

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

**BIOLOGIA DE *Ceratobasidium* spp. ASSOCIADA À DOENÇA QUEIMA
DOS FIOS NO CHÁ (*Camellia sinensis* L.)**

RENATO BORELI SILVA

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em Agronomia
(Proteção de Plantas)

BOTUCATU
MARÇO/2013

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

**BIOLOGIA DE *Ceratobasidium* spp. ASSOCIADA À DOENÇA QUEIMA
DOS FIOS NO CHÁ (*Camellia sinensis* L.)**

RENATO BORELI SILVA

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em Agronomia
(Proteção de Plantas)

BOTUCATU
Março/2013

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

Silva, Renato Boreli , 1986-
S583b Biologia de *Ceratobasidium* spp. associada à doença queima dos fios no chá (*Camellia sinensis* L.) / Renato Boreli Silva.- Botucatu : [s.n.], 2013
viii, 64 f. : il., color., grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2013
Orientador: Edson Luiz Furtado
Inclui bibliografia

1. *Rhizoctonia* binucleada. 2. Patogenicidade. 3. Morfologia. 4. Chá. I. Furtado, Edson Luiz. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "BIOLOGIA DE *Ceratobasidium* spp. ASSOCIADA À DOENÇA QUEIMA
DOS FIOS NO CHÁ (*Camellia sinensis* L.)"

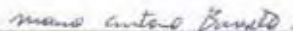
ALUNO: RENATO BORELI SILVA

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

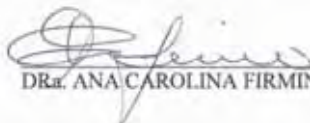
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO



DR. MARCO ANTONIO BASSETO



DR. ANA CAROLINA FIRMINO

Data da Realização: 22 de janeiro de 2013.

À minha Família,

Meu pai Rigomar Soares Silva

Minha mãe Rojuhercymar Boreli Soares

Minhas irmãs Jéssica Lais Boreli Silva e Isabella Boreli Silva

Obrigado, por vocês estarem sempre ao meu lado!

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Edson Luiz Furtado pelos ensinamentos, confiança e amizade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo auxílio financeiro, através da concessão da bolsa de Mestrado;

Aos Srs. Milton Amaya e Lincon Amaya da Amaya Agropecuária LTDA por permitirem a coleta dos isolados nos chazais da Fazenda e por cederem às mudas de chá para o experimento.

À minha amiga e companheira Junia Karst Caminha Ruggiero e Família: Lutt, Patrícia, Lucas e Sofia, por todo apoio, carinho e amizade;

À Dra. Catalina Romero Lopes pelos grandes ensinamentos, apoio e amizade.

Aos amigos Ricardo (JAPA), Efrain, Sharon, Thiago (CAPACETE), Eduardo (Dudu- Fertilab) Gabriela e Talita (Murici);

Aos amigos e colegas de trabalho do laboratório de fungos de solo e patologia florestal: Leo, Haroldo, Willian, João, Juliana, Ana Carolina, Caroline, Cris, Marília, Marta e Karina, pelos momentos agradáveis e divertidos;

Aos funcionários do Departamento Produção Vegetal - Defesa Fitossanitária, Biblioteca e da Seção de Pós-graduação da FCA;

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

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	1
2. SUMMARY	3
3. INTRODUÇÃO	5
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
4.1. A queima do fio e seus hospedeiros	8
4.2. Etiologia da queima do fio	10
4.3. Classificação de <i>Rhizoctonia binucleada</i> (teleomorfo <i>Ceratobasidium</i> spp.).....	11
4.3.1. Formação da fase teleomorfa de <i>Rhizoctonia binucleada</i>	12
4.3.2. Grupos de anastomose e interações somáticas vegetativas.....	13
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
5.1. Coleta, isolamento e preservação do material biológico	17
5.2. Determinação das características citomorfológicas de <i>Rhizoctonia</i> spp.	19
5.2.1. Número de núcleos por célula.....	19
5.2.2. Indução da fase teleomórfica.....	19
5.3. Avaliação do grupo de anastomose (GA)	20
5.4. Compatibilidade somática vegetativa entre isolados do chá.....	21
5.4.1. Reação de compatibilidade vegetativa microscópica	21
5.4.2. Reação de compatibilidade vegetativa macroscópica.....	22
5.5. Determinação das características culturais	22
5.5.1. Características morfológicas das colônias	22
5.5.2. Temperatura ótima de crescimento.....	23
5.6. Teste de patogenicidade.....	23
5.7. Caracterização molecular.....	25
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6.1. Isolados e características citomorfológicas de <i>Rhizoctonia</i> sp.	27
6.1.1. Condição nuclear	28
6.1.2. Indução da fase teleomórfica.....	28

6.2.	Determinação do grupo de anastomose (GA)	31
6.3.	Compatibilidade somática vegetativa entre isolados do chá.....	32
6.4.	Determinação das características culturais	37
6.4.1.	Características morfológicas das colônias	37
6.4.2.	Temperatura ótima de crescimento	40
6.5.	Teste de patogenicidade	44
6.6.	Caracterização molecular	50
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
8.	CONCLUSÕES	56
9.	REFERÊNCIAS.....	57

Lista de Figuras

Figura 1. A-Área de coleta no Município de Registro, na região do Vale do Ribeira-SP, Brasil; B-Local amostrado na plantação de chá ao redor do fragmento de Mata Atlântica. Pontos amarelos GPS.	18
Figura 2. A-Pareamento dos isolados na lâmina de vidro. B-Vasilha coberta com plástico transparente.....	21
Figura 3. Inoculação com discos de micélio nas axilas dos ramos novos de chá.....	24
Figura 4. Câmera úmida após 24h da inoculação.	25
Figura 5. A-Aspectos da ramificação das hifas; B-condição binucleada de hifas de <i>Rhizoctonia</i>	28
Figura 6. Estruturas sexuadas de isolados de <i>Ceratobasidium spp.</i> do chá e GA-P. H=himênio; M= metabasídio; Isolado;meio de cultura;luminosidade.	29
Figura 7. A e B- Reação C0 (não fusão) de isolados do chá x GAs de <i>Rhizoctonia</i> binucleada.	31
Figura 8. Reações microscópicas vegetativas entre isolados de <i>Rhizoctonia</i> binucleada.....	33
Figura 9. Reações macroscópicas vegetativas entre isoladas de <i>Rhizoctonia</i> binucleada. [+]=compatibilidade vegetativa; [-]=incompatibilidade vegetativa; [x]=incompatibilidade fraca.....	35
Figura 10. Características morfológicas das colônias de <i>Rhizoctonia</i> binucleada associada ao chá.	39
Figura 11. Características morfológicas das colônias de <i>Rhizoctonia</i> binucleada padrões de GAs.	40
Figura 12. Curva de crescimento micelial de <i>Rhizoctonia</i> binucleada do chá em função da temperatura.	41
Figura 13. Curva de crescimento micelial de isolados padrões de <i>Rhizoctonia</i> binucleada GAs.	42
Figura 14. Características das colônias de <i>Rhizoctonia</i> binucleada na temperatura de 30°C. ...	43
Figura 15. Características da colonização de folhas de chá por <i>Rhizoctonia</i> binucleada.	44
Figura 16. Início dos sintomas de queima foliar. 18 DAI.	45

Figura 17. Cordão micelial do fungo, característico da doença queima do fio. 27 dias após a inoculação.....	46
Figura 18. Reisolamento dos isolados do chá	46
Figura 19. Diferentes níveis de infecção de <i>Rhizoctonia</i> binucleada do chá comparados a testemunha sem a doença.	47
Figura 20. Diferença entre isolados quanto a patogenicidade de <i>Rhizoctonia</i> binucleada no chá.	48
Figura 21. Número médio de folhas doentes (NMF) causadas por <i>Rhizoctonia</i> binucleada no chá.	49
Figura 22. Número de plantas doentes (NPD) causadas por <i>Rhizoctonia</i> binucleada no chá... ..	49
Figura 23. Árvore filogenética dos isolados de <i>Rhizoctonia</i> binucleada do chá (RCA, RCB, RCC, RCD e RC2).....	51

Lista de Tabelas

Tabela 1. Natureza genética das relações segundo Macnish et al (1993).	21
Tabela 2. Formação de estruturas de <i>Ceratobasidium spp.</i> em diferentes meios de cultura, sob luz contínua, a 24°C por 12 dias.	29
Tabela 3. Formação de estruturas de <i>Ceratobasidium spp.</i> em diferentes meios de cultura, sob fotoperíodo 12h luz/12h escuro, a 24°C por 12 dias.....	30
Tabela 4. Reações vegetativas microscópicas e macroscópicas entre isolados de <i>Rhizoctonia binucleada</i>	32
Tabela 5. Características morfológicas das colônias de <i>Rhizoctonia binucleada</i> do chá e GAs padrões.	38
Tabela 6. Crescimento micelial em diferentes temperaturas de isolados de <i>Rhizoctonia binucleada</i>	41

1. RESUMO

A cultura do chá na região do Vale do Ribeira está localizada ao Sul do Estado de São Paulo, onde se concentra uma grande área de Floresta Mata Atlântica do Brasil. A ‘Queima dos fios’ causada pelo fungo *Rhizoctonia* binucleada (*Ceratobasidium* spp.; sin. *Pellicularia koleroga*) é a principal doença que ataca a cultura. A espécie deste fungo ainda não é totalmente conhecida, bem como as informações sobre sua biologia. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi elucidar aspectos da biologia do fungo, realizando a caracterização citomorfológica, cultural, patogênica e molecular de *Rhizoctonia* binucleada associada a queima dos fios do chá no Vale do Ribeira - SP. Em uma área de cultivo do chá, rodeado por um fragmento de Floresta Mata Atlântica, realizou-se a coleta de ramos e folhas atacadas pela queima do fio e o isolamento em laboratório, obtendo cinco isolados com características específicas de *Rhizoctonia* spp. Verificou-se que todos os isolados apresentaram dois núcleos por célula, sendo considerados binucleados. A indução da fase teleomórfica foi realizada, mas não houve sucesso na formação completa das estruturas sexuadas de *Ceratobasidium* spp., porém, houve escassa formação de himênio e metabasídios

por alguns isolados, nos meios de cultura Batata dextrose ágar, Agua ágar, Corn meal ágar e Czapeck dox ágar, sob maior ocorrência na condição de fotoperíodo 12h luz/12h escuro a 24°C. Todos os isolados do chá não apresentaram interação de anastomose de hifas com os isolados padrões de *Rhizoctonia* binucleada GA-A, GA-Bo, GA-P e GA-Q, não pertencendo a estes grupos. A compatibilidade somática entre os isolados do chá apresentaram a formação de três grupos de compatibilidade somática: GCS-1, GCS-2 e GCS-3 entre os cinco isolados, apresentando similaridade entre as reações microscópicas e macroscópicas. As características morfológicas das colônias também permitiram a formação de três grupos morfológicos: GM-1, GM-2 e GM-3, representados pelos mesmos isolados dos GCS. A faixa de temperatura ótima de crescimento micelial do fungo e para o desenvolvimento da doença foram em torno de 25°C. O teste de patogenicidade confirmou-se o postulado de Kock. As análises filogenéticas da região ITS 5.8 rDNA demonstraram que os isolados do chá agruparam-se com outros isolados de *Ceratobasidium spp.* do chá depositados no GenBank, apresentando variabilidade entre si, sendo diferentes de todas as outras espécies conhecidas do gênero até o momento.

BIOLOGY OF CERATOBASIDIUM SPP. ASSOCIATED THREAD BLIGHT DISEASE IN TEA (*Camellia sinensis* L.) Botucatu, 2013. 64p.

Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: RENATO BORELI SILVA

Adviser: EDSON LUIZ FURTADO

2. SUMMARY

The tea culture in the Vale do Ribeira is located in south of Sao Paulo State which concentrates the large area of Brazil Atlantic Forest. The 'Thread blight' caused by the fungus binucleate *Rhizoctonia* (*Ceratobasidium spp.*; Sin. *Pellicularia koleroga*) is the main disease that attacks the culture. The species of this fungus is not yet fully known, as well as information about its biology. Thus, the aim of this study was to elucidate the fungus biology, by the characterization of cytomorphological, cultural, molecular and pathogenic binucleate *Rhizoctonia* associated with the tea thread blight in the Ribeira Valley - SP, Brazil. In a area of growing tea, surrounded by a fragment of Atlantic Forest was collect branches and leaves attacked by thread blight and forwarded by laboratory isolation, obtaining five isolates with specific characteristics of *Rhizoctonia* spp. It was verified that all isolates showed two nuclei per cell being considered binucleate. The teleomorph induction was performed, but there was no success in the complete formation of sexed *Ceratobasidium* sp structures. However, there was scarce formation of hymenium and metabasidias by some isolates in culture medium Potato dextrose agar, Water agar, Corn meal agar and Czapeck dox agar, under increased

occurrence in photoperiod condition 12h light /12h dark at 24 ° C. All isolates of tea showed no interaction of hyphal anastomosis with the standard isolates of binucleate *Rhizoctonia* GA-A, GA-Bo, GA and GA-P-Q not belonging to these anastomosis groups. The somatic compatibility among isolates of tea showed the formation of three somatic compatibility groups: GCS-1, GCS-2 and GCS-1 among the five isolates showing similarity between the microscopic and macroscopic reactions. The morphological characteristics of the colonies also allowed the formation of three morphological groups: GM-1, GM-2 e GM-3, represented by the same isolates of GCS. The optimum temperature of mycelial growth and development of disease have been around 25 °C. The pathogenicity test has confirmed by the postulate Kock. The Phylogenetic analysis of the rDNA ITS region 5.8 showed genetic variability among isolates of tea and clustered with other isolates *Ceratobasidium spp.* Tea deposited in GenBank.

Keywords: Binucleate *Rhizoctonia*, Somatic vegetative compatibility, Pathogenicity.

3. INTRODUÇÃO

Os chás produzidos a partir de folhas de *Camellia sinensis* L. constituem a bebida mais consumida no mundo e são produzidas anualmente cerca de três bilhões de toneladas de chá, sendo 78% preto, 20% verde e 2% semifermentado (RUAN et al., 2007 apud LIMA et al., 2009, KHAN; MUKHTAR, 2007 apud LIMA et al., 2009).

O cultivo do chá originou-se na China, provavelmente trazido das cordilheiras do Himalaia, e espalhou-se para o Japão, Ásia Central e Rússia. Os navegadores portugueses exerceram papel primordial na difusão do chá pela Europa (PEREZ, 2007).

No Brasil, a cultura do chá foi introduzida no Rio de Janeiro por D. João VI e espalhou-se para Minas Gerais, São Paulo e Paraná (OSAWA, 1990 apud LIMA et al., 2009). Atualmente, a principal região produtora do chá no Brasil é o Vale do Ribeira, no Estado de São Paulo, principalmente os municípios de Registro, Pariquera-Açu e Cajati, sendo a colonização japonesa a grande responsável pela expansão dessa cultura na região (LIMA et al., 2009).

Cerca de 99% do chá exportado pelo Brasil, em 2006, foi produzido no Estado de São Paulo (PÉREZ, 2007 apud LIMA et al., 2009). A cultura do chá tem grande importância socioeconômica para a região do Vale do Ribeira, onde se concentram 85% da área cultivada no país (FURTADO, 2005). Entretanto, a área de produção de chá na região vem diminuindo a cada ano. Segundo dados da CATI/IEA, nos últimos 20 anos a área e produção de chá no Vale do Ribeira caíram cerca de 30%, e gradativamente os produtos de menor qualidade vêm perdendo mercado e levando ao abandono dos chazais (PEREZ; FREITAS, 2003).

Vários aspectos agronômicos da cultura do chá estão fortemente ligados a produção e qualidade do produto final, sendo influenciada por vários fatores do ambiente, como a altitude, tipo de solo, temperatura, umidade do ar, nutrição da planta e o ataque de pragas e doenças (GUOHUA et al., 1995; KONISHI et al., 1985; FERRARA et al., 2001; VENKATESAN; GANAPATHY, 2004; LIMA et al., 2009).

