

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

**A COMPLEXA ETIOLOGIA DA MANCHA AREOLADA DE
Thanatephorus sp. E/OU *Ceratobasidium* sp. EM ESPÉCIES
CULTIVADAS OU NATIVAS DA AMAZÔNIA**

Ana Paula da Silva de Campos

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini

Co-orientador: Prof. Dr. Alcebíades Ribeiro Campos

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia–Unesp, Câmpus de Ilha Solteira, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de concentração em Sistemas de Produção

Ilha Solteira - SP
Julho - 2006

A Deus,
Agradeço

Aos meus queridos,

Pais, **Ilton e Ivonete**, pelo amor e dedicação,

Fabiana e Alessandra, pela amizade e incentivo,

Ruberlei, pelo amor e respeito que me são concedidos,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini, pela orientação, confiança, incentivo e amizade dedicados ao longo desses anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo, pelo apoio e financiamento ao projeto de pesquisa.

À Capes pelo incentivo através da concessão de bolsa de estudo.

Aos professores Alcebíades Ribeiro Campos e Cristina Lacerda Soares Petrarolha pela amizade e orientações.

As funcionárias Vera Andrade (Laboratório de Fitopatologia) e Antonia Gomes Cambuim (Laboratório de Biotecnologia), pelo auxílio e, principalmente, pela amizade.

À todos os docentes desta unidade que contribuíram decisivamente para minha formação profissional.

Aos Pesquisadores Luadir Gasparotto (Embrapa Amazônia Ocidental) e Dr. Luiz Sebastião Poltronieri (Embrapa Amazonia Oriental) pela concessão de materiais infectados por *Thanatephorus cucumeris* para a realização deste trabalho.

À EMBRAPA Amazônia Oriental, Amazônia Ocidental e Acre que nos ofereceu suporte logístico e laboratorial para coleta e isolamento de material.

À Maisa Ciampi pelas orientações e colaboração na execução de parte da análises moleculares.

Aos funcionários Ângela Kato e Domingos Carneiro da Secretária do Departamento Fitossanitário, Engenharia Rural e Solos.

Aos funcionários da Biblioteca e Seção de Pós-graduação da FEIS - Unesp.

Aos meus companheiros Elaine e Marco Antônio pelo auxílio e amizade.

Ao meu querido Vovô Carlinho (*in memoriam*) pelo imenso amor e incentivo.

Enfim, a todos que partilharam comigo de mais está etapa da minha vida, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
1 RESUMO.....	1
2 SUMMARY.....	3
3 INTRODUÇÃO.....	5
3.1 Filogenia e reconstrução filogenética de fungos do gênero <i>Rhizoctonia</i>	5
4 REVISÃO.....	10
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
5.1 Isolados.....	15
5.2 Isolamento do patógeno a partir de tecidos foliares infectados.....	17
5.3 Determinação das características citológicas de isolados de <i>Thanatephorus</i> sp. da seringueira e mimosa.....	17
5.4 Caracterização do grupamento de anastomose de isolados de <i>Thanatephorus</i> sp. da seringueira e de mimosa.....	18
5.5 Caracterização cultural de isolados de <i>Thanatephorus</i> sp. da seringueira e de mimosa.....	18
5.5.1 Características da colônia.....	18
5.5.2 Determinação do crescimento micelial em função da temperatura.....	19
5.5.3 Necessidade fisiológica de tiamina.....	19
5.6 Caracterização molecular baseada em sequenciamento da região ITS – 5,8S do DNA ribossomal nuclear.....	20
5.6.1 Clonagem dos produtos de PCR.....	22

5.6.2 Análise de dados de seqüências da região ITS – 5,8S do rDNA.....	22
5.7 Análise filogenética.....	23
5.8 Patogenicidade cruzada de isolados.....	24
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
6.1 Determinação das características citológicas de isolados de <i>Thanatephorus</i> sp. da seringueira e mimosa.....	25
6.2 Caracterização do grupamento de anastomose de isolados de <i>Thanatephorus</i> sp. da seringueira e de mimosa.....	25
6.3 Caracterização cultural de isolados de <i>Thanatephorus</i> sp. da seringueira e de mimosa.....	26
6.3.1 Características da colônia.....	26
6.3.2 Determinação do crescimento micelial em função da temperatura.....	28
6.3.3 Necessidade fisiológica de tiamina.....	31
6.4 Caracterização molecular baseada em sequenciamento da região ITS – 5,8S do DNA ribossomal nuclear.....	32
6.5 Análise filogenética.....	32
6.6 Patogenicidade cruzada de isolados.....	50
7 CONCLUSÕES.....	55
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Relação de isolados de *Thanatephorus cucumeris* de espécies cultivadas na Amazônia Ocidental, Amazônia Oriental e em Rio Branco, disponíveis na Micoteca do Departamento de Fitossanidade, Engenharia, Rural e Solos, FEIS, UNESP, Ilha Solteira-SP.....16
- Quadro 2.** Taxas de crescimento micelial, temperaturas mínima, máxima e ótima e taxa máxima de crescimento (TMC), na temperatura ótima, de isolados de *Rhizoctonia solani* associados à seringueira, mimosa, feijão e de isolados padrões.....29
- Quadro 3.** Necessidade comparativa de tiamina entre isolados de *Rhizoctonia solani* da seringueira, mimosa, feijão e dos grupos de anastomose AG1- IA e AG2-2 IV.....31
- Quadro 4.** Haplótipos mundiais de *Thanatephorus cucumeris* (grupos de anastomose de *Rhizoctonia solani* multinucleadas) determinados com base em polimorfismos detectados em seqüências de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA.....35
- Quadro 5.** Caracterização de haplótipos mundiais de *Thanatephorus cucumeris* (grupos de anastomose AG-1 a AG-12 e AG-BI de *Rhizoctonia solani*) e aqueles associado a *Hevea brasiliensis*, *Citrus* spp., *Passiflora edulis* e a diversas outras espécies cultivadas ou nativas da Amazônia brasileira.....38
- Quadro 6.** Haplótipos mundiais de *Ceratobasidium* spp. (*Rhizoctonia* spp. binucleadas) determinados com base em polimorfismos detectados em seqüências de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA.....40
- Quadro 7.** Caracterização de haplótipos mundiais de *Ceratobasidium* spp. (*Rhizoctonia* spp. binucleadas) e aqueles associados à *Mimosa* sp. (espécie nativa da Amazônia brasileira).....42

