

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO E PATOGENICIDADE DE GRUPOS DE
ANASTOMOSE DE *Rhizoctonia* spp. ASSOCIADOS A HORTALIÇAS**

ALEXANDRE LUIS BUZETO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP –
Campus de Botucatu, para obtenção do
Título de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU – SP

Outubro – 2001

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO E PATOGENICIDADE DE GRUPOS DE
ANASTOMOSE DE *Rhizoctonia* spp. ASSOCIADOS A HORTALIÇAS**

ALEXANDRE LUIS BUZETO

Orientadora: **Prof^ª. Dr^ª. Eiko Eurya Kuramae**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP –
Campus de Botucatu, para obtenção do
Título de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU – SP

Outubro – 2001

**A DEUS,
AGRADEÇO**

*À minha querida mãe **Diva Spadotto Buzeto** (in memoriam)*

OFEREÇO

*Ao meu pai **Alécio**, meu irmão **André**
e minha avó **Honória**, pelo carinho e amor,*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Eiko Eurya-Kuramae pela orientação, confiança e compreensão nesse período;

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro, através da concessão da bolsa de Mestrado;

Ao Prof. Dr. Nilton Luiz de Souza, pelo incentivo no período;

Ao Prof. Dr. Chikichi Kurozawa, pelo carinho, compreensão e ao grande incentivo;

À amiga Simone pelo companheirismo e ajuda no início do Mestrado;

Aos amigos Juropoca, Denise, Gustavo, Maurício, Sérgio, Roldney, Jorge, Lúcia, Fábio, Carmen, Ricardo, Luciana, Rodrigo, Ana Paula, Fubango, Camillo, Maringoni, Rodrigo (Napa), Antonio, Armando, Nika, Fião, Cleo, pelos momentos agradáveis e companheirismo;

Aos funcionários da Biblioteca e da Seção de Pós-graduação da FCA;

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
1. RESUMO.....	1
2. SUMMARY.....	3
3. INTRODUÇÃO.....	5
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
4.1. Patógeno.....	7
4.2. Condições ambientais que favorecem o patógeno.....	10
4.3. Número de núcleos.....	10
4.4. Grupos de anastomose.....	11
4.5. Aplicação da biologia molecular em estudos de grupos de anastomose de <i>Rhizoctonia</i> spp.....	14
4.6. Importância do gênero <i>Rhizoctonia</i> spp. em hortaliças.....	15
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
5.1. Estabelecimento de coleção de isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp. de hortaliças e manutenção de culturas.....	21
5.1.1. Isolamento a partir de tecidos vegetais infectados.....	21
5.1.2. Preservação do fungo.....	22
5.2. Determinação de características citológicas específicas de <i>Rhizoctonia</i> <i>solani</i> e <i>Rhizoctonia</i> sp. binucleada de hortaliças.....	23
5.2.1. Número médio de núcleos por célula.....	23

	Página
5.2.2. Caracterização de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Rhizoctonia</i> sp. binucleada de hortaliças com relação ao grupamento de anastomose.....	25
5.3. Caracterização dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> de alface através de RAPD.....	27
5.3.1. Extração de DNA total.....	27
5.3.2. RAPD.....	28
5.3.2.1. Análise de RAPD.....	29
5.4. Testes de patogenicidade.....	29
5.4.1. Patogenicidade de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> de parte aérea com AG conhecido em alface e tomateiro.....	30
5.4.2. Patogenicidade de isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp. de raízes e colo com AG conhecido em espinafre, melão, brócolos e couve-manteiga.....	31
5.4.2.1. Teste de germinação de sementes de espinafre, melão, brócolos e couve-manteiga.....	31
5.4.2.2. Patogenicidade de isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp. de raízes e colo com AG conhecido em espinafre, melão, brócolos e couve-manteiga.....	32
6. RESULTADOS.....	35
6.1. Coleção de isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp. de hortaliças.....	35
6.2. Determinação de características citológicas específicas de <i>Rhizoctonia</i> spp. de hortaliças.....	36
6.2.1. Número médio de núcleos por célula.....	36

	Página
6.2.2. Caracterização de isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp. de hortaliças com relação ao grupamento de anastomose.....	38
6.3. Extração de DNA genômico total.....	40
6.3.1. RAPD.....	41
6.4. Patogenicidade de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> de parte aérea com AG conhecido em tomateiro e alface.....	42
6.4.1. Teste de patogenicidade dos isolados de tomateiro.....	42
6.4.2. Teste de patogenicidade dos isolados de alface.....	42
6.5. Teste de germinação de espinafre, melão, brócolos e couve-manteiga.....	46
6.6. Patogenicidade de isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp. de raízes e colo com AG conhecido em espinafre, melão, brócolos e couve-manteiga.....	47
6.6.1. Teste de patogenicidade dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> de espinafre.....	47
6.6.2. Teste de patogenicidade dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> de melão....	48
6.6.3. Teste de patogenicidade dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> de brócolos.....	49
6.6.4. Teste de patogenicidade dos isolados de <i>Rhizoctonia</i> sp. binucleada de couve manteiga.....	51
7 DISCUSSÃO.....	54
8 CONCLUSÕES.....	59
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
1 Distribuição de grupos de anastomose e grupos intra-específicos de <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Rhizoctonia</i> sp. binucleada no mundo.....	19
2 Distribuição em hortaliças de <i>Rhizoctonia solani</i> de alguns isolados no Brasil.....	20
3 Relação de grupos de anastomose de <i>Rhizoctonia solani</i> mantidos na micoteca do Departamento de Produção Vegetal – Setor Defesa Fitossanitária, FCA, UNESP, Botucatu-SP.....	26
4 Análise química do solo utilizado no experimento.....	33
5 Isolados de hortaliças obtidos e preservados em óleo “Nujol”, grãos de arroz e glicerol.....	36
6 Número médio de núcleos por célula em cada isolado estudado.....	37
7 Grupos e subgrupos de anastomose dos isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp. de alface, tomateiro, espinafre, melão, brócolos e couve-manteiga.....	39
8 Resultados da quantidade de DNA (ng/μL) de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> de alface.....	41
9 Avaliação da severidade dos isolados TO-1, TO-2, TO-3, TO-4 e TO-5 de <i>Rhizoctonia solani</i> em folhas de tomateiro, aos cinco dias após a inoculação.....	43
10 Avaliação da severidade dos isolados AL-1, AL-2 e AL-3 de <i>Rhizoctonia solani</i> em folhas de alface, aos cinco dias após a inoculação.....	45
11 Avaliação da germinação de sementes de espinafre, melão, brócolos e couve-manteiga em papel de filtro esterilizado em caixa Gerbox, aos 8 dias após a introdução do teste.....	46

Quadro	Página
12 Avaliação de germinação de sementes de espinafre, melão, brócolos e couve-manteiga em solo + substrato, aos 14 dias após a semeadura.....	47
13 Avaliação da severidade dos isolados EP-1, EP-2 e EP-3 de <i>Rhizoctonia solani</i> em espinafre, aos vinte dias após a inoculação.....	48
14 Avaliação da severidade dos isolados ME-1, ME-2 e ME-3 de <i>Rhizoctonia solani</i> em melão, aos vinte dias após a inoculação.....	49
15 Avaliação da severidade dos isolados BR-1, BR-2 e BR-3 de <i>Rhizoctonia solani</i> em brócolos, aos vinte dias após a inoculação.....	50
16 Avaliação da severidade dos isolados CM-1, CM-2, CM-3 e CM-4 de <i>Rhizoctonia</i> sp. binucleada em couve-manteiga, aos vinte dias após a inoculação.	52

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Condição multinucleada do isolado TO-2 (A) de <i>Rhizoctonia solani</i> e binucleada do isolado CM-1 (B) de <i>Rhizoctonia</i> sp. binucleada.....	38
2 Reação de anastomose de hifas do isolado EP-3 com o padrão AG-4 HGI (A), do isolado BR-1 com o padrão AG-4 HGII (B) e do isolado CM-2 com o padrão AG-G (C).....	40
3 Dendograma da similaridade genética entre isolados de alface, AL-1, AL-2 e AL-3 e seus padrões de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA, IB e IC, através de RAPD.....	41
4 Patogenicidade em tomateiro dos isolados TO-2 (A), TO-3 (B) e TO-5 (C) de <i>Rhizoctonia solani</i> comparando-se com as folhas testemunhas e do isolado TO-4 (D) comparando-se com a planta testemunha (E).....	44
5 Patogenicidade do isolado AL-3 (A) de <i>Rhizoctonia solani</i> de alface comparando-se com uma folha testemunha (B) e do isolado AL-1 (C) comparando-se com a planta testemunha (D).....	46
6 Patogenicidade do isolado BR-1 (A) de <i>Rhizoctonia solani</i> de brócolos comparando-se com a planta testemunha (B).....	51
7 Patogenicidade do isolado CM-4 (A) de <i>Rhizoctonia</i> sp. binucleada de couve-manteiga comparando-se com a planta testemunha (B).....	53

1. RESUMO

Rhizoctonia spp. caracterizam-se por serem patógenos muito importantes em hortaliças, principalmente se cultivadas sucessivamente na mesma área de produção.

As hortaliças testadas foram tomate, espinafre, melão, alface, brócolos e couve-manteiga. Estabeleceu-se uma coleção de isolados de *Rhizoctonia* spp. destas hortaliças, e foram avaliados as características citológicas, através da contagem de núcleos, as características quanto ao grupo de anastomose, através de anastomose de hifas, RAPD e através do teste de patogenicidade.

Na contagem de núcleos, verificou-se que os isolados de tomate, espinafre, alface, melão e brócolos foram caracterizados como sendo *Rhizoctonia solani*, enquanto que os isolados de couve-manteiga foram caracterizados como sendo de *Rhizoctonia*

sp. binucleada. Quanto ao grupamento de anastomose, verificou-se que os isolados de espinafre e tomateiro pertenciam ao grupo AG 4 HGI, os isolados de melão e brócolos pertenciam ao AG 4 HGII, os de alface pertenciam ao AG 1 IA, sendo corroborada através da técnica de RAPD, enquanto os de couve-manteiga ao AG G. No teste de patogenicidade, todos os isolados foram patogênicos nas hortaliças dos quais foram isolados.

O presente trabalho teve como objetivo principal a caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp. de hortaliças. As hortaliças testadas foram tomate, espinafre, alface, melão, brócolos e couve-manteiga.

Palavras chave: *Rhizoctonia*, caracterização, grupos de anastomose, patogenicidade e hortaliças

CHARACTERIZATION OF ANASTOMOSIS GROUP AND PATHOGENICITY OF *Rhizoctonia* spp. ASSOCIATED WITH HORTICULTURAL. Botucatu, 2001. Np. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: ALEXANDRE LUIS BUZETO

Adviser: EIKO EURYA KURAMAE-IZIOKA

2. SUMMARY

Rhizoctonia spp. are characterized for being of the very important pathogens on vegetables, mainly in their successive cultivation on the same production area.

The main objective of the present study was the characterization of isolates of *Rhizoctonia* spp. from vegetables.

The vegetables tested were tomato, lettuce, broccoli, spinach, melon, and kale. A collection of isolates of *Rhizoctonia* spp. of those vegetables was obtained, and each isolate was characterized by the nuclei number, hipal anastomosis reactinon, RAPD technique, and by pathogenicity tests.

Isolates from tomato, spinach, lettuce, melon and broccoli were characterized as *Rhizoctonia solani*, while the isolates of kale were characterized as binucleate *Rhizoctonia* sp. Through anastomosis reaction, it was determined that the isolates from tomato and spinach belong to the group AG 4 HGI, the isolates from melon and broccoli belong to AG 4 HGII, the isolates from lettuce belong to AG-1-IA, by RAPD thecnique and, isolates from kale belong to AG-G. All isolates were pathogenic to their respectives hosts.

Key words: *Rhizoctonia*, anastomosis group, pathogenicity and vegetables

3. INTRODUÇÃO

O fungo *Rhizoctonia solani* caracteriza-se como um dos patógenos mais importantes em diversas plantas cultivadas no Brasil, sendo composto por 14 grupos de anastomose: de AG 1 a AG 13 e o AG BI. Além de 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). *Rhizoctonia* sp. binucleadas (patogênicas e apatogênicas) são divididas em 21 grupos (Sneh et. al., 1991). Principalmente em hortaliças, poucos são os relatos descrevendo a ocorrência de grupos de anastomose associados a essas culturas.

O cultivo de hortaliças em nosso país, constitui-se importante atividade agrícola que tende a aumentar com a expansão do consumo. Especialmente nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Minas Gerais, a produção de hortícolas representa atividade

importante, para atender à crescente demanda desses produtos, tanto para serem consumidos “in natura”, como industrializados.

Rhizoctonia spp. são fungos que apresentam grande diversidade e, somente a partir da caracterização de grupos de anastomose (AG) e de grupos intraespecíficos (ISG), torna-se possível a obtenção de dados padrões da variação genética existente nesse gênero (Anderson, 1982; Ogoshi, 1987; Sneh et al., 1991; Vilgalys & Cubeta, 1994).

Antes do conceito de AG ou de ISG dentro de *R. solani* não era possível o melhoramento de variedades resistentes às doenças causadas por esse patógeno, pois este era considerado um patógeno com ampla gama de hospedeiros, e as diferenças entre isolados não eram óbvias (Leach & Garber, 1970). No entanto, com o avanço nesses conceitos, o alvo para o programa de melhoramento tornou-se mais claro, visto que o patógeno causador de determinada doença numa planta sempre pertence a um AG ou ISG específico. Além disso, as diferenças taxonômicas entre AG ou ISG de *R. solani* estão frequentemente relacionadas com diferenças ecológicas e epidemiológicas (Ogoshi, 1987).

