, 6, 7, 8), resultado similar ao gene fator de alongação 1- α (EF), supõe-se que por tratar-se de genes nucleares apresentem comportamento bastante semelhantes. Moncalvo et al. (2000) mostraram que dados das seqüências da mtSSU-rDNA (mitocôndrial) apresentam baixa resolução filogenética quando comparada com os dados do nLSU-rDNA (nuclear).

A partir da matriz de similaridade gerada das seqüências da região do espaço interno transcrito (ITS) dos isolados de *Rhizoctonia* spp. foi possível agrupar os isolados de *Rhizoctonia* spp. em 5 clados (Figura 12). O **clado 1** compreende isolados de brasel (USA), *Juncus* sp. (Japão), soja (Canadá), cafeeiro (India), orquídea (Austrália, Canada), *Serendipita vermifera* (Australia), maçã (USA) e os padrões AGQ, AGBa, AGA, AGBO, AGG e AGO. Os isolados de brasel (USA) e *Juncus* sp. (Japão) agruparam com o padrão AGQ. Foram relatados isolados de *Rhizoctonia* AGD causando podridão da haste em *Juncus effusus* L. var. *decipiens* Buch (Ikata & Yoshida, 1940). Isolados de orquídea (CBS189.90), *Serendipita vermifera* (CBS572.83) e maçã (CBS477.82) apresentaram maior similaridade genética com o padrão de anastomose AGBa. O **clado 2** compreende isolados de aguapé (Panamá), soja (Brasil), *Pittosporum tobira* (USA, ornamental), junipero (USA), teixo (USA), pau- incenso (USA) e os padrões AG1-IB, AG1-IC e AGP. Os isolados de aguapé (CBS700.82) e soja (SJ57) agruparam com o padrão de anastomose AG1-IB. Embora isolados de soja tenham sido relatados causando podridão de hipocótilo (Fenille et al., 2003), queima foliar (Fenille et al., 2003), morte de plântula (Yang et al., 2005), como pertencentes aos grupos de anastomose AG4-HGI, AG1-IA e AGA respectivamente. De acordo com Carling & Sumner (1992) a clara distinção entre os três grupos AG1-IA, AG1-IB e AG1-IC não é possível somente através da técnica de anastomose. Isolados de *Pittosporum tobira* (CBS133.82), junipero (CBS135.82), teixo (CBS136.82) e pau-incenso (139.82) agruparam com o padrão de anastomose AGP. Isolados de junipero e *Pittosporum tobira* são relatados como pertencentes ao AGE (CAG-3) e AGS (CAG-7), respectivamente (González et al., 2000). O **clado 3** inclui isolados de

algodão (Turquia), soja (Brasil), tomate (Brasil), margaridinha do campo (USA) e os padrões AG4-HGI, AG4-HGII e AGE. Isolados de algodão (CBS293.31), soja (SJ02), tomate (TO-1 e TO-4) agruparam com o padrão de anastomose AG4-HGI. No **clado 4** agruparam isolados de soja (Brasil), e o padrão AG2-2IV. Os grupos de anastomose AG1-IA, 1-IB, 1-IC, 2, 2-2, 3, 4, 5 e 7 são relatados como patogênicos a soja (Nelson et al., 1996; Sneh et al., 1991; Yang, 1999; Pope & Carter, 2001). O **clado 5** contém isolado de haste de planta de batata (USA), tremoço azul (Japão), raiz de batata, trigo (Austrália) e os padrões de anastomose AG9, AG3, AG6-HGI e AG7. Isolados de haste de planta de batata (CBS970.96) e tremoço azul (CBS208.84) agruparam com o padrão AG9 enquanto isolados de raiz de batata (CBS200.25) e trigo (CBS101.782) agruparam com o isolado AG3, uma vez que o AG3 é considerado um grupo homogêneo de hospedeiro específico (Anderson 1982; Ceresini et al., 2002) causando cancrios em raiz e brotos em batatas.

De acordo com o cladograma, observou-se que a análise das seqüências da região do espaço interno transcrito (ITS) dos isolados de *Rhizoctonia* spp. tendeu a agrupar os isolados de *Rhizoctonia* spp. e os padrões em binucleados e multinucleados, com exceção dos padrões AGP (clado 2) e AGE (clado 3). Análises filogenéticas da região do espaço interno transcrito (ITS) é usual em muitos organismos, mas para espécies do complexo *Fusarium oxysporum* não foram informativas (Baayen et al., 2000).

Geralmente, admite-se, que com o aumento dos números de caracteres na análise filogenética aumenta-se a acurácia da mesma. Mas, em muitos casos, como o de Moncalvo et al (2000), a adição de dados de mtSSU-rDNA e dados de nLSU-rDNA não significou melhora na filogenia, pode ser devido a combinação do conjunto de dados heterogêneos e a taxa de evolução não pode ser acomodada num simples modelo de evolução.