Várias doenças atacam a cultura do chá, e sua identificação, manejo e controle são essenciais, pois algumas ocorrem diretamente nas folhas novas e nos brotos, podendo afetar tanto a produtividade, como a qualidade, sendo a deterioração da qualidade diretamente proporcional à severidade da doença, causando decréscimos na quantidade de fenóis, catequinas, nitrogênio total, aminoácidos e clorofila (GULATI et al., 1999).

A principal doença que ocorre na cultura do chá é conhecida como o mal dos fios ou queima dos fios e desperta bastante preocupação dos teicultores. Os principais danos são verificados nas folhas e ramos novos, que constituem matéria-prima para a indústria, podendo provocar perdas de até 20% na produção (FURTADO, 2005).

Atualmente, as espécies causadoras da queima-do-fio em diversas plantas arbóreas estão agrupadas no gênero *Ceratobasidium* (ROBERTS, 1999). Fungos do gênero *Ceratobasidium* são Basidiomicetos que tem como fase anamórfica espécies binucleadas de *Rhizoctonia* (SNEH et al., 1991; GARCÍA et al., 2006).

A queima do fio associado com fungos do complexo de espécies *Ceratobasidium* spp. é considerada uma doença de planta emergente para as espécies cultivadas no Brasil (CERESINI et al., 2012).

A etiologia do patógeno agente causador da doença queima do fio no chá é ainda desconhecida. Recentes análises filogenéticas de uma população de isolados do

chá indicaram ser uma nova espécie de *Ceratobasidium spp.*, diferente de todas as espécies conhecidas no mundo (CERESINI et al., 2012). Contudo, ainda não há descrições das características morfológicas e culturais do fungo publicadas.

Os conceitos mais discutidos de espécies são: a) espécie morfológica, onde os organismos são agrupados de acordo com suas características morfológicas; b) espécie biológica, que se baseia principalmente na capacidade dos indivíduos se cruzarem naturalmente; e c) espécie filogenética, que se define de acordo com as relações de ancestralidade entre os organismos (MAYDEN, 1997 apud BASSETO, 2006). Em fungos, o conceito filogenético tem se mostrado eficaz e por isso vem sendo mais usado no processo de identificação de espécies (TAYLOR et al., 2000 apud BASSETO, 2006).

Embora a análise filogenética seja mais eficaz e rápida, informações das características morfológicas, culturais e patogênicas do patógeno, são muito importantes para o melhor entendimento da sua biologia e o desenvolvimento da doença. Devido a escassez de informações sobre o agente causal da doença queima do fio no chá, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização citomorfológica, cultural, patogênica e molecular de isolados de *Rhizoctonia* binucleada, associada ao chá no Vale do Ribeira - SP.

Acredita-se que a informação gerada por esta pesquisa possibilitará importante contribuição para o conhecimento da biologia do fungo agente causal da doença.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. A queima do fio e seus hospedeiros

O nome queima do fio foi primeiramente aplicado para a doença no chá no Norte da Índia e vem sendo utilizado como designação para outras doenças de várias espécies de árvores e arbustos nas quais manifestam pela formação do filamento branco a marrom do fungo nas folhas, galhos e ramos pequenos (WOLF; BACH, 1927).

Os sintomas característicos da queima do fio em várias plantas cultivadas é a formação de cordões miceliais finos em ramos e galhos, as folhas tornam-se escuras, secam e ficam penduradas no ramo pelo micélio do fungo (WOLF; BACH, 1927; LOURD; ALVES, 1997; FURTADO, 1997). Em algumas culturas como citros e maçã há a produção de escleródios nos ramos e galhos (WOLF; BACH, 1927; LOURD; ALVES, 1987).

A lista de hospedeiros da queima do fio no mundo é extensa. Desde o ano de 1900, o fungo tem sido observado em plantas ornamentais e frutíferas da família das Annonaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Rosaceae, Teaceae e em diversas outras Famílias de

plantas em vários países da América, América do sul, África e Ásia (WOLF; BACH, 1927; ROSSETI et al.,1982).

No Brasil a doença já foi descrita afetando diversas famílias de plantas e culturas de importância econômica como o chá (*Camellia sinensis*), caqui (*Diospyrus kaki*), graviola (*Anona muricata*), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), pimenta do reino (*Piper nigrum*), cacau (*Theobroma cacao*), citros (*Citrus* sp.), café (*Coffea arabica*), manga (*Mangifera indica*), abacate (*Persea atriearicann*), seringueira (*Hevea brasiliensis*), nim (*Azadirachta indica*), Mogno Africano (*Khaya ivorensis*), coco (*Cocos nucifera*), banana (*Musa* sp.) e outras plantas ornamentais arbustivas como *Ficus* sp, *Mussaenda alicia*, *Codiaeum* sp. e *Ixora coccínea* (GONÇALVES, 1963; ROSSETI et al.,1982; LOURD; ALVES, 1987; FURTADO, 1997; BENCHIMOL et al., 2001; PEREIRA et al., 2003; BENCHIMOL; BASTOS, 2004).

A lista de frutíferas atacadas pela queima do fio, estabelecida a partir das observações feitas no município de Manaus, região floresta amazônica e dos relatos anteriores, chega a mais de 27 espécies pertencentes a 12 famílias botânicas diferentes (LOURD; ALVES, 1987; BENCHIMOL et al., 2001; BENCHIMOL; BASTOS, 2004).

A queima do fio é de comum ocorrência nos trópicos e de rara ocorrência nos países de clima temperados (WOLF; BACH, 1927). É interessante notar que a ocorrência da doença queima do fio em várias plantas hospedeiras geralmente está situada em locais rodeados por florestas densas (WOLF; BACH, 1927; LOURD; ALVES, 1987; FURTADO, 1997; BENCHIMOL et al., 2001). Na Florida, os pomares eram rodeados por pântanos densamente arborizados e por causa da floresta circundante, tornava-se impossível a evaporação do ar carregado de umidade (WOLF; BACH, 1927).

No Brasil a queima do fio é frequente em regiões de alta precipitação e temperaturas elevadas como nas florestas tropicais da Amazônia e da Mata Atlântica, ambiente propício para a ocorrência da doença (FURTADO, 1997; LOURD; ALVES, 1987; SOUSA et al., 2009).

4.2. Etiologia da queima do fio

A identidade dos agentes causais da queima do fio em várias plantas hospedeiras ainda não é totalmente conhecida. Segundo Wolf e Bach (1927), esse fungo foi primeiramente descrito em 1875/1876 por Cooke, de coleções de café enviados da Índia. Ele considerou como um Hyphomycete e designou-o como *Pellicularia Koleroga*. Em 1910, Von Hohnel redescreveu o fungo do tipo Cooke e atribuiu a ele o nome de *Corticium koleroga*. Em 1911, Fawcett comparou o fungo da queima do café em Porto Rico com espécimes enviados da Índia e considerou-os idênticos.

Continuando as observações de Wolf e Bach (1927), o fungo da queima do fio nas Pomaceas como maçã, pera e marmelo no Sul dos Estados Unidos foi identificado em 1907 por Stevens, como um *Hypochnus ochroleucus*. Noack, em 1898 foi o primeiro a observar no Brasil o fungo em plantas de Pomaceas e também o identificou como *H. ochroleucus*. Em 1918, Burt observando as características morfológicas e culturais de espécimes do café e de plantas pomaceas considerou-os como sinônimos de *Corticium Koloroga* e *Corticium stevensii* e *Hypochnus ochroleucus*.

Em 1935, quase duas décadas depois, Rogers reorganizou quatro táxons, alguns destes incluíam uma complexa mistura de gênero e espécies reconhecidas por um amplo ancestral do gênero *Corticium* ou *Hypochnus*, propondo o Gênero *Ceratobasidium* (GARCÍA et al., 2006).

De acordo com a literatura brasileira, os agentes causais da queima do fio em diversas plantas da Região Amazônica e de Mata Atlântica são classificados como *Pellicularia Koleroga*, *Corticium Koleroga*, *Corticium stevensii*, *Corticium* sp., *Ceratobasidium stenvesii* e *Ceratobasidium anceps* (KIMATI et al., 2005), contudo ainda há escassez de informações sobre as características morfológicas, culturais e moleculares dos agentes causais da doença nas diversas plantas hospedeiras no Brasil.

Na cultura do chá o agente causal da queima dos fios já foi denominado como *Corticium koleroga* (sin. *Pellicularia Koleroga*) e revisada posteriormente como *Ceratobasidium anceps* (FURTADO, 1997; FURTADO, 2005).

Recentes estudos moleculares realizados em duas populações de *Ceratobasidium* associadas à queima do fio no chá e a queima do fio no caqui no Estado de

São Paulo, detectaram que estas foram filogeneticamente distintas das diversas espécies de *Ceratobasidium* depositadas no GenBank®/NCBI, tanto de *C. anceps*, *C. noxium* (sin. *Pellicularia koleroga*) quanto de *C. cornigerum*, a espécie filogeneticamente mais próxima (CERESINI et al., 2012).

Embora compartilhando um mesmo ancestral, constatou-se também a distinção filogenética entre as populações de isolados de *Ceratobasidium spp.* que atacam o chá e o caqui, representando duas distintas linhagens historicamente divergentes e que tiveram histórico de diversificação (CERESINI et al., 2012).

4.3. Classificação de *Rhizoctonia binucleada* (teleomorfo *Ceratobasidium spp.*)

De acordo com Hawksworth et al (1995), o Gênero *Ceratobasidium* é classificado dentro do Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Classe Basidiomycetes, Ordem Ceratobasidiales, Família Ceratobasidiaceae. Para a identificação de espécies de Basidiomycetes, são características importantes na classificação à forma, número e medidas de basídios, esterigmas e basidiósporos, bem como a morfologia do himênio (SNEH et al., 1991; WOLF; BACH, 1927; GARCÍA et al., 2006). A fase anamórfica ou assexual de *Ceratobasidium* é correspondente a espécies de *Rhizoctonia binucleada* e são classificadas no Reino Fungi, Divisão Fungos Mitospóricos, Classe forma Agonomycetes/Micelio sterillia (HAWKSWORTH et al., 1995). Os fungos do Gênero *Rhizoctonia* são caracterizados pela não esporulação, micélio com ramificação em ângulo reto 90°C, com septação imediatamente e após o ramo, constrição na base da ramificação e septo doliporo (ANDERSON, 1982; ADAMS, 1988).

Os Fungos do Gênero *Rhizoctonia* são classificados por espécies multinucleadas que possui como espécie tipo *Rhizoctonia solani*, fase anamórfica de *Thanatephorus cucumeris*, a espécie mais estudada no mundo; e em espécies binucleadas correspondentes ao teleomorfo *Ceratobasidium spp.* (SNEH et al., 1991; GARCÍA et al., 2006).

O fungo *Rhizoctonia binucleada* é relatado como fitopatógeno de várias plantas, mas frequentemente é relacionado ao controle biológico de *Rhizoctonia solani*

em feijão e soja e outros fitopatógenos como *Botrytis* em gerânio (CARDOSO; ECHANDI, 1987; HONEYCUTT; BENSON, 2001; OLSON; BENSON, 2007; BASSETO et al., 2008).

Em geral, as técnicas básicas para classificação de espécies do Gênero *Rhizoctonia* spp. e teleomorfos correspondentes, são às características citológicas da hifa, morfologia do teleomorfo e o grupamento de anastomose (GA) (SNEH et al., 1991; GARCÍA et al., 2006). Para se completar o processo de identificação, recomenda-se caracterizar atributos culturais considerados particulares aos grupos de anastomose (GA), tais como a necessidade de tiamina para o crescimento micelial, número de núcleos por célula, coloração e morfologia da colônia, taxa de crescimento micelial, temperatura ótima de crescimento, tipo de escleródios produzidos, gama de hospedeiros e patogenicidade, técnicas moleculares como perfil isoenzimático, padrões de RFLP e similaridade de bases da região ITS do rDNA (SNEH et al., 1991; CARLING; SUMNER, 1992; NAKATANI, 2006).

4.3.1. Formação da fase teleomorfa de *Rhizoctonia binucleada*

Os teleomorfos frequentemente proporcionam um meio de diferenciação conclusiva entre os isolados que são semelhantes no estado anamorfo (WARCUP; TALBOT, 1966), apresentando características importantes para a descrição de novas espécies.

Os fatores ambientais específicos que influenciam a formação do teleomorfo para muitas espécies de *Rhizoctonia* spp. ainda não são claramente entendidos e as condições requeridas para a esporulação diferem entre espécies e entre isolados. (SNEH et al., 1991). Geralmente, condições de alta umidade, aeração, temperaturas variando de 20-30°C, alternância de luminosidade, tipo de substrato e idade do inóculo são fatores importantes para a esporulação de *Rhizoctonia* spp. (SNEH et al., 1991).

Os métodos aplicados para a indução da esporulação de *Rhizoctonia* binucleada são semelhantes às utilizadas com sucesso para *Rhizoctonia solani* Küh, teleomorfo *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk, (UCHIDA et al., 1986). Os teleomorfos podem ser formados no solo, na planta 'in vivo' e em meio de cultura 'in vitro' (UCHIDA et al., 1986; SNEH et al., 1991; SANFUENTES et al., 2007).

Entre as espécies de *Rhizoctonia* binucleada, o procedimento de indução da cultura em solo tem sido comumente aplicado para a esporulação, mas uma grande proporção dos isolados não frutifica com esse método (WARCUP; TALBOT, 1966; BURPEE et al., 1980; OGOSHI et al., 1979). Ocasionalmente alguns isolados frutificaram escassamente em meio de cultura água agar (OGOSHI et al., 1979). A transferência de colônias de *Rhizoctonia* binucleada de um meio agar rico em nutrientes para outro meio agar pobre em nutrientes resultou na frutificação de poucos isolados e não induziu a formação basidial em outros isolados (MURRAY; BURPEE, 1984; ADAMS; BUTLER, 1983).

Efeitos da luz foram estudados para a formação da fase teleomórfica de *Rhizoctonia solani*, mas os trabalhos são ainda poucos (UCHIDA et al., 1986). Já foi observado que a luz de baixa intensidade ou difusa é estimulatório (FLENTJE et al, 1963; MURRAY, 1982), bem como, a luz com intensidade relativamente elevada também induz a formação dos esporos em *T. cucumeris* (STRETTON et al., 1964), por outro lado Whitney (1964) afirmaram que a luz era inibitória para a produção de basídios.

Ao longo dos anos, devido a grande dificuldade da formação da fase teleomórfica de *Rhizoctonia* binucleada na natureza e em laboratório, o critério de classificação de *Ceratobasidium* spp. tem sido mais realizado na sua forma anamórfica (SNEH et al., 1991; HIETALA et al., 2003; GARCÍA et al., 2006).

4.3.2. Grupos de anastomose e interações somáticas vegetativas

A caracterização da reação de anastomose é realizada pelo pareamento entre hifas de diferentes isolados, fruto de uma atração mútua que resulta em anastomose ou não de hifas (ANDERSON, 1982; CARLING, 1996).

Segundo García et al. (2006), existem 14 grupos de anastomose (GA) para *R. solani*, GA-1 a GA-13 e GA-BI e nove grupos intraespecíficos de anastomose (GIA). Para as espécies de *Rhizoctonia* binucleada existem 23 GA, de GA-A a GA-U e três GIA dentro do grupo GA-B (GA-Ba, GA-Bb, e GA-Bo) (GARCIA et al., 2006).

Atualmente, os grupos de anastomose de *Rhizoctonia* binucleada que a fase teleomorfa de *Ceratobasidium* spp. é conhecida são os grupos GA-A; GA-Ba, GA-Bb, GA-Bo, GA-C, GA-D, GA-P e GA-Q (SNEH et al., 1991; GARCÍA et al., 2006).

O conceito sobre grupo de anastomose dentro do complexo *Rhizoctonia* spp. é de extrema importância para fitopatologistas e melhoristas de plantas, sob o ponto de vista etiológico (SOUZA et al., 2009).

A identificação de GA ou de GIA dentro de *Rhizoctonia* spp. trouxe grandes contribuições para o estudo da resistência genética de plantas, estudos epidemiológicos e ecológicos de várias doenças (OGOSHI, 1987). Diferentes GIA podem variar consideravelmente em seu cruzamento, sua forma de dispersão e patogenicidade (VILGALYS; CUBETA, 1994). Após o estabelecimento de GA ou de GIA 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 GA ou GIA específico (NAKATANI, 2006).