Com o presente trabalho, pretendeu-se caracterizar, com relação à anastomose, os AGs e ISGs de *Rhizoctonia* spp. causadores de doenças em hortaliças.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Patógeno

O gênero *Rhizoctonia* é um dos mais difundidos no mundo em terras cultivadas e não cultivadas, sendo que cerca de 3% do total de trabalhos publicados na área de Fitopatologia são a respeito desse gênero (Ogoshi, 1996). A obtenção de isolados de *Rhizoctonia* spp. em culturas puras, a partir de plantas doentes ou do próprio solo, é relativamente fácil e podem ser encontrados vários, os quais diferem em termos de patogenicidade e características morfológicas, culturais e fisiológicas. Baseado nestas diferenças, muitas espécies, os AGs e ISGs têm sido descritos. Entretanto, não é fácil a identificação da maioria das espécies e os AGs de *Rhizoctonia*, pois ecologicamente é um fungo diversificado e conhecido como patógeno em muitas culturas, assim como saprófita em solo e até da micorriza de orquidáceas (Sneh et. al., 1996).

Além de ser um grupo grande de fungos, diversificado e complexo com aproximadamente 120 espécies registradas desde a constatação do gênero, a taxonomia convencional, baseada no International Code of Botanical Nomenclature, que utiliza características como o tamanho, forma, coloração e septação das estruturas de reprodução assexual e sexual, não pode ser aplicada totalmente ao gênero *Rhizoctonia* (Ogoshi, 1996).

Para que o fungo seja enquadrado dentro do gênero anamórfico *Rhizoctonia*, várias são as características que devem ser consideradas, tais como: ramificação observada próximo ao septo distal em hifas jovens; presença de um septo na ramificação da hifa próximo ao seu ponto de origem; presença de septos do tipo doliporo; ramificações de hifas que são concêntricas em sua extremidade basal; ausência de grampos de conexão; ausência de conídios; tecido esclerocial não diferenciado em membrana, córtex e medula e ausência de rizomorfos (Sneh et. al., 1991).

A maioria dos fungos do gênero *Rhizoctonia* são anamorfos de quatro gêneros de Basidiomycetes: *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 multinucleadas. As espécies binucleadas de *Rhizoctonia* como *Rhizoctonia repens* Bernard e *Rhizoctonia oryzae-sativae* (Sawada) Mordue, associam-se a várias espécies de *Ceratobasidium* como: *C. cornigerum* (Bourdot) D.P. Rogers, *C. gramineum* (Ikata & T. Matsuura) Oniki et al. e *C. oryzae-sativae* P.S. Gunnell & R.K. Webster, ou ainda, a *Tulasnella* (Ogoshi, 1987; Sneh et al., 1991; Carling & Sumner, 1992).

Rhizoctonia spp. infectam tanto plantas jovens como plantas adultas. Podem infectar em qualquer estágio fenológico da planta e em qualquer órgão, principalmente aqueles em contato com o solo. A podridão de mudas em pré-emergência pode ser confundido com má germinação das sementes, pois o fungo infecta a radícula e o caulículo antes da germinação, provocando redução do estande. Neste caso, ocorre também podridão de sementes, provocando seu encharcamento e deformação, sendo isto um indicativo de que já estavam infectadas e o tratamento foi ineficiente ou a semeadura foi realizada em solo já infestado. Em pós-emergência, ocorre estrangulamento, encharcamento e posterior necrose do colo, provocando o tombamento e murcha de plântulas, sendo que o fungo pode colonizar até a parte aérea, ocasionando a morte das plântulas em reboleiras. Isto ocorre devido ao plantio sucessivo no mesmo local sob condições favoráveis à ocorrência da doença, sendo que praticamente todas as hortaliças (herbáceas, folhosas, tuberosas e de frutos) são suscetíveis. Inicialmente ocorre podridão radicular, estrangulamento do colo da planta e a colonização do fungo até a parte aérea, sendo que ocorre amarelecimento e murcha da planta com a sua consequente morte, ocorrendo em reboleiras no campo. Ocorre para hortaliças em geral, principalmente para aquelas que exigem transplante para o campo definitivo de produção (Matsuoka et. al., 1985).

Os basidiósporos são de disseminação a longa distância e os responsáveis por causarem doenças foliares, além de serem importantes fontes de variação genética (Sneh et. al., 1991).

Os escleródios (agregado de micélio somático) são estruturas de resistência e importantes como fonte de inóculo. São formados no solo ou em restos culturais e

podem sobreviver no solo por vários anos. Tanto basidiósporos como escleródios podem germinar e formar micélio ou tubo germinativo para infecção (Sneh et. al., 1991).

Micélio, além de servir para sobrevivência e disseminação, serve também para infecção, pois pode rapidamente crescer e colonizar o solo, além de sobreviver por um tempo relativamente longo no solo e em restos culturais (Sneh et. al., 1991).

4.2. Condições ambientais que favorecem o patógeno

Em geral, *Rhizoctonia* spp. são favorecidas por temperaturas acima de 25°C, alta umidade relativa do ar e do solo, solos mal drenados, irrigações excessivas (gerando microclima), sementeiras densas (tombamento), adubação nitrogenada em excesso (tecidos ficam mais tenros e aumentando a probabilidade de ocorrer ferimentos), alto teor de matéria orgânica, cultivos sucessivos no mesmo local e pH ácido. Porém, são muito desfavoráveis para o patógeno os solos muito secos ou muito encharcados (Sneh et. al., 1996).

Estes fatores são muito variáveis entre as hortaliças, principalmente em relação à temperatura e umidade do ar e do solo. Um exemplo típico é o da cultura da ervilha, na qual a temperatura de crescimento da cultura é de 8°C a 35°C, sendo que 25°C é a temperatura ótima para crescimento do fungo (Café Filho et. al., 1989).

As faixas de temperatura são muito amplas para hortaliças e geralmente a temperatura ideal para o desenvolvimento da cultura é também ideal para o desenvolvimento do patógeno, independente do grupo de anastomose ao qual este pertença.

4.3. Número de núcleos

A contagem do número de núcleos constitui um importante parâmetro taxonômico, pois primeiramente dividirá as espécies de *Rhizoctonia* em multinucleadas, representadas por *Rhizoctonia solani*, *R. zae* e *R. oryzae*, em binucleadas compreendendo, principalmente, as espécies *R. repens* e *R. oryzae-sativae* como também as uninucleadas.

O número de núcleos de espécies multinucleadas varia de 3 a 28 núcleos nas células jovens, sendo que o número de núcleos é baixo nas células mais velhas, provavelmente devido à formação de septos secundários, enquanto que espécies binucleadas possuem 2 núcleos por célula, (Butler & Bracker, 1970).

4.4. Grupos de anastomose

A classificação da espécie *R. solani* baseia-se em critérios morfológicos, fisiológicos, genéticos e patológicos (Anderson, 1982; Ogoshi, 1987; Sneh et al., 1991; Vilgalys & Cubeta, 1994). Segundo Carling (2000) existem 14 AGs para *Rhizoctonia solani*: AG 1 a AG 13 e AG BI. Além de 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 *R. 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.

Inicialmente, para esclarecer as distinções entre AG e ISG de *Rhizoctonia*, são propostas as seguintes definições (Sneh et. al., 1991):

- AG: representa um grupo de isolados relacionados capazes de auto reconhecimento através da fusão das hifas (anastomose). A fusão entre indivíduos geneticamente diferentes dentro de um grupo de anastomose produz uma resposta de incompatibilidade somática (vegetativa) distinta a nível celular, enquanto que as anastomoses envolvendo indivíduos geneticamente idênticos resulta em fusão perfeita. Interações entre isolados de diferentes AG podem também resultar em incompatibilidade somática através do contato de hifas, mas não envolvendo fusão direta de hifas. Hifas de isolados pertencentes ao mesmo AG são atraídas e conectadas, ou fundidas, umas às outras, enquanto que isolados de diferentes AG não exibem esse comportamento (Ogoshi, 1987). Segundo Matsumoto et al. (1932), Flentje & Stretton (1964), Parmeter et al. (1969), Carling et al. (1988), MacNish et al. (1993) e Cubeta & Vilgalys (1997), quatro classes de reação podem ser diferenciadas em função do grau de interação entre hifas de isolados distintos, sendo representadas por C0, C1, C2 e C3. Interações do tipo C0 e C1 resultam em ausência de fusão ou somente contato entre os isolados, e acontecem quando isolados de diferentes AGs são pareados. Dentro do mesmo AG podem ocorrer interações do tipo C2 e C3. Reações do tipo C2, também chamadas de ‘reação de morte’ ou ‘anastomose imperfeita’, representam incompatibilidade somática entre indivíduos distintos geneticamente. Neste caso ocorre fusão de parede celular e morte de algumas das células em cada hifa envolvida na fusão, sendo que sob microscopia de campo claro, as células mortas apresentam-se plasmolisadas quando comparadas às células adjacentes. Já reações do tipo C3, também denominadas de ‘anastomose perfeita’, indicam identidade genética entre isolados, podendo representar relacionamento clonal. Reações C3 são caracterizadas por fusão de parede e membrana celular, sendo que o ponto de fusão não fica claramente visível, não ocorrendo morte de células;

- ISG: representa um subgrupo de isolados dentro de um AG, cuja fusão de hifas é mais frequente entre os isolados do mesmo subgrupo, ou ainda possuem outras características particulares, incluindo diferenças genéticas baseadas em marcadores moleculares. A maioria dos ISG são geneticamente e, frequentemente, morfologicamente distintos uns dos outros.

Atualmente, para *R. solani* são relatados 3 ISG dentro do AG 1 (IA, IB e IC), 8 dentro do AG 2 (2-1 I, 2-1 II, 2-1 III, 2-2 IIIB, 2-2 IV, 2-2 LP, 2-3 e 2-t), 3 dentro do AG 4 (HGI, HGII e HGIII), 2 dentro do AG 6 (HGI e GV), 5 dentro do AG 8 (ZG1 1, ZG1 2, ZG1 3, ZG1 4 e ZG1 5) e 2 dentro do AG 9 (TP e TX) (Carling, 2000; Kuninaga & Carling, 2000; MacNish & O'Brien, 2000).

Os estudos de similaridade de seqüência de bases do DNA, também melhoraram o sistema de caracterização de AG, visto que pelo método de agrupamento por anastomose de hifas podem ocorrer erros de identificação devido à variação na frequência de fusão de hifas pois, segundo Sneh et. al. (1991), existe dificuldade na diferenciação de isolados do AG 1 e AG 2 pela fusão de hifas. Além disso, hifas dos isolados do AG 2 fundem-se com isolados do AG 8 e AG BI.

A identificação de AG ou de ISG dentro de *R. solani*, a partir de 1937 por Schultz (Schultz, citado por Vilgalys & Cubeta, 1994), trouxe grandes contribuições para o estudo da resistência de plantas ao patógeno, bem como para estudos epidemiológicos e ecológicos de várias doenças causadas por *Rhizoctonia*, gerando avanços no controle destas.

A caracterização do AG ou ISG de *R. solani* incidente sobre determinada cultura pode determinar o sucesso ou não de práticas culturais empregadas para o controle de doenças causadas por *Rhizoctonia*. O emprego de determinado programa de rotação de culturas e a realização de plantio direto podem ser condenados ao insucesso,

quando não se considera necessária a caracterização de grupos de anastomose que ocorreram sobre a cultura precedente.

A variabilidade existente dentro de uma espécie, sendo esta dividida em grupos de anastomose (AG) e grupos intra específicos (ISG) se deve à recombinação parassexual, que representa uma alternativa para o ciclo sexual para criar novas combinações de genes.

A importância dos estudos e a determinação de AG e ISG em *Rhizoctonia* spp. deve-se a uma série de fatores, tais como:

- nível de diversidade das espécies;
- ausência de estruturas assexuais (corpo de frutificação e conídios);
- impedimento do uso da taxonomia convencional.

4.5 Aplicação da biologia molecular em estudos de grupos de anastomose de *Rhizoctonia* spp.

A sistemática de *Rhizoctonia* é difícil devido à falta de características seguras para a delimitação num taxon biológico significativo (Tu & Kimbrough, 1978). Muitos problemas associados ao estudo de diferentes níveis de diversidade em *Rhizoctonia* são compreendidos melhor através do uso de marcadores moleculares (Vilgalys & Cubeta, 1994).

Progressos consideráveis têm sido possíveis pelo reconhecimento de ISG como unidades taxonômicas fundamentais dentro de diferentes grupos em *Rhizoctonia*. Vários estudos têm demonstrado a utilidade dos conceitos de AG e ISG como indicadores de

grupamento genético e a validação mais convincente de tais conceitos advém de estudos de sistemática molecular (Vilgalys & Cubeta, 1994).

Dentre as ferramentas aplicadas para a sistemática de *Rhizoctonia* estão: isoenzimas, hibridização DNA/DNA, análises do polimorfismo de tamanho fragmentos restringidos (RFLP), reação da polimerase em cadeia (PCR), polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD) e sequenciamento de DNA ribossômico.