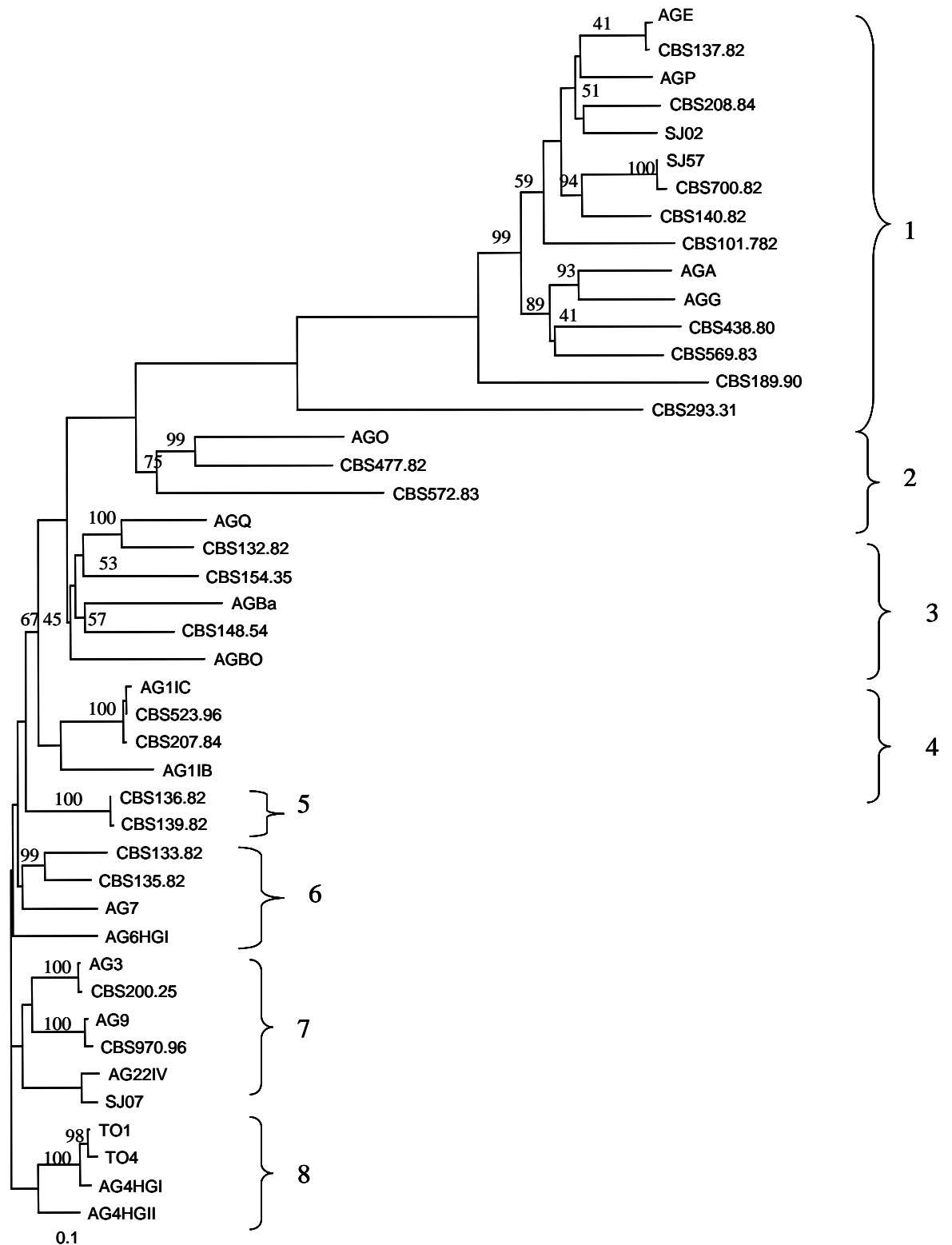


Figura 11. Cladograma gerado pela análise “neighbor-joining” obtido dos 44 alinhamentos das seqüências dos gene RNA polimerase 2 (RPB2) de isolados de *Rhizoctonia* spp.