A caracterização do GA e do GIA baseado na morfologia, patologia, anastomose e características moleculares representa um grande avanço na descrição da variação genética dentro de *Thanatephorus* spp., *Ceratobasidium* spp. e *Waitea* spp. (VILGALYS; CUBETA, 1994).

As interações vegetativas microscópicas e macroscópicas que ocorrem entre isolados de *Rhizoctonia solani* têm sido extensamente estudadas (MACNISH et al., 1993; MACNISH et al., 1997). As reações microscópicas vegetativas (anastomoses) são de fato as reações de incompatibilidade vegetativa entre isolados e tem sido usado para dividir *Rhizoctonia* spp. dentro dos GA (SNEH et al., 1991; MACNISH et al., 1997).

Segundo Macnish et al. (1993), as relações genéticas são caracterizadas em quatro classes de reações microscópicas vegetativas, que podem ser diferenciadas em função do grau de interação entre hifas de isolados distintos, sendo representadas por reações C0, C1, C2 e C3. Reações do tipo C0 resultam em ausência de fusão e reações do tipo C1 ocorre somente o contato das hifas, não ocorrendo fusão perfeita. Nesta reação ocorre a fusão da parede celular, mas não da membrana celular, observando uma linha de separação no ponto de contato. Reações do tipo C2, também chamadas de ‘reação de morte’ ou ‘anastomose imperfeita’, representa a incompatibilidade somática entre indivíduos

distintos geneticamente. Nesta reação ocorre a morte das células de cada hifa envolvida na fusão, as células mortas apresentam-se plasmolisadas quando comparadas às células adjacentes. Já as reações do tipo C3 ocorrem a fusão das hifas, também denominadas de ‘anastomose perfeita’, indicando 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.

As interações descritas acima são reações somáticas vegetativas que são avaliados no nível de microscópico óptico, mas também as interações podem ser observáveis no nível macroscópico, na qual ocorrem entre pares de isolados de *Rhizoctonia solani*. (MACNISH et al., 1997; CAMPOS; CERESINI, 2006).

Whitney; Parmeter (1963) observaram pela primeira vez reações macroscópicas 'tipo tufos' em um contexto sexual entre pares de homocários (indivíduos haploides) de *R. solani* AG-1. Eles descreveram reações em meio de cultura em que pares de isolados: (a) crescem e se misturam sem a reação de formação de ‘barreiras’ na linha de contato, (b) entram em contato, mas não se misturam e há reação de formação de uma “barreira”, ou (c), formam um tufo de micélio na linha de contato.

Segundo Macnish et al. (1997), as reações macroscópicas vegetativas não têm sido apenas utilizadas no contexto sexual ou de acasalamento. Syminis et al (1987) não usou os termos das reações no contexto de acasalamento, mas sugeriu como um processo vegetativo que pode permitir a transferência de vírus e plasmídeos entre isolados de *R. solani*.

De acordo com Macnish et al. (1997), as reações vegetativas macroscópicas ‘tipo tufos’ têm sido usados em ambos os contextos vegetativos (somática) e acasalamento (sexual), mas confusões tem ocorrido devido ao uso destes dois contextos.

Segundo Ceresini et al. (2002), comumente a incompatibilidade somática e marcadores moleculares são usados como dois critérios independentes para inferência inicial sobre os sistemas de cruzamento e a estrutura predominante em populações de *R. solani*. Uma progênie gerada via reprodução sexual homotática (autofértil) será geneticamente idêntica (ou quase idêntica) aos isolados parentais, e todas as partes do genoma terão a mesma história evolucionária, devido à ausência de recombinação (WHITNEY; PARMETER, 1963 apud CAMPOS; CERESINI, 2006). Em contraste, a progênie gerada

através de reprodução sexual heterotálica (autoestéril) será geneticamente diferente dos isolados parentais, como resultado da recombinação de núcleos geneticamente diferentes e assim, regiões diferentes do genoma da progênie terão histórias evolucionárias diferentes (WHITNEY; PARMETER, 1963 apud CAMPOS; CERESINI, 2006).

Vários trabalhos foram realizados sobre a incompatibilidade somática vegetativa e a variação genética intraespecífica por meio de análises moleculares de isolados de GA de *R. solani* (CUBETA; VIGALYS, 1997; CERESINI et al.; 2002; CAMPOS; CERESINI, 2006), mas poucos trabalhos foram desenvolvidos com isolados de *Rhizoctonia* binucleada (HIETALA et al., 2003).

A compatibilidade vegetativa macroscópica e microscópica por outro lado, em alguns casos pode ser usadas para identificar ou comparar a similaridade das reações a nível microscópio e vice-versa, mas nem sempre estas reações são similares (MACNISH et al., 1997; CAMPOS; CERESINI, 2006). As interações microscópicas parecem ser mais adequadas na discriminação entre isolados compatíveis ou não, comparado com a análise das interações macroscópicas (CAMPOS; CERESINI, 2006).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Coleta, isolamento e preservação do material biológico

Foi realizada a coleta de órgãos infectados, com sintomas da doença queima dos fios em uma área de chazais do grupo AMAYA Agropecuária LTDA., cultivados ao redor de um remanescente de floresta Mata Atlântica, no município de Registro na região do Vale do Ribeira - SP (Figura1). Utilizou-se um GPS Garmin para marcação dos pontos amostrados, ponto n° 7 - localização da área: Lat. 24°31'52.51"S; Long. 47°47'48.44"W.

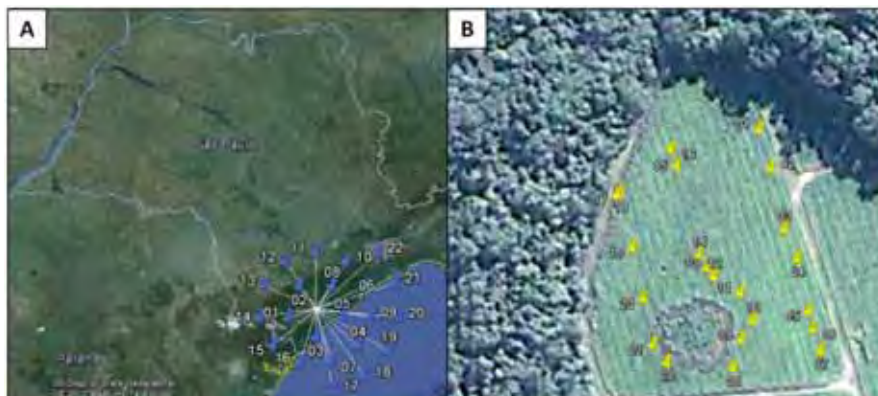


Figura 1. A-Área de coleta no Município de Registro, na região do Vale do Ribeira-SP, Brasil; B-Local amostrado na plantação de chá ao redor do fragmento de Mata Atlântica. Pontos amarelos GPS.

O isolamento foi realizado no Laboratório de Fungos do Solo Nilton Luiz de Souza do Departamento de Produção Vegetal - Setor de Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agrônômicas - UNESP, Botucatu-SP.

Foram realizados métodos de isolamento direto e indireto, utilizando meio de cultura BDA (Batata dextrose agar Acumedia[®]) e AA a 2% (Água agar CQA[®]) (ALFENAS; MAFIA, 2007). O isolamento direto constituiu da retirada de pequenos fragmentos de hifas aderidos as folhas infectadas e plaqueadas diretamente nas placas de petri contendo os meios de cultura. O isolamento indireto constituiu do processo de desinfecção de pequenos fragmentos de tecidos doentes da planta em álcool 70% por 30s, hipoclorito de sódio a 2% por 1 min. e lavadas em água destilada autoclavada, para a retirada do excesso de desinfetantes. As placas de petri foram incubadas estufa tipo BOD no escuro a 25°C e após 3 a 4 dias, as colônias crescidas nos meios com características de *Rhizoctonia* spp. foram repicadas para meio BDA, e posteriormente preservadas em tubo inclinado com óleo mineral e em tubos de penicilina com água estéril (método de Castelani) (GONÇALVES et al., 2007).

Os isolados obtidos foram incluídos na Micoteca do Departamento de Produção Vegetal - Setor de Defesa Fitossanitária - FCA - UNESP, Botucatu-SP e também na Micoteca "Mário Barreto Figueiredo" do Instituto Biológico - IB de São Paulo.

Quatro isolados padrões de anastomose de *Rhizoctonia* binucleada (GA-A, GA-Bo, GA-P e GA-Q), da coleção da Micoteca do Departamento de Produção Vegetal - Setor de Defesa Fitossanitária - FCA - UNESP, Botucatu-SP, foram utilizados no estudo para efeito de comparação. Os isolados GAs foram reativados transferindo fragmentos

de hifas, preservadas em tubo de ensaio com óleo mineral para placas de Petri contendo o meio de cultura BDA e incubados em estufa tipo BOD a 25°C no escuro até o crescimento das colônias.

Segundo García et al. (2006), os isolados padrões GA de *Rhizoctonia binucleada*: GA-A, GA-Bo, GA-P e GA-Q, possuem sua fase telemórfica correspondente ao *Ceratobasidium cornigerum*, espécie filogeneticamente mais próxima de isolados de *Ceratobasidium* do chá. (CERESINI et al., 2012).

5.2. Determinação das características citomorfológicas de *Rhizoctonia* spp.

5.2.1. Número de núcleos por célula

Os procedimentos para visualização dos núcleos foi realizado segundo Ceresini et al. (1996) para avaliação do grupamento de anastomose, mas com uma pequena mudança. Discos de micélio obtidos da periferia de colônias crescidas em placas de Petri contendo meio BDA a 25°C no escuro por 48 horas em estufa do tipo BOD, foram removidos e colocados individualmente na extremidade de lâminas de vidro esterelizada contendo uma fina camada de meio AA a 2% e colocadas dentro de vasilhas de plásticas, fechadas com saco plástico transparente. O conjunto foi incubado nas mesmas condições anteriormente e após o crescimento inicial das hifas na lamina de vidro, realizou-se a coloração dos núcleos com uma gota de solução corante azul de algodão (20 g de fenol cristalizado, 20 ml de ácido láctico, 40 ml glicerina, 20 ml de água destilada e 0,05 g de azul de algodão) e foram cobertas com lamínulas de vidro. No microscópio óptico sob lente de 40x, foi contado o número de núcleos de 20 células jovens de cada isolado e GAs padrão. Os núcleos são coloridos de cor azul.

5.2.2. Indução da fase telemórfica

Para o teste de indução da fase telemórfica dos isolados do chá, foi utilizado somente o isolado padrão do grupo de anastomose GA-P.

Foi realizado o teste 'in vitro' da indução do teleomorfo em cinco diferentes meios de cultura: BDA (Batata dextrose agar), AA a 2% (Água agar), CMA (Corn meal agar Sigma[®]), CPD (Agar Czapek's dox Vetec[®]) e MA a 2% (Malte agar Acumedia[®]), sob duas condições de luminosidade: luz contínua e fotoperíodo 12h luz/12h escuro e incubados a 24°C em estufa tipo BOD por 12 dias (UCHIDA et al., 1986). Para isso os isolados do chá e o padrão AG-P, foram semeados em placas de Petri contendo meio BDA por 72 horas a 25°C no escuro. Posteriormente cada isolado foi repicado para os cinco meios de cultura e incubados nas condições descritas acima. Após 12 dias foi realizada a observação das estruturas sexuadas de *Ceratobasidium* spp.: himênio, metabasídios, esterigmas e basidiósporos, com o auxílio do microscópio óptico. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições, cada repetição foi constituída por uma placa de Petri.

5.3. Avaliação do grupo de anastomose (GA)

Os isolados do chá e os GAs foram semeados em placas de Petri contendo meio BDA por 48 horas a 25°C no escuro. Após este período, um disco de micélio da margem da colônia de cada isolado foi transferido assepticamente e posicionado a 2 cm um do outro sobre a lâmina de vidro esterelizada contendo uma fina camada de meio de AA a 2% (CERESINI et al., 1996). Em uma extremidade foi posicionado o isolado do chá a ser identificado e na outra extremidade um disco do isolado padrão do GA.

As lâminas foram colocadas dentro de vasilha de plástico, fechadas com saco plástico transparente e incubadas a 25° C no escuro em estufa BOD. Após 48 a 72 horas, quando as hifas de ambos os isolados se tocaram, foram observadas as interações das hifas, com o auxílio do microscópio óptico, utilizando uma gota de solução corante de azul de algodão, sobrepondo-se uma lamínula de vidro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições, cada repetição foi avaliado cinco pontos ou mais de interação e caracterizada conforme Macnish et al. (1993) (Tabela 1).

Tabela 1. Natureza genética das relações segundo Macnish et al (1993).

Reação	Natureza genética das relações entre isolados	GA
C0 = não interação	Não	Diferentes
C1 = apenas contato da hifa	Distante	Mesmo ou diferente
C2 = fusão imperfeita ou reação de morte	Indivíduos distintos	Mesmo
C3 = fusão perfeita	Indivíduos idênticos (prováveis clones)	Mesmo

5.4. Compatibilidade somática vegetativa entre isolados do chá

5.4.1. Reação de compatibilidade vegetativa microscópica

A metodologia e avaliação da reação de anastomose microscópica entre os isolados do chá foi a mesma utilizada para a determinação do grupamento de anastomose (Figura 2).



Figura 2. A-Pareamento dos isolados na lâmina de vidro. B-Vasilha coberta com plástico transparente.

5.4.2. Reação de compatibilidade vegetativa macroscópica

Os isolados do chá foram semeados em placas de Petri contendo meio BDA por 72 horas a 25°C no escuro. Após este período, um disco de micélio da margem da colônia de cada isolado foi transferido assepticamente e posicionado em lados opostos em placa de Petri contendo meio BDA suplementado com 1% de carvão ativado (MACNISH et al., 1997). Posteriormente os conjuntos foram incubados estufa BOD por sete dias, a 25°C no escuro. A avaliação da compatibilidade vegetativa macroscópica foi realizada conforme os termos utilizados por Macnish et al. (1997) e Campos; Ceresini (2006).

As reações foram classificadas como: a) compatibilidade somática (nenhuma reação é observada na linha de contato entre pares de isolados); b) incompatibilidade somática (reação é caracterizada por ‘tufos’ de hifas densas na linha de contato entre pares de isolados); c) reação de incompatibilidade fraca (o que não é estritamente uma categoria em si, mas sim um lugar para colocar as reações que claramente não corresponde a reação de compatibilidade ou incompatibilidade somática. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições, cada repetição foi constituída por uma placa de Petri.

5.5. Determinação das características culturais

5.5.1. Características morfológicas das colônias

Os isolados do chá e os isolados GAs de *Rhizoctonia* binucleada foram semeados em placas de Petri contendo meio BDA por 72 horas a 25°C no escuro. Após este período, um disco de micélio da margem da colônia de cada isolado foi transferido para placas contendo o meio BDA e incubados em estufa tipo BOD a 25°C por 10 dias. Posteriormente foi realizada a avaliação visual de cor, aspecto da colônia, tipo de crescimento e presença de tufos e/ou escleródios. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições, cada repetição foi constituída por uma placa de Petri.

5.5.2. Temperatura ótima de crescimento

O estabelecimento de curvas de crescimento micelial radial em função da temperatura foi realizado para determinação da temperatura ótima de crescimento. Os isolados do chá e os isolados padrões GAs foram cultivados em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA, em estufa tipo BOD a 10,15,20,25 e 30°C no escuro. O inóculo foi constituído de um disco de micélio de 7 mm de diâmetro obtidos das margens de culturas crescidas em meio BDA. As avaliações foram efetuadas determinando-se crescimento micelial radial dos isolados (cm/dia) em cada temperatura, até o primeiro isolado ocupar toda a placa de Petri. As médias do crescimento micelial radial foram comparadas pelo teste de Tukey a nível de 5%, utilizando o programa estatístico Sisvar 5.3 DEX/UFLA. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições, cada repetição foi constituída por uma placa de Petri.