Quadro 8. Relação de isolados de *Thanatephorus cucumeris* de espécies cultivadas ou nativas da Amazônia Ocidental e da Amazônia Oriental, caracterizados quanto ao grupamento de anastomose.....48

Quadro 9. Relação de isolados de *Thanatephorus cucumeris* de espécies cultivadas ou nativas da Amazônia Ocidental e da Amazônia Oriental, caracterizados quanto a patogenicidade cruzada ao clone de seringueira RRIM 600 e em plantas de Mimosa spp.....51

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aspecto de colônias de isolados de *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) causadores da mancha areolada da seringueira (SR) e de *Ceratobasidium* sp., causador de mancha foliar de mimosa (MS), em meio de BDA a 25°C após 10 dias na ausência de luz. **A**, SR01; **B**, SR02; **C**, SR03; **D**, SR06; **E**, SR07; **F**, SR09; **G**, MIM1.....27
- Figura 2.** Curvas de crescimento micelial radial de isolados de *Rhizoctonia solani* associados à seringueira, mimosa e feijão, em função da temperatura.....30
- Figura 3.** Curvas de crescimento micelial radial de isolados de *Rhizoctonia solani* pertencentes aos grupos de anastomose AG1-IA, AG1-IB, AG2-2 IV e AG 2-3, em função da temperatura.....30
- Figura 4.** Árvore filogenética ilustrando as relações entre haplótipos da região ITS-5.8S dos grupos de anastomose de *Rhizoctonia solani* (AG-1 a AG-12 e AG-BI) e o grupo de isolados de *R. solani* obtido de *Hevea brasiliensis*, *Citrus* sp., *Passiflora edulis* e diversas outras espécies cultivadas ou nativas na Amazônia brasileira.....44
- Figura 5.** Árvore filogenética ilustrando as relações entre haplótipos da região ITS-5.8S dos grupos de anastomose de *Ceratobasidium* sp. (*Rhizoctonia* sp. binucleadas AG-A a AG-U e CAG-1 a CAG-7) e o grupo de isolados de *Rhizoctonia* sp. binucleadas obtido de *Mimosa* sp., espécie nativa da Amazônia brasileira.....46
- Figura 6.** Sintomas de mancha areolada em citros, sob condições naturais de Rio Branco, Acre.....49

Figura 7. Sintomas de mancha areolada da seringueira com o isolados SR06 (A), MIM1 (B) e sintomas de mancha foliar em mimosa com os isolados SR06 (C) de *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) e MIM1 (D), de *Ceratobasidium* sp., cinco dias após a inoculação.....52

Figura 8. Sintomas de mancha areolada de *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) em folhas destacadas de seringueira, em condições de estufa incubadora. **A**, testemunha, sem palitos; **B**, testemunha com palitos; **C**, SER1 (seringueira, AG 2-2); **D** e **F**, BEL71 (pimenta-do-reino, AG 1 ID); **E**, BEL54 (capim *Brachiaria*, AG 4 HGI); **G**, BEL88.1 (maracujá, AG 2-2); **H**, BEL64 (urucum, AG 4 HGI); **I** (H38), **J** (H48) e **K** (H52) (*Citrus*, provavelmente um novo AG de *R. solani*).....53

Figura 9. Sintomas de mancha foliar de mimosa (A) e mancha areolada de seringueira (B), sob condições naturais do Amazonas. Material obtido de L. Gasparoto, Embrapa Amazônia Ocidental.....54

1 RESUMO

O fungo *Thanatephorus cucumeris* é responsável por várias doenças foliares em culturas de importância agrícola ou em espécies nativas na região Amazônica do país. Entre as doenças relatadas, a mancha areolada de *Thanatephorus* é considerada uma das mais importantes para a região. Neste estudo, baseando-se na ausência de informações sobre quais os grupamentos de anastomose (AG) de *Rhizoctonia solani* estão associados a plantas hospedeiras na Amazônia, foi testada a hipótese de que os isolados de *T. cucumeris* oriundos de seringueira e citros e outras espécies cultivadas ou nativas pertencem a grupamentos de anastomose distintos. Assim, os isolados de *T. cucumeris* foram caracterizados citomorfologicamente, por meio da caracterização cultural, grupamento de anastomose e molecular. Esta última baseou-se na observação da variação associada a seqüências da região ITS-5,8S do rDNA. Também não há informação sobre a patogenicidade cruzada, à seringueira, de isolados provenientes de outras espécies de plantas da Amazônia. Então, por meio do teste de patogenicidade cruzada foi testada uma segunda hipótese, a de que isolados de *T. cucumeris* de hospedeiros distintos são patogênicos também à seringueira. O estudo teve como objetivo elucidar aspectos importantes sobre a etiologia do patógeno, que podem

ser relevantes para o manejo da doença. De forma importante, concluiu-se que a seringueira hospeda não apenas um, mas sim vários grupos de anastomose de *R. solani* como agente causal da mancha areolada: o AG2-2, como o mais frequentemente associado, o AG-1 IB, o AG-1 ID e o AG-4 HGI. Observou-se também a associação de *Rhizoctonia* sp. binucleada (AG-R) e do AG-CT (novo grupo de anastomose sugerido para alocar os isolados da mancha foliar dos citrus no Acre). Esses isolados de grupos distintos de anastomose, além de infectar plantas de seringueira, ocorrem também em diversas outras espécies vegetais, cultivadas ou nativas, o que implica em diversidade de fonte de inóculo para a disseminação dos patógenos da mancha areolada. De maneira inédita relata-se a ocorrência de um novo grupo de anastomose de *R. solani* (AG-CT) infectando citrus no Acre, Brasil, distinto dos demais relatados no mundo.

Palavras chaves: *Rhizoctonia solani*, grupamento de anastomose, patogenicidade cruzada, seringueira, citrus.

THE COMPLEX AETIOLOGY OF THE MANCHA AREOLADA OF *Thanatephorus* sp. AND/OR *Ceratobasidium* sp. IN RUBBER TREE, CITROS AND OTHER CULTIVATED SPECIES OR NATIVE OF THE AMAZONIAN. Ilha Solteira, 2006. 70p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Sistema de Produção) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista.