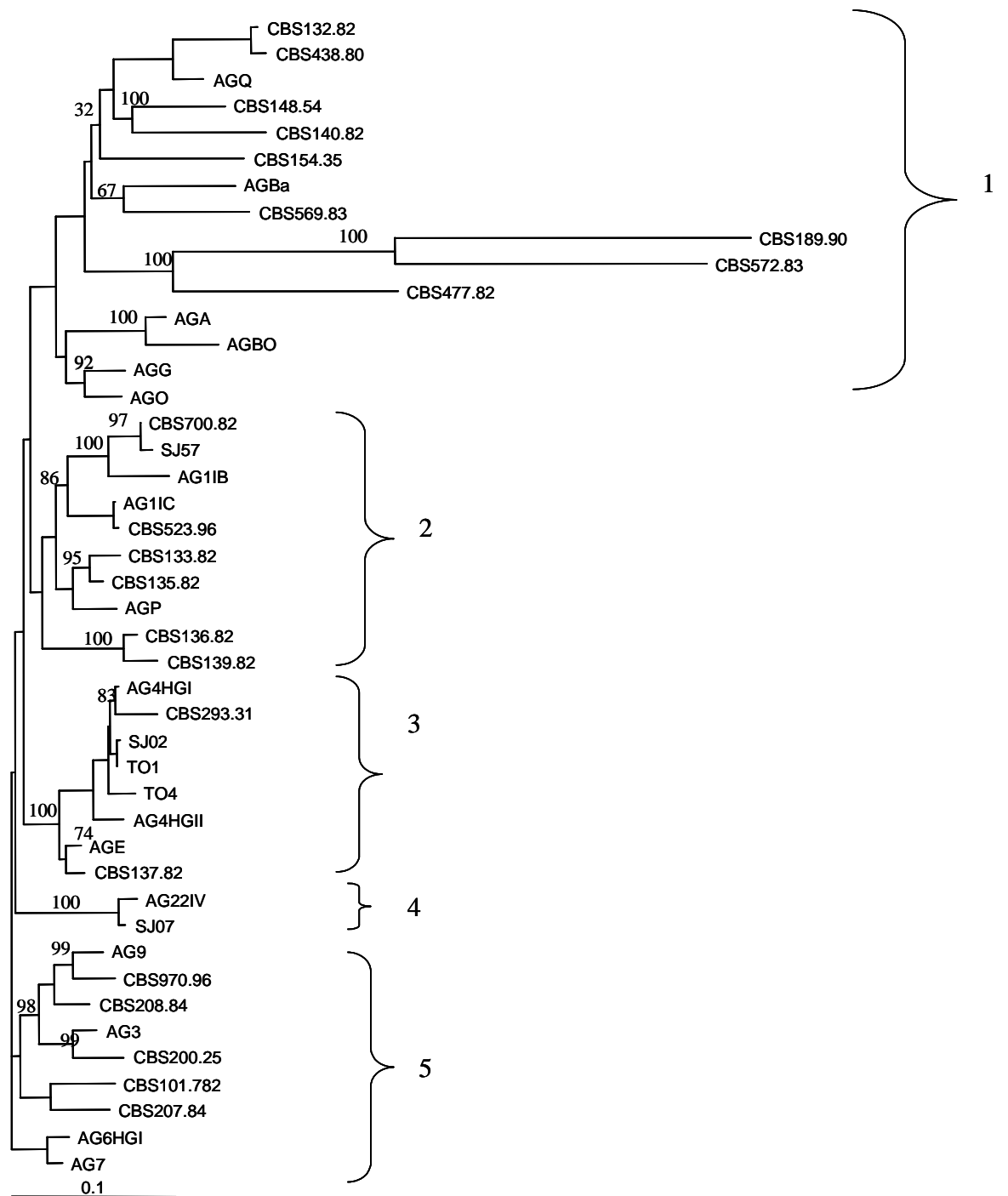


Figura 12. Cladograma gerado pela análise “neighbor-joining” obtido dos 44 alinhamentos das seqüências do espaço interno transcrito (ITS) de isolados de *Rhizoctonia* spp.

7. CONCLUSÕES

- Através da análise da seqüência da região ITS é possível agrupar os isolados do Brasil, de *Rhizoctonia* spp. de acordo com os grupos de anastomose já previamente determinados e servem de base para a síntese de “primers” específicos de grupos de anastomose.
- Há variações de seqüências de nucleotídeos na região ITS obtidas de clones de um mesmo isolado demonstrando a existência de uma heterogeneidade nesta região para os isolados CBS 316.84 e CBS 569.83.
- As árvores filogenéticas geradas das seqüências dos genes EF-1 α e RPB2 separam os isolados e os padrões de anastomose, aqueles que se conhece, em binucleados e multinucleados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASHI, K., MAEDA, K., ABE, H. Studies on root diseases of spinach and soil scientific research on the occurrence II. Pathogens of damping-off occurring in fields around Sapporo city. *Bulletin of Hokkaido Prefectural Agricultural Experiment Stations*, v. 54, p. 1-8, 1986.

ALMEIDA, O.C., ROBBS, C.F., AKIBA, F., KIMURA, O. Enfermidade nova em pimentão causada por *Rhizoctonia solani* Kühn no Brasil. *Fitopatol. Bras.*, v. 5, p. 7-10, 1980.

AMBRÓSIO, C.J., BUENO, C.J., NAKATANI, A.K., KURAMAE, E.E., SOUZA, N.L., Ocorrência de *Rhizoctonia* spp. binucleada AGG em fruto de melância (*Citrullus lanatus* Schrad). *Summa Phytopathologica*, v. 31, supl., p. 18, 2005.

ANDERSON, N.A. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Ann. Rev. Phytopathol.*, v. 20, p. 329-347, 1982.

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

BAAYEN, R.P., O'DONNELL, K., BONANTS, P.J.M., CIGELNIK, E., KROON, L.P.N.M., ROEBROECK, E.J.A., WAALWIJK, C. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathol.*, v. 90, n. 8, p. 891-900, 2000.

BALALI, G.R., KOWSARI, M. Pectic zymogram variation and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* AG-4 to bean (*Phaseolus vulgaris*) isolates in Isfahn, Iran. *Mycopathol.*, v. 158, p. 377-384, 2004.

BIRKY, Jr.W.C. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *PNAS*, v. 92, p. 11331-11338, 1995.

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

BOYSEN, M., BORJA, M., MORAL, C., 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.

BRASIER, C.M., RAYNER, A.D.M. Whiter terminology below the species level. *Evolutionary Biology of the Fungi. Cambridge Univ. Press*, 1987.

BRUNS, T.D., SARRO, T.M., GARDES, M., CULLINGS, K.W., PAN, J., TAYLOR, D.L., HORTON, T.R., KRETZER, A., GARBELOTTO, M., LI, Y. A sequence database for the identification of ectomycorrhizas basidiomycetes by phylogenetic analysis. *Mol. Ecol.*, v. 7, p. 257-272, 1998.

BRUNS, T.D., SZARO, T.M. Rate and mode differences between nuclear and mitochondrial small-subunit rRNA genes in mushrooms. *Mol. Biol. Evol.*, v. 9, p. 836-855, 1992.

BUGBEE, W.M., CAMPBELL, L.G. Combined resistance in sugar beet to *Rhizoctonia solani*, *Phoma betae*, and *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.*, v. 74, n. 5, p. 353-355, 1990.

BURTON, R.J., COLEY-SMITH, J.R., WAREING, P.W., GLADDES, P. *Rhizoctonia oryzae* and *R. solani* associated with barley stunt disease in the United Kingdom. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, v. 91, 409-417, 1988.

CAMPACI, C.A., FIGUEIREDO, M.B. Ocorrência de rizoctonioze em amendoim. *O Biológico* (São Paulo), v. 30, p. 267-8, 1964.

CARLING, D.E. Anastomosis group and subets of anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. In: International Symposium on *Rhizoctonia* 3, Taichung, 2000. *Abstract Taichung, ISR*, p. 14, 2000.

- CARLING, D.E., BAIRD, R.E., KUNINAGA, S., GITAITIS, R.D. Characterization of anastomosis group (AG) 13 of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol.*, v. 89, suppl., p. S11, 1999.
- 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*, p. 37-47, 1996.
- CARLING, D.E., KUNINAGA, S. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn: inter – and intragroup relatedness of anastomosis group 9. *Phytopathol.*, v. 80, p. 1362-1364, 1990.
- CARLING, D.E., KUNINAGA, S., BRAINARD, K.A. Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. *Phytopathol.*, v. 92, n. 1, p. 43-50, 2002.
- CARLING, D.E., LEINER, R.H. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* on potato. *Phytopathol.*, v. 80, p. 930-934, 1990.
- CARLING, D.E., LEINER, R.H., KLEBER, K.M. Characterization of a new anastomosis group (AG-9) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol.*, v. 77, p. 1609-1612, 1987.