Diferenças genéticas entre ISG também têm sido demonstradas utilizando-se o método de marcadores RAPD desenvolvido por Welsh et al. (1990) e Williams et al. (1990). Duncan et al. (1993) descobriram que marcadores RAPD eram viáveis para diferenciação entre ISG australianos no complexo *R. solani*, assim como entre diferentes isolados dentro de alguns ISG. Através de análises com marcadores RAPD, Yang et al. (1995), conseguiram diferenciar isolados do AG 8 ZG1 de isolados do ZG 2, atualmente designado como ZG 1-5 (MacNish et al., 1993), contudo, isolados dos subgrupos do ZG 1 não puderam ser diferenciados, pelo marcador utilizado. Segundo Toda et al. (1999), considerável variabilidade foram constatadas entre isolados de diferentes AGs, na análise de produtos amplificados por RAPD.

Pascual et al. (2000) utilizaram marcadores RAPD para analisar o DNA 'fingerprinting' de 30 isolados de *R. solani* AG 1 IA causadores da queima da bainha em milho nas Filipinas e Japão, observando níveis de 75% de similaridade entre os sete grupos formados.

4.6. Importância de *Rhizoctonia* spp. em hortaliças

Rhizoctonia spp. são fungos que têm causado perdas consideráveis à várias hortaliças no Brasil, como alface, tomate, pimentão, melão, beterraba, cenoura, pepino, morango, rabanete, couve, entre outras.

Bolkan & Ribeiro (1985) observaram que dentre 130 isolados de *Rhizoctonia solani* de 31 espécies de plantas provenientes de 11 estados brasileiros, 59 foram designados como sendo do AG 4, 10 do AG 3, 42 do AG 2, 11 do AG 1, 1 do AG 5 e 7 do AG-8. A patogenicidade de 35 isolados de diferentes AGs em pimentão, rabanete e repolho variaram consideravelmente.

De 361 isolados de mudas de beterraba, Windels & Nabben (1989) verificaram que 36 isolados eram *Rhizoctonia* sp. binucleada, enquanto que os 325 isolados restantes eram *R. solani* pertencentes aos AG 4, AG 5, AG 2-2, AG 1, AG 2-1 e AG 3. Em testes de patogenicidade com mudas de beterraba, os autores constataram que os AG 1, AG 2-2 e AG 4 foram altamente agressivos, enquanto que AG 2-1, AG 3, AG 5 e isolados de *Rhizoctonia* sp. binucleada não foram agressivos.

No Texas, 98 isolados de *Rhizoctonia* spp. de mudas e plantas adultas de beterraba foram identificados. De 46 isolados de *R. solani* obtidos de plantas de beterraba adulta, 89% pertenciam ao AG 2-2, enquanto que os isolados obtidos de mudas eram AG 4 e AG 5; dois isolados de *Rhizoctonia* sp. binucleada foram identificados, sendo um proveniente de mudas e outro de plantas adultas. Em testes de patogenicidade, Rush et. al. (1994) verificaram que os AG 4 e AG 2-2 reduziram o estande de beterraba provocando *damping-off*, AG 2-2 causou podridão em plantas adultas e os dois isolados de *Rhizoctonia* sp. binucleada não foram agressivos nos dois estágios de desenvolvimento da planta.

Isolados provenientes de hastes de plantas de beterraba foram caracterizados como AG 4, enquanto que os isolados de raízes como AG 2-2 (Umralina et. al., 1987). No Japão, foi identificado por Hyakumachi et. al. (1990) o AG 2-2 de *R. solani* causando podridão de raízes e *damping-off* na cultura da beterraba. Após isolamento em mudas de beterraba na Irlanda, O'sullivan & Kavanagh (1991) identificaram as espécies *R. solani* e *R. cerealis*, sendo que nos isolados de *R. solani* identificou-se como AG 2, AG 4 e AG 5. Sakaguchi et. al. (1990) relataram a primeira ocorrência de *R. solani* AG 4 provocando *damping-off* em mudas de aspargo.

Em rabanete, 10 - 14 dias após a semeadura a 22°C em condições de casa de vegetação, Nieuwhof & Giezen (1988) constataram alta infecção de *R. solani* dos AG 2-1 e AG 4.

Em mudas de salsa com *damping-off* foram identificados os AG 4, AG 1 e AG 2-2 de *R. solani*, segundo Hershman et. al. (1986), que em testes de patogenicidade, constataram que os AG 4 e AG 2-2 foram altamente agressivos, enquanto que o AG 1 variou consideravelmente em agressividade.

Rhizoctonia solani AG-4 tem sido determinado como agente causal de *damping-off* em crucíferas na China (Chen et. al., 1990), em melão (Uematsu et. al., 1993) e espinafre (Naiki e Kanoh, 1978) no Japão. *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI foi observado como agente causal de podridão de frutos em tomateiro no Irã (Rahimian, 1988). *Rhizoctonia solani* AG-4 também foi observado causando queima das folhas em alface, assim como, os AG-1 e AG-2 (Wareing et. al., 1986). Além de *R. solani* AG-4 causar *damping-off* em tomateiro, AG-1 IA, IB e IC também causaram os mesmos sintomas (Hyakumachi & Sumino, 1984) em tomateiros no Japão, AG-5 em espinafre (Akashi et. al., 1986) e melão (Manzali & D'Ercole,

1992), AG-2-1 em crucíferas (Kang & Kim, 1986) na Coréia e, isolados do AG-2-1 coletados de *Durio zibethimis* foram agressivos a melão e pepino (Lim et. al., 1987).

O Quadro 1 apresenta a descrição dos isolados de *R. solani* e de *Rhizoctonia* sp. binucleada e seus respectivos hospedeiros no mundo, enquanto que o Quadro 2 apresenta os isolados de *R. solani* no Brasil.

Quadro 1. Distribuição de grupos anastomose e grupos intra específicos de *Rhizoctonia solani* e *Rhizoctonia* sp. binucleada no mundo

Família	Hospedeiro	AG ou ISG	Local
Alliaceae	Cebola	5	Itália
Apiaceae	Cenoura	3 e 9	Turquia
	Salsa	1; 2-2 e 4	EUA
Brassicaceae	Repolho	2-1 e 4	Coréia
	Couve-chinesa	2-1 e 4	Canadá
	Rabanete	1; 2-1; 4 e 11	Holanda
Chenopodiaceae	Beterraba açucareira	2-2IIIB; 2-2IV. 1 e 4	Japão
	Espinafre	4 e 5	Japão
Cichoriaceae	Alface	1-1A e 5	Coréia
		9	EUA
Cucurbitaceae	Pepino	1; 4 e 5	EUA
		A, Ba, G, O, 2-2 e 4	Japão
	Melão	1 e 5	Itália
	Melancia	4 e 7	EUA
Rosaceae	Morangueiro	A; G e I	EUA
Solanaceae	Berinjela	A; F	Iugoslávia
		4 e 5	China
		2-1; 3; 4 e 5	China
		4 (frutos)	Irã

Quadro 2. Distribuição em hortaliças de *Rhizoctonia solani* de alguns isolados no Brasil (Bolkan & Ribeiro, 1985)

Hospedeiro	Local do sintoma	AG	Estado
Alcachofra	Raiz	4	SP
Pimentão	Fruto e hipocótilo	1 e 4	DF, AM e RJ
Cenoura	Raiz	4	DF
Repolho	Folhas	2	AM
Chicória	Raiz	4	RJ
Pepino	Folhas	1	AM
Berinjela	Fruto	4	DF
Alface	Folhas	1	RJ
Ervilha	Hipocótilo	4	DF
Rabanete	Folhas	1	AM
Beterraba	Raiz	4	DF

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Estabelecimento de coleção de isolados de *Rhizoctonia* spp. de hortaliças e manutenção de culturas

5.1.1. Isolamento a partir de tecidos vegetais infectados

Brócolos (*Brassica oleracea* var. *italica*), couve-manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*), espinafre (*Spinacia oleracea*) e melão (*Cucumis melo*) com sintomas de podridão de raiz e de colo, alface (*Lactuca sativa*) com lesões foliares e tomate (*Lycopersicon esculentum*) com hastes e frutos necrosados foram coletados e lavados em água corrente e secos com papel absorvente. A partir dos materiais, retirou-se fragmentos de tecidos de raiz, colo, folhas, hastes e frutos das respectivas hortaliças, foram transferidos

separadamente para placas de petri contendo o meio de cultura KHMP [modificação do meio de Ko & Hora (1971) pela substituição de fenaminosulf (Dexon) por metalaxyl (Ceresini et. al., 1996) e adição de prochloraz (Castro et. al., 1988)] composto por 1,0 g de KH_2PO_4 , 0,50 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,50 g de KCl, 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g de NaNO_2 , 0,05 g de cloranfenicol, 20 g de ágar e 1000 mL de água destilada. Após esterilização em autoclave a 121°C durante 30 minutos, foram adicionados 0,05 g de estreptomicina, 0,24 g de metalaxyl e 0,005 g de prochloraz. As placas foram mantidas a 28°C sob ausência de luz. Após 48 horas e evidenciando-se o crescimento micelial típico de *Rhizoctonia* spp., fragmentos de hifas foram transferidos individualmente para o meio BDAO [extrato da cocção de 200g de batata descascada, 20g de dextrose, 15g de ágar, 1000mL de água destilada (Tuite, 1969) e 0,06g de oxitetraciclina. Realizaram-se repicagens sucessivas de fragmentos de hifas até que culturas puras e uniformes foram obtidas.

5.1.2. Preservação do fungo

Os isolados padrões de anastomose foram recebidos de coleções mantidas pelos pesquisadores J. B. Sinclair (Universidade de Illinois, Urbana-Champaign, EUA), A. Ogoshi (Hokkaido University, Sapporo, Japão), L. J. Herr (The Ohio State University, Wooster, EUA), S. Naito (Tohoku National Agricultural).

Os isolados obtidos de hortaliças foram preservados em tubos de cultura contendo BDA e óleo mineral “Nujol” esterilizado (Tuite, 1969), em grãos de arroz com casca, segundo a metodologia modificada de Sneh & Adams (1996), e também em tubos “Eppendorf” contendo glicerol. No armazenamento em grãos de arroz, utilizou-se frascos do

tipo Duran de 250mL com tampa de rosca contendo grãos de arroz com casca, água destilada e cloranfenicol, na concentração de 250µg/mL que foram levados ao fogo até iniciar fervura. Em seguida, após descanso por 10 minutos, retirou-se a água dos frascos, e estes foram autoclavados duas vezes a 121°C/1h, com um período de 24 horas de repouso entre as autoclavagens. Os grãos foram transferidos para tubos com tampa de plástico para vedação, e submetidos a nova autoclavagem a 121°C/1h. Após descanso por 24 horas, fragmentos de micélio dos isolados, obtidos da periferia de culturas incubadas a 28°C por três dias sob ausência de luz, foram transferidos para os tubos, os quais receberam filme plástico para melhorar a vedação, e foram mantidos a 26°C durante 10-14 dias sob ausência de luz. Concluída a infestação total dos grãos, os mesmos foram transferidos para placas de plástico, as quais permaneceram em dessecador por 48 horas, objetivando retirar a umidade, a fim de aumentar o tempo de preservação dos isolados. As placas foram conservadas em “freezer” a temperatura de -20°C. No caso da preservação em glicerol, utilizou-se tubos “Eppendorf” com capacidade de 1,5mL e colocou-se nos mesmos cinco discos de micélio de cada isolado juntamente com 1mL da mistura de 1 parte de glicerol e 4 partes de água destilada, previamente autoclavada a 121°C durante 30 minutos; este conjunto foi conservado em “freezer” a -80°C.

5.2. Determinação de características citológicas específicas de *Rhizoctonia solani* e *Rhizoctonia* sp. binucleada de hortaliças

5.2.1. Número médio de núcleos por célula

Contou-se o número de núcleos em 20 células jovens em lâminas de vidro para microscopia contendo uma camada de ágar-água (AA). Essas lâminas foram preparadas de forma semelhante à técnica da lâmina de vidro para microscopia [adaptada por Ceresini et. al. (1996) das técnicas de Herr & Roberts (1980) e Kulik & Dery (1992)] descrita para a identificação de anastomose de hifas, diferente apenas pela não execução de pareamento entre isolados. As lâminas de vidro foram lavadas em solução detergente, enxaguadas e secas ao ar. Em seguida, foram colocadas no interior de placas de petri. Os conjuntos de lâminas foram autoclavadas a 121°C durante 30 minutos. Asepticamente, com o auxílio de uma pipeta automática, as lâminas foram cobertas com 1 mL de AA a cerca de 90°C, a fim de formar uma camada em torno de 1mm de espessura. A seguir, um disco de BDAO com cultura nova (em torno de 3 dias) de um isolado a ser identificado foi transferido para a lâmina. Este conjunto foi mantido a 25°C durante 40 horas no escuro. Após este período, as lâminas foram tratadas com safranina O de Bandoni a 0,03% e em seguida com hidróxido de potássio a 0,3%, a fim de que ocorresse a fixação do corante. Em seguida, retirou-se o excesso de corante com o auxílio de um papel absorvente e adicionou-se sobre a camada de AA uma lamínula.

Realizou-se a contagem de número de núcleos por célula através de microscopia sob campo claro a 200 e 400x de aumento (Liu & Sinclair, 1991), sendo que isolados possuindo 2 núcleos por célula foram determinados como *Rhizoctonia* sp. binucleada, enquanto que isolados com mais de 2 núcleos por célula foram determinados como sendo *Rhizoctonia solani*.

5.2.2. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia solani* e *Rhizoctonia* sp. binucleada de hortaliças com relação ao grupamento de anastomose

No Quadro 3 é apresentada a relação de isolados de *Rhizoctonia* sp. e de *R. solani* de alface, brócolos, melão, espinafre, tomate e couve-manteiga, mantidos na coleção da micoteca do Departamento de Produção Vegetal – Setor Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP, Botucatu-SP.