Author: Ana Paula da Silva de Campos

Adviser: Paulo Cezar Ceresini

2 SUMMARY

The fungus *Thanatephorus cucumeris* is responsible for causing several foliar diseases on important agricultural crops or on native species in the Amazonian area of the country. Among the diseases, *Thanatephorus* aerial blight is considered one of the most important in that region. In this study, based on the lack of information on which anastomosis groups (AG) of *R. solani* are associated with distinct hosts in the Amazon, we tested the hypothesis that *T. cucumeris* isolates from rubber tree, citrus and other cultivated or native species from the area belong to distinct AGs. So, *T. cucumeris* isolates were characterized based on cytomorphology, cultural characteristics, by anastomosis grouping, and molecularly. This last one was based on the observation of the variation associated with sequences of the ITS-5.8S region of the rDNA. There is no information about the cross pathogenicity (to rubber tree) of isolates from other Amazonian plant species. Based on cross-pathogenicity tests, a second hypothesis was tested stating that *T. cucumeris* isolates from distinct hosts are also pathogenic to rubber tree. This study had as objective to elucidate important aspects of the aetiology of

the pathogen that can be relevant for managing the disease. We have found that the rubber tree hosts not only one, but several anastomosis groups of *R. solani* as causal agent of the aerial blight: AG2-2, as the more frequently associate, AG-1 IB, AG-1 ID and AG-4 HGI. The association of a *Rhizoctonia* sp. binucleada (AG-R) and of the AG-CT (a new anastomose group designated for allocating the isolated associated with the citrus aerial blight from Acre) was also observed. These isolates from distinct anastomosis groups, besides infecting rubber tree plants, also can be associated with several other vegetable species, cultivated or native, what implicates in diversity of inoculum source for the spread of the pathogen. For the very first time we report the occurrence of a new anastomosis group of *R. solani* infecting citrus in Acre, Brazil, which is distinct from all the others already described worldwide.

Key words: *Rhizoctonia solani*, anastomosis grouping, cross pathogenicity, rubber tree, citrus.

3 INTRODUÇÃO

3.1 Filogenia e reconstrução filogenética de fungos do gênero *Rhizoctonia*

Desde a metade do século XVIII, já havia proposta por parte de vários estudiosos sobre modelos que explicassem como as espécies teriam se modificado ao longo do tempo (AMORIM, 1997). Dos modelos sugeridos, o de Darwin e Wallace foi o que mais contribuiu para a formação de uma base sólida para os estudos das relações entre os grupos de organismos.

O modelo de Darwin e Wallace fundamenta-se na idéia de que as espécies conectam-se entre si em espécies ancestrais, em uma árvore que liga todos os seres vivos, inclusive a espécie humana. Diferindo-se de vários modelos propostos por diversos autores, que contrariam a idéia de que as espécies não são fixas em sua natureza, ou seja, em que havia um componente evolutivo (PAPAVERO & LLORENTE – BOUSQUETS, 1994). No modelo idealista platônico não há conexão material ou histórico entre as espécies, cada espécie corresponde ao conjunto de indivíduos que são cópias imperfeitas de um mesmo tipo ideal (AMORIM, 2002).

Quando se propõem a existência de uma filogenia que conecta as espécies, passamos de modelos em que às espécies são entidades imutáveis e desconectadas uma das outras, para um modelo em que não apenas as espécies, mas também suas características são conectadas historicamente (AMORIM, 1997).

Assim surge com Darwin, o conceito de filogenia juntamente com o próprio conceito de ancestralidade entre espécies, sendo que é seu, o primeiro diagrama publicado representando relações filogenéticas [A Origem das Espécies, de Charles Darwin (1859)] (MIYAKI et al., 2001). Assim, as filogenias nada mais são que a indicação das relações de ancestralidade supostas para um conjunto de espécies. Apesar de revolucionária, as implicações do conceito de filogenia para a compreensão da diversidade biológica, levaram mais de cem anos para serem compreendidas de um modo mais amplo (AMORIM, 2002).

A reconstrução filogenética estima as relações de ancestralidade para um determinado número de organismos (táxons). Uma árvore filogenética representa a história evolutiva dos organismos nela presentes; graficamente, consiste de pontos (ou nós) ligados por linhas (ou ramos) (MIYAKI et al., 2001). As inferências de filogenias para um determinado grupo de organismos se baseiam em dados que se originam de diversos caracteres (morfológicos, ecológicos, comportamentais, fisiológicos, citogenéticos e moleculares). Dados moleculares, em particular, passaram a ser utilizados extensivamente não somente para esclarecer relações filogenéticas difíceis de abordar por outros métodos, mas também para questionar visões filogenéticas propostas anteriormente (RUSSO & MIYAKI, 2001).

Os dados moleculares se tornaram uma ferramenta fundamental como fonte de informação biológica, sendo usados para resolver problemas de filogenia de grandes grupos (WOESE et al., 1990; DOOLITTLE et al., 1996; KUMAR e RZHETSKY, 1996; LYNCH, 1999) e relações filogenéticas entre espécies de organismos que vão desde humanos e dos

grandes primatas até microrganismos como fungos (GOLDSTEIN et al., 1995; NEI e TAKEZAKI, 1996; SATTA et al., 2000; TAYLOR et al., 1999).

Técnicas moleculares de classificação e identificação estão contribuindo de forma significativa para o entendimento das relações filogenéticas entre as diferentes espécies de fungos, bem como para uma melhor classificação das novas espécies que poderiam ser catalogadas em projetos de análise da biodiversidade. Nesse sentido, a utilização de métodos moleculares (como o sequenciamento de genes conservados) para a identificação de microrganismos pode possibilitar ainda o desenvolvimento de métodos de diagnóstico, análises filogenéticas, epidemiológicas e de genética de populações (AZEVEDO et al., 2006).

Em fungos, o operon que codifica o RNA ribossomal (rDNA) tem sido usado para estudos de sistemática molecular e filogenética (WHITE et al., 1990). Os dados de seqüências de DNA, também estão sendo utilizados para estudos de genética de populações em fungos, onde a variação no rDNA é sempre menor dentro de uma única espécie fúngica que entre espécies distintas (CARBONE et al., 1999; CARBONE & KOHN, 2004; JAMES et al., 2001). A análise da variação na seqüência de DNA, através de métodos filogenéticos, possibilita examinar padrões ancestrais da diversidade genética atual encontrada, bem como, a inferência sobre a história dos alelos ou haplótipos (CARBONE & KOHN, 2001).