CARLING, D.E., LEINER, R.H., WESTPHALE., P.C. Symptoms, signs and yield reduction associated with *Rhizoctonia* disease of potato induced by tuberborne inoculum of *Rhizoctonia solani* AG-3. *Am. Potato J.*, v. 66, p. 693-701, 1989.

CARLING, D.E., ROTHROCK, C.S., MACNISHI, G.C., SWEETINGHAM, M.W., BRAINARD, K.A., WINTERS, S.W. Characterization of anastomosis group 11 (AG-11) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol.*, v. 84, p. 1387-1393, 1994.

CARLING, D.E., SUMNER D.R. *Rhizoctonia*. In: SINGLETON, L.L., MIHAIL, J.D., RUSH, C.M. (eds.). Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. St. Paul: *American Phytopathological Society*, p.157-65, 1992.

CERESINI, P.C., FENILLE, R.C., SOUZA, N.L. de Associação de *Rhizoctonia* spp. binucleadas e de *R. solani* Kühn AG4 HGI à vagens de amendoineiro (*Arachis hypogea*) no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathol.*, v. 22, p. 145-55, 1996.

CERESINI, P.C., SHEW, H.D., VILGALYS, R.J., CUBETA, M.A. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco in North Carolina. *Mycol.*, v. 94, n. 3, p. 437-449, 2002.

CERESINI, P.C., SOUZA, N.L. Associação de *Rhizoctonia* spp. binucleadas e *R.solani* Kühn AG4 HGI e AG 2-2 IIIB ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Estado se São Paulo. *Summa Phytopathol.*, v. 23, p. 14-24, 1997.

CHANG, K.F., HWANG, S.F., GOSSEN, B.B., HOWARD, R.J., LOPETINSKY, K., OLSON, M. First report of *Rhizoctonia solani* AG-4 and AG-2-2 on *Lupinus angustifolius* in Canada. *Plant Dis.*, v. 89, p. 685, 2005.

CUBETA, M.A., VILGAYS, R. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. *Phytopathol.*, v. 87, p. 480-484, 1997.

CURRAH, R.S. *Thanatephorus pennatus* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of *Calypso bulbosa* (Orchidaceae) from Alberta. *Can. J. Bot.*, v. 65, p. 1957-1960, 1987.

DATE, H., YAGI, S., OKAMOTO, Y., ONIKI, M. On the leaf blight of tomatoes by *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (*Rhizoctonia solani*). *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v. 50, p. 339, 1984.

ELANGO, F. The role of high temperature in the damping-off of true potato seedlings in the lowland tropics. *Trop. Agric.*, v. 63, p. 66-67, 1986.

EWING, B., GREEN, P. Base calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, v. 8, p. 186-194, 1998.

FENILLE, R.C., CIAMPI, M.B., KURAMAE, E.E., SOUZA, N.L. Identification of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil by rDNA-ITS sequences. *Fitopatol. Brás.*, v. 28, n. 4, p. 413-419, 2003.

FENILLE, R.C., CIAMPI, M.B., SOUZA, N.L., NAKATANI, A.K., KURAMAE, E.E.

Binucleate *Rhizoctonia* sp. AG causing root rot in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in Brazil. *Plant Pathol.*, v. 54, p. 325-330, 2005.

FENILLE, R.C., SOUZA, N.L, KURAMAE, E.E. Characterization of *Rhizoctonia solani*

associated with soybean in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, v. 10, p. 773-792, 2002.

GARZA-CHAPA, R., ANDERSON, N.A. Behavior of single-basidiospore isolates and

heterokaryons of *Rhizoctonia solani* from flax. *Phytopatho.*, v. 56, p. 1260-1268, 1966.

GASPARATO, L., TRINDADE, D.R., LIEBEREI, R. Avaliação da resistência de clones

de seringueira a mancha aureolada (*Thanatephorus cucumeris*). *Fitopatol. Bras.*, v. 6, supl., p. 555, 1981.

GILL, J.S., SIVASITHAMPARAM, K., SMETTEM, K.R.J. Size of bare-patches in wheat

caused by *Rhizoctonia solani* AG-8 is determined by the established mycelial network at sowing. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 34, p. 889-893, 2002.

GODOY-LUTZ, G., STEADMAN, J.R., HIGGINS, POWERS, K. Genetic variation

among isolates of the web blight pathogen of common bean based on PCR-RFLP of the ITS-rDNA region. *Plant Dis.*, v. 87, n. 7, p. 766-771, 2003.

GONZALEZ, D., CARLING, D.E., KUNINAGA, S., VILGALYS, R., CUBETA, M.A.

Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. *Mycol.*, v. 93, n. 6, p. 1138-1150, 2001.

GONZALEZ, V., SALAZAR, O., JULIAN, M.C., ACERO, J., PORTAL, M.A., MUÑOZ,

R., LOPEZ-CÓRCOLES, H., GÓMEZ-ACEBO, E., LÓPEZ-FUSTER, P., RUBIO, V. *Ceratobasidium albasitensis*, um nuevo hongo del complejo *Rhizoctonia* aislado em España. p. 398, 2000.

GRAU, A., REA, J. Yacon. *Smallanthus sonchifolius*. (Poepp & Endl.) H. Robinson. In:

Hermann, M. and J. Heller (eds.). Andean roots and tubers: ahipa, arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized crops. *IPK, Gatersleben/IPGRI, Rome*, p. 199-256, 1997.