Os isolados de *R. solani* representantes dos AG 1 ao AG 9 foram pareados com os isolados de *R. solani* obtidos de tomate, espinafre, alface, melão e couve brócolo e os AG A a AG Q de *Rhizoctonia* sp. binucleada com os obtidos de couve manteiga, tomando-se como base os relatos da literatura a respeito dos AGs associados a estas hortaliças, bem como pelos aspectos morfológicos das culturas em BDA, além da coloração e tamanho dos escleródios.

A anastomose de hifas foi determinada pela técnica da lâmina de vidro para microscopia [adaptada por Ceresini et. al., (1996) das técnicas de Herr & Roberts (1980) e Kulik & Dery (1992)]. Um disco de BDAO obtido da margem de uma cultura nova (em torno de 3 dias) de um isolado a ser identificado e outro de um dos isolados padrões de *Rhizoctonia solani* ou de *Rhizoctonia* sp., com AGs conhecidos, foram posicionados a 2 cm um do outro sobre a lâmina de vidro contendo uma camada de ágar-água. Este conjunto foi incubado a 25°C durante 40 horas no escuro.

Quadro 3. Relação de grupos de anastomose de *Rhizoctonia solani* mantidos na micoteca do Departamento de Produção Vegetal – Setor Defesa Fitossanitária, FCA, UNESP, Botucatu-SP

Grupo de anastomose	Origem		Hospedeiro	Local	Ano
	Número original	Responsável pelo isolamento (fonte)			
AG-1 IA	H5-513	NAITO	Arroz	Tohoku, Japão	1993
AG-1 IA	H5-519	NAITO	Milho	Tohoku, Japão	1993
AG-1 IA	H5-526	NAITO	Milho	Tohoku, Japão	1993
AG 1-IB	-	HERR	Alface	Ohio, EUA	1993
AG 1-IC	-	HERR	Alface	Ohio, EUA	1993
AG 1-IC	M43	-	Coníferas	Canadá	-
AG 2-1	-	SINCLAIR	-	Illinois, EUA	1993
AG 2-1	PS-4	OGOSHI	Ervilha	Tokushima, Japão	1973
AG 2-2 IIIB	-	SINCLAIR	Soja	Illinois, EUA	1993
AG 2-2 IV	RI-64	OGOSHI	Beterraba	Ibaraki, Japão	1960
AG 2-3	-	NAITO	Soja	Japão	-
AG 3	SCL24	CARLING	Tubérculo de batata	Palmer, Alaska, EUA	1983
AG 4	-	PARMETER	-	-	-
AG 4 HGI	-	HERR	Fumo	Ohio, EUA	1993
AG 4 HGI	AH-1	OGOSHI	Amendoim	Chiba, Japão	1968
AG 4 HGI	-	KUNINAGA	-	Japão	-
AG 4 HGII	-	HERR	Beterraba	Ohio, EUA	1993
AG 4 HGII	RH 165	OGOSHI	Beterraba	Hokkaido, Japão	-
AG 4 HGII	-	KUNINAGA	-	Japão	-
AG 4 HGIII	-	CUBETA	Amendoim	EUA	-
AG 5	GM-10	OGOSHI	Soja	Nagano, Japão	-
AG 5	RH 25	CUBETA	-	Japão	-
AG 6 HGI	HAM 1-1	KUNINAGA	Solo nativo	Japão	1977
AG 6 HGI	OHT 1-1	KUNINAGA	Solo nativo	Hokkaido, Japão	1977
AG 6 HGI	UBU 1-1	KUNINAGA	Solo nativo	Japão	1976
AG 6 HGI	NTA 3-1	KUNINAGA	Solo nativo	Japão	1977
AG 6 GV	HN 1-1	KUNINAGA	Solo nativo	Japão	1977
AG 6 GV	NKN 2-1	KUNINAGA	Solo nativo	Hokkaido, Japão	1977
AG 7	1529	KUNINAGA	Solo de campo	Japão	1979
AG 7	HO-1556	KUNINAGA	Solo de campo	Kagawa, Japão	1979
AG 8	RH 28	CUBETA	-	-	-
AG 9	Sq R1	CARLING	Solo	Palmer, Alaska, EUA	1984
AG 11	RH 31	CUBETA	-	Arkansas, EUA	-

Quando as hifas dos isolados estivessem se interceptando, foi adicionado, sobre o centro da lâmina, uma gota de safranina O de Bandoni a 0,03% e, a seguir, uma gota de solução aquosa de KOH a 3%, sobrepondo-se então uma lamínula de vidro, sendo que o excesso de corante foi retirado com papel de filtro. As observações foram feitas em microscópio sob campo claro a 200 e 400x de aumento (Liu & Sinclair, 1991).

Foram consideradas hifas compatíveis quando observou-se conexão de paredes celulares acompanhada de fusão de células em anastomose e morte das adjacentes (reação categoria 2) ou fusão de paredes celulares e plasmalema das hifas em anastomose (reação categoria 3) em pelo menos 5 pontos em cada uma de 4 lâminas (Carling & Leiner, 1990).

5.3. Caracterização dos isolados de *Rhizoctonia solani* de alface através de RAPD

5.3.1. Extração de DNA total

De todos os isolados de alface AG 1 preservados e dos padrões de anastomose dos subgrupos AG 1 IA, IB e IC, foi transferida uma pequena porção de micélio para uma placa de petri contendo meio de BDAO. As placas de petri com o fungo foram mantidas em BOD por 10 dias em condições de escuro, a 25°C. Após este período, retirou-se 6 discos de micélio, de 5mm de diâmetro, da colônia, colocou-os em tubos “Eppendorf” com capacidade de 2000µL e macerou-os com nitrogênio líquido. Em seguida, pipetou-se 1000µL de DNAzol (Genomic DNA Isolation Reagent, Life Technology) em cada amostra, deixando-o agir por 60 minutos. As amostras foram centrifugadas (Centrífuga 5417R) a 10.000g durante

10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, retirou-se 650µL do sobrenadante de cada amostra e transferiu-o para um novo tubo “Eppendorf”. A seguir, adicionou-se a cada amostra 650µL de isopropanol absoluto a fim de precipitar o DNA. Novamente centrifugou-se a 4.000g por 2 minutos a 4°C. Logo após, retirou-se cuidadosamente o sobrenadante sem remover o “pellet” formado e pipetou-se 1000µL de etanol 95% deixando-se agir por 5 minutos, a fim de ocorrer a lavagem do DNA. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 3 minutos a 4°C e retirou-se novamente o sobrenadante, com o cuidado de não remover o “pellet”, e as amostras foram colocadas para secar a temperatura ambiente durante 2 horas. Após a secagem, adicionou-se 50µL de TE (1mM de EDTA, pH 8,0, 10mM Tris) + RNase (40µg/mL). A fim de verificar a qualidade do DNA, 10µL de cada amostra foram misturadas com 4µL de tampão de carregamento (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose em água) e separadas em gel de agarose a 1% em TBE (0,1M de Tris-HCl, 0,1M de ácido bórico e 0,02mM de EDTA pH 8,3) a 5 volts/minuto. As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro (Pharmacia) a 260 nm.

5.3.2. RAPD

A partir da realização da extração de DNA dos isolados de alface e três padrões dos subgrupos de AG 1, realizou-se a técnica de RAPD (“random amplified polymorphic DNA”) com os “primers” OPA 02, OPA 09, OPA 13 e OPA 20 (Operon).

A reação foi realizada em tubos Eppendorf de 200µL contendo 10X de tampão *Taq* polimerase, 10 mM da mistura dos quatro nucleotídeos, 50 mM de MgCl₂, 10µM de “primer”, 100 ng de DNA e 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies).

A programação do termociclador foi uma denaturação inicial de 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 35°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e trinta segundos e, mais uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Depois da amplificação, as amostras foram misturadas com 4µL de tampão de carregamento e, 500 ng de marcador 100 bp Ladder, também misturado com 4µL de tampão de carregamento, foram separados em gel de agarose a 1,5% em TBE aproximadamente 5V/cm de gel. A revelação da visualização das bandas do gel foi realizado sob luz ultravioleta.

5.3.2.1. Análise de RAPD

As análises dos dados do polimorfismo de DNA amplificados ao acaso (RAPD) foram realizadas no programa computacional NTSYS-pc 1.8, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Rohlf, 1992).

Os dados foram registrados na forma de ausência/presença de bandas de gel. Bandas de mesmo comprimento foram consideradas como idênticas. Esses dados foram codificados na forma binária (1 para a presença e 0 para a ausência).

A distância genética entre os isolados de *R. solani* de alface e os padrões AG 1IA, AG 1IB e AG 1IC foi determinada pelo coeficiente Sample Matching.

A matriz de distâncias foi em seguida transformada num dendograma utilizando-se o método SAHN Clustering (sequential agglomerative, hierarchical and nested) sob procedimento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averaging).

5.4. Testes de patogenicidade

5.4..1. Patogenicidade de isolados de *Rhizoctonia solani* de parte aérea com AG conhecido em alface e tomateiro

A patogenicidade de isolados de *Rhizoctonia solani* de parte aérea com AG conhecido foi testada em alface e tomateiro, sob condições de casa-de-vegetação. Os três isolados obtidos das folhas basais de alface foram inoculados em plantas de alface da cultivar Elisa, enquanto que os cinco isolados obtidos da inserção das folhas com as hastes de tomateiro foram inoculados em plantas de tomateiro da cultivar Santa Clara, através da metodologia descrita por Bolkan & Ribeiro (1985). Três plantas de alface e de tomateiro com idade de 35 dias, crescidas em vasos plásticos contendo solo previamente esterilizado, foram inoculadas através da deposição, na região central da folha ou da haste, de um disco de micélio do isolado a ser testado, obtido de cultura crescida em BDA por 72 horas a 26°C, sob ausência de luz. Após a inoculação, as plantas foram cobertas com saco plástico por 48 horas. Foram inoculadas três folhas por planta.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com cinco repetições, sendo cada parcela constituída de um vaso contendo três plantas.

Folhas inoculadas de forma semelhante, no entanto, com discos somente de BDA, serviram como testemunha.

A avaliação da severidade da doença destes isolados foi efetuada cinco dias após a inoculação, utilizando-se o índice de doença (ID) baseado numa escala de notas com cinco níveis (Bolkan & Ribeiro, 1985):

0: sem sintomas

- 1: 1-25% da superfície da folha ou da haste com área necrosada
- 2: 26-50% da superfície da folha ou da haste com área necrosada
- 3: 51-75% da superfície da folha ou da haste com área necrosada
- 4: mais de 75% da superfície da folha ou da haste com área necrosada

Foi efetuado também o reisolamento do fungo das plantas inoculadas.

Os dados referentes à patogenicidade foram submetidos à análise de variância pelo teste de Tukey para comparação de médias, ao nível de 5% de probabilidade (Pimentel Gomes, 1982).

5.4.2. Patogenicidade de isolados de *Rhizoctonia* spp. de raízes e colo com AG conhecido em espinafre, melão, brócolos e couve-manteiga

5.4.2.1. Teste de germinação de sementes de espinafre, melão, brócolos e couve-manteiga

Para espinafre, melão, brócolos e couve-manteiga realizou-se o teste de germinação antes da implantação do teste definitivo, para a melhor realização da avaliação do índice de doença.

O teste de germinação foi realizado com papel germitest, com 50 sementes e três repetições. Após 3 dias de incubação em BOD a 28°C, observou-se a emissão ou não de radículas e procedeu-se as avaliações. O critério utilizado para avaliar o ensaio foi: as sementes que emitiram radículas, desde pequenas a grandes, foram consideradas sementes germinadas e as que não emitiram nenhuma radícula, consideradas sementes não germinadas.

Neste caso, colocaram-se 50 sementes de cada uma destas hotaliças em papel germitest e mantidas a 25°C sob ausência de luz. Após 8 dias da implantação do teste, realizou-se a avaliação, através da contagem de sementes germinadas e a partir daí a obteve-se a respectiva porcentagem de germinação.

Também foi realizada a semeadura em solos mais substrato, colocando-se 30 sementes de espinafre e de melão e 50 sementes de brócolos e de couve-manteiga, porém, neste caso, realizou-se a avaliação aos 14 dias após a semeadura.

5.4.2.2. Patogenicidade de isolados de *Rhizoctonia* spp. de raízes e colo com AG conhecido em espinafre, melão, brócolos e couve-manteiga

A patogenicidade de isolados de *Rhizoctonia* spp. de raízes e colo com AG conhecido foi testada em espinafre, melão, brócolos e couve-manteiga, sob condições de casa-de-vegetação.

Os isolados obtidos de raízes e de colo foram inoculados nas plantas hospedeiras, utilizando-se substrato de crescimento areno-orgânico, constituído por 3 partes de esterco curtido peneirado, 1 parte de areia lavada e 2% de farelo de aveia (p/v), umedecido com água destilada na proporção de 30ml de água para cada 100ml de substrato seco ao ar. Foram colocados cerca de 200ml desse substrato por frasco de vidro transparente (soro fisiológico de 350ml), tampado com rolha de borracha furada ao centro, na qual se introduziu um tubo de vidro vazado, vedando-se com tampão de algodão. Procedeu-se a autoclavagem destes por duas vezes, durante uma hora a 121°C, com um período de 24 horas entre as autoclavagens (Fenille e Souza, 1999).