Entre os fungos, o presente trabalho teve particular interesse no gênero fitopatogênico *Thanatephorus* (Basidiomycetes) cuja fase anamórfica inclui a espécie complexa *Rhizoctonia solani*. O gênero *Rhizoctonia* constitui um complexo grupo de fungos com espécies geneticamente distintas e histórias evolutivas diferentes. Apesar do número significativo de estudos referentes a *Rhizoctonia* spp., pouco sabe-se sobre a biologia e genética da população do fungo. As pesquisas sobre o gênero estão concentradas na taxonomia e identificação de *Rhizoctonia solani* (CUBETA e VILGALYS, 1997).

A classificação do complexo *R. solani* é baseado em critérios morfológicos, fisiológicos, genéticos e patológicos, que permitem a divisão em grupos de anastomose (ANDERSON, 1982; OGOSHI, 1987; SNEH et al., 1991; VILGALYS & CUBETA, 1997). Segundo Carling (2000), 14 AGs (grupos de anastomose) têm sido descritos para *Rhizoctonia solani*: AG-1 a AG-13 e AG-BI. Além de AG, o conceito de grupos intraespecíficos (ISG) baseado em evidências de reação de anastomose, patogenicidade, morfologia, permitiu a diferenciação de 23 ISG dentre os AGs de *R. solani* (CARLING, 2000). Essa classificação sugere que os AGs são geneticamente distintos e os ISG grupos evolutivos independentes dentro do grupo *R. solani* (VILGALYS e CUBETA, 1994). O grupo de anastomose ainda é o mais importante avanço na compreensão da diversidade genética de *Rhizoctonia* (ADAMS, 1996).

Para inferir relações taxonômicas entre os diferentes AGs de *R. solani*, técnicas moleculares têm sido amplamente utilizadas, principalmente, aquelas baseadas na região ITS-5,8S do DNA ribossomal (rDNA). Por tratar-se de uma região gênica conservada, isto facilita os estudos moleculares de diversos organismos. Em isolados de *Ceratobasidium* sp. e *Thanatephorus* sp. é possível verificar um alto nível de variação na região ITS, permitindo conhecer aspectos importantes da biologia dos fungos (GONZALES et al., 2001).

Neste estudo foi testada a hipótese de que os isolados de *T. cucumeris*, provenientes da região Amazônica e oriundos de seringueira, citros e outras espécies cultivadas ou nativas, pertencem a grupamentos de anastomose distintos. Para isso, isolados de *T. cucumeris* foram caracterizados citomorfologicamente, culturalmente, por grupamento de anastomose e molecularmente (por meio do seqüenciamento da região ITS-5.8S do rDNA). Da mesma forma, não há informação sobre a patogenicidade cruzada de isolados provenientes de outras espécies arbóreas cultivadas ou nativas da Amazônia para a seringueira. Assim, por meio de

teste de patogenicidade cruzada foi testada uma segunda hipótese de que isolados de *T. cucumeris* de hospedeiros distintos são patogênicos também à seringueira.

Este estudo teve como objetivo geral elucidar aspectos importantes sobre a etiologia do fungo *T. cucumeris*, responsável por ocasionar mancha areolada em seringueira e citrus cultivados na região Amazônica, bem como a mancha foliar em plantas de mimosa e em diversos outros hospedeiros. Acredita-se que a informação gerada por esta pesquisa possibilitará importante contribuição para o conhecimento da biologia de *Thanatephorus* sp. na região Amazônica, com implicações positivas para o manejo da doença.

4 REVISÃO DE LITERATURA

Sob condições naturais, *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk [fase anamórfica = *R. solani* Kühn] é responsável por várias doenças foliares em culturas de importância agrícola ou em espécies nativas na região Amazônica do país. Entre as doenças relatadas, a mancha areolada dos citros (LOURD et al., 1984) e da seringueira (DESLANDES, 1944) são consideradas as mais importantes na região. O patógeno ataca também o feijoeiro, causando a murcha da teia micélica (ALBUQUERQUE & OLIVEIRA, 1973), a soja, causando a mela (FENILLE et al., 2002), o mógno africano (GASPAROTO et al., 2001) e o maracujá (POLTRONIERI et al., 1999). Plantas de *Mimosa* spp. são também suscetíveis à mancha foliar de *Thanatephorus* (GASPAROTO, informação pessoal).

Várias outras espécies cultivadas ou nativas da Amazônia são atacadas por manchas foliares típicas de *Thanatephorus* sp. (GASPAROTTO et al., 1997). A infecção dessas plantas ocorre através de basidiósporos produzidos por *T. cucumeris* e que podem ser disseminados rapidamente a longas distâncias (NAITO, 1996).

Em citros, os primeiros relatos de epidemias causadas pela mancha areolada surgiram com a expansão de áreas de cultivo no estado do Pará nos últimos anos. Nesta cultura, o fungo

afeta especificamente as espécies de laranjeira doce, não sendo observado ataque em limoeiros e tangerinas (TRINDADE, 1997). Muito pouco é relatado sobre esta doença em condições brasileiras e o potencial de expansão para outras regiões do Brasil é desconhecido.

Em contraste, o patossistema *Thanatephorus*-seringueira tem sido estudado com maior profundidade. Em seringueira, a mancha areolada foi relatada pela primeira vez no Brasil, em 1943, no Pará (DESLANDES, 1944). Hoje é considerada a segunda enfermidade de maior importância econômica para a seringueira, provocando lesões foliares que evoluem para intensa desfolha em condições de viveiros, jardins clonais e plantas adultas (CONDURÚ & STEIN, 1984). Apesar de já ser conhecida há algum tempo, a doença começou a causar danos a partir da década de 70, com o aumento das áreas de cultivo racional da seringueira na Amazônia (FERREIRA & GASPAROTTO, 1989). Prejuízos em torno de 30% na produção de látex em seringais brasileiro foram relatados nos anos 70 (CONDURÚ & STEIN, 1984). Sob condições de habitat natural, entretanto, a seringueira convive normalmente com o patógeno, sem problemas fitossanitários sérios. Isso ocorre devido ao reduzido número de plantas da mesma espécie por unidade de área e, por consequência, fonte insuficiente de inóculo (CONDURÚ & STEIN, 1984).