5.6. Teste de patogenicidade

As mudas de chá foram obtidas de um mini viveiro próprio da AMAYA Agropecuária LTDA., e transportadas para casa de vegetação no Depto. de Proteção de Plantas da FCA. Estas foram transplantadas para vasos plásticos de 10 L com proporção 1:1:1 de solo : areia : matéria orgânica : adubação química (0,95 g termofosfato BZ; 0,85g superfosfato simples; 0,195g cloreto de potássio/ 1 L de substrato) e foram levadas para uma estufa com sistema de irrigação por microaspersão e mantidas sob dois regimes de irrigações diários (manhã e tarde). As plantas de chá com mais de quatro ramos novos, foram utilizadas para o teste.

Para a inoculação, foram utilizados colônias dos isolados do chá cultivados em meio BDA com sete dias de incubação a 25°C no escuro. Um disco de micélio de cada isolado foi depositado nas axilas das folhas novas de um ramo com até dois pares de folhas (Figura 3). Utilizou-se um disco de BDA sem o fungo, como testemunha.



Figura 3. Inoculação com discos de micélio nas axilas dos ramos novos de chá.

Em cada planta foi montada uma câmara úmida com saco plástico transparente durante 24 h (Figura 4). Após 72 h retornou o regime de irrigação durante todo o período do experimento e realizou-se o monitoramento diário da temperatura com o auxílio de um termômetro.



Figura 4. Câmara úmida após 24h da inoculação.

A patogenicidade foi avaliada com base no número médio de folhas doentes (NMFD) e pelo número de plantas doentes (NPD) pelo teste de Tukey a nível de 5%, Sisvar 5.3 DEX/UFLA. As avaliações foram efetuadas a cada cinco dias, assim que iniciou o aparecimento dos primeiros sintomas. No final das avaliações realizou-se o reisolamento do patógeno, para completar o postulado de Koch. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições, cada repetição foi constituída por uma planta de chá.

5.7. Caracterização molecular

A extração de DNA dos isolados do chá coletados foi realizada conforme o método desenvolvido por Murray; Thompson (1980) modificado. Em cada tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, foram macerados 3 discos de micélio com 1000 μ L de tampão de extração CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA; 2 % CTAB; 0,2 % β -mercaptoetanol). Em seguida, os tubos foram incubados a 65°C, por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 500 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v) aos tubos e estes foram misturados manualmente, por agitação, durante 10 minutos e centrifugados

a 10.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi removida para novos tubos com isopropanol. A mistura foi centrifugada por 15 minutos a 12.000 rpm e o “pellet” obtido foi lavado com 500 µL de etanol 70% e submetido a uma nova centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 100 µL de água com Diethylpirocarbonato (DEPC).

A reação de PCR foi feita utilizando os pares de primers ITS 1 (5´ TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3´) e ITS 4 (5´ TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3), que amplificam a região ITS-5,8S rDNA do fungo. Para a PCR, empregaram-se 3 µl de DNA total extraído (30ng), tampão 1X da enzima *GoTaq* DNA polimerase (Promega®), 2mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,2 µM de cada primer na concentração e 1,25 U de *GoTaq* DNA polimerase (Promega®), ajustando o volume da reação para 50 µl com água tratada com DEPC. O regime de programa utilizado no termociclador foi: 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 35 segundos, 52°C por 1 min, 72°C por 1 min, finalizando-se o processo com 72°C por 15 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose corado com Brometo de etídio e observados sob luz UV.

Para o sequenciamento dos fragmentos amplificados, o produto de PCR foi purificado com o Kit SV Gel and PCR Clean UP system (Promega®). O DNA dos isolados obtidos foi sequenciado no Centro de Genoma Humano da USP (Universidade de São Paulo). As sequências obtidas foram editadas através do software BioEdit Sequence Alignment Editor (1997-2005). Após edição, estas foram utilizadas para procurar sequências similares usando o software Blastn do NCBI. As sequências obtidas foram alinhadas e processadas com o programa Mega 5.05 para que fosse construída a árvore filogenética dos isolados de *Ceratobasidium* spp., utilizando o método “Jukes-Cantor” (JUKES; CANTOR, 1969) para a construção da matriz de distâncias, pelo método de Neighbor- Joining. Foi realizado um “bootstrap” com 10.000 replicações.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Isolados e características citomorfológicas de *Rhizoctonia* sp.

Das 22 amostras realizadas no campo, apenas cinco isolados foram obtidos com características de *Rhizoctonia*. Para a identificação das características das hifas dos isolados do chá obtidos e dos isolados GAs reativados, foram feitas lâminas da cultura do fungo e coradas com uma gota da solução corante azul de algodão para a visualização no microscópio óptico. Todos os isolados apresentaram hifas com ramificação em ângulo de 90°C e septação logo após a ramificação com constrição na base da ramificação (Figura 5). Os cinco isolados do chá foram denominados neste estudo como RCA, RCB, RCC, RCD e RC2. Os isolados receberam número de registro pela Micoteca "Mário Barreto Figueiredo" do IB-SP: MMBF 38/13 - RCA; MMBF 39/13 - RCB; MMBF 40/13 - RCC; MMBF 41/13 - RCD e MMBF 129/12 - RC2.

6.1.1. Condição nuclear

Os cinco isolados de *Rhizoctonia* sp. do chá e os isolados de *Rhizoctonia* binucleada padrões GAs (GA-A, GA-Bo, GA-P e GA-Q), foram considerados binucleados, apresentando dois núcleos por célula (Figura 5).

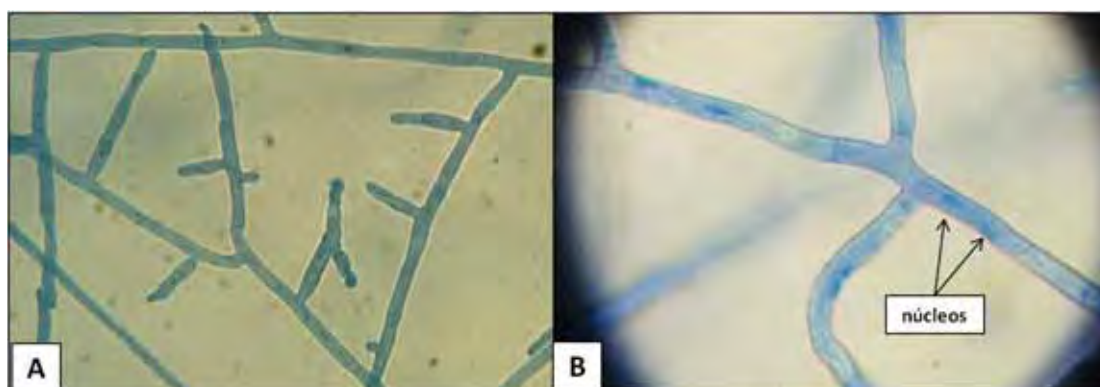


Figura 5. A-Aspectos da ramificação das hifas; B-condição binucleada de hifas de *Rhizoctonia*.

6.1.2. Indução da fase teleomórfica

Na indução do estágio teleomorfo de *Rhizoctonia* binucleada sp. associada ao chá e do isolado padrão GA-P, não foi observada a formação basidial de *Ceratobasidium* em nenhum dos meios de cultura e condições de luminosidades. Porém, para alguns isolados, meios de cultura e condições de luminosidade, houve escassa formação de estruturas como: himênio e metabasídio (Figura 6). Não se realizou a medição destas estruturas devido à baixa formação destas nos meios de cultura.

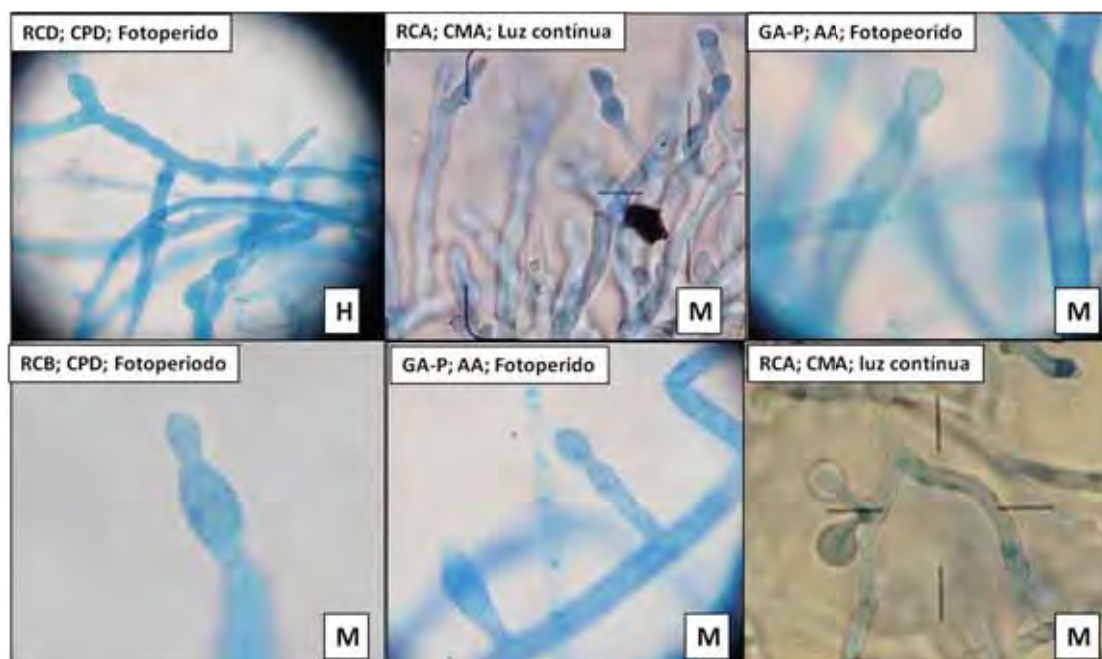


Figura 6. Estruturas sexuais de isolados de *Ceratobasidium spp.* do chá e GA-P. H=himênio; M=metabásidio; Isolado;meio de cultura;luminosidade.

Observou-se a formação de himênio e metabasidio nos meios BDA e CMA, sob luz contínua, pelos isolados RCB e RCA (Tabela 2). Sob fotoperíodo 12h luz/12 escuro, observou-se a formação destas estruturas nos meios AA, CMA e CPD, pelos isolados RCB, RCD e GA-P (Tabela 3).

Tabela 2. Formação de estruturas de *Ceratobasidium spp.* em diferentes meios de cultura, sob luz contínua, a 24°C por 12 dias.

Isolados	Meios de cultura				
	BDA	AA	MA	CMA	CPD
RCA	-	-	-	H / M	-
RCB	H / M	-	-	-	-
RCC	-	-	-	-	-
RCD	-	-	-	-	-
RC2	-	-	-	-	-
GA-P	-	-	-	-	-

H=himênio; M=metabásidio; [-]=ausente

Tabela 3. Formação de estruturas de *Ceratobasidium spp.* em diferentes meios de cultura, sob fotoperíodo 12h luz/12h escuro, a 24°C por 12 dias.

Isolados	Meios de cultura				
	BDA	AA	MA	CMA	CPD
RCA	-	-	-	-	-
RCB	-	-	-	-	H
RCC	-	-	-	-	-
RCD	-	H / M	-	-	-
RC2	-	-	-	-	-
GA-P	-	H / M	-	H / M	H / M

H=himênio; M=metabasídio; [-]=ausente

Segundo UCHIDA et al (1986), a esporulação de isolados de *Ceratobasidium spp.* ocorrem em meio CMA e AA, mas sendo ausente nos meios BDA e CPD.

Analisando os fatores de condição de luminosidade, os estudos realizados por Uchida et al (1986), demonstrou a esporulação de culturas de *Ceratobasidium spp.* incubadas no escuro e que a luz não é requerida, mas a esporulação é aumentada em culturas crescidas sob luz contínua, indicando que a luz é altamente estimulatória. Entretanto, para os isolados de *Ceratobasidium spp.* do chá testados houve maior formação de himênio e metabasídio na condição de fotoperíodo 12h luz/12h escuro do que a condição de luz contínua (Tabela 2 e 3).

O estudo realizado por Uchida et al (1986), indicou que existe uma grande variação na capacidade de reprodução entre isolados de *Ceratobasidium spp.* e que fatores como comprimento de onda, intensidade da luz, aeração e temperatura são necessários para determinar as condições inibitórias e estimulatórias desse fenômeno.

Segundo Warcup e Talbot (1966), as condições de cultura utilizadas em experimentos de indução do teleomorfo são, na maioria das vezes, conducentes à expressão da variação da esporulação obtida e, por conseguinte, pode ser difícil em alguns casos determinar a espécie.

Este estudo apesar do insucesso na formação da fase teleomorfa de *Rhizoctonia binucleada*, evidenciou a possibilidade de indução das estruturas sexuadas de

Ceratobasidium spp. do chá em meio de cultura, toda via, o estudo dos fatores: luminosidade, temperatura e dias de incubação devem ser considerados, bem como os outros métodos de indução do teleomorfo, como cultura em solo, na planta ‘in vivo’ ou em folhas de chá destacadas.

6.2. Determinação do grupo de anastomose (GA)

A reação dos isolados de *Rhizoctonia binucleada* do chá com os isolados padrões dos GAs testados foi caracterizada como C0, de acordo com os critérios de Macnish et al (1993), não ocorrendo anastomose de hifas (Figura 7). Essas análises indicam que os isolados do chá testados não pertencem aos GA-A, GA-Bo, GA-P e GA-Q, ou seja, não possuem relação genética, sendo diferentes.

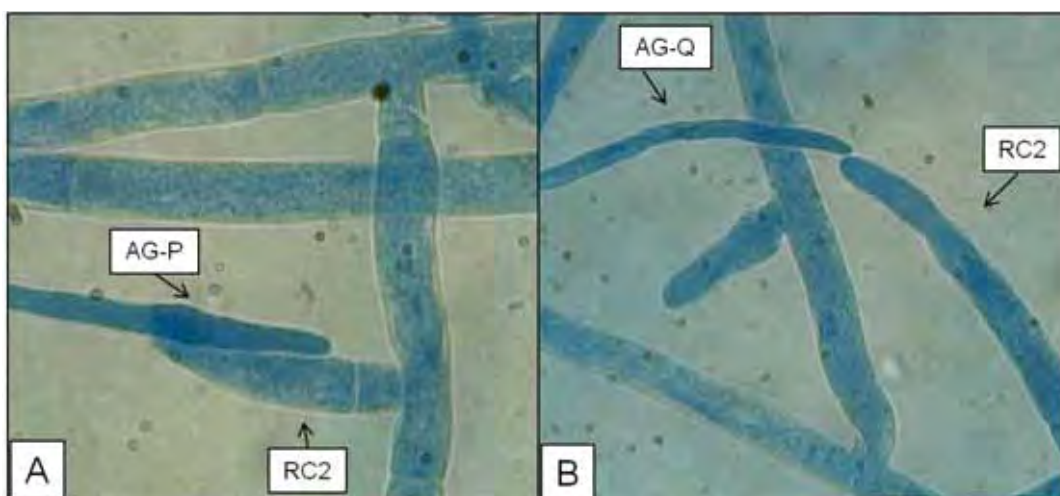


Figura 7. A e B- Reação C0 (não fusão) de isolados do chá x GAs de *Rhizoctonia binucleada*.

Ceresini et al. (2012) também diferencia por análises filogenéticas, as espécies de *Ceratobasidium spp.* do chá com a espécie de *C. cornigerum*, o que reforça a não interação de hifas entre os isolados do chá deste estudo com os isolados padrões de GAs nos quais correspondem a *C. cornigerum* (GARCIA et al., 2006).

Esses resultados são os primeiros registros de determinação de grupos de anastomose de *Rhizoctonia binucleada* associada à doença queima do fio no chá no Brasil.

Entretanto, ainda é preciso avaliar a reação de anastomose com os outros GAs de *Rhizoctonia* binucleada para levantar informações sobre alguma possível anastomose ou não de hifas, podendo assim, classificar em algum GA ou propor a criação de um novo GA de *Rhizoctonia* binucleada.

6.3. Compatibilidade somática vegetativa entre isolados do chá

A avaliação vegetativa microscópica e macroscópica foi realizada para inferir se há ocorrência de grupos de compatibilidade somática (GCS) entre os isolados de *Rhizoctonia* binucleada do chá e também avaliar a relação das reações vegetativas microscópica com a reação vegetativa macroscópica.