Para a superfície do substrato, após descanso de 24 horas, foram repicados 3 discos de micélio de 5mm de diâmetro obtidos da periferia de culturas crescidas em BDA + oxitetraciclina (50 µg/ml) a 26°C/48 h, no escuro. Os frascos foram mantidos em incubadora a 26°C por 15 dias, até colonização total de substrato. Alguns frascos permaneceram sem o fungo, servindo assim para confirmar o sucesso da autoclavagem. Após 4 dias da repicagem e por mais 2 vezes a cada 4 dias, procedeu-se a agitação dos frascos para promover a colonização uniforme do substrato.

Foram utilizados vasos de 18 cm de diâmetro na parte superior e formato cônico, com capacidade para 1.500ml de solo. Do volume total, 500ml para cada vaso, foi retirado para inoculação. A análise química do solo utilizado como substrato segue no Quadro 4.

Quadro 4. Análise química do solo utilizado no experimento.

	PH	M.O.	P resina	mmol _c /dm ³						V
	CaCl ₂	g/ dm ³	mg/dm ³	H + Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	%
Solo usado	5,9	44	209	24	3,2	66	29	98	121	80

Os isolados de *Rhizoctonia* spp. foram incorporados pela mistura do substrato areno-orgânico contido nos frascos, com 500ml de solo, na proporção de 1,5% (peso/volume - peso do substrato por volume de solo). Após homogeneização, em sacos plásticos, o solo inoculado foi retornado aos vasos. Posteriormente, 12 sementes de espinafre da cultivar Tohkai, 12 sementes de melão da cultivar Valenciano Amarelo, 30 sementes de brócolos da cultivar Calabres e 30 sementes de couve-manteiga da cultivar Portuguesa foram semeadas em cada vaso e foram mantidos em casa de vegetação, com temperatura ajustada para 25±2°C. Sempre que necessário os vasos foram molhados, de modo a manter a umidade

dentro da capacidade de campo. Foram incluídos vasos contendo plantas não inoculadas com o patógeno representando a testemunha do experimento, bem como padrão para cálculo da porcentagem de germinação das sementes. O delineamento foi em blocos ao acaso, com 5 repetições.

A avaliação da severidade da doença dos isolados foi efetuada vinte dias após a inoculação e semeadura, através do índice de doença (ID), baseado numa escala de notas variáveis de 0 a 3 (modificada de Chung et. al., 1988):

0: plantas sem lesões

1: plantas com lesões no colo e cotilédones

2: *damping off* de pós emergência

3: *damping off* de pré emergência

Foi efetuado também o reisolamento do fungo das plantas inoculadas.

Os dados referentes à patogenicidade foram submetidos à análise de variância pelo teste de Tukey para comparação de médias, ao nível de 5% de probabilidade (Pimentel Gomes, 1982).

6. RESULTADOS

6.1. Coleção de isolados de *Rhizoctonia* spp. de hortaliças

Realizou-se o estabelecimento de uma coleção representativa de isolados de *Rhizoctonia* spp. associados a essas hortaliças. Obteve-se cinco isolados de tomateiro provenientes de Patos de Minas-MG e Paracatu-MG, quatro isolados de couve-manteiga provenientes de Lençóis Paulista-SP, três isolados de espinafre provenientes de Mogi das Cruzes-SP, três isolados de brócolos provenientes de Pardinho-SP, três isolados de melão e três de alface provenientes de Botucatu-SP, conforme apresentado no Quadro 5.

Quadro 5. Isolados de hortaliças obtidos e preservados em óleo “Nujol”, grãos de arroz e glicerol

Hospedeiros	Códigos dos isolados	Procedência	Sintomas nos hospedeiros	Número de isolados usados
Alface	AL-1 AL-2 AL-3	Botucatu-SP	Queima da saia	3
Brócolos	BR-1 BR-2 BR-3	Pardinho-SP	Podridão do colo e de raiz	3
Couve-manteiga	CM-1 CM-2 CM-3 CM-4	Lençóis Paulista-SP	Podridão de colo e de raiz	4
Espinafre	EP-1 EP-2 EP-3	Mogi das Cruzes-SP	Podridão de colo e de raiz	3
Melão	ME-1 ME-2 ME-3	Botucatu-SP	Podridão de colo e de raiz	3
Tomate	TO-1 TO-2 TO-3 TO-4 TO-5	Patos de Minas-MG Paracatu-MG	Podridão de haste e de frutos Podridão de frutos	2 3

6.2. Determinação de características citológicas específicas de *Rhizoctonia* spp. de hortaliças

6.2.1. Número médio de núcleos por célula

No Quadro 6 são apresentados os isolados nos quais foram determinados o número médio de núcleo por célula.

Quadro 6. Número médio de núcleos por célula em cada isolado estudado

Isolados	Número médio de núcleos por célula
AL-1	9
AL-2	11
AL-3	13
BR-1	5
BR-2	4
BR-3	5
CM-1	2
CM-2	2
CM-3	2
CM-4	2
EP-1	6
EP-2	5
EP-3	6
ME-1	9
ME-2	10
ME-3	9
TO-1	6
TO-2	5
TO-3	7
TO-4	7
TO-5	6

Os isolados de alface apresentaram em média 11 núcleos por célula, os de brócolos apresentaram 4,7 núcleos por célula, os de melão apresentaram 9,3 núcleos por célula, os de espinafre apresentaram 5,7 núcleos por célula, os de tomateiro apresentaram 6,5 núcleos por célula e somente os de couve-manteiga apresentaram 2 núcleos por célula.

A Figura 1 representa os núcleos do isolado TO-2 de tomateiro em condição multinucleada e a condição binucleada do isolado CM-1 de couve-manteiga.

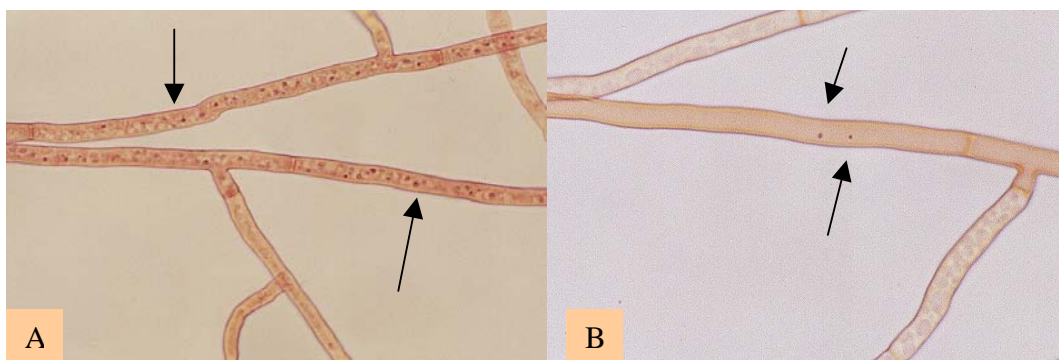


Figura 1. Condição multinucleada do isolado TO-2 (A) de *Rhizoctonia solani* e binucleada do isolado CM-1 (B) de *Rhizoctonia* sp. binucleada

6.2.2. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp. de hortaliças com relação ao grupamento de anastomose

Os pareamentos foram realizados levando-se em consideração as informações obtidas na literatura, bem como pelo aspecto morfológico das culturas em meio de BDA.

De acordo com a metodologia adotada para a determinação do grupamento de anastomose, tem-se os resultados apresentados no Quadro 7.

A Figura 2 representa a anastomose de hifas do isolado EP-3 de *Rhizoctonia solani* de espinafre com o isolado padrão AG 4 HGI, anastomose entre o isolado

BR-1 de *Rhizoctonia solani* de brócolos e o isolado padrão AG 4 HGII e a anastomose entre o isolado CM-2 de *Rhizoctonia* sp. binucleada de couve-manteiga e o isolado padrão AG G.

Quadro7. Grupo e subgrupos de anastomose dos isolados de *Rhizoctonia* spp. de alface, tomateiro, espinafre, melão, brócolos e couve-manteiga

Isolados	AGs e ISGs
AL-1	AG 1IA
AL-2	AG 1IA
AL-3	AG 1IA
TO-1	AG 4
TO-2	AG 4
TO-3	AG 4
TO-4	AG 4
EP-1	AG 4
EP-2	AG 4
EP-3	AG 4
ME-1	AG 4
ME-2	AG 4
ME-3	AG 4
BR-1	AG 4
BR-2	AG 4
BR-3	AG 4
CM-1	AG G
CM-2	AG G
CM-3	AG G
CM-4	AG G

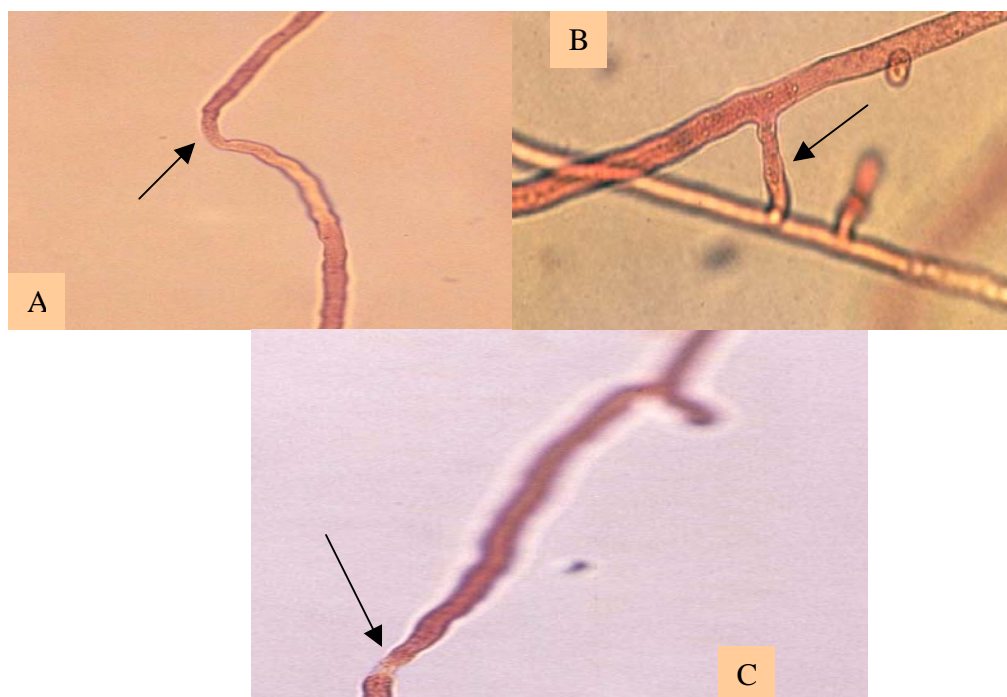


Figura 2. Reação de anastomose de hifas do isolado EP-3 com o padrão AG-4 HGI (A), do isolado BR-1 com o padrão AG-4 HGII (B) e do isolado CM-2 com o padrão AG-G (C)

6.3. Extração de DNA genômico total

Os resultados obtidos da quantificação apresentam-se no Quadro 8.

Quadro 8. Resultados da quantidade de DNA (ng/ μ L) de isolados de *Rhizoctonia solani* de alface

Isolado	Absorbância (260nm)	Razão	DNA (ng/ μ L)
AL-1	0,064	1,581	2,2
AL-2	0,026	1,446	0,7
AL-3	0,055	1,565	1,9

Pelos dados do Quadro 8, verifica-se que a qualidade e a quantidade de DNAs foram suficientes para a realização de reação de RAPD.

6.3.1. RAPD

Trinta bandas foram obtidas utilizando-se os “primers” OPA-02, OPA-09, OPA-13 e OPA-20, sendo que vinte e cinco foram polimórficas. Os três isolados de alface tiveram similaridade genética de 100% entre si, e também foram geneticamente mais próximos do padrão AG-1 IA, como apresenta a Figura 3.

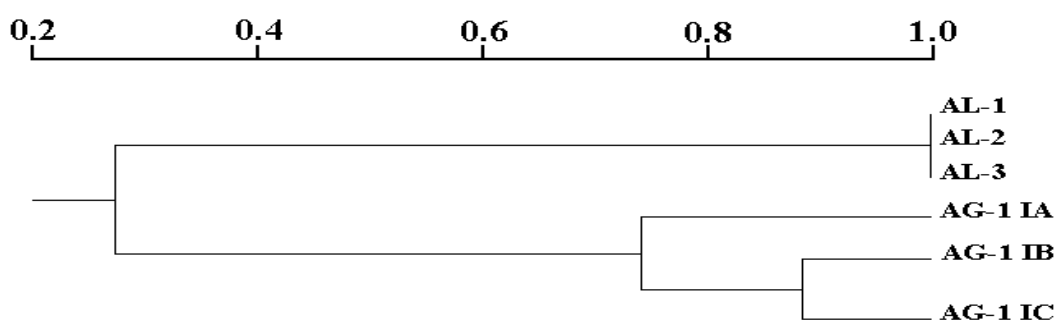


Figura 3. Dendrograma de similaridade genética entre isolados de alface, AL-1, AL-2 e AL-3 e seus padrões de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, IB e IC, através de RAPD

6.4. Patogenicidade de isolados de *Rhizoctonia solani* de parte aérea com AG conhecido em tomateiro e alface

6.4.1. Teste de patogenicidade dos isolados de tomateiro

Os dados de patogenicidade dos isolados TO-1, TO-2, TO-3, TO-4 e TO-5 de *Rhizoctonia solani* em tomateiro são apresentados no Quadro 9.

Na Figura 4 é apresentada a patogenicidade dos isolados TO-2, TO-3, TO-5 e TO-4 de *Rhizoctonia solani* de tomateiro em folhas e planta inoculadas comparando-se com folhas e planta testemunhas.