A doença está restrita à região norte do país, provavelmente pelas condições climáticas favoráveis. Umidade em torno de 90% e períodos chuvosos associados a temperaturas mais amenas são pré-requisitos para a ocorrência da mancha areolada. Já em épocas mais quentes e menos chuvosas, plantas de seringueira que possuem um reenfolhamento uniforme ao longo do ano apresentam índices extremamente baixos da doença (GASPAROTTO & FERREIRA, 1990).

O patógeno afeta todas as espécies de *Hevea* (DESLANDES, 1944; CARPENTER, 1950; CHEE & WASTIE, 1980). A maioria dos clones brasileiros de seringueira é considerada suscetível à mancha areolada (GASPAROTTO, 1982). Em um estudo feito com

70 clones orientais e 34 clones nacionais, observou-se que todos os clones foram suscetíveis ou altamente suscetíveis à mancha areolada. Entretanto, na Costa Rica, há relato de resistência em *Hevea brasiliensis* (clones FB 54 e FB 3363), *Hevea benthamiana* (clones F 4515, F 4327 e F 4542), *Hevea pauciflora* e *Hevea rigidifolia* (CARPENTER, 1951).

Muito embora uma série de pesquisas tenha sido desenvolvida para compreender aspectos relativos à epidemiologia e controle do fungo, a etiologia do patógeno ainda não está totalmente definida, especialmente para seringueira e citros.

O gênero *Rhizoctonia* é um grande, diversificado e complexo grupo de fungos (CARLING & SUMNER, 1992), desde a constatação do gênero, aproximadamente 120 espécies foram registradas (FENILLE, 2001). Vários fungos deste gênero, na fase teleomórfica, estão associados com a fase anamórfica de *Rhizoctonia*, inclusive *Botryobasidium* Donk, *Ceratobasidium* Rogers, *Thanatephorus* Donk, *Tulasnella* Schröt., *Uthatabasidium* Donk e *Waitea* Warcup & Talbot (ANDERSON, 1996).

O grupo é composto por espécies multinucleadas (*R. solani*) e binucleadas (*Rhizoctonia* spp.) (SNEH et al., 1996). O fungo *R. solani* é uma espécie complexa e atualmente é composto por 14 grupos de anastomose: de AG1 a AG13 e o AG BI (CARLING, 2000).

Rhizoctonia sp. binucleada (*Ceratobasidium* sp.) é dividida em 7 grupos de anastomose nos EUA (CAG-1 a CAG-7) e no Japão, em 19 grupos (AG-A a AG-S). Posteriormente, o grupo de anastomose de *Ceratobasidium* (AG-B) foi dividido em subgrupos baseando-se em características culturais e frequência de anastomose (AG-Ba, AG-Bb, e AG-Bo) (GONZALES et al. 2001).

O fungo *Rhizoctonia* sp. binucleada frequentemente está relacionado ao controle biológico de outras espécies de *Rhizoctonia* spp. (SNEH et al., 1996). No entanto, algumas

espécies de *Rhizoctonia* sp. binucleada patogênicas, cuja fase teleomórfica, corresponde ao *Ceratobasidium*, como o *C. noxium* (sin. *Pellicularia koleroga*), causam doenças foliares em uma série de culturas de importância econômica como cacau, café, manga, seringueira, *Citrus* sp., graviola, pimenta-preta, chá e caqui (FAWCETT, 1914; ROSSETI et al., 1982; FURTADO, 1997; TRINDADE & FURTADO, 1997; PEREIRA et al., 2000; PEREIRA et al., 2003; COSTA-SOUZA et al., 2006).

Isolados de *Rhizoctonia* spp. são classificados de acordo com grupos de anastomose (AGs) baseando-se na ocorrência de fusão de hifas (anastomose) com isolados padrões de AGs designados. Isolados de diferentes AG geralmente não são capazes de fundir hifas entre si, indicando que AGs são geneticamente distintos. Este conceito foi solidificado por dados de hibridização DNA/DNA (VILGALYS, 1988), sequenciamento das regiões do ITS (espaçador interno transcrito) e da subunidade 28S do DNA ribossômico nuclearmente codificadas (GONZALES et al., 2001).

Há poucas informações sobre quais grupamentos de anastomose (AG) de *Thanatephorus cucumeris* estão associados à seringueira e citrus. O único relato clássico da literatura data da década de 80, quando Bolkan & Ribeiro (1985) determinaram que o AG-1 estava associado à mancha foliar dos citros no Distrito Federal e o AG-2 estava consistentemente associado à mancha areolada da seringueira do Amazonas. Naquela época, entretanto, haviam sido descritos mundialmente apenas cinco grupos de anastomose de *R. solani*. Muitos outros grupos de anastomose foram descritos desde então.

Atualmente existem quatro diferentes sub-grupos do AG-1 descritos (AG-1 IA, IB, IC e ID) e estes sub-grupos estão associados a hospedeiros particulares. Por exemplo, no Brasil, o AG-1IA está associado a mela da soja (FENILLE et al., 2002), o AG-1 IB à murcha de teia micélica do feijoeiro e à mancha foliar necrótica do *Eucalyptus* (SILVEIRA et al., 2000). No mundo, o AG-1 IC é patógeno de solo associado a *damping off* (PARMETER et al. 1969), e

nas Filipinas, o AG1 ID está associado à mancha necrótica foliar do cafeeiro. Da mesma forma, o AG-2 é atualmente subdividido em AG2-1 (I, II e III), AG2-2 (IIIB, IV e LP), AG2-3 e AG2-t, também apresentando especificidade quanto aos hospedeiros. Apenas o AG2-2 IV e o AG2-3 são reconhecidos como patógenos foliares mundialmente (CARLING & SUMMER, 1992; KUNINAGA & CARLING, 2000; HYAKUMACHI et al., 1998; NAITO et al., 1995; NAITO, 1996).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Isolados

O material constituído de folhas herborizadas infectado naturalmente por *T. cucumeris* da seringueira e de *Mimosa* sp. foi coletado por Luadir Gasparotto (EMBRAPA Amazônia Ocidental, Manaus), e teve como procedência o estado do Amazonas. Esta primeira amostragem resultou em seis isolados de seringueira e um de *Mimosa* sp. Uma segunda amostra de *T. cucumeris* causando mancha foliar em uma série de hospedeiros nativos ou cultivados na Amazônia Oriental (Pará) e no Acre, ocorreu em cooperação com pesquisadores da EMBRAPA, em viagem a Belém e a Rio Branco (Acre). Esta amostra totalizou 15 isolados (Quadro 1). Por se tratar de amostras tão diversas em termos de hospedeiros de origem, e provavelmente também quanto a grupos de anastomose, optou-se pelo sequenciamento da região ITS-5,8S do rDNA como estratégia para acelerar o processo de determinação dos grupos de anastomose, baseando-se em análise filogenética em relação à maioria dos grupos de anastomose de *R. solani* já descritos.