Os resultados de compatibilidade somática microscópica e macroscópica apresentaram a formação de três GCS entre os cinco isolados do chá. O GCS-1 foi composto pelos isolados RCA e RCB, o GCS-2 pelos isolados RCC e RCD e o GCS-3 composto apenas pelo isolado RC2, sendo compatível com ele mesmo (Tabela 4).

Tabela 4. Reações vegetativas microscópicas e macroscópicas entre isolados de *Rhizoctonia* binucleada.

Isolados	RCA	RCB	RCC	RCD	RC2
RCA	C3 / [+]	C3 / [+]	C1 / [-]	C1 / [-]	C1/C2 / [x]
RCB	C3 / [+]	C3 / [+]	C1 / [-]	C1 / [-]	C1 / [-]
RCC	C1 / [-]	C1 / [-]	C3 / [+]	C3 / [+]	C1 / [-]
RCD	C1 / [-]	C1 / [-]	C3 / [+]	C3 / [+]	C1 / [-]
RC2	C1 / [-]	C1 / [-]	C1 / [-]	C1 / [-]	C3 / [+]

* Reações microscópicas - C1=contato da hifa; C2= fusão imperfeita; C3=fusão perfeita;

*Reações macroscópicas - [+]=compatibilidade vegetativa; [-]=incompatibilidade vegetativa;

[x]=incompatibilidade fraca.

Na reação vegetativa microscópica observaram-se interações do tipo C3, C1 e C2 (Figura 8).

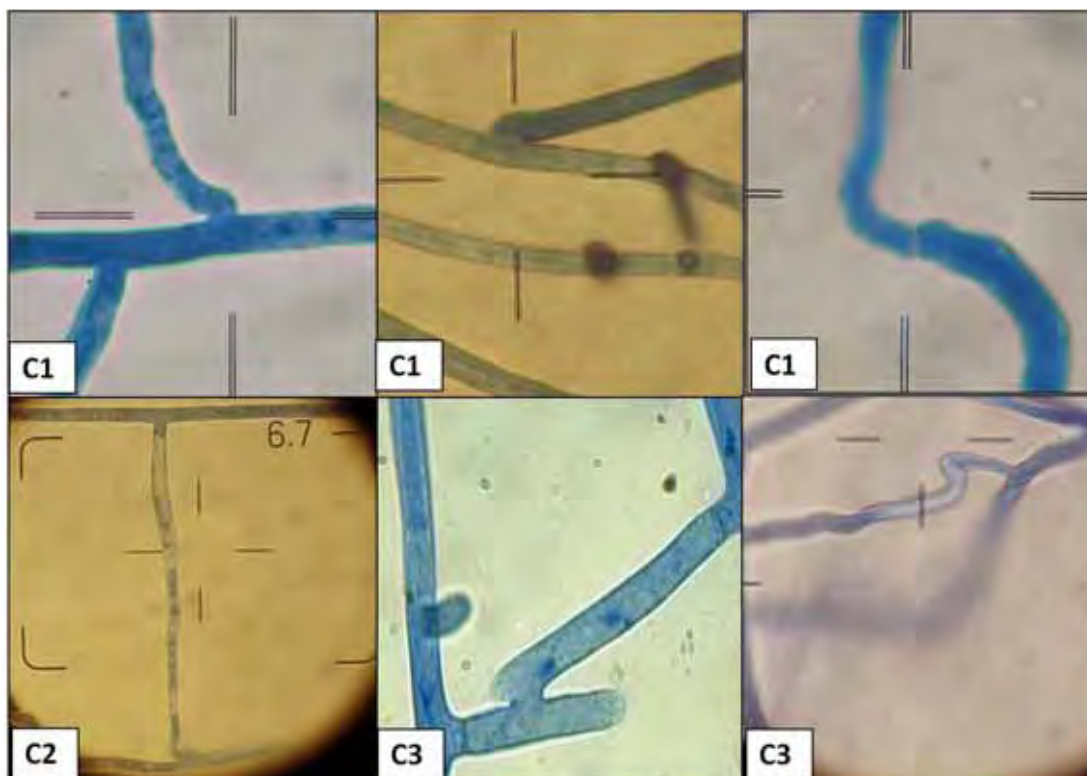


Figura 8. Reações microscópicas vegetativas entre isolados de *Rhizoctonia binucleata*.
Reações C1=contato da hifa; C2=fusão imperfeita (reação de morte); C3=fusão perfeita.

Interações do tipo C3 ocorreram entre os isolados do mesmo GCS-1, GCS-2 e GCS-3, havendo fusão perfeita de hifas. De acordo com os critérios de Macnish et al. (1993), reações C3 indicam que a natureza genética das relações entre os isolados são bem próximas, sendo provavelmente indivíduos idênticos ou clones, os quais podem pertencerem ao mesmo GA.

As reações do tipo C1 ocorreram entre isolados de GCS diferentes, havendo apenas o contato da hifa, com fusão de parede celular, mas não fusão da membrana. Segundo Macnish et al. (1993), as reações C1 indicam que as relações genéticas entre os isolados são distantes, ocorrendo diferenças entre os indivíduos, os quais podem pertencerem ao mesmo GA ou diferente.

No pareamento entre os isolados RCA x RC2 foi observado reações do tipo C1, no qual foi predominante, e do tipo C2 apenas em dois pontos de interação de hifas, ocorrendo fusão e morte das hifas em contato. As reações C2 indicam as relações genéticas entre indivíduos distintos, podendo pertencer ao mesmo grupo de anastomose.

Nas reações macroscópicas vegetativas observaram-se reações de compatibilidade somática entre os isolados do GCS-1, GCS-2 e GCS-3, onde nenhuma reação ocorreu na linha de contato das hifas no meio de cultura. Reações de incompatibilidade somática foram observadas entre os isolados de GCS diferentes, ocorrendo à formação de 'barreira' de 'tufos' densos de hifas, de cor branca na linha de contato (Figura 9).

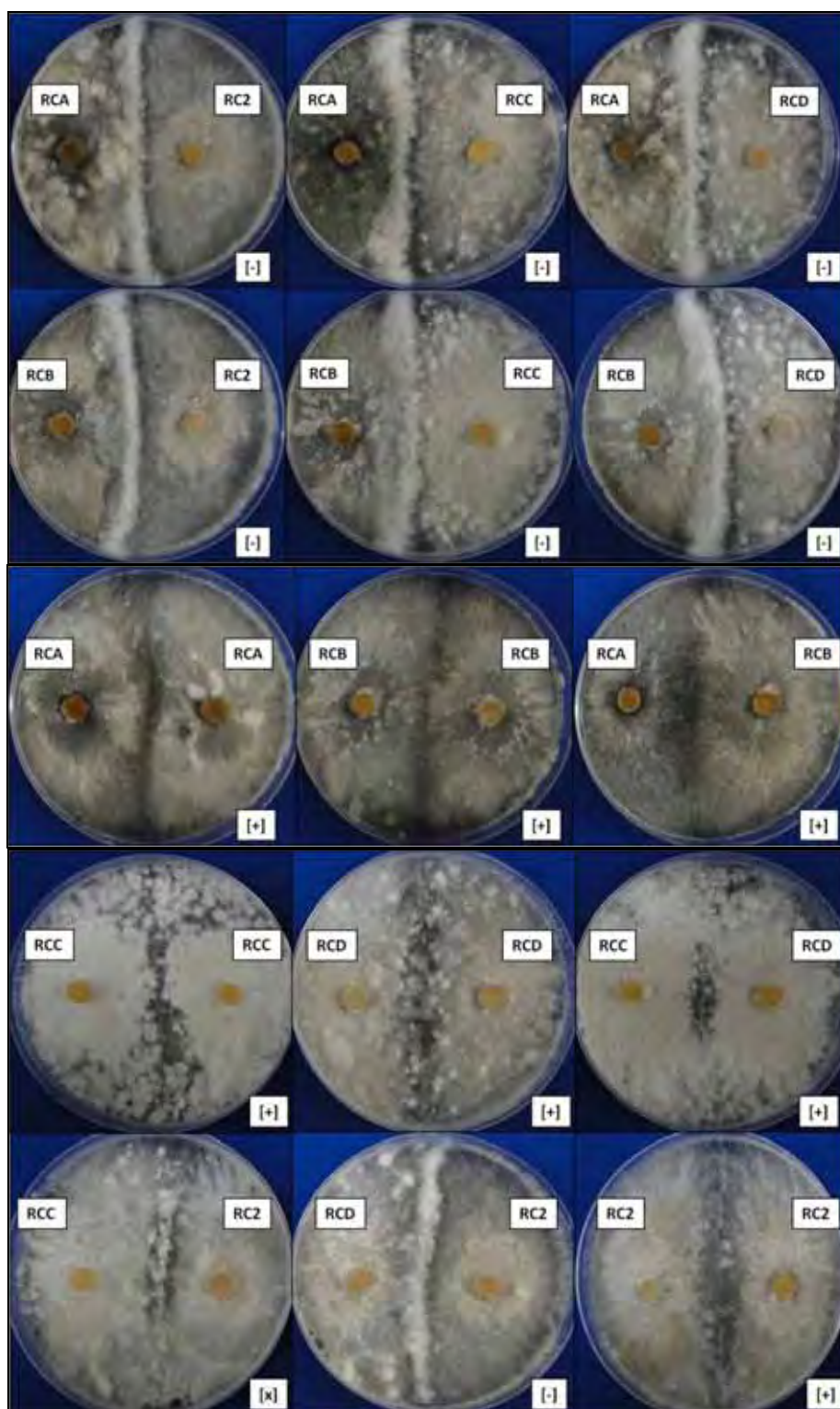


Figura 9. Reações macroscópicas vegetativas entre isoladas de *Rhizoctonia binucleata*. [+]=compatibilidade vegetativa; [-]=incompatibilidade vegetativa; [x]=incompatibilidade fraca.

O GCS-3 representado pelo isolado RC2, foi somaticamente incompatível com os isolados RCA, RCB e RCD, ocorrendo a formação de tufos de hifas densos em toda linha de contato. Porém, a reação do isolado RC2 x RCC apresentou reação fraca de incompatibilidade, ocorrendo à formação pequenas barreiras de tufos de hifas poucos densos, na linha de contato. De acordo com Campos; Ceresini (2006), as reações incompatíveis fracas são caracterizadas por pequenas áreas salientes na linha de interação micelial, que variam de intensidade. Fatores tais como, a relação genética dos isolados, a idade do micélio e a distância de pareamento podem ser responsáveis pela variação na intensidade das interações macroscópicas entre hifas (MACNISH et al., 1997; CAMPOS; CERESINI, 2006). Entretanto a significância biológica dessas reações macroscópicas fracas de incompatibilidade ainda é desconhecida (CERESINI et al., 2002).

A relação das reações microscópicas vegetativas com as reações macroscópicas vegetativas demonstrou similaridade. Reações do tipo C3 foram observadas no pareamento dos isolados dos três GCS, ocorrendo fusão perfeita de hifas o que corresponde a compatibilidade somática observada na reação macroscópica, onde nenhuma reação foi observada na linha de contato dos isolados.

Segundo Hietala et al (2003) a reação C3 também foi observada em estudos com *Ceratobasidium bicornis*. Essas interações têm sido claramente observadas em trabalhos de compatibilidade somática vegetativa de *R. solani*, em que reações C3 são frequentemente correlacionadas com as reações macroscópicas de compatibilidade vegetativa (MACNISH et al., 1997; CAMPOS; CERESINI, 2006).

Analisando a relação da incompatibilidade somática, esses trabalhos também descrevem que a reação C2 é correlacionada com as reações macroscópicas de incompatibilidade vegetativa. Entretanto, neste estudo a reação do tipo C1 foi predominante, tendo similaridade com as reações macroscópicas vegetativas, ocorrendo a formação de barreira de ‘tufos’ de micélio na linha de contato dos isolados.

Estes resultados indicam que as reações C1 também podem ser representadas nas reações onde há a formação de tufos densos de micélio na linha de contato dos isolados. A incompatibilidade somática vegetativa observada entre os isolados de *Rhizoctonia binucleata* do chá foi alta, considerando o número de isolados e que estes foram coletados de uma área continua ao redor de um fragmento de Floresta Mata Atlântica.

Segundo Macnish et al (1997), devido ao pequeno número de isolados testados, essa conclusão deve ser tratada com cautela, até que faça estudos com maior número de amostras. Contudo, as análises moleculares de CERESINI, et al. (2012) em isolados de *Ceratobasidium spp.* do chá, demonstraram uma grande variabilidade genética entre os isolados da população, o que permite reforçar neste estudo as diferenças genéticas entre os isolados do chá, caracterizados pela reação de incompatibilidade somática vegetativa.

6.4. Determinação das características culturais

6.4.1. Características morfológicas das colônias

Os isolados de *Rhizoctonia binucleada* do chá foram agrupados em três grupos morfológicos (GM) de acordo com suas características fenotípicas. O GM-1 foi representado pelos isolados RCA e RCB, o GM-2 pelos isolados RCC e RCD e o GM-3 pelo isolado RC2 (Tabela 5).

Os isolados do chá também foram fenotipicamente diferentes dos isolados padrões de GAs de *Rhizoctonia binucleada* GA-A, GA-Bo, GA-P e GA-Q (Tabela 5).

Tabela 5. Características morfológicas das colônias de *Rhizoctonia binucleada* do chá e GAs padrões.

Isolados	Cor da colônia	Tipo de crescimento	Aspecto da colônia	Presença de tufo
RCA	branco a marrom	rasteiro	micélio vigoroso	cor marrom
RCB	branco a marrom	rasteiro	micélio vigoroso	cor marrom
RCC	branco	rasteiro	micélio vigoroso	cor branca
RCD	branco	rasteiro	micélio vigoroso	cor branca
RC2	branco a marrom	rasteiro	micélio vigoroso	cor branca
AG-A	branco	rasteiros	micélio fino	ausência
AG-BO	branco	rasteiros e com halos concêntricos	micélio fino	ausência
AG-P	creme	rasteiro	micélio fino e rugoso	ausência
AG-Q	branco	rasteiro	micélio fino e pouco rugoso	cor branca

Os isolados do GM-1 apresentaram micélio de coloração variando em intensidade de tons de branco a marrom claro, crescimento micelial vigoroso e rasteiro, com presença de tufo de micélio de cor marrom. Os isolados do GM-2 apresentaram micélio de coloração branca, crescimento micelial vigoroso e rasteiro, com presença de tufo de micélio de cor branca. O isolado do GM-3 apresentou micélio de coloração branca, com pequena mancha de cor marrom claro, crescimento micelial vigoroso e rasteiro, com tufo de micélio de cor branca (Figura 10).

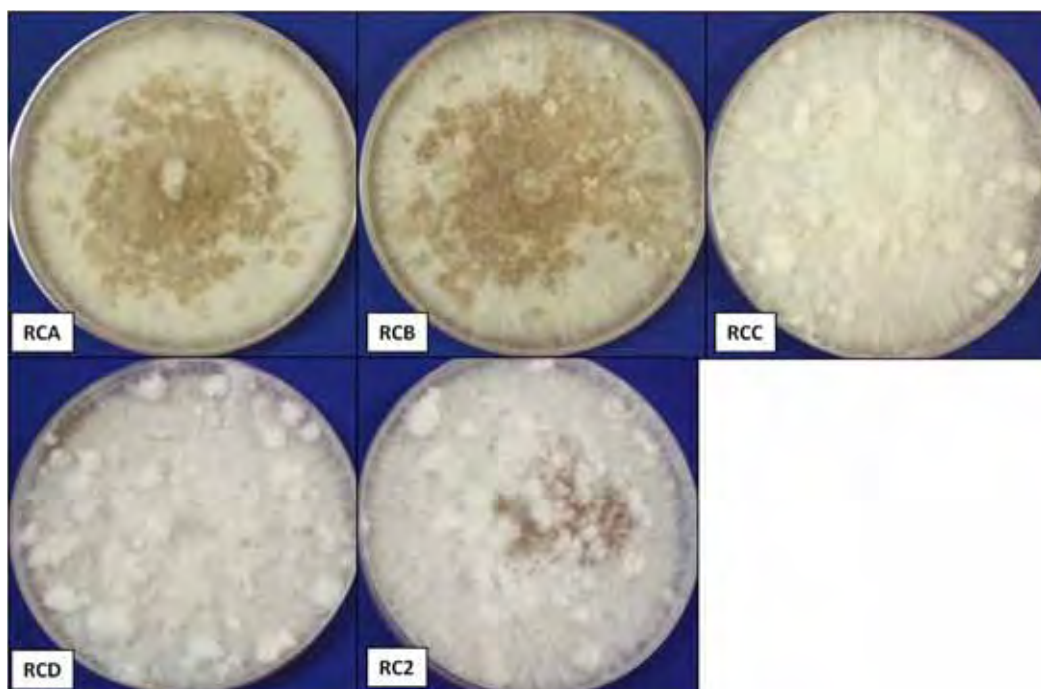


Figura 10. Características morfológicas das colônias de *Rhizoctonia binucleata* associada ao chá.