Quadro 9. Avaliação da severidade dos isolados TO-1, TO-2, TO-3, TO-4 e TO-5 de *Rhizoctonia solani* em folhas de tomateiro, aos cinco dias após a inoculação

Isolados	Repetições	Médias das notas das três plantas	Médias das repetições
TO-5	I	4,00	4,00 a
	II	4,00	
	III	4,00	
	IV	4,00	
	V	4,00	
TO-3	I	4,00	3,67 ab
	II	3,33	
	III	4,00	
	IV	3,33	
	V	3,67	
TO-4	I	3,67	3,13 bc
	II	4,00	
	III	2,33	
	IV	3,00	
	V	2,67	
TO-2	I	2,67	1,76 c
	II	2,00	
	III	2,67	
	IV	3,33	
	V	2,33	
TO-1	I	1,67	1,38 d
	II	1,00	
	III	1,33	
	IV	1,67	
	V	1,33	
Testemunha	I	0,00	0,00 e
	II	0,00	
	III	0,00	
	IV	0,00	
	V	0,00	

Coefficiente de variação: 6,60%

DMS (Tukey): 0,2166

Desvio padrão: 0,1088

0: sem sintomas; 1: 1-25% da superfície da folha ou da haste com área necrosada; 2: 26-50% da superfície da folha ou da haste com área necrosada; 3: 51-75% da superfície da folha ou da haste com área necrosada; 4: mais de 75% da superfície da folha ou da haste com área necrosada

Pelos dados do Quadro 9, verifica-se que todos os isolados testados de tomateiro diferiram estatisticamente da testemunha, sendo que os isolados TO-5 e TO-3 foram os mais agressivos.

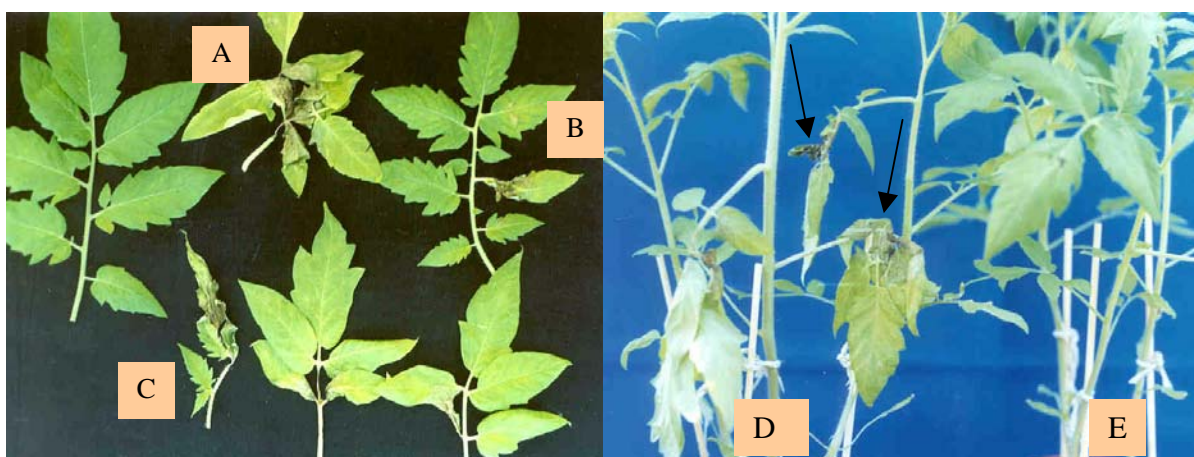


Figura 4. Patogenicidade em tomateiro dos isolados TO-2 (A), TO-3 (B) e TO-5 (C) de *Rhizoctonia solani* comparando-se com as folhas testemunhas e do isolado TO-4 (D) comparando-se com a planta testemunha (E)

6.4.2. Teste de patogenicidade dos isolados de alface

Os dados de patogenicidade dos isolados AL-1, AL-2 e AL-3 de *Rhizoctonia solani* em alface seguem no Quadro 10.

A Figura 5 apresenta a patogenicidade dos isolados AL-3 e AL-1 de *Rhizoctonia solani* de alface em folhas e planta inoculadas comparando-se com uma folha e uma planta do tratamento testemunha.

Quadro 10. Avaliação da severidade dos isolados AL-1, AL-2 e AL-3 de *Rhizoctonia solani* em folhas de alface, aos cinco dias após a inoculação

Isolados	Repetições	Médias das notas das três plantas	Médias das repetições
AL-3	I	4,00	4,00 a
	II	4,00	
	III	4,00	
	IV	4,00	
	V	4,00	
AL-1	I	2,67	3,20 b
	II	3,33	
	III	3,33	
	IV	3,33	
	V	3,33	
AL-2	I	2,67	2,67 c
	II	2,67	
	III	2,33	
	IV	2,67	
	V	3,00	
Testemunha	I	0,00	0,00 d
	II	0,00	
	III	0,00	
	IV	0,00	
	V	0,00	

Coefficiente de variação: 3,17%

DMS (Tukey): 0,0973

Desvio padrão: 0,0518

0: sem sintomas; 1: 1-25% da superfície da folha ou da haste com área necrosada; 2: 26-50% da superfície da folha ou da haste com área necrosada; 3: 51-75% da superfície da folha ou da haste com área necrosada; 4: mais de 75% da superfície da folha ou da haste com área necrosada

No Quadro 10, verifica-se que todos os isolados de alface diferiram estatisticamente da testemunha, sendo que o isolado AL-3 foi o mais agressivo.

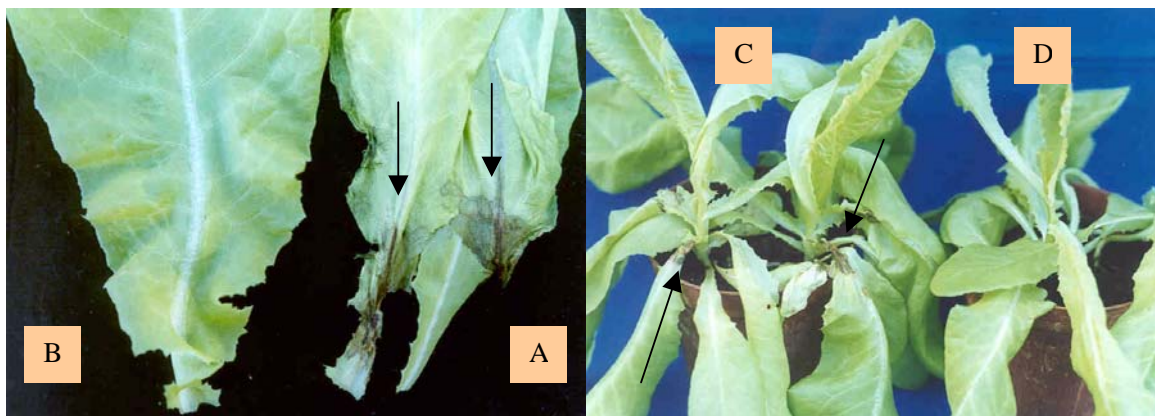


Figura 5. Patogenicidade do isolado AL-3 (A) de *Rhizoctonia solani* de alface comparando-se com uma folha testemunha (B) e do isolado AL-1 (C) comparando-se com a planta testemunha (D)

6.5. Teste de germinação de espinafre, melão, brócolos e couve-manteiga

No Quadro 11 são apresentados os resultados referentes à pré-germinação em papel de filtro, enquanto que no Quadro 12 seguem os resultados dos realizados em solo + substrato.

Quadro 11. Avaliação da germinação de sementes de espinafre, melão, brócolos e couve-manteiga em papel de filtro esterilizado em caixa Gerbox, aos 8 dias após a introdução do teste

Hortaliças	Porcentagem de germinação
Espinafre	79%
Melão	86%
Brócolos	92%
Couve-manteiga	94%

Quadro 12. Avaliação da germinação de sementes de espinafre, melão, brócolos e couve-manteiga em solo + substrato, aos 14 dias após a semeadura

Hortaliças	Porcentagem de germinação
Espinafre	77%
Melão	87%
Brócolos	91%
Couve-manteiga	93%

Comparando-se os dados dos Quadros 11 e 12, verifica-se que a porcentagem de germinação destas hortaliças não diferiram em relação ao papel de filtro esterilizado em Gerbox e no solo + substrato, sendo que a partir daí conclui-se que não afetará na avaliação da doença nestas hortaliças.

6.6. Patogenicidade de isolados de *Rhizoctonia* spp. de raízes e colo com AG conhecido em espinafre, melão, brócolos e couve-manteiga

6.6.1. Teste de patogenicidade dos isolados de *Rhizoctonia solani* de espinafre

Os dados de patogenicidade dos isolados EP-1, EP-2 e EP-3 de *Rhizoctonia solani* em espinafre são apresentados no Quadro 13.

Quadro 13. Avaliação da severidade dos isolados EP-1, EP-2 e EP-3 de *Rhizoctonia solani* em espinafre, aos vinte dias após a inoculação

Isolados	Repetições	Médias das notas das plantas	Médias das repetições
EP-2	I	1,50	1,62 a
	II	1,70	
	III	1,60	
	IV	1,60	
	V	1,70	
EP-3	I	1,30	1,50 ab
	II	1,40	
	III	1,70	
	IV	1,50	
	V	1,60	
EP-1	I	1,20	1,36 b
	II	1,40	
	III	1,50	
	IV	1,40	
	V	1,30	
Testemunha	I	0,00	0,00 c
	II	0,00	
	III	0,00	
	IV	0,00	
	V	0,00	

Coefficiente de variação: 7,86%

DMS (Tukey): 0,1654

Desvio padrão: 0,0880

0: plantas sem lesões; 1: plantas com lesões no colo e cotilédones; 2: *damping off* de pós emergência; 3: *damping off* de pré emergência

No Quadro 13, verifica-se que todos os isolados de espinafre diferiram estatisticamente da testemunha, sendo que os isolados EP-2 e EP-3 foram os mais agressivos.

6.6.2. Teste de patogenicidade dos isolados de *Rhizoctonia solani* de melão

Os dados de patogenicidade dos isolados ME-1, ME-2 e ME-3 de *Rhizoctonia solani* em melão são apresentados no Quadro 14.

Quadro 14. Avaliação da severidade dos isolados ME-1, ME-2 e ME-3 de *Rhizoctonia solani* em melão, aos vinte dias após a inoculação

Isolados	Repetições	Médias das notas das plantas	Médias das repetições
ME-1	I	2,20	2,00 a
	II	2,10	
	III	1,80	
	IV	1,90	
	V	2,00	
ME-3	I	1,90	1,78 ab
	II	1,80	
	III	1,60	
	IV	2,10	
	V	1,50	
ME-2	I	1,50	1,66 b
	II	1,70	
	III	1,60	
	IV	1,80	
	V	1,70	
Testemunha	I	0,00	0,00 c
	II	0,00	
	III	0,00	
	IV	0,00	
	V	0,00	

Coefficiente de variação: 11,07%

DMS (Tukey): 0,2828

Desvio padrão: 0,1506

0: plantas sem lesões; 1: plantas com lesões no colo e cotilédones; 2: *damping off* de pós emergência; 3: *damping off* de pré emergência

No Quadro 14, verifica-se que todos os isolados de melão diferiram estatisticamente da testemunha, sendo que os isolados ME-1 e ME-3 foram os mais agressivos.

6.6.3. Teste de patogenicidade dos isolados de *Rhizoctonia solani* de brócolos

Os dados de patogenicidade dos isolados BR-1, BR-2 e BR-3 de *Rhizoctonia solani* em brócolos são apresentados no Quadro 15.

A Figura 6 representa a patogenicidade do isolado BR-1 de *Rhizoctonia solani* de brócolos comparando-se com o tratamento testemunha.

Quadro 15. Avaliação da severidade dos isolados BR-1, BR-2 e BR-3 de *Rhizoctonia solani* em brócolos, aos vinte dias após a inoculação

Isolados	Repetições	Médias das notas das plantas	Médias das repetições
BR-1	I	2,10	2,08 a
	II	2,20	
	III	2,20	
	IV	1,90	
	V	2,00	
BR-2	I	1,90	1,98 ab
	II	1,80	
	III	2,10	
	IV	2,10	
	V	2,00	
BR-3	I	1,80	1,80 b
	II	1,70	
	III	1,80	
	IV	1,90	
	V	1,80	
Testemunha	I	0,00	0,00 c
	II	0,00	
	III	0,00	
	IV	0,00	
	V	0,00	

Coefficiente de variação: 7,19%

DMS (Tukey): 0,1977

Desvio padrão: 0,1053

0: plantas sem lesões; 1: plantas com lesões no colo e cotilédones; 2: *damping off* de pós emergência; 3: *damping off* de pré emergência

No Quadro 15, verifica-se que todos os isolados de brócolos diferiram estatisticamente da testemunha, sendo que os isolados BR-1 e BR-2 foram os mais agressivos.

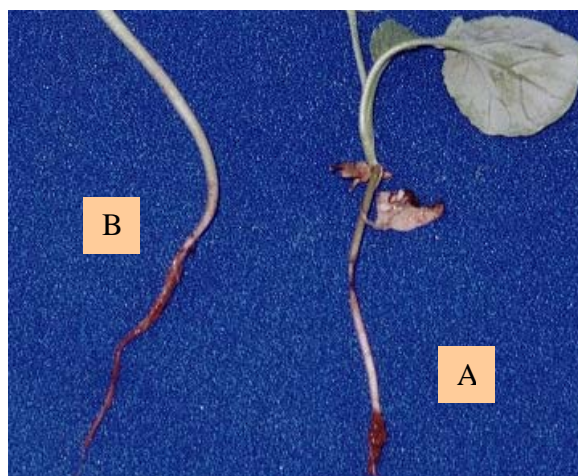


Figura 6. Patogenicidade do isolado BR-1 (A) de *Rhizoctonia solani* de brócolos comparando-se com a planta testemunha (B)

6.6.4. Teste de patogenicidade dos isolados de *Rhizoctonia* sp. binucleada de couve-manteiga

Os dados de patogenicidade dos isolados CM-1, CM-2, CM-3 e CM-4 de *Rhizoctonia* sp. binucleada em couve-manteiga são apresentados no Quadro 16.