GRISHAM, M.P., ANDERSON, N.A. Pathogenicity and host specificity of *Rhizoctonia*

solani isolated from carrot roots. *Phytopatol.*, v. 73, p. 1564-1569, 1983.

GROSCH, R., SCHNEIDER, J.H.M., KOFOET, A. Characterization of *Rhizoctonia solani*

anastomosis groups causing bottom rot in field-grown lettuce in Germany. *Plant Pathol.*, v. 110, p. 53-62, 2004.

HASHIOKA, Y. Rice disease in the world-VI. Sheath spots due to sclerotial fungi. v. 19,

p.111-128, 1970.

HAWKSWORHT, D.L., KIRK, P.M., SUTTON, B.C., PEGLER, D.N. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. 8. ed. New York: CAB International, p. 616, 1995.

HIBBETT, D.D., DONOGHUE, M.J., Progress toward a phylogenetic classification of the Polyporaceae through parsimony analyses of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Can. J. Bot.*, v. 73, p. s853-s861, 1995.

HIBBETT, D.S., PINE, E. M., LANGER, E., LANGER, G., DONOGHUE, M.J. Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 94, p. 12002-12006, 1997.

HO, L.C., ARMUGAM, A., JEYASEELAN, K., YAP, E.H., SINGH, M. *Blastocytis* elongation factor-1 α : genomic organization, taxonomy and phylogenetic relationships. *Parasitol.*, v. 121, p. 135-144, 2000.

HOMMA, Y., ISHII, M. Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kuehn responsible for various symptoms of the root rot of Japanese radish. *Bull. Shikoku Agric. Exp. Stn.*, v. 42, p. 1-11, 1984.

HOMMA, Y., YAMASHITA, Y., ISHII, M. A new anastomosis group (AG-7) of *Rhizoctonia solani* Kühn from Japanese radish fields. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v. 49, p. 184-190, 1983.

HURD, B., GRISHAM, M.P. *Rhizoctonia* spp. associated with brown patch of St. Augustinegrass. *Phytopathol.*, v. 73, p. 1661-1665, 1983.

HYAKUMACHI, M., MUSHIKA, T., OGISO, Y., TODA, T., KAGEYAMA, K., TSUGE, T. Characterization of a new cultural type (LP) of *Rhizoctonia solani* AG2-2 isolated from warm-season turfgrasses, and its genetic differentiation from other cultural types. *Plant Pathol.*, v. 47, p. 1-9, 1998.

HYAKUMACHI, M., PRIYATMOJO, A., KUBOTA, M., FUKUY, H. New anastomosis groups, AG-T and AG-U, of binucleate *Rhizoctonia* spp. causing root and stem rot of cut-flower and miniature roses. *Phytopathol.*, v. 95, n. 7, p. 784-792, 2005.

ICHIELEVICH-AUSTER, M., SNEH, B., KOLTIN, Y., BARASH, I. Suppression of damping-off caused by *Rhizoctonia* spp. by non-pathogenic *R. solani*. *Phytopathol.*, v. 75, p. 1080-1084, 1985.

IKATA, S., YOSHIDA, M. Studies on the disease of mat rush, 1.blight. Special Bull. *Okayama Agric. Exp. Sta.*, v. 42, p. 1-47, 1940.

JOHANSON, A., TURNER, H.C., MCKAY, G.J., BROWN A.E. A PCR-based method to distinguish fungi of the rice sheath-blight complex, *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae* and *R. oryzae-sative*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 162, p. 289-294, 1998.

JONES, R.K., BELMAR, S.B. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* ssp. isolates from rice, soybean, and other crops grown in rotation with rice in Texas. *Plant Dis.*, v. 73, p. 1004-1010, 1989.

KAJIWARA, T., SUGATA, S. On the damping-off of chrysanthemum by *Rhizoctonia*. *Resp. Soc. Plant Prot. Kanto*, v. 18, p. 74, 1971.

KATARIA, H.R., VERMA, P.R., GISI, U. Variability in the sensitivity of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups to fungicides. *Phytopathol.* , v. 153, p. 121-133.,1991.

KEIJER, J., HOUTERMAN, P.M., DULLEMANS, A.M., KORSMAN, M.G. Heterogeneity in electrophoretic karyotype within and between anastomosis groups of *Rhizoctonia solani*. *Mycol. Res.*, v. 100, p. 789-797, 1996.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v. 16, p. 111-120, 1980.

KODAMA, T., HORIMOTO, K., OGOSHI, A. On the brown spot of eggplants caused by *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (*Rhizoctonia solani*) AG-3. *Ann. Phytopathol.*, v. 48, p. 356, 1982.

KOFOET, A., FRICKE, A., HEINE, H., HOMMES, M., RICHTER, E., ULBRICH, A., WEIER, U. Kopfsalatsorten und ihre anfälligkeit gegenüber bodenbürtigen pathogenen. *Gemüse*, v. 37, n. 10, p. 10-13, 2001.

KRETZER, A.M., BRUNS, T.D. Use of *atp6* in fungal phylogenetics; an example from the Boletales. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 13, p. 438-492, 1999.

KUMAR, S., SIVASITHAMPARAM, K., SWEETINGHAM, M.W. Prolific production of sclerotia in soil by *Rhizoctonia solani* anastomosis group (AG) 11 pathogenic on lupin. *Ann. appl. Biol.*, v. 141, p. 1-18, 2002.

KUMAR, S., TAMURA, K., NEI, M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment Briefings. *Bioinformatics*, v. 5, p. 150-163, 2004.

KUNINAGA, S., CARLING, D.E. Comparison of isolates of *Rhizoctonia solani* AG-2 and AG-BI based on anastomosis reactions, rDNA sequence analysis and pathogenic potential. In: International Symposium on *Rhizoctonia*, 3, 2000, Taichung. Abstract. Taichung: International Symposium on *Rhizoctonia*, p.23, 2000.