O isolado padrão GA-A apresentou micélio de coloração branca, com um crescimento micelial fino e rasteiro, com ausência de tufo de micélio (Figura 11). O isolado padrão GA-Bo apresentou micélio de coloração branca, com um crescimento micelial fino, rasteiro e com formação de halos concêntricos, com ausência de tufo de micélio (Figura 11). O isolado padrão GA-P apresentou micélio de coloração creme, com um crescimento micelial fino, rugoso e rasteiro, com ausência de tufo de micélio (Figura 11). O isolado padrão GA-Q apresentou micélio de coloração branca, com um crescimento micelial fino, pouco rugoso e rasteiro, com presença de tufo de micélio de cor branca (Figura 11).

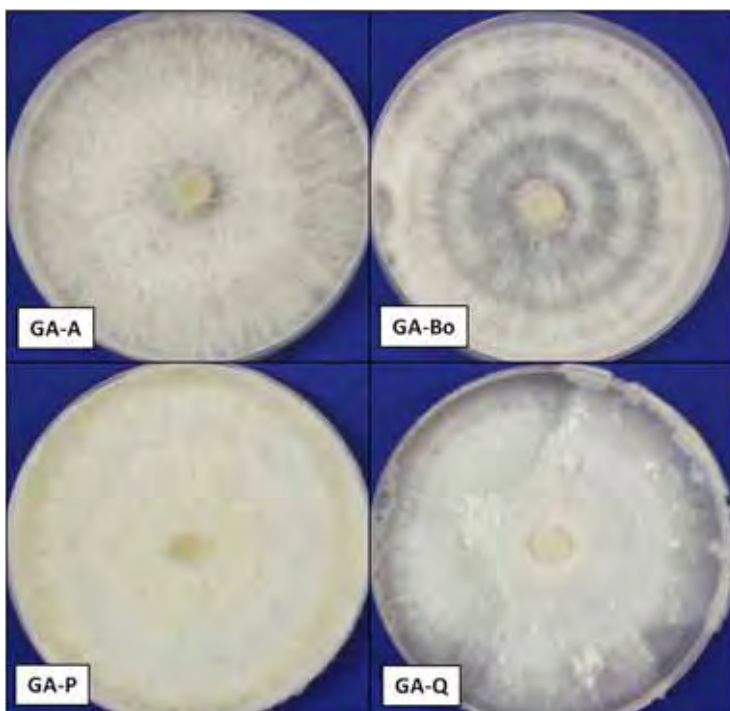


Figura 11. Características morfológicas das colônias de *Rhizoctonia binucleata* padrões de GAs.

6.4.2. Temperatura ótima de crescimento

No estudo de curvas de crescimento micelial, observou-se que todos os isolados de *Rhizoctonia binucleata* do chá apresentaram curvas de crescimento semelhantes, com temperatura ótima de 25°C, variando em média de 3,31 a 3,86 cm por dia (Tabela 6 e Figura 12).

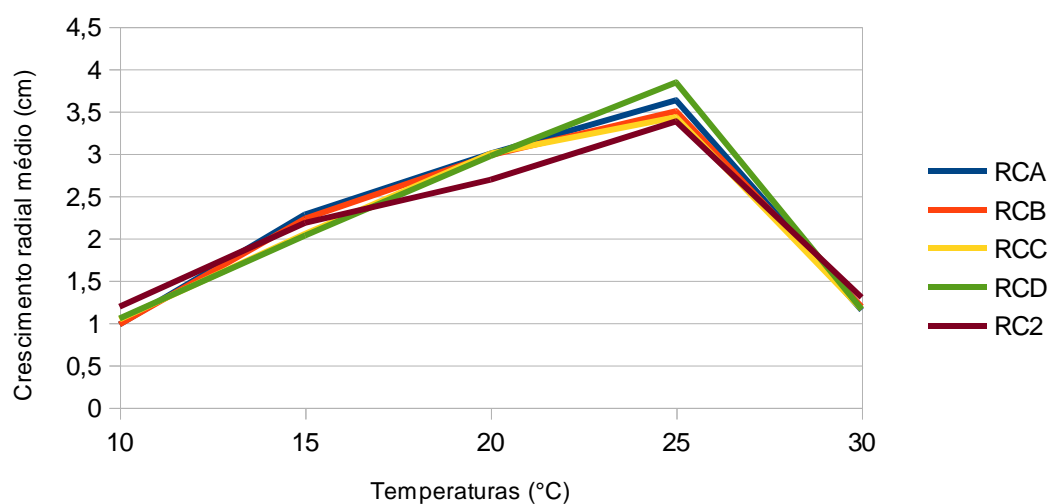
A média de crescimento micelial dos isolados do chá em comparação os isolados padrões dos GA, apresentou diferenças significativas nas temperaturas de 10, 15 e 30°C (Tabela 6). Nas temperaturas de 20 e 25°C, os isolados padrões GA-Bo e GA-P não apresentou diferença significativa em comparação aos isolados do chá (Tabela 6).

No estudo de curvas de crescimento micelial dos isolados padrões dos GA, a temperatura ótima de crescimento dos isolados também foi de 25°C (Figura 13).

Tabela 6. Crescimento micelial em diferentes temperaturas de isolados de *Rhizoctonia binucleada*.

Isolados	*Média de crescimento micelial (cm/dia)					Temperatura
	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	ótima de crescimento
RCA	0,98a	2,28bc	3,01bc	3,64bc	1,15a	25°C
RCB	0,99a	2,24b	3,03bc	3,53bc	1,18a	25°C
RCC	1,05a	2,06a	2,96bc	3,42bc	1,16a	25°C
RCD	1,05a	2,05a	2,97bc	3,86bcd	1,16a	25°C
RC2	1,18b	2,19ab	2,69b	3,31ab	1,31a	25°C
Padrões						
GA-A	1,72d	2,63d	3,94d	5,17e	4,39e	25°C
GA-BO	1,72d	2,80d	3,08bc	4,60de	3,77d	25°C
GA-P	1,60c	2,75d	3,24c	4,23cd	3,10c	25°C
GA-Q	1,70cd	2,43c	1,50a	2,44a	1,85b	25°C
CV (%)	3,38	3,13	6,48	9,61	6,91	
DMS	0,10	0,17	0,45	0,86	0,34	

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente a nível de 5% pelo teste de tukey.

**Figura 12. Curva de crescimento micelial de *Rhizoctonia binucleada* do chá em função da temperatura.**

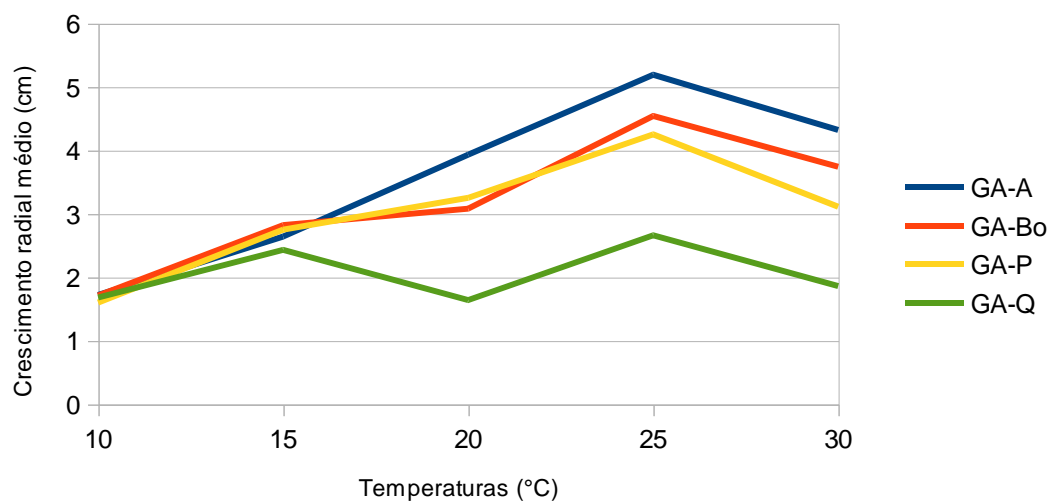


Figura 13. Curva de crescimento micelial de isolados padrões de *Rhizoctonia binucleada* GAs.

Na temperatura de 30°C, o crescimento micelial dos isolados do chá, diminui significativamente em relação a temperatura de 25°C, variando em média de 1,15 a 1,31 cm por dia (Tabela 6 e Figura 12), e foi observado a formação de um halo marrom escuro, com diferenças no tamanho e intensidade nos isolados RCA, RCB em comparação ao isolados RCC, RCD e RC2 (Figura 14).

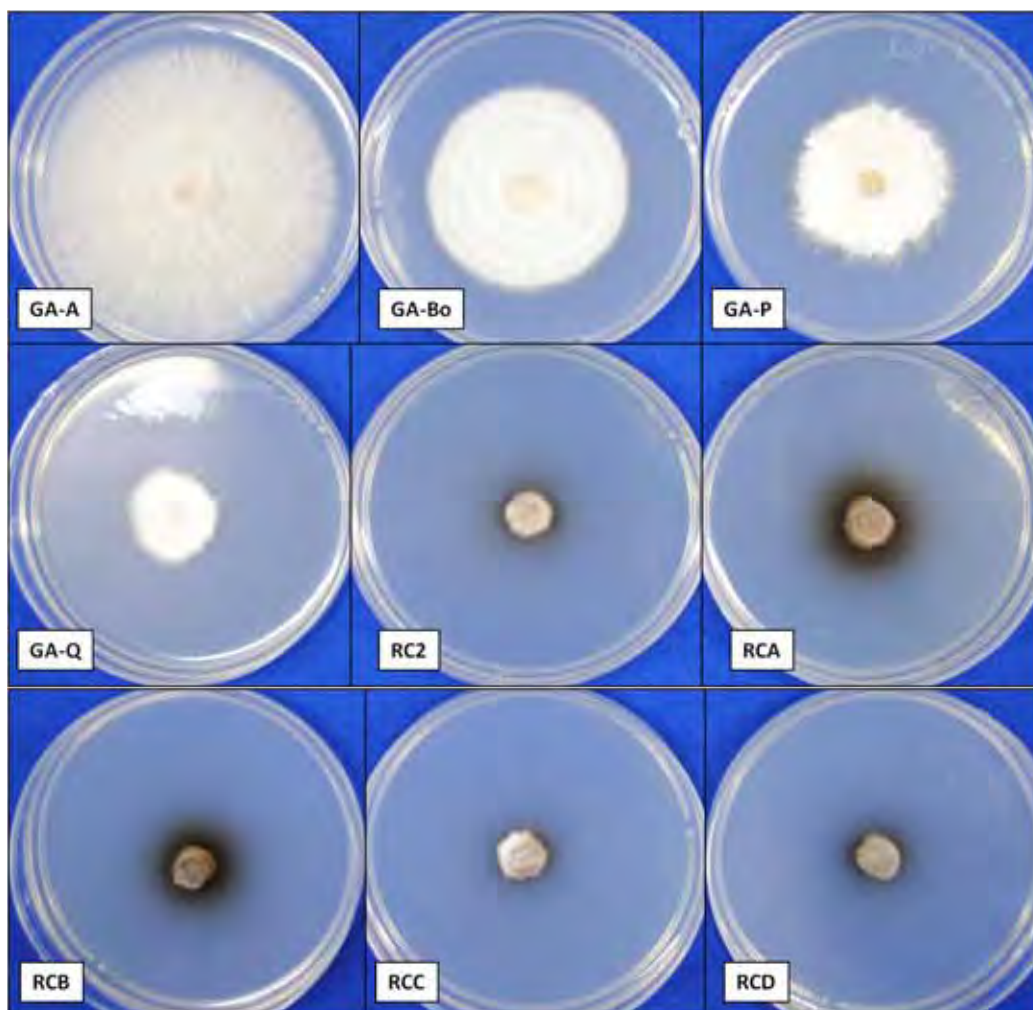


Figura 14. Características das colônias de *Rhizoctonia binucleata* na temperatura de 30°C.

A formação do halo e a diferença significativa no crescimento micelial a 30°C permite reforçar as diferenças culturais e genéticas dos isolados de *Rhizoctonia binucleata* do chá em comparação aos isolados padrões de GAs.

A exsudação de substâncias por fungos em meio de cultura específicos é frequentemente estudada na produção de enzimas extracelulares como celulase, lipase, proteinase, pectinase e outros, estabelecendo relações com os mecanismos de patogenicidade e diferenças genéticas entre espécies e isolados (GRIFFIN, 1994).

Estudos realizados por Aliferis e Jabaji (2010) com escleródios de *Rhizoctonia solani*, demonstrou a exsudação de gotas de cor marrom com propriedades bioativas possuindo múltiplas funções na fisiologia de fungos. Durante sua fase de dormência,

os escleródios são expostos a predadores e parasitas que os utilizam como fonte de alimento, e a presença de metabolitos bioativos contribui para a sua atividade antifúngica e fitotóxica (ALIFERIS; JABAJI, 2010). Contudo, a exsudação de substâncias pelos isolados de *Ceratobasidium spp.* do chá e outras espécies do Gênero *Rhizoctonia* são desconhecidas (SNEH et al., 1991; ALIFERIS; JABAJI, 2010).

6.5. Teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade foi realizado durante entres os meses de abril e junho de 2012. Desde a inoculação até o final da ultima avaliação, compreendeu um período de 37 dias, e a média diária da temperatura dentro da estufa foi de 24,8°C, com mínima de 19°C e máxima de 30°C. Durante esse período foi possível observar o início da colonização dos isolados, o início dos sintomas da queima das folhas e a formação do fio (cordão micelial), sintoma característico da doença queima do fio.

Ocorreu aos 14 dias após a inoculação (DAI) o início da colonização nas folhas de chá. Esta etapa caracterizou-se pela formação de um abundante crescimento micelial no ponto de inoculação (axilas do ramo), avançando como uma fina película micelial na face abaxial da primeira folha infectada (Figura 15).



Figura 15. Características da colonização de folhas de chá por *Rhizoctonia binucleada*.

Após quatro dias pode observar os primeiros sintomas de queima foliar (Figura 16).



Figura 16. Início dos sintomas de queima foliar. 18 DAI.

A formação do fio ocorreu nove dias após os primeiros sintomas, ocorrendo aos 27 DAI (Figura 17). A partir do ponto de infecção, o crescimento do cordão micelial pode ser tanto ascendente quanto descendente em direção as folhas.



Figura 17. Cordão micelial do fungo, característico da doença queima do fio. 27 dias após a inoculação.

Após 10 dias da formação do fio, finalizou-se o teste de patogenicidade, completando-se o postulado de Kock (Figura 18).