A Figura 7 representa a patogenicidade do isolado CM-4 de *Rhizoctonia* sp. binucleada de couve-manteiga comparando-se com o tratamento testemunha.

Quadro 16. Avaliação da severidade dos isolados CM-1, CM-2, CM-3 e CM-4 de *Rhizoctonia* sp. binucleada em couve-manteiga, aos vinte dias após a inoculação

Isolados	Repetições	Médias das notas das plantas	Médias das repetições
CM-4	I	2,10	2,00 a
	II	2,00	
	III	2,00	
	IV	2,10	
	V	1,80	
CM-2	I	1,80	1,92 ab
	II	2,10	
	III	1,90	
	IV	1,80	
	V	2,00	
CM-1	I	2,00	1,66 b
	II	1,40	
	III	1,50	
	IV	1,70	
	V	1,70	
CM-3	I	1,60	1,66 b
	II	1,70	
	III	1,70	
	IV	1,80	
	V	1,50	
Testemunha	I	0,00	0,00 c
	II	0,00	
	III	0,00	
	IV	0,00	
	V	0,00	

Coefficiente de variação: 10,32%

DMS (Tukey): 0,2895

Desvio padrão: 0,1495

0: plantas sem lesões; 1: plantas com lesões no colo e cotilédones; 2: *damping off* de pós emergência; 3: *damping off* de pré emergência

No Quadro 16, verifica-se que todos os isolados de couve-manteiga diferiram estatisticamente da testemunha, sendo que os isolados CM-4 e CM-2 foram os mais agressivos.

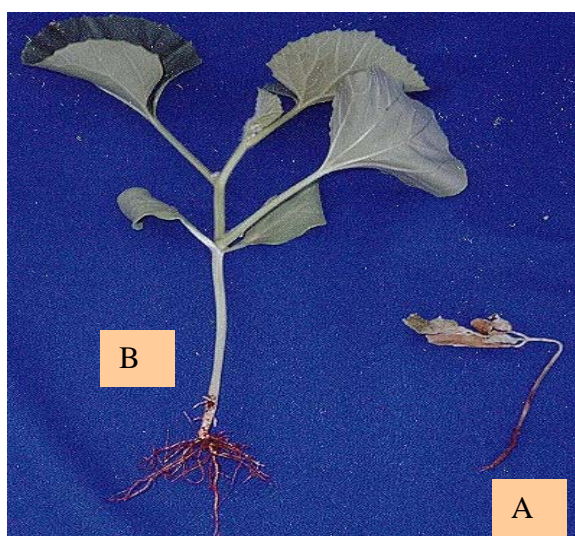


Figura 7. Patogenicidade do isolado CM-4 (A) de *Rhizoctonia* sp. binucleada de couve-manteiga comparando-se com a planta testemunha (B)

7. DISCUSSÃO

A coleção de isolados estabelecida evidencia que *Rhizoctonia* spp. estão associadaa, no Estado de São Paulo de alface, brócolos, melão, espinafre e couve-manteiga, e em Minas Gerais no caso do tomateiro, aos sintomas de podridão de raízes, colo, folhas e frutos.

As características de colônias, aliadas às informações recorridas na literatura, direcionaram os pareamentos realizados para se determinar o grupamento de anastomose dos isolados de *Rhizoctonia* spp. de hortaliças.

Os isolados coletados de tomate, alface, brócolos, espinafre, melão foram caracterizados como *Rhizoctonia solani*, enquanto que os isolados de couve-manteiga como *Rhizoctonia* sp. binucleada. Todos os isolados obtidos de tomate e espinafre pertencem ao AG-4 HGI, os brócolos e melão ao AG-4 HGII, os de alface ao AG-1 IA e os de couve-

manteiga ao AG-G.

O teste de patogenicidade dos isolados causadores de *damping-off* e lesões no colo permitiu constatar que todos os isolados testados foram agressivos a couve brócolo, melão, espinafre e couve manteiga. Já no teste de patogenicidade dos isolados de parte aérea de alface e tomateiro constatou-se o mesmo.

Os isolados de *Rhizoctonia solani* coletados de tomate com necroses de hastes e podridão de frutos, do Estado de Minas Gerais, pertencem ao AG-4 HGI. A ocorrência de *Rhizoctonia solani* aG-4 HGI em tomate causando podridão de frutos também foi relatada por Rahimian (1988) no Irã, e o AG-1 IC causando *damping-off* em mudas de tomateiro foi relatada por Hyakumachi & Sumino (1984) no Japão. Yang et. al. (1996) observaram que de 2 isolados do grupo de anastomose AG 9 de *Rhizoctonia solani* coletados de solos em Alberta, no Canadá, ambos não foram agressivos para tomateiro. O mesmo foi observado por Macnish et. al. (1995), que após a obtenção de isolados de *Rhizoctonia solani* do grupo de anastomose AG 10 provenientes de raízes de trigo e cevada em Washington e Oregon nos Estados Unidos e da Austrália, observaram que não foram agressivos ao tomateiro. Também no Japão, os isolados do grupo de anastomose AG 7 provenientes de campos de cultivo de rabanete foram relativamente pouco agressivos para rabanete, pepino e tomateiro (Homma et. al., 1983).

Todos os isolados de espinafre coletados causando podridão de hastes e raízes pertencem ao AG-4 HGI, como também observado em tomate. O mesmo grupo de anastomose foi descrito por Naiki & Kanoh (1978) no Japão, mas não o sub-grupo, sendo que tem sido observado que é o fungo mais frequente e mais agressivo naquele local. O AG-5 tem também sido relatado causando *damping-off* em espinafre no Japão (Akashi et. al, 1986).

Os isolados coletados de brócolos e de melão com sintomas de podridão de raízes e de colo foram caracterizados como AG-4 HGII. Na China, Chen et. al. (1990) observaram que em crucíferas, o grupo de anastomose AG 2-1 foi mais obtido durante a primavera e o AG 4 durante as outras estações, enquanto que em cucurbitáceas em geral prevaleceu isolados do AG 4. *Damping-off* em couve-chinesa causada por AG-2-1 também tem sido relatada (Kang & Kim, 1986), AG-1 e AG-2-1 (Roh & Kim, 1987) na Coréia. Em Alberta, Canadá, de 130 isolados de *R. solani* AG 9 possuindo de 3-17 núcleos por célula, Yang et. al. (1996) observaram que esses isolados foram altamente agressivos em mudas de couve-flor causando *damping-off*, porém, esses mesmos isolados foram não agressivos para ervilha e tomate. Uematsu et. al. (1993) verificaram que isolados de *Rhizoctonia solani* do AG-4 causaram *damping-off* em melão e Lim et. al. (1987) verificaram que isolados do AG-2-1 obtidos de *Durio zibethimis* foram também agressivos ao melão. Em mudas de melância, Baird et. al. (1996) verificaram que os isolados AG 7 e AG 4 de *R. solani* possuem características morfológicas e culturais similares, no qual o isolado AG 7 foi agressivo causando *damping-off*.

Os sub-grupos de AG-4 (HGI, HGII e HGIII), são similares e há dificuldades em separá-los quanto ao crescimento micelial, coloração e tamanho dos escleródios e reação de anastomose de hifas (Sneh et. al., 1991). De acordo com esses autores, a separação dos sub-grupos HGI e HGII do AG-4 não é possível por critério de reação de anastomose de hifas, pois a reação pode ocorrer entre os sub-grupos de AG-4. Fenille (2001), estudando isolados de soja no Brasil, utilizou a técnica de RAPD para caracterizar os isolados em AG-4 HGI ou HGII. Entretanto, no presente trabalho, ficou claro por anastomose de hifas que os isolados de tomate e espinafre pertencem ao AG-4 HGI e os de brócolos e de melão

pertencem ao AG-4 HGII.

Os três isolados de alface coletados de alface foram caracterizados como AG-1 por reação de anastomose de hifas ,porém, a caracterização do sub-grupo não foi possível somente através de anastomose. Todos os isolados de alface fizeram anastomose tanto com o AG-1 IA como o IB. Diante disso, realizou-se a técnica de RAPD para caracterizá-los definitivamente como pertencentes ao AG-1 IA. A técnica de RAPD foi também utilizada por Duncan et. al. (1993), Pascual et. al. (2000) e Fenille (2001) na análise de separação dos sub-grupos de *Rhizoctonia solani*. Técnicas de RAPD foram utilizadas para caracterizar sub-grupos de AG-1 por Fenille (2001) para caracterizar isolados de soja pertencentes ao AG-1 IA causando necrose foliar. Isolados com AG-1 é dividido dentro de 3 sub-grupos baseados na origem do hospedeiro, sintomas e características culturais e moleculares. Em mudas de alface, os AG-1 IA, IB e IC, foram descritos no Japão por Hyakumachi & Sumino (1984), mas o AG-1 IC não foi agressivo para essa cultura. Herr (1992) observou que isolados de *Rhizoctonia solani* de alface em Ohio, pertencentes ao AG-1 IB foram mais agressivos do que isolados pertencentes ao AG-1 IC. *Rhizoctonia solani* é o patógeno mais importante em alface causando altas perdas em alface no Brasil (Pinto et. al., 1994). *Rhizoctonia solani* AG-4, como também AG-1, AG-2-1 e AG-2-2 foi relatado causando necrose foliar em alface (Wareing et. al., 1986).

Todos os isolados de *Rhizoctonia* sp. binucleada de couve-manteiga foram agressivos e pertencentes ao AG-G. *Rhizoctonia* spp. binucleadas também têm sido relatadas em algumas hortaliças. Vico (1994) obteve os isolados do grupo de anastomose AG A e AG I de plantas de tomateiro doentes na Bósnia. Martin (1988), em Connecticut, obteve os isolados binucleados AG A, AG G e AG I provenientes de raízes de morangueiro. Em teste

de patogenicidade, verificou-se que todos esses isolados foram patogênicos, porém, a 15°C, o isolado AG I induziu maior severidade da doença no morangueiro. Já Safae & Minassian (1997) relataram o primeiro caso de *Rhizoctonia fragariae* em morangueiro no Iran, sendo que os isolados provenientes de lesões das raízes pertenciam aos grupos de anastomose AG A e AG G, enquanto que os de frutos eram somente os do AG A.

Em 13 locais de Gifu, Japão, Juan-Abgona et. al. (1996), obtiveram 143 isolados de *Rhizoctonia binucleada*, 60 de *R. solani* e 45 de *R. zae*. Em testes de patogenicidade, 3 isolados de *R. solani* AG 4 e 54 isolados de *Rhizoctonia binucleada* pertencentes aos grupos AG A, AG Ba, AG G e AG O foram não patogênicos em rabanete, enquanto que os isolados de *R. zae* foram patogênicos. Porém, testes em pepino com 32 isolados de *Rhizoctonia binucleada*, apenas 5 não foram patogênicos.

8. CONCLUSÕES

Todos os isolados de tomate e espinafre foram agressivos para essas culturas, caracterizados como *Rhizocotonia solani* e pertencentes ao AG-4 HGI;

Todos os isolados de brócolos e melão foram agressivos para essas culturas, caracterizados como *Rhizocotonia solani* e pertencentes ao AG-4 HGII;

Todos os isolados de alface foram agressivos para essa cultura, caracterizados como *Rhizocotonia solani* e pertencentes ao AG-1 IA, diferenciando-se através da técnica de RAPD;

Todos os isolados de couve-manteiga foram agressivos para essa cultura, caracterizados como *Rhizocotonia* sp. binucleada e pertencentes ao AG-G.

9. 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**, n.54, p.1-8, 1986.

ANDERSON, N.A. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. **Annual Review Phytopathology**, v.20, p.329-74, 1982.

BAIRD, R.E.; CARLING, D.E.; MULLINIX, B.G. Characterization and comparison of isolates of *Rhizoctonia solani* AG-7 from Arkansas, Indiana, and Japan, and select AG-4 isolates. **Plant Disease**, v.80, n.12, p.1421-4, 1996.

BANDONI, R.J. Safranin O as a rapid nuclear stain for fungi. **Mycology**, v.71, p.873-4, 1979.

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

BUTLER, E.E.; BRACKER, C.E. Morphology and cytology of *Rhizoctonia solani*. p.32-53. In: PARMWATER, JR., ed. **Biology and Pathology of *Rhizoctonia solani***, Univ. of California, Press, Berkeley, 1970, 255p.

CAFÉ FILHO, A. C.; LOPES, C. A.; DUSI, A. N.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; CHARCHAR, J. M. Principais doenças de ervilha no Brasil e seu controle. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.14,n.158, p.38-45, 1989.

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

CARLING, D.E., KUNINAGA, S., LEINER, R.H. Relatedness within and among intraspecific groups of *Rhizoctonia solani*: A comparison of grouping by anastomosis and by DNA hybridization. **Phytoparasitica**, v.16, p.209-10, 1988.