Quadro 1. Relação de isolados de *Thanatephorus cucumeris* de espécies cultivadas na Amazônia Ocidental, Amazônia Oriental e em Rio Branco, disponíveis na Micoteca do Departamento de Fitossanidade, Engenharia, Rural e Solos, FEIS, UNESP, Ilha Solteira-SP.

Código do isolado	Hospedeiro	Procedência	Ano
SER 01	Folhas de seringueira	Amazonas	2003
SER 02	Folhas de seringueira	Amazonas	2003
SER 03	Folhas de seringueira	Amazonas	2003
SER 06	Folhas de seringueira	Amazonas	2003
SER 07	Folhas de seringueira	Amazonas	2003
SER 09	Folhas de seringueira	Amazonas	2003
MIM1	Folhas de <i>Mimosa</i> spp.	Amazonas	2003
BEL54	Capim <i>Brachiaria</i>	Paragominas	2004
BEL56	Café	Altamira	2004
BEL59	Maracujá,	Belém	2004
BEL60	Feijoeiro	Tracoateua	2004
BEL61	Vindicá	Belém	2005
BEL62	Abóbora	Belém	2004
BEL64	Urucum	Belém	2003
BEL66	Jambú (hortaliça folhosa)	Santa Isabel	2004
BEL68	Repolho	Belém	2004
BEL71	Pimenta do reino	Belém	2004
BEL88.1	Maracujá	Benevides	2005
BEL88.2	Maracujá	Benevides	2005
H38	Citrus	Rio Branco	2005
H48	Citrus	Rio Branco	2005
H52	Citrus	Rio Branco	2005

*Isolados provenientes do Amazonas foram cedidos por Luadir Gasparotto (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Amazônia Ocidental). ** Fonte dos isolamentos de Belém, Pará: Dr. Luiz Sebastião Poltronieri, Técnicos, José Maria de Souza e Carmen Dolores Costeiro, EMBRAPA-Amazônia Oriental.

5.2 Isolamento do patógeno a partir de tecidos foliares infectados

Para o isolamento do patógeno, fragmentos de lesões foliares foram desinfestadas pela imersão em solução de álcool 70%, hipoclorito de sódio a 1% e lavados duas vezes em água destilada e autoclavada. A seguir, os fragmentos vegetais foram transferidos para placas de Petri, contendo meio de cultura ágar-água (AA) alcalino (pH 8,0) e mantidos a 25°C, na ausência de luz, por 48 horas. Os crescimentos miceliais característicos de *R. solani* obtidos foram repicadas novamente para o meio de cultura ágar-água (AA) alcalino e, posteriormente, para o meio de batata-dextrose-ágar (BDA) (TUIITE, 1969). Os isolados purificados foram preservados em grãos de arroz parboilizado, segundo metodologia adaptada de Sneh & Adams (1996) e estocados à temperatura de -20°C.

5.3 Determinação das características citológicas de isolados de *Thanatephorus* sp. da seringueira e mimosa

A anamorfase de *T. cucumeris* (*R. solani*) é uma espécie considerada multinucleada, sendo o número médio de núcleos em células jovens de hifa utilizado como um critério importante para discriminar espécies (SNEH et al., 1991). Para a caracterização da condição nuclear, foram retirados discos de 2 mm de diâmetro do meio de BDA e transferidos individualmente para lâminas de vidro contendo uma camada fina do meio AA, em seguida incubados a 25°C, por 18h. O número de núcleos por células foi observado utilizando-se corante nuclear Safranina O, de Bandoni (1979). Na determinação do número de núcleos foram examinadas 20 células jovens por lâmina.

5.4 Caracterização do grupamento de anastomose de isolados de *Thanatephorus* sp. da seringueira e de mimosa

Para determinar AGs, os isolados de *R. solani* obtidos de seringueira e de mimosa foram pareados com isolados padrões do AG-1 (AG-1 -IA H5 526, AG-1 -IB), AG-2-2 (AG-2-2 IV) e AG-2-3 e examinados quanto as categorias de reação de anastomose entre pares de isolados. Os isolados padrões foram escolhidos em função do histórico como agentes causais de manchas foliares nos hospedeiros em questão (BOLKAN & RIBEIRO, 1985). Os isolados de *R. solani* e os padrões foram crescidos em placas de Petri contendo meio de BDA + estreptomicina ($0,050\text{g.L}^{-1}$) por 48 horas a 25°C . Discos foram retirados das margens das culturas e posicionados a 2 cm um do outro sobre a lâmina de vidro com uma fina camada de AA a 1,5% e $1,5\text{ mL.L}^{-1}$ do corante McCormick (HERR & ROBERTS, 1980; GUTIERREZ et al., 1998). O conjunto foi incubado por 18 horas a 25°C , sendo realizadas 3 repetições de cada isolado. As observações das reações de anastomose foram efetuadas em microscópio, com a utilização de uma gota de H_2O , sobrepondo-se uma lamínula de vidro. Para a determinação do grupamento de anastomose foram examinados 5 campos por lâmina de cada isolado testado. As categorias de reações de anastomoses de hifas foram examinadas de acordo com Carling (1996).

5.5 Caracterização cultural de isolados de *Thanatephorus* sp. da seringueira e de mimosa

5.5.1 Características da colônia

A caracterização do aspecto da colônia foi realizada por avaliação visual das culturas cultivadas em placas de Petri contendo meio de BDA e mantidas por um período de

10 dias a 25°C, na ausência de luz. Na avaliação foram observados o volume e coloração do micélio, bem como, a presença ou ausência de escleródios formados.