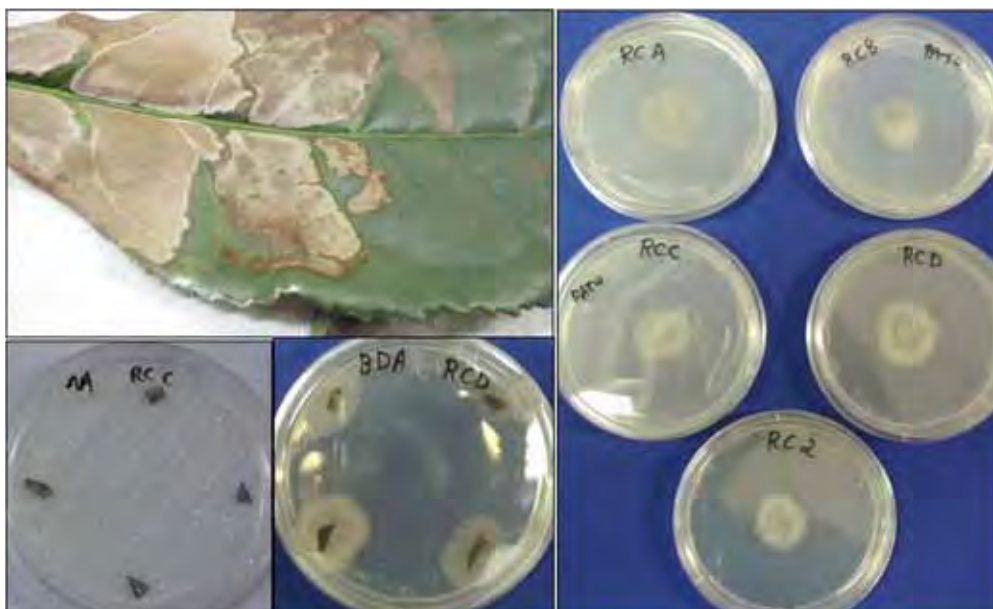


Figura 18. Reisolamento dos isolados do chá

A avaliação da patogenicidade dos isolados foi realizada após o aparecimento dos primeiros sintomas de queima foliar (18DAI), compreendendo cinco avaliações durante o período do experimento.

Os resultados do NMFD e NPD não foram significativos a nível de 5% pelo teste de Tukey. Acredita-se que o teste de patogenicidade não apresentou diferença significativa entre os isolados, devido a diferenças morfológicas nas plantas utilizadas, sendo plantas não clones, oriundas de estaquias de variedades diferentes não identificadas.

Porém, avaliando o comportamento dos isolados, observaram-se diferenças nos níveis de infecção e patogenicidade destes (Figura 19 e 20).



Figura 19. Diferentes níveis de infecção de *Rhizoctonia binucleata* do chá comparados a testemunha sem a doença.



Figura 20. Diferença entre isolados quanto a patogenicidade de *Rhizoctonia binucleata* no chá.

Por exemplo, os isolados RCB e RCC apresentou maior NMFD/planta, causando queima foliar em média de duas folhas/planta em relação aos demais isolados, que variaram de 1 a 1,5 NMFD (Figura 21).

Nos resultados do NPD, todos os isolados causaram doenças em pelo menos uma planta de cada tratamento. Porém os isolados RCD e RC2 causaram doenças em todas as plantas do tratamento e em um menor período de tempo, em relação aos outros isolados (Figura 22).

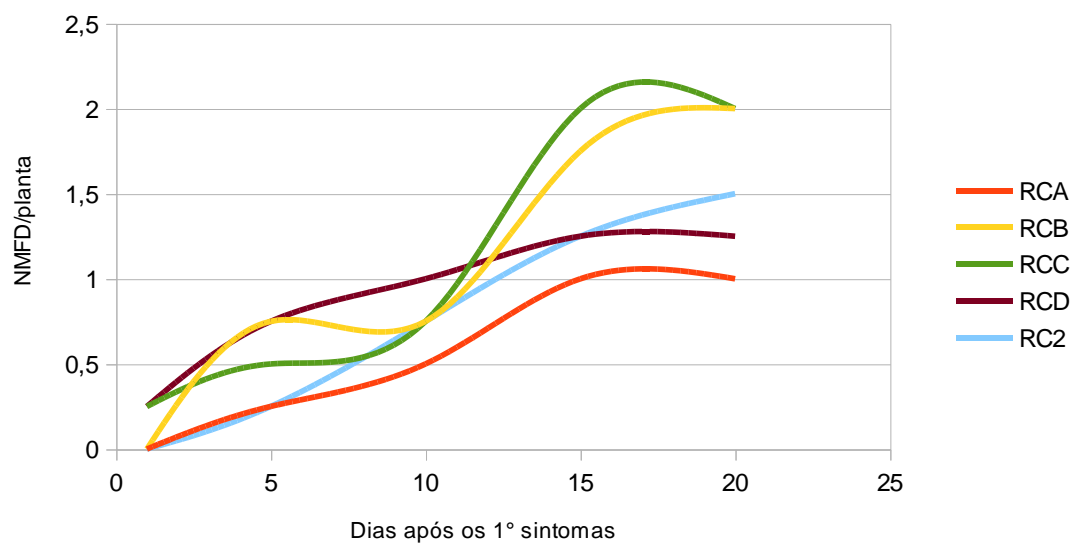


Figura 21. Número médio de folhas doentes (NMFD) causadas por *Rhizoctonia binucleada* no chá.

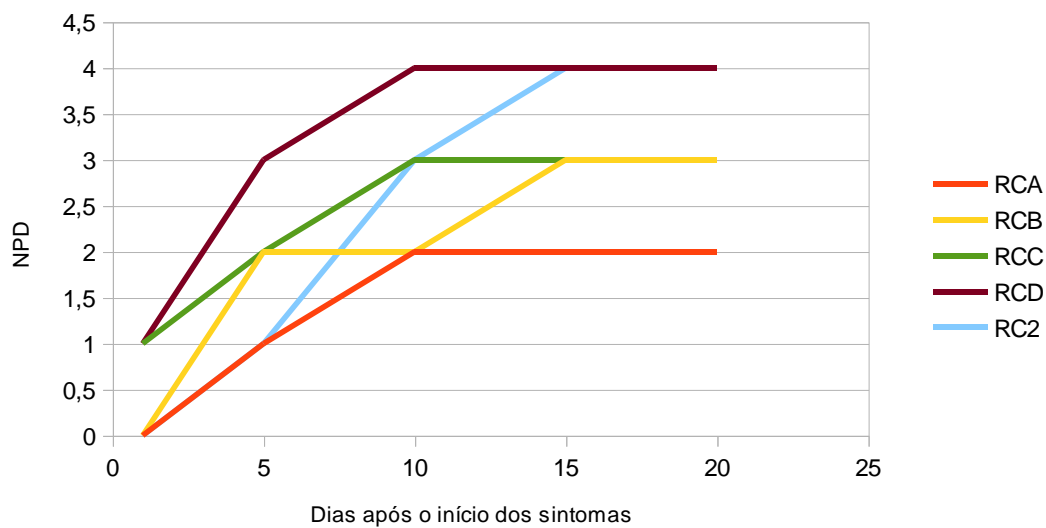


Figura 22. Número de plantas doentes (NPD) causadas por *Rhizoctonia binucleada* no chá.

É interessante notar que a média e a variação de temperatura durante o experimento foi fator importante, demonstrando que a temperatura favorável para o desenvolvimento da doença é em torno de 25°C, correspondendo a temperatura ótima de crescimento micelial de *Rhizoctonia binucleada* do chá.

No entanto, as informações da literatura consideram que temperaturas elevadas acima de 30°C são mais propícias para a doença (FURTADO, 2005), o que contradiz com os resultados obtidos de crescimento micelial dos isolados do chá na temperatura de 30°C, no qual diminuiu significativamente.

Essas observações são muito importantes, pois segundo informações dos teicultores no município de Registro-SP no Vale do Ribeira, a doença é mais problemática nos meses de dezembro até final de janeiro, onde nesse período há ocorrência de chuvas intermitentes e temperaturas médias variando de 25 a 28°C, de acordo com informações do CEPAGRI (Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura, 2012).

6.6. Caracterização molecular

As espécies *C. albasitensis* e *C. raminicola* foram definidas como *out-groups* para enraizamento da árvore filogenética.

Os resultados da análise molecular da região ITS 5.8 demonstraram uma relação filogenética diferente dos isolados RCA, RCB, RCC, RCD e RC2 de *Rhizoctonia binucleada* (*Ceratobasidium spp.*) do chá, constituindo um ramo independente em relação às demais espécies analisadas, incluindo *C. cornigerum*, *C. anceps*, *C. angustiporum*, *C. papillatum*, *C. cereale* e *C. bicornis* (Figura 23).

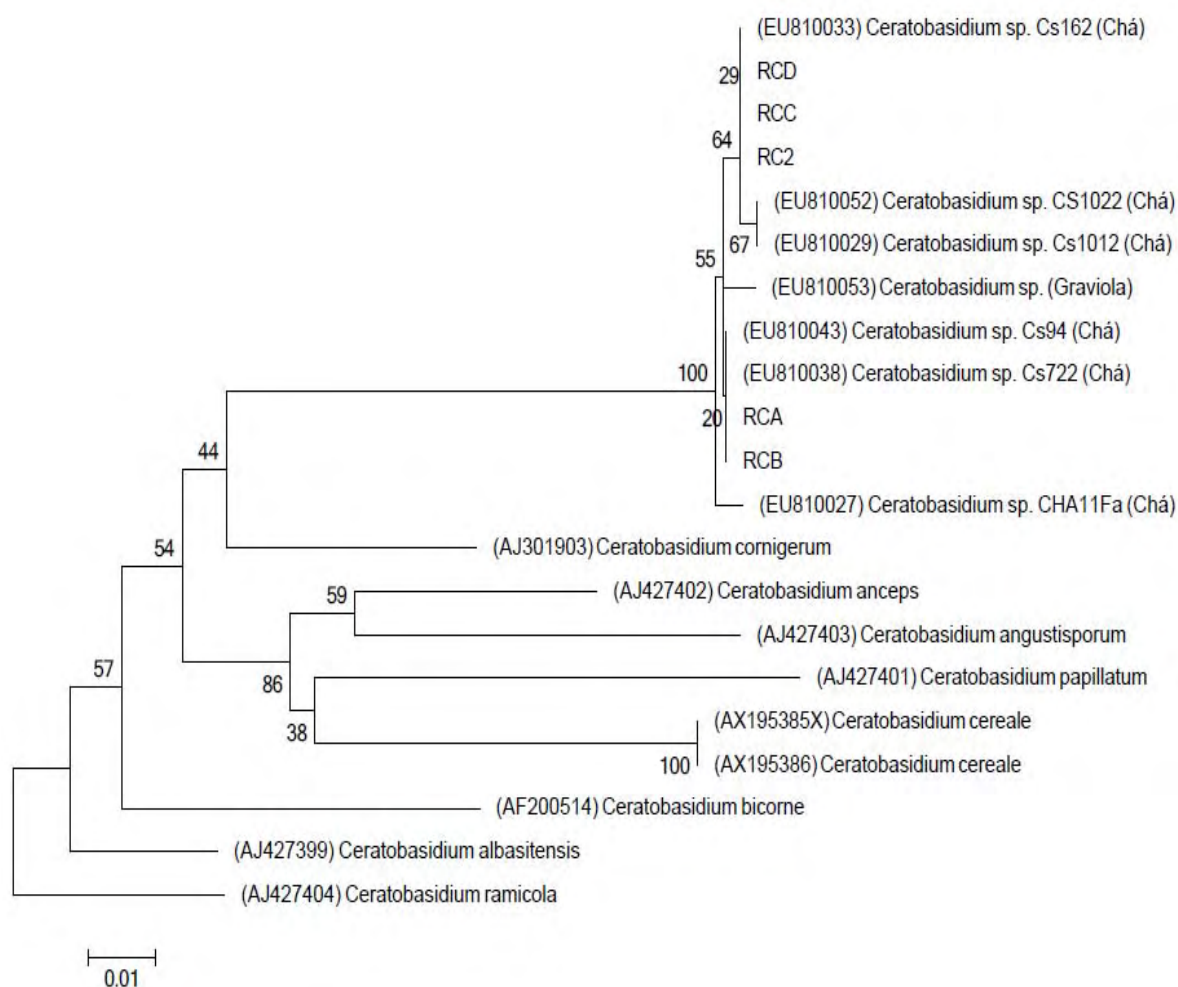


Figura 23. Árvore filogenética dos isolados de *Rhizoctonia binucleada* do chá (RCA, RCB, RCC, RCD e RC2).

Esses resultados corroboram com a análise de Ceresini et al (2012), no quais utilizou-se as sequências das regiões espaçadoras internas transcritas, incluindo a região de codificação de rDNA 5.8S (ITS-5.8S rDNA), para determinar a colocação filogenética da população de isolados de *Ceratobasidium* spp. de chá e caqui, em relação às demais espécies de *Ceratobasidium* spp. As análises filogenéticas realizadas por Ceresini et al (2012) mostraram que isolados do chá e do caqui são distintos entre si e de todas as outras espécies de *Ceratobasidium* spp. que causa a doença queima do fio branco, e que podem representar duas espécies novas dentro de *Ceratobasidium* spp.

Os isolados do chá deste estudo se agruparam com outros isolados de *Ceratobasidium spp.* do chá depositados no GenBank por Ceresini et al (2012), também coletados no Município de Registro - SP. (Figura 23).

Os isolados RCC, RCD e RC2 se agruparam com o isolado Cs.162 e os isolados RCA e RCB se agruparam com os isolados Cs722 e Cs94, juntamente com o isolado EU810053 de graviola, que possui seu local de origem o Município de Manaus-AM (CERESISNI et al., 2012).

Observou-se também a diferença genética entre os isolados RCA e RCB com os isolados RCC, RCD e RC2 (Figura 23), separando-os em dois clados diferentes. Ceresini et al. (2012) também analisou a variação intraespecífica para as duas população de *Ceratobasidium spp.* do chá e do caqui, demonstrando alta variabilidade genética na região do rDNA 5.8S.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização citomorfológica, cultural, patogênica e molecular dos isolados de *Rhizoctonia* binucleada associada a doença queima do fio no chá, permitiu levantar informações importantes sobre a biologia do fungo, bem como reforçar as evidências de que este fitopatógeno pode ser uma nova espécie diferente das demais espécies de *Rhizoctonia* binucleada (*Ceratobasidium* spp) conhecidas até o momento.

A tentativa da formação do teleomorfo indicou há possibilidade de formação de estruturas sexuais primárias (himênio e basídio) de *Ceratobasidium* spp. do chá 'in vitro' e acredita-se que as informações geradas neste estudo, desperte interesse na realização de novos trabalhos de indução do teleomorfo, na tentativa de se conhecer a forma basidial deste fungo, visto que as características citomorfológicas da fase teleomórfica são necessárias para que se confirme as evidências de uma nova espécie de *Rhizoctonia* binucleada (*Ceratobasidium* sp) associada a queima do fio no chá.

O grupamento de anastomose mostrou que os isolados de *Rhizoctonia* binucleada do chá, não ocorrem anastomose de hifas com os isolados padrões dos GAs

testados (Figura 7), ou seja, não possuem interação biológica, são diferentes. Estes GAs correspondem ao teleomorfo *C. cornigerum* (SNEH et al., 1991; GARCIA et al., 2006), a espécie mais próxima dos isolados do chá de acordo com as análises filogenéticas do presente trabalho e com as análises de Ceresini et al (2012).

Os isolados do chá e os isolados dos GAs também se mostraram diferentes nas características culturais, tanto na morfologia da colônia (Tabela 5), quanto na curva de crescimento micelial em função da temperatura (Tabela 6), sendo que neste último, na temperatura de 30°C os isolados de *Rhizoctonia* binucleada do chá, apresentaram a formação de um halo de cor marrom no meio de cultura, indicando também diferenças nas características fisiológicas deste fungo em relação aos isolados padrões dos GAs, no qual não apresentou a formação de halo no meio de cultura (Figura 14).

O teste de compatibilidade somática vegetativa entre os isolados de *Rhizoctonia* binucleada do chá demonstrou que estes formaram três GCS, tanto na reação microscópica vegetativa quanto na reação macroscópica vegetativa, representados pelos GCS-1: RCA e RCB, GCS-2: RCC e RCD e GCS: RC2 (Tabela 4). As características culturais da morfologia das colônias também formaram três GMs: GM-1: RCA e RCB, GM-2: RCC e RCD e GM-3: RC2, representado pelos mesmos isolados dos GCS, o que reforça as diferenças genéticas entre os mesmos (Tabela 5). Pode observar também diferença no tamanho e intensidade dos halos de coloração marrom formados pelos isolados do chá na temperatura de 30°C (Figura 14). Entretanto, a análise molecular separou os isolados do chá em apenas dois grupos, no quais os isolados RCC, RCD e RC2 se agruparam no mesmo ramo (Figura 23).

Acredita-se que a análise de outras regiões dos genes do DNA do fungo, como o fator de elongação 1-alpha ($EF-1\alpha$) e RNA polimerase 2 (RPB2) poderiam melhorar a diferenciação genética entre esses isolados, permitindo uma melhor separação dos mesmos (NAKATANI, 2006).