KUNINAGA, S., NATSUAKI, T., TAKEUCHI, T., YOKOSAWA, R. Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. *Curr Genetic*, v. 32, p. 237-243, 1997.

- KUNINAGA, S., YOKOSAWA, R. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. IV. Genetic relatedness within AG-4. *Ann. Phytopatol. Soc. Jpn.*, v. 50, p. 322-330, 1984.
- KUNINAGA, S.; YOKOSAWA, R., OGOSHI, A. Some properties of anastomosis group 6 and BI in *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v. 45, p. 207-217, 1979.
- KURAMAE, E.E., BUZETO, A.L, CIAMPI, M.B, SOUZA, N.L. Identification of *Rhizoctonia solani* AG 1-IB in Lettuce, AG 4 HG-I in Tomato and Melon, and AG 4 HG-III in Broccoli and Spinach, in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, v. 109, n. 4, p. 391-395, 2003.
- KURAMAE, E.E., NOZAKI, D.N., FENILLE, R.C., CERESINI, P.C., SOUZA, N.L. Elemento extracromossomal dsRNA em *Rhizoctonia* AG4 HGI e AG2-2 IIIB e *Rhizoctonia* spp. binucleada associados às culturas de feijão e amendoim. *Summa Phytopathologica*, v. 28, p. 52-57, 2002.
- KURAMAE-IZIOKA, E. E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation from *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* for RAPD. *Revista Unimar*, v. 19, n. 3, p. 683-689, 1997.
- LEACH, S. S., WEBB, R. E. Evaluation of potato cultivars, clones and a true seed population for resistance to *Rhizoctonia solani*. *Am. Potato J.*, v. 70, p. 317-328, 1993.

- LIU, Y., WHELEN, S., HALL, B. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution*, v. 16, p. 1799-1808, 1999.
- LIU, Z.L., DOMIER, L.L., SINCLAIR, J.B., ISG specific ribosomal DNA polymorphism of the *Rhizoctonia Solani* complex. *Mycol.*, v. 85, p. 795-800, 1993.
- LUTZONI, F. Phylogeny of lichen and non-lichen-forming omphalinoid mushrooms and the utility of testing for combinability among multiple data sets. *Syst. Biol.*, v. 46, p. 373-406, 1997.
- MAcNISH, G.C., O'BRIEN, P.A. RAPD-PCR used to support concept of sub-populations with *Rhizoctonia solani* AG-8. In: International Symposium on *Rhizoctonia*, 3, 2000, Taichung. Abstract... Taichung: International Symposium on *Rhizoctonia*, p.41, 2000.
- MARTIN, F.N. *Rhizoctonia* spp. Recovered from strawberry roots in Central Coastal California. *Phytopathol.*, v. 90, n. 4, p. 345-353, 2000.
- MARTIN, S.B., LUCAS, L.T. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* ssp. and binucleate *Rhizoctonia*-like fungi from turfgrasses in North Carolina. *Phytopathol.*, v. 74, p. 170-5, 1984.

- MAZZOLA, M., WONG, O.T., COOK, R.J. Virulence of *Rhizoctonia oryzae* and *Rhizoctonia solani* AG-8 on wheat and detection of *Rhizoctonia oryzae* in plant tissue by PCR. *Phytopathol.*, v. 86, p. 354–60, 1996.
- McNABB, R.F.R., TALBOT., P.H.B. Holobasidiomyceteidae. En G.C.Ainsworth et al. (eds.) *The Fungi: An advanced Treatise*. IV B. Academic Press, N.Y. p. 317-325, 1973.
- MEHMANN, B., BRUNNER, I., BRAUS, G.H. Nucleotide sequence variation of chitin synthase genes among ectomycorrhizal fungi and its potential use in taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p. 3105-3111, 1994.
- MEYER, J.C., VAN WYK, R.J., PHILLIPS, A.J.L. *Rhizoctonia* leaf spot of tobacco in South Africa. *Plant Pathol.*, v. 39, p. 206-207, 1990.
- 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)
- MONCALVO, J.M., DHREMEL, D., VILGALYS, R. Variation in modes and rates of evolution in nuclear and mitochondrial ribosomal DNA in the mushroom genus *Amanita* (Agaricales, Basidiomycota): phylogenetic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 16, n. 1, p. 48-63, 2000.

- MONCALVO, J.M., LUTZONI, F., REHNER, S., JOHNSON, J., VILGALYS, R. Molecular phylogeny of the Agaricales based on 25S rDNA sequences. *Inoculum*, v. 28, p. 26, 1997.
- 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. *Phytopathol.*, v. 83, n. 4, p. 438-444, 1993.
- NAIKI, T., UI, T. *Rhizoctonia* root rot of bean, soybean and adzukibean seedlings. *Mem. Fac. Agriculture Hokkaido University*, v. 12, p. 262-269, 1981.
- NAITO, S., MOCHIDA, H., NAKAJIMA, T., OHTO, Y. Infection with basidiospores of *Thanatephorus cucumeris* (AG2-3 of *Rhizoctonia solani*) and development of soybean foliar blight lesion. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, v. 61, p. 362-8, 1995.
- NAKATANI, A.K., VALDEBENITO, R.M., KURAMAE, E.E., SOUZA, N.L. Caracterização de *Rhizoctonia* spp. agente causal de podridão de raiz de morangueiro (Fragaria X Ananassa). *Fitopatol. Bras.*, v. 29. supl., p. S50, 2004.
- NAKATOMI, Y., KANEKO, H. Ecology and control of leaf blight of tulip. *Plant Prot.*, v. 25, p. 191-194, 1971.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide&cmd=search&term=AY387535.1>>. Acesso em: 20 mar. 2006.

NATIONAL SCIENCE FOUNDATION. Assembling the Fungal tree of life. Disponível em:
<<http://ocid.nacse.org/research/aftol/>>. Acesso em: 22 mar. 2006.