5.5.2 Determinação do crescimento micelial em função da temperatura

Para o estabelecimento das curvas de crescimento micelial radial, os isolados de *T. cucumeris* foram incubados em meio de cultura de BDA + cloranfenicol + estreptomicina (0,050g.L⁻¹) (BDACE) por 48 horas, à 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C, sob ausência de luz. Os isolados de *R. solani* utilizados como padrões foram AG-1 -IA, AG-1 -IB, AG-2-2 IV e AG-2-3. O crescimento micelial radial de cada isolado nas diversas temperaturas foi determinado por meio de medidas lineares. Cada experimento foi composto por 5 repetições em delineamento inteiramente casualizado.

5.5.3 Necessidade fisiológica de tiamina

A necessidade de tiamina para crescimento micelial foi determinada para os isolados de *R. solani* de seringueira e mimosa, bem como para os isolados padrões e um isolado de *Rhizoctonia* spp. binucleada (*Ceratobasidium* sp.) obtido de feijão (FJ 31.4) e caracterizado anteriormente por Ceresini & Souza (1997). Para o teste foram utilizados ainda isolados padrões autotróficos e auxotróficos para tiamina (AG-1 -IA H5 526 e AG-2-2 IV). Para a determinação do requerimento de tiamina utilizou-se o meio GASP (D-glucose, 50 mM; L-asparagina, 13 mM; MgSO₄.7H₂O, 2 mM; KH₂PO₄, 7,3 mM; Fe(NO₃)₃.9H₂O, 0,5 µM; ZnSO₄.7H₂O, 0,7 µM; MnSO₄.7H₂O, 0,4 µM e água destilada e deionizada, q.s.p, 1000 mL), descrito por Ogoshi & Ui (1979) e metodologia adaptada por Johnk & Jones (1993). Inicialmente, um disco de cada isolado foi transferido para placas de Petri com meio GASP+20g de ágar e incubados por 9 dias a 25°C, sob ausência de luz. Posteriormente,

retirou-se um disco da cultura e transferiu-o para 50 mL do meio GASP líquido [pH corrigido para 7,0], com ou sem 10^{-5} M de hidrocloreto de tiamina em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Em seguida, os frascos foram distribuídos em um agitador horizontal, onde permaneceu por 14 dias a uma temperatura de cerca de 25°C, a 120 rpm, no escuro. Após esse período, realizou-se a separação da massa micelial de cada isolado do meio GASP líquido por meio de filtração á vácuo. Em seguida, o micélio foi seco em estufa por 48h a uma temperatura de 65°C. A massa micelial seca dos isolados foi comparada determinando-se a relação entre a massa produzida em meio com tiamina e com o meio GASP sem tiamina (LUI & SINCLAIR, 1991). O experimento foi delineado de forma inteiramente casualizada com 3 repetições.

5.6 Caracterização molecular baseada em seqüenciamento da região ITS-5,8S do DNA ribossomal nuclear

Para a caracterização molecular, os isolados foram cultivados no meio de cultura de batata-dextrose-ágar + estreptomicina (0,050 g/L) por 2 dias, a 25°C. Após o período de incubação, retirou-se o micélio da superfície do meio e o colocou em tubos de eppendorf de 500µL, para que o mesmo fosse triturado em nitrogênio líquido. A extração de DNA genômico do micélio dos isolados de *R. solani* seguiu o protocolo de KURAMAE-IZIOKA (1997). Assim que o micélio foi triturado, acrescentou-se 700 µL de tampão de extração em cada tubo de eppendorf. O homogeneizado foi incubado por 30 minutos a 60-65°C, em banho-maria, sob agitação manual, a cada 5 minutos. Adicionou-se 500µL de acetato de potássio 5M e incubou as amostras em banho de gelo por mais 30 minutos, sendo realizada a cada 5 minutos a inversão dos eppendorf. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 12.000-14.000 rpm. Um volume de 700µL do sobrenadante foi transferido para tubos de eppendorf novos e acrescentou-se 1 volume de clorofórmio: álcool isoamílico (25:1), invertendo 20 vezes e centrifugados por 10 minutos a 12.000-14.000 rpm. O

sobrenadante novamente foi extraído e transferido para novos tubos de forma cuidadosa para que não houvesse o contato com a interface. O “pellet” foi lavado com 2 volumes de etanol absoluto e gentilmente misturado, sendo deixado por 10-15 minutos em condição de temperatura ambiente para precipitar o DNA. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 700µL de etanol 70% ao “pellet” e centrifugados por 5 minutos, sendo descartado novamente o sobrenadante. O “pellet” de DNA foi secado em temperatura ambiente. O DNA foi dissolvido em 50µL de TE e tratado com 40µL de RNase e posteriormente incubado por 1 hora a 37°C. Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro e em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio. Uma vez quantificado o DNA, procedeu-se amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal (rDNA) através de reações da polimerase em cadeia (PCR) utilizando condições semelhantes às descritas por GONZALES et al. (2001). Amplificações iniciais foram efetuadas usando-se o conjunto de iniciadores (“primers”) ITS4/ITS5 (WHITE et al., 1990). As amplificações (50 µL) foram efetuadas utilizando-se 100 ng de DNA genômico, MgCl₂ a 1,5 mM, 2 U de *Taq* polymerase (Gibco Life Technologies), 0,2 mM de cada um dos dNTPs, KCl a 50 mM, Tris-HCl a 10 mM, e 0.2 µM de cada iniciador. Uma alíquota de 5 µL de água milliQ foi utilizada como controle negativo no lugar do DNA alvo. O programa de amplificação em termociclador compreendeu o seguinte ciclo: dois min. a 94°C, ciclo inicial de desnaturação; um min. a 94°C, um min. a 55°C, dois min. a 72°C, 35 ciclos e cinco min. a 72°C, um ciclo. Os produtos da amplificação da região ITS do rDNA foram visualizados em transiluminador de UV após eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE e coloração com brometo de etídio (SAMBROOK et al., 1987). Cada produto de PCR foi purificado utilizando-se colunas MicroSpin S-400 HR (Amersham Pharmacia), de acordo com instruções do fabricante. Para o sequenciamento da região ITS do rDNA amplificada foi utilizado kit pré-misturado para ciclo de sequenciamento baseado em química de corante

terminador (“dye terminator cycle sequencing pre-mix kit”) (Amershan Life Science). Setenta e cinco ng de DNA amplificado foram utilizados por reação e um μM de cada um dos iniciadores ITS4 ou ITS5 em reações independentes. Os produtos de sequenciamento foram separados em gel de poliacrilamida a 6% utilizando-se sequenciador automático PE Applied Biosystems ABI-377.