Contudo, as análises em conjunto realizadas no presente estudo não deixa dúvidas da existência de variabilidade genética entre os isolados, o que corrobora com os resultados de Ceresini et al (2012), que demonstrou alta variabilidade dentro da população de isolados de *Ceratobasidium* do chá através da região ITS 5.8 rDNA.

A reação microscópica vegetativa e a reação macroscópica vegetativa mostraram similaridades entre as interações microscópicas e macroscópicas de *Rhizoctonia*

binucleada do chá, onde reações do tipo C3 de compatibilidade somática microscópica correlacionaram com reações de compatibilidade somática macroscópica, onde não se observou barreiras no contato das hifas no meio de cultura, se misturando. Outra correlação importante foi à relação das reações microscópicas de incompatibilidade do tipo C1, com as reações macroscópicas de incompatibilidade, apresentado uma barreira de ‘tufos’ de hifa em toda linha de contato dos isolados no meio de cultura. Reações do tipo C1, até o presente trabalho, não tinham sido relacionadas com as reações macroscópicas de incompatibilidade.

A reação do tipo C1 também desperta curiosidades na determinação de novos GAs ou GIAs dentro da população de isolados de *Rhizoctonia* binucleada associada a queima do fio no chá, tendo em vista que esse tipo de interação indicam que estes isolados podem pertencer ao mesmo GA ou diferente (MACNISH et al., 1993).

O teste de patogenicidade permitiu confirmar a etiologia dos isolados do presente trabalho como os causadores da queima do fio do chá, bem como caracterizar as principais etapas do desenvolvimento da doença, como a queima das folhas e a formação do fio, sintoma característico da doença. As condições do ambiente, como a variação de temperatura entre 19 a 30°C e umidade do ar também foram importantes para o sucesso do teste.

Os resultados apresentados no presente trabalho permitiu gerar informações importantes sobre a biologia do fungo *Rhizoctonia* binucleada associada a doença queima do fio do chá (*Camellia sinensis* L.) no Vale do Ribeira-SP, reforçando as evidências que este fitopatógeno seja uma nova espécie de *Ceratobasidium* spp.

8. CONCLUSÕES

- Todos os isolados do chá apresentaram dois núcleos por célula, sendo classificados como *Rhizoctonia* binucleada.
- Houve a formação de himênio e metabasídio na tentativa de formação da fase teleomórfica de *Rhizoctonia* binucleada do chá.
- Os isolados de *Rhizoctonia* binucleada do chá não pertencem aos GA-A, GA-Bo, GA-P e GA-Q de *Rhizoctonia* binucleada.
- Existe incompatibilidade somática vegetativa entre os isolados de *Rhizoctonia* binucleada do chá, demonstrando variabilidade genética dos mesmos.
- A temperatura ótima de crescimento micelial de *Rhizoctonia* binucleada e a média de temperatura favorável para o desenvolvimento da doença queima do fio no chá foi em torno de 25°C.
- Os isolados de *Rhizoctonia* binucleada do chá são geneticamente diferentes em relação às demais espécies de *Ceratobasidium* spp. conhecidas até o momento.

9. REFERÊNCIAS

ADAMS, G. C. Jr.; BUTLER, E. E. Influence of nutrition on the formation of basidia and basidiospores in *Thanatephorus cucumeris*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, p. 147-151, 1983.

ADAMS, G. C. *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*), a species complex of wide host range. **Advances in Plant Pathology**, London, v. 6, p. 535-552, 1988.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Eds.). **Métodos em Fitopatologia**. 1 ed. Viçosa: UFV, 2007. p. 382.

ALIFERIS, K. A.; JABAJI, S. Metabolite Composition and Bioactivity of *Rhizoctonia solani* Sclerotial Exudates. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 7604–7615, 2010.

ANDERSON, N.A. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. **Annual Review Phytopathology**, Canada, v. 20, p. 329-347, 1982.

BASSETO, M. A. **Mancha areolada da seringueira (*Hevea brasiliensis*) na Amazônia: evolução do patógeno (*Thanatephorus cucumeris* / *Rhizoctonia solani* grupo de anastomose AG 2- 2 Hb) num patossistema tropical**. 2006. 56f. Dissertação. (Mestrado em Sistema de produção) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP, Ilha Solteira, 2006.

BASSETO, M. A.; VALÉRIO FILHO, W. V.; COSTA SOUZA, E.; CERESINI, P. C. O papel de *Rhizoctonia* spp. binucleadas na indução de resistência a mela da soja. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, p. 183-189, 2008.

BENCHIMOL, R. L.; BASTOS, C. N. Queima-do-Fio em Três Espécies de Plantas Ornamentais. **Embrapa**, Bélem, Comunicado técnico, p. 1-3, 2004.

BENCHIMOL, R. L.; POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R.; ALBUQUERQUE, F. C. White-thread blight: five new hosts in the state of Pará, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 778, 2001.

BURPEE, L. L.; SANDERS, P. L.; COLE, H. Jr.; SHERWOOD, R. T. Anastomosis groups among isolates of *Ceratobasidium cornigerum* and related fungi. **Mycologia**, Lawrence, v. 72, p. 689-701, 1980.

BURT, E. A. Corticiums causing *Pellicularia Koleroga* disease of the coffee plant, *Hypochnose* of pomaceous fruits and *Rhizoctonia* disease. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 5, p. 119-132, 1918.

CAMPOS, A. P. S.; CERESINI, P. C. Incompatibilidade somática em *Rhizoctonia solani* AG-1 IA da soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 3, p. 247-254, 2006.

CARDOSO, J. E.; ECHANDI, E. Nature of protection of bean seedlings from *Rhizoctonia* root rot by a binucleate *Rhizoctonia*-like fungus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, p. 1548-1551, 1987.

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, 1992. p.157-165.

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.

CEPAGRI - Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura. Disponível em: http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_480.html. Acesso em: Dez. 2012.

CERESINI, P. C.; COSTA-SOUZA, E.; ZALA, M.; FURTADO, E. L.; SOUZA, N. L. Evidence that the *Ceratobasidium*-like white-thread blight and black rot fungal pathogens from persimmon and tea crops in the Brazilian Atlantic Forest agroecosystem are two distinct phylopecies. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 2, p. 480-497, 2012.

CERESINI, P. C.; SHEW, H. D.; VILGALYS, R.; CUBETA, M. A. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco in North Carolina. **Mycologia**, Lawrence, v.94, n.3, p.448-460, 2002.

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 amendoimzeiro (*Arachis hypogaea*) no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 22, p. 145-55, 1996.

COOKE, M. C. **Some Indian fungi**. Grevillea, v. 4, p. 116-118, 1875/1876.

CUBETA, M. A.; VILGALYS, R. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, p. 480-484, 1997.

FAWCETT, G. L. **Coffe diseases**. Porto Rico Agricultural Exp. Sta., Annual Report, v. 35, 1911.

FERRARA, L.; MONTESANO, D.; SENATORE, A. The distribution of minerals and flavonoids in the tea plant (*Camellia sinensis*). **II Farmaco**, Pavia, v. 56, n. 5-7, p. 397-401, 2001.

FLENTJE, N. T.; STRETTON, H. M.; HAWN, E. J. Nuclear distribution and behaviour throughout the life cycles of *Thanatephorus*, *Waitea*, and *Ceratobasidium* species. **Australian Journal of Biological Sciences**, Collingwood, v. 16, p. 450- 46, 1963.

FURTADO, E. L. Doenças do chá preto. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (ed.) **Manual de fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 663.

FURTADO, E. L. Doenças do chá preto. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (ed.) **Manual de fitopatologia**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 663.

GARCÍA, G. V.; ONCO, M. A. P.; SUSAN, V. R. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 4, n. 1, p. 55-79, 2006.

GONÇALVES, J. R. C. Controle da doença que ataca as folhas da pimenteira denominada “queima do fio” (*Pellicularia koleroga* = *Corticium stevensii*). **Embrapa**, Belém, IPEAN-Comunicado técnico, p. 4, 1963.

GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Eds.). **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. p. 382.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2ª ed. New York. John Wiley & Sons, Inc. 1994.

GULATI, A.; GULATI, A.; RAVINDRANATH, S. D.; GUPTA, A. K. Variation in chemical composition and quality of tea (*Camellia sinensis*) with increasing blister blight (*Exobasidium vexans*) severity. **Mycological Research**, Cambridge, v. 103, n. 11, p. 1380-1384, 1999.

GUOHUA, Z.; LIXIN, Z.; TIANXIANG, R.; LIANSHENG, Z. JINQIU, G. Geochemical characteristics affecting the cultivation and quality of Longjing Tea. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 55, n. 1-3, p. 183-191, 1995.

HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. M. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**. CAB International, Wallingford, 8 ed., 1995.

HIETALA, A. M.; KORHONEN, K.; SEN, R. An unknown mechanism promotes somatic incompatibility in *Ceratobasidium bicorne*. **Mycologia**, Lawrence, v. 95, p. 239-250, 2003.

HONEYCUTT, E. W.; BENSON, D. M. Formulation of Binucleate *Rhizoctonia* spp. and Biocontrol of *Rhizoctonia solani* on Impatiens. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85 n. 12, 2001.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H. N. (ed), **Mammalian Protein Metabolism**, Academic Press, New York, pp. 21-132, 1969.

KHAN, N.; MUKHTAR, H. Tea polyphenols for health promotion. **Life Sciences**, Oxford, v. 81, n. 7, p. 519-533, 2007.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.663.

KONISHI, S. MIYAMOTOA, S.; TAKI, T. Stimulatory effects of aluminum on tea plants growth under low and high phosphorus supply. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.31, p. 361-368, 1985.

LIMA, J. D.; MAZZAFERA, P.; MORAES, W. S.; SILVA, R. B. Chá: aspectos relacionados à qualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, p. 1258-1266, 2009.

LOURD, M; ALVES, M. L. B. Lista de hospedeiros e etiologia da queima do fio das plantas frutíferas da região Amazônica. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v.12, p. 88-89, 1987.

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**, St. Paul, v. 83, p. 922–927, 1993.

MACNISH, G. C.; CARLING, D. E.; BRAINARD, K. A. Relationship of microscopic and macroscopic vegetative reactions in *Rhizoctonia solani* and the occurrence of vegetatively compatible populations (VCPs) in AG-8. **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, p. 61-68, 1997.

MAYDEN, R. L. A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. In: CLARIDGE, M. F.; DAWAH, H. A.; WILSON, M. R. (Eds.). **Species: The Units of Biodiversity**, CHAPMAN & HALL, London, p.381–424, 1997.

- MURRAY, D. I. L. A modified procedure for fruiting *Rhizoctonia solani* on agar. **Transactions British Mycological Society**, London, v. 79, p. 129-135, 1982.
- MURRAY, D. I. L.; BURPEE, L. L. *Ceratobasidium cereale* sp. nov., the teleomorph of *Rhizoctonia cereale*. **Transactions British Mycological Society**, London, v. 82, p. 170-172, 1984.
- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Standford, v.8,n.19, p.4321-4325, 1980.
- NAKATANI, A. K. **Diversidade genética de *Rhizoctonia* spp. e análise de seqüências multilocos**. 2006. 110f. Tese (Doutorado em Concentração em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.
- NOACK, F. **Boletim do Instituto Agrônômico do Estado de São Paulo**. Campinas, v. 9, p. 80, 1898.
- OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Annual Review of Phytopathology**, Canada, v. 25, p. 125–143, 1987.
- OGOSHI, A.; ONIKI, M.; SAKAI, R.; UI, T. Anastomosis grouping among isolates of binucleate *Rhizoctonia*. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, Tokyo, v. 20, p. 33-39, 1979.
- OLSON, H. A.; D. BENSON, M. Induced systemic resistance and the role of *binucleate Rhizoctonia* and *Trichoderma hamatum* 382 in biocontrol of *Botrytis* blight in geranium. **Biological Control**, Elsevier, v. 42, p. 233–241, 2007.
- OSAWA, J.L. **O chá do município de Registro e seus reflexos na expansão sócio econômica da região**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1990. 75p.
- PEREIRA, R. A.; TAKADA, H. M.; RIBEIRO, I. J. A.; BUENO, S. C. S., YANAGISAWA, S. S.; FREIRE, I. L. C.; SANTOS, M. C.; TIMÓTEO, W. S. Registro da queima dos fios (*Ceratobasidium* spp..) em caqui (*Diospyros kaki*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, Suplemento, p. 90, 2003.

PEREZ, L. H.; FREITAS, B. B. Chá preto: estabilidade no mercado. São Paulo. IEA, 2003. Disponível em:< <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=791>>. Acesso em dez. 2012.

PÉREZ, L. Chá, mate e especiarias: exportações brasileiras 1996 a 2006. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 37, n. 7, p. 40-49, 2007.

ROBERTS, P. ***Rhizoctonia-forming fungi: a taxonomic guide***. Royal Botanical Gardens, Kew. 1999. p. 239.

ROGERS, D. P. **Notes on lower Basidiomycetes**. University Of Iowa Studies In Natural History, Iowa City, v. 17, n. 1, p. 1-43, 1935.

ROSSETI, V.; ALVES, M. L. B.; CLEMENT, C. Ocorrência de *Pellicularia koleroga* em pomares cítricos na Amazonas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, p. 526, 1982.

RUAN, J.; GERENDÁS, J.; HÄRDTER, R.; SATTELMACHER, B. Effect of root zone pH and form and concentration of nitrogen on accumulation of quality-related components in green tea. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 87, n. 8, p. 1505-1516, 2007.

SANFUENTES, E.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; MAFIA, R. G. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp. e identificação de novos grupos de anastomose em jardim clonal de eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 229-236, 2007.

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

SOUZA, E. C.; BASSETO, M. A.; BOLIANI, A. C.; TAKADA, H. M.; CERESINI, P.C. Patogenicidade cruzada de *Ceratobasidium* spp. do caquizeiro (*Diospyros kaki*) e do chá (*Camellia sinensis*) e reação de cultivares de caqui ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 1, p. 09-14, 2009.

STEVENS, F. L. Two interesting apple fungi. **Science**, v. 26, p. 724-725, 1907.

STRETTON, H. M.; MCKENZIE, A. R.; BAKER, K. F.; FLENTJE, N. T. Formation of the basidial stage of some isolates of *Rhizoctonia*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 5, n. 4, p. 1093-1095, 1964.

SYMINIS, T.; BANDY, B. P.; TAVANTZIS, S. M. Vegetative incompatibility in *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, St. Paul, Abstracts, v. 77, p. 1669–1670, 1987.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D. M.; HIBBETT, D. S.; FISHER, M. C. Phylogenetic species recognition and species concepts in Fungi. **Fungal Genetics and Biology**, New York, v. 31, p. 21-32, 2000.

UCHIDA, J. Y.; ARAGAKI, M.; YAHATA, P. S. Basidiospore formation by *Ceratobasidium* spp. on agar. **Mycologia**, Lawrence, v. 78, p. 587-592, 1986.

VENKATESAN, S.; GANAPATHY, M. N. K. Impact of nitrogen and potassium fertilizer application on quality of CTC teas. **Food Chemistry**, London, v. 84, n. 3, p. 325-328, 2004.

VILGALYS, R.; CUBETA, M. A. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 32, p. 135-155, 1994.

VON HONER, F. **Fragments Zur Mykologie**. X. Sitzungber. K. Akad. Wiss. Wien, Math.-Natur. Wiss. Klass. 119: 395, 1910.

WARCUP, J. H.; TALBOT, P. H. B. Perfect states of some *Rhizoctonias*. **Transactions British Mycological Society**, London, v. 49, p. 427-435, 1966.

WHITNEY, H. S. Sporulation of *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) in the light and in the dark. **Phytopathology**, St. Paul, v. 54, p. 874-875, 1964.

WHITNEY, H. S.; PARMETER, J. R. Synthesis of heterokaryons in *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Canadian Journal of Botany**, Canada, v. 41, p. 879–886, 1963.

WOLF, F.; BACH, W. J. The thread blight disease caused by *Corticium koleroga* (Cooke) Hohn., on citrus and pomaceus plants. **Phytopathology**, St. Paul, v. 17, p. 689-707, 1927.