NEATE, S.M., WARCUP, J.H. Anastomosis grouping of some isolates of *Thanatephorus cucumeris* from agricultural soils in South Australia. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, v. 85, p. 615-620, 1985.

NELSON, B., HELMS, T., CHRISTIANSON, T., KURAL, I. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* from soybean. *Plant Dis.*, v. 80, p. 74-80, 1996.

O'DONNELL, K., LUTZONI, F.M., WARD, T.J., BENNY, G.L. Evolutionary relationships among mucorales fungi (zygomycota): evidence for family polyphyly on a large scale. *Mycol.*, v. 93, p. 286-296, 2001.

OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Phytopathol.*, v. 25, p. 125-143, 1987.

OGOSHI, A., COOK, R.J., BASSET, E.N. *Rhizoctonia* species and anastomosis groups causing root rot of wheat and barley in the Pacific Northwest. *Phytopathol.*, v. 80, p. 784-788, 1990.

OGOSHI, A., UI, T. Specificity in vitamin requirement among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v. 45, p. 47-53, 1979.

ONIKI, M., OGOSHI, A., ARAKI, T., SAKAI, R., TANAKA, S. The perfect state of *Rhizoctonia oryzae* and *R. Zeae* and the anastomosis groups of *Waitea circinata*. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.*, v. 26, p. 189-198, 1985.

OTERO, J. T., ACKERMAN, J. D., BAYMAN, P. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, v. 89, p. 1852-1858, 2002.

OZAWA, T. Occurrence of bottom rot of lettuce and related fungus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v. 43, p. 81-2, 1977.

PARMETER, J.R., Jr., SHERWOOD, R.T., PLATT, W.D. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathol.*, v. 59, p. 1270-1278, 1969.

- PARMETER, J.R., 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, p. 7-19, 1970.
- PHILLIPS, D.V., CARBONE, I., GOLD, S.E., KOHN, L.M. Phylogeography and genotype-
symptom associations in early and late season infections of canola by *Sclerotinia*
sclerotiorum. *Phytopathol.*, v. 92, n. 7, p. 785-793, 2002.
- POPE, E.J., CARTER, D.A. Phylogenetic placement and host specificity of mycorrhizal
isolates belonging to AG-6 and AG-12 in the *Rhizoctonia solani* species complex.
Mycol., v. 93, n. 4, p. 712-719, 2001.
- PRIYATMOJO, A., YAMAUCHI, R., KAGEYAMA, K., HYAKUMACHI, M. Grouping of
binucleate *Rhizoctonia* anastomosis group D (AG-D) isolates into subgroups I and II
whole-cell fatty acid compositions. *Phytopathol.*, v. 149, p. 421-426, 2001.
- ROBERTS, F.A., SIVASITHAMPARAM, K. Identity and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp.
associated with bare patch disease of cereals at a field site in Western Australia.
European Journal of Plant Pathol., v. 92, n. 5, p.185 - 195, 1986.
- ROGER, A.J., SANDBLOM, O., DOOLITTLE, W.E., PHILIPPE, H. An evaluation of
elongation factor 1 α as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Molecular Biology and*
Evolution, v. 16, p. 218-233, 1999.

- ROSA, D.D., FENILLE, R.C., SOUZA, N.L., KURAMAE, E.E. Caracterização citomorfológica, molecular e patogênica de isolados de *Rhizoctonia solani* de batata. *Summa Phytopathol.*, v. 31, n. 2, p. 133-141, 2005.
- ROZAS, J., SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C., MESSEGUER, X., ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, v. 19, p. 2496-2497, 2003.
- SAMBROOK, J., MANIATS, T., FRITSCH, E.F. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1987.
- SCHILLBERG, S., GROSS, P., TIBURZY, R. Isolation and characterization of the EF-1 α gene of the filamentous fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Curr Genet*, v. 27, p. 367-372, 1995.
- SCHNEIDER, J.H.M., VAN DEN BOOGERT, P.H.J.F., ZADOKS, J.C. Exploring differential interactions between *Rhizoctonia solani* AG 2-t isolates and tulip cultivars. *Plant Dis.*, v. 83, n. 5, p. 474-481, 1999.
- SHEHATA, M.A., PFLEGER, F.L., DAVIS, D.W. Response of susceptible and moderately resistant pea genotypes to interaction between *Rhizoctonia solani* and three other stem and root rot pathogens. *Plant Dis.*, v. 67, p. 1146-1148, 1983.

- SILVEIRA, S.F., ALFENAS, A.C., FERREIRA, F.A., SUTTON, J.C. Characterization of *Rhizoctonia* species associated with foliar necrosis and leaf scorch of clonally-propagated *Eucalyptus* in Brazil. *European Journal Plant Pathol.*, v. 106, p. 27-36, 2000.
- SMILEY, R.W., UDDIN, W., OTT, S., RHINHART, K.E.L. Influence of flutolanil and tolcfos-methyl on root and culm diseases of winter wheat. *Plant Dis.*, v. 74, p. 788–791. 1990.
- SNEH, B., BURPEE, L., OGOSHI, A. Identification of *Rhizoctonia* species. *Saint Paul: American Phytopathological Society*, p. 133, 1991.
- SUSSEL, A.A.B., FENILLE, R.C., KURAMAE, E.E., SOUZA, N.L. Caracterização de *Rhizoctonia solani*, agente etiológico do tombamento de mudas de café. *Summa Phytopathol.*, v. 27, n. 4, p. 348-352, 2001.
- SWANN, E., HIBBETT, D.S. Basidiomycota. The Club Fungi. Version 18 September 2003. Disponível em: <<http://tolweb.org/Basidiomycota/20520/2003.09.18>> in The Tree of Life Web Project. Acesso em: 26 mar. 2006.
- SWANN, E.C., TAYLOR, J.W. Higher taxa of basidiomycetes: An 18S rRNA gene perspective. *Mycol.*, v. 85, n. 6, p. 923-936, 1993.