5.6.1 Clonagem dos produtos de PCR

Dada à condição predominante de heterocário no ciclo de vida de *T. cucumeris* é comum observar-se heterogeneidade nas seqüências de DNA em produtos de PCR não clonados. Para separar diferentes alelos no operon ITS1-5.8S-ITS2 dentro de uma reação heterogênea de PCR, os amplicons/produtos da amplificação foram clonados dentro de um vetor PCR2.1-TOPO® (Invitrogen, San Diego). Plasmídeos selecionados de *Escherichia coli* One Shot® DH5a™-T1R recombinantes (Invitrogen, San Diego) foram extraídos de cada amostra e purificados por QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN®). Foram usados *primers* iniciadores universal “*foward*” e “*reverse*”, para um dos múltiplos sítios de clonagem do vetor, visando reamplificar e seqüenciar os clones obtidos.

5.6.2 Análise de dados de seqüências da região ITS-5.8S do rDNA

As seqüências obtidas foram analisadas pelo programa phred/phrap/consed para determinação de qualidade (GORDON et al., 1998), alinhadas pelo programa computacional “ClustalX” (THOMPSON et al., 1997) e comparadas com seqüências da região ITS do rDNA de todos os grupos de anastomose de *R. solani* e *Rhizoctonia* spp. binucleadas depositadas no banco de dados do NCBI/GenBank®. A busca por seqüências similares foram efetuadas por BLASTN (nucleotídeo-nucleotídeo) versão 2.2.6 de 09/04/2003, disponível no site <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST> (ALTSCHUL et al., 1997).

5.7 Análise filogenética

As relações filogenéticas entre haplótipos da região ITS-5.8S do rDNA dos isolados de *T. cucumeris* da seringueira e de outras plantas hospedeiras cultivadas ou nativas da Amazônia foram determinadas por meio da análise Bayesiana, usando o método de Monte Carlo - Cadeia de Markov, conjugado ao algoritmo de Metropolis (MCMCMC), por meio do programa MrBayes v 2.01 (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001).

Para a análise de MCMCMC, MODELTEST 3.7 (POSADA & CRANDALL, 1998), implementado no programa PAUP4* (SWOFFORD, 1998), foi utilizado para se determinar o modelo de substituição de bases de DNA o qual mais se ajustou aos dados. Um teste hierárquico da razão da verossimilhança implementado no MODELTEST selecionou o modelo HKY + G como modelo de substituição de bases da região ITS-5.8S do rDNA dentro do complexo *Thanatephorus/Rhizoctonia* (proporção de sítios invariáveis = 0; frequência de bases A = 0,2713, C = 0,2228; G = 0,1336 e T = 0,3724; parâmetro da distribuição gama = 0,3138; razão T de transições/transversões = 1,9654). Sob este modelo evolutivo, o valor de ML da árvore mais provável foi de -ln L 1972,64.

Já para o Complexo *Rhizoctonia* spp. binucleadas (*Ceratobasidium* spp.), o modelo de substituição de bases selecionado pelo MODELTEST foi o K80 + G (proporção de sítios invariáveis = 0; frequência de bases = semelhante; parâmetro da distribuição gama = 3,3271; razão T de transições/transversões = 2,1843). Sob este modelo evolutivo, o valor de ML da árvore mais provável foi de -ln L 1621,18.

A análise filogenética através de MCMCMC foi executada usando como hipótese *a priori* o modelo de substituição de bases de DNA acima descrito. Procurou-se por 3.000.000 de gerações usando-se quatro cadeias de buscas, eliminando-se as primeiras 250 árvores e armazenando-se uma árvore a cada 500. Valores de probabilidade posterior (PP) para as

ramificações da árvore consenso foram gerados considerando-se a regra de no mínimo 50% do total de 11542 árvores apresentarem a respectiva ramificação.

5. 8 Patogenicidade cruzada de isolados

A patogenicidade cruzada dos isolados de *T. cucumeris* de seringueira e mimosa foram comparados no clone de seringueira RRIM 600 (Rubber Research Instituto Malaysia) e em plantas de *Mimosa* spp. Comparou-se também a patogenicidade cruzada de isolados obtidos de diversos outros hospedeiros ao clone de seringueira RRIM 600. O preparo do inóculo foi realizado por meio do método de colonização de palitos de madeira com micélio de *R. solani*. Para a inoculação, os palitos de madeira e os isolados de *R. solani* foram cultivados juntamente no meio de BDA por 5 dias e mantidos a 25°C, sob ausência de luz. Após o recobrimento dos palitos pelo micélio do fungo, estes foram colocados sobre os folíolos próximos a ferimentos efetuados com alfinete esterilizado e incubados em placas de Petri, em estufa biológica, por aproximadamente 5 dias a 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas. A avaliação dos resultados do teste de patogenicidade cruzada foi determinada por meio da observação da incidência de sintomas nas folhas inoculadas. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

O reisolamento dos patógenos foi efetuado em uma repetição de cada planta testada (clone de seringueira RRIM 600 e *Mimosa* spp.) para confirmação de sua atuação como agente casual da doença.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Determinação das características citológicas de isolados de *Thanatephorus* sp. da seringueira e mimosa

Na determinação da condição nuclear, os seis isolados de seringueira submetidos à caracterização citológica foram considerados espécies multinucleadas. Já o isolado de mimosa (MIM1) foi caracterizado como binucleado.

6.2 Caracterização do grupamento de anastomose de isolados de *Thanatephorus* sp. da seringueira e de mimosa

Na caracterização do grupo de anastomose verificou-se que fusões entre hifas dos isolados de seringueira (SER01, SER02, SER03, SER06, SER07, e SER09) e do isolado padrão AG-2-2 IV foram positivas, ou seja, observando reações do tipo C2 (CARLING, 1990). Já em relação aos isolados padrões AG-1 IA, AG-1 IB e AG-2-3 a reação observada foi de anastomose negativa, isto é, reação do tipo C0. O isolado MIM1 não apresentou reação de anastomose em relação a nenhum dos isolados padrões testados.