- CARLING, D.E., LEINER, R.H. Virulence of isolates of *Rhizoctonia solani* AG-3 collected from potato plant organs and soil. **Plant Disease**, v.74, p.901-3, 1990.
- CARLING, D.E., SUMNER, D.R. *Rhizoctonia*. In: SINGLETON, L.L., MIHAIL, J.D., RUSH, C.M. (Ed.) **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**, St. Paul: American Phytopathological Society, p.157-65, 1992.
- CASTRO, C., DAVIS, J.R., WIESE, M.V. Quantitative estimation of *Rhizoctonia solani* AG-3 in soil. **Phytopathology**, v.78, p.1287-92, 1988.
- CERESINI, P.C., FENILLE, R.C., SOUZA, N.L. Associação de *Rhizoctonia* spp. binucleadas e de *R. solani* Kühn GA 4 HGI à vagens de amendoineiro (*Arachis hypogaea*) no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.22, p.145-55, 1996.
- CHEN, J.S.; GE, Q.X.; ZHANG, B.X. Identification of *Rhizoctonia solani* on crops and in related soil. **Acta Agriculturae Universitatis Zhejiangensis**, v.16, p.219-24, 1990.
(Abstract)
- CHUNG, Y.R., HOITINK, H.A. H., LIPPS, P.E. Interactions between organic-matter decomposition level and soilborne disease severity. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.24, p.183-93, 1988.

CUBETA, M.A., VILGALYS, R. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex.

Phytopathology, v.87, p.480-4, 1997.

DUNCAN, S., BARTON, J.E., O'BRIEN, P.A. Analysis of variation in isolates of

Rhizoctonia solani by random amplified polymorphic DNA assay. **Mycology. Revision**,

v.97, p.1075-82, 1993.

FENILLE, R.C.; SOUZA, N.L. Efeitos de materiais orgânicos e da umidade do solo na

patogenicidade de *Rhizoctonia solani* Kuhn GA-4 HGI ao feijoeiro. **Pesquisa**

Agropecuária Brasileira, v.34, p.1959-67, 1999.

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

solani Kuhn associado à soja no Brasil. Botucatu, 2001, 136p. Tese (Doutorado em

Agronomia – Área de Concentração Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências

Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

FLENTJE, N.T., STRETTON, H.M. Mechanisms of variation in *Thanatephorus cucumeris*

and *T. praticolus*. **Australian Journal Biology Science**, v.17, p.686-704, 1964.

HERR, L.J. Characteristics of *Rhizoctonia* isolates associated with bottom rot of lettuce in

organic soils in Ohio. **Phytopathology**, v.82, n.10, p.1046-50, 1992.

- HERR, L.J., ROBERTS, D.L. Characterization of *Rhizoctonia solani* populations obtained from sugarbeet fields with differing soil textures. **Phytopathology**, v.70, p.476-80, 1980.
- HERSHMAN, D.E.; VARNEY, E.H.; JOHNSTON, S.A. Etiology of parsley damping-off and influence of temperature on disease development. **Plant Disease**, v.70, n.10, p.927-30, 1986.
- HOMMA, Y.; YAMASHITA, Y.; ISHII, M. A new anastomosis group (AG-7) of *Rhizoctonia solani* Kuhn from Japanese radish fields. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v.49, n.2, p.184-90, 1983.
- HYAKUMACHI, M.; KANZAWA, K.; UI, T.; HORNBY, D. Rhizoctonia root rot decline in sugar beet monoculture. **Biological control of soil borne plant pathogens**, p.227-47, 1990.
- HYAKUMACHI, M.; SUMINO, A. New morphological type (IC) in *Rhizoctonia solani* AG 1 isolated from the sugarbeet-manufacture-waste-soils and some of its characteristics. **Annals-of-the-Phytopathological-Society-of-Japan**, v.50, n.4, p.507-14, 1984.
- JUAN ABGONA, R.V.; KATSUNO, N.; KAGEYAMA, K.; HYAKUMACHI, M. Isolation and identification of hypovirulent *Rhizoctonia* spp. from soil. **Plant Pathology**, v.45, n.5, p.896-904, 1996.

- KANG, S.W.; KIM, H.K. Incidence and control of bottom rot of Chinese cabbage caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Koreal Journal of Plant Pathology**, v.2, n.3, p.193-8, 1986.
- KO, W., HORA, K. F. A selective media for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology**, v.61, p.707-10, 1971.
- KULIK, M.M., DERY, P.D. **Notes on the use of DAPI for determining the anastomosis group of isolates of *Rhizoctonia solani***. Beltsville: USDA-ARS, 1992, 7p.
- 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. *Abstracts...* Taichung: International Symposium on *Rhizoctonia*, p.23, 2000.
- LEACH, L.D., GARBER, R.H. Control of *Rhizoctonia solani*. In: PARMETER Jr., R. (ed.) *Rhizoctonia solani: biology and pathology*. Berkeley: University California Press, p.189-98, 1970.
- LIM, T.K.; NG, C.C.; CHIN, C.L. Etiology and control of durian foliar blight and dieback caused by *Rhizoctonia solani*. **Annals of Applied Biology**, v.111, n.2, p.301-7, 1987.
- LIU, Z., SINCLAIR, J.B. Isolates of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2-2 pathogenic to soybean. **Plant Disease**, v.75, p.682-7, 1991.

MACNISH, G.C., CARLING, D.E., BRAINARD, K.A. Characterization of *Rhizoctonia solani* AG-8 from bare patches by pectic isozyme (zymogram) and anastomosis techniques. **Phytopathology**, v.83, p.922-7, 1993.

MACNISH, G.C., O'BRIEN, P.A. RAPD-PCR used to support concept of sub-populations within *Rhizoctonia solani* AG-8. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *RHIZOCTONIA*, 3, 2000, Taichung. *Abstracts...* Taichung: International Symposium on *Rhizoctonia*, p.41, 2000.

MACNISH, G.C.; CARLING, D.E.; SWEETINGHAM, M.W.; OGOSHI, A.; BRAINARD, K.A. Characterization of anastomosis group-10 (AG-10) of *Rhizoctonia solani*. **Australasian-Plant-Pathology**, v.24, n.4, p.252-60, 1995.

MANZALI, D.; D'ERCOLE, N. Research in anastomosis groups of *Rhizoctonia* spp. **Phytopathologia Mediterrânea**, v.31, n.3, p.182-4, 1992.

MARTIN, S.B. Identification, isolation frequency, and pathogenicity of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* spp. from strawberry roots. **Phytopathology**, v.78, n.4, p.379-84, 1988.

MATSUMOTO, T., YAMAMOTO, W., HIRANE, S. Physiology and parasitology of the fungi generally referred to as *Hypochnus sasakii* Shirai. I. Differentiation of the strains by means of hyphal fusion and culture in differential media. **Journal Society Tropical Agricultural**, v.4, p.370-88, 1932.

MATSUOKA, K.; CRUZ FILHO, J.; MARTINS, M. C.; ANSANI, C. V. Brássicas, doenças causadas por fungos e bactérias. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.131, p.22-6, 1985.

NAIKI, T.; KANO, M. Grouping of *Rhizoctonia solani* Kuhn causing root diseases of spinach in plastic house cropping. **Annals-of-the-Phytopathological-Society-of-Japan**, v.44, n.5, p.54-60, 1978.

NIEUWHOF, M.; GIEZEN, S. Investigation of resistance to *Rhizoctonia* in radish. **Prophyta**, v. 42, n. 5, p. 118-20, 1988.

O' SULLIVAN, E.; KAVANAGH, J.A. Characteristics and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia* spp. associated with damping-off of sugar beet. **Plant Pathology**, v.40, n.1, p.128-35, 1991.

OGOSHI, A. Introduction – the genus *Rhizoctonia*. In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S., DIJST, G. (Ed.) *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Dordrecht: Kluwer Academic, p.1-9,1996.

OGOSHI, A. Studies on the grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn with hyphal anastomosis, and on the perfect stage of groups. *Bull. Ser. C.*, no. 3. Natl. Inst. Agric. Sci., Tokyo, Japan. 1976 apud CARLING, D.E., LEINER, R.H., KEBLER, K.M. Characterization of a new anastomosis group (AG-9) of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v.77, p.1609-12, 1987.

OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. **Annual Review Phytopathology**, v.25, p.125-43, 1987.

PARMETER, J.R., Jr., SHERWOOD, R.T., PLATT, W.D. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. **Phytopathology**, v. 59, p.1270-8, 1969.

PASCUAL, C.B., TODA, T., RAYMONDO, A.D., HYAKUMACHI, M. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. **Plant Pathology**, v.49, p.108-18, 2000.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 10^a ed. Piracicaba: Nobel, 1982. 430p.

PINTO, C.M.F.; DE-PAULA-JUNIOR, T.J.; MIZUBUTI, E.S.G. Diseases caused by fungi on artichoke, lettuce, chicory, strawberries and okra. **Informe Agropecuário de Belo Horizonte**, v.17, n.182, p.5-13, 1994.

- RAHIMIAN, H. Anastomosis group of *Rhizoctonia solani* causing soil rot of tomato fruit in Mazandaran. **Iranian Journal of Plant Pathology**, v.24, n.1-4, p.9-11, 1988.
- ROH, M.J.; KIM, H.K. Pathogenicity of *Rhizoctonia* isolates from southern horticultural area in Korea. **Korean Journal of Plant Pathology**, v.3, n.3, p.217-22, 1987.
- ROHLF, F.J. *NTSYS-PC version 1.7 numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Setauket: Exeter Software Publ., 1992.
- RUSH, C.M.; CARLING, D.E.; HARVESON, R.M.; MATHIESON, J.T. Prevalence and pathogenicity of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* from wheat and sugar beet in Texas. **Plant Disease**, v.78, n.4, p.349-52, 1994.
- SAFAEE, N.; MINASSIAN, V. Occurrence of *Ceratobasidium (Rhizoctonia fragariae)* root and fruit rot of strawberries in Khuzestan Province. **Iranian Journal of Plant Pathology**, v.33, n.3, p.42-3, 1997.
- SAKAGUCHI, S.; ETO, H.; SOUDA, E. Damping-off of asparagus caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu**, v.36, p.48-51, 1990.

- SCHULTZ, H. Vergleichende Untersuchungen zur Ökologie, Morphologie, und Systematik der "Vermehrungspilzen". **Arb. Biol. Reichsanst. Land Forswirtsch**, v.22, p.1-141, 1937
apud VILGALYS, R., CUBETA, M.A. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. **Annual Review Phytopathology**, v.32, p.135-55, 1994.
- SNEH, B., ADAMS, G.C. Culture preservation methods for maintaining genetic integrity of *Rhizoctonia* spp. isolates. In: Sneh, B., Jabaji-hare, S., Neate, S., Dijst, G. ***Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control***. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.139-46, 1996.
- SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. Identification of *Rhizoctonia* species. **APS Press**, St. Paul, Minnesota, USA, 1991, 133p.
- SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. **Kluwer Academic Publishers**, Boston, London, 1996, 578p.
- TODA, T., HYAKUMACHI, M., ARORA, D.K. Genetic relatedness among and within different *Rhizoctonia solani* anastomosis groups as assessed by RAPD, ERIC and REP-PCR. **Microbiological Res.**, v.154, p.247-258, 1999.
- TU, C.C., KIMBROUGH, J.W. Systematics and phylogeny of fungi in the *Rhizoctonia* complex. **Bot. Gaz.**, v.139, p.454-66, 1978.

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

UEMATSU, S.; KODAMA, K.; NAKAMURA, Y. Occurrence of *Rhizoctonia* rot/blights of muskmelon, scarlet plume, stock and parsley caused by *Rhizoctonia solani* AG-4, and bishop's weed, Boston fern and balloon flower caused by *R. solani* AG-2-2. **Proceedings of the Kanto Tosan Plant Protection Society**, n.40, p.85-8, 1993.

UMRALINA, A.R.; VASIL'EVA, K.V.; NCHAGAN, S.V. Determination of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. Isolates infecting sugarbeet in the Kirghiz SSR. **Mikologiya i Fitopatologiya**, v.21, n.3, p.212-5, 1987.

VICO, I. Investigation of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* spp. isolated from strawberries. **Phytopathologia Mediterranea**, v.33, n.2, p.165-7, 1994.

VILGALYS, R., CUBETA, M.A. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. **Annual Review Phytopathology**, v.32, p.135-55, 1994.

WAREING, P.W.; WANG, Z.N.; COLEY-SMITH, J.R.; JEVES, T.M. Fungal pathogens in rotted basal leaves of lettuce in Humberside and Lancashire with particular reference to *Rhizoctonia solani*. **Plant Pathology**, v.35, n.3, p.390-5, 1986.

WELSH, J., PETERSEN, C., McCLELLAND, M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. **Nucl. Acids Res.**, v.19, p.303-6, 1990.

WHILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.**, v.18, p.6531-5, 1990.

WINDELS, C.E.; NABBEN, D.J. Characterization and pathogenicity of anastomosis group of *Rhizoctonia solani* isolated from *Beta vulgaris*. **Phytopathology**, v.79, n.1, p.83-8, 1989.

YANG, H.A., SIVASITHAMPARAM, K., BARTON, J.E., O'BRIEN, P.A. Characterization of cereal bare patch isolates of *Rhizoctonia solani* by random amplified polymorphic DNA analysis. **Plant Pathology**, v.44, p.811-8, 1995.

YANG, J.; KHARBANDA, P.D.; WANG, H.; Mc ANDREW, D.W. Characterization, virulence and genetic variation of *Rhizoctonia solani* AG-9 em Alberta. **Plant Disease**, v.80, n.5, p.513-8, 1996.