- SWANN, E.C., FRIEDERS, E.M., MCLAUGHLIN, D.J. Microbotryum, Kriegeria and the changing paradigm in basidiomycete classification. *Mycol.*, v. 91, p. 51-66, 1999.
- SWEETINGHAM, M.W. Coping with brown spot and root rots of lupings – *Rhizoctonia solani* and hypocotyl rots. *West Australian Journal of Agriculture*, v. 31, p. 11-13, 1990.
- SWOFFORD D.L. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 2001.
- TACHIBANA, H., JOWETT, D., AND FEHR, W. R. Determination of losses in soybeans caused by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol.*, v. 61, p. 1444-1446, 1971.
- TANAKA, M.A.S., COQUEIRO, G.R. *Thanatephorus cucumeris* (*Pellicularia filamentosa* (Pat.) Rogers) em viveiros de seringueira em Felixlândia, MG. *Fitopatol. Bras.*, v. 6, p. 123-125, 1981.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- THON, M.R., ROYSE, D.J. Partial β tubulin gene sequences for evolutionary studies in the Basidiomycotina. *Mycol.*, v. 91, p. 468-474, 1999.

TODA, T., HYAKUMACHI, M., SUGA, H., KAGEYAMA, K., TANAKA, A., TOSHIKAZU, T. Differentiation of *Rhizoctonia* AG-D isolates from turfgrass into subgroups I and II based on rDNA and RAPD analyses. *Plant Pathol.*, v. 105, p. 835-846, 1999.

TODA, T., MUSHIKA, T., HAYAKAWA, T., TANAKA, A., TANI, T., HYAKUMACHI. Brown ring patch: a new disease on bentgrass caused *Waitea circinata* var. *circinata*. *Plant Disease*, v. 89, n. 6, p. 536-542, 2005.

TOMASO-PETERSON, M., TREVATHAN, E. *Rhizoctonia solani* AG-13 isolated from Corn in Mississippi. *Plant Dis.*, v. 88, n. 8, p. 908, 2004.

TRUTER, M., WEHNER, F.C. Anastomosis grouping of *Rhizoctonia solani* associated with black scurf and stem canker of potato in South Africa. *Plant Dis.*, v. 88, p. 83, 2004.

UCHINO, H., KANAZAWA, K., OGOSHI, A. Anastomosis group of binucleate *Rhizoctonia* isolated from diseased sugar beet seedlings. *Mem. Fac. Agriculture Hokkaido University*, v. 13, p. 494-499, 1983.

UETAKE, Y., OBAYASHI, K., OGOSHI, A., TSUTSUI, K. Identification of *Rhizoctonia* species isolated from orchids. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v. 54, p. 114, 1988.

- VILGALYS, R., CUBETA, M.A. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. *Phytopathol.*, v. 32, p. 135-155, 1994.
- VILGALYS, R., Genetic relatedness among anastomosis groups in *Rhizoctonia* as measured by DNA/DNA hybridization. *Phytopathol.*, v. 78, p. 698-702, 1988.
- VILGALYS, R., GONZALES, D. Organization of ribosomal DNA in the basidiomycete *Thanatephorus praticola*. *Curr. Genet.*, v. 18, p. 277-280, 1990.
- VOGLER, D.R., BRUNS, T.D. Phylogenetic relationships among the pine stem rust fungi (*Cronartium* and *Peridermium* spp.). *Mycol.*, v. 90, p. 244-257, 1998.
- WANG, H., DAVIS, R.M. Susceptibility of selected cotton cultivars to seedling disease pathogens and benefits of chemical seed treatments. *Plant Dis.*, v. 18, p. 1085-1088, 1997.
- WARCUP, J.H., TALBOT, P.H.B. Perfect state of rhizoctonias associated with orchids. *New Phytol.*, v. 66, p. 631-641, 1967.
- WATANABE, B., MATSUDA, A. Studies on the grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn pathogenic to upland crops. *Bull. App. Exp.*, v. 7, p. 1-131, 1966.

- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S., TAYLOR, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: A guide to methods and applications (INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J., WHITE, T.J., eds). *Academic Press, San Diego, CA*, p. 315-322, 1990.
- YAMAMOTO, T., UEHARA, H. seedling damping-off of welsh onion and the control. *Plant Prot.*, v. 26, p. 153-159, 1972.
- YANG, G.H., CHEN, H.R., NAITO, S., OGOSHI, A., DENG, Y.L. First report of AG-A of binucleate *Rhizoctonia* in China, pathogenic to soya bean, pea, snap, bean and pak choy. *Phytopathol.*, v. 153, p. 333-336, 2005.
- YANG, G.H., CHEN, X.Q., CHEN, H.R., NAITO, S., OGOSHI, A., ZHAO, J.F. First report of foliar blight in *Brassica rapa* ssp. *chinensis* caused by *Rhizoctonia solani* AG-4. *Plant Pathol.*, v. 53, p. 260, 2004.
- YANG, J., VERMA, P. Screening genotypes for resistance to pre-emergence damping-off and postemergence seedling root rot of oilseed rape and canola caused by *Rhizoctonia solani* AG-2-1. *Crop Protection*, v. 11, p. 443-448, 1992.
- YANG, X.B. *Rhizoctonia* damping-off and root rot. In: *Compendium of Soybean Diseases*, 4^a ed., p. 45-46, 1999.

YANG, X.B., BERGGREN, G.T., SNOW, J.P. Seedlings infection of soybean by *Rhizoctonia solani* AG-1, causal agent of aerial blight. *Plant Dis.*, v. 72, p. 644, 1988.

YORINORI, J.T. Estratégias de controle das doenças da soja. *Correio Agrícola*, n. 2, p. 8-12, 1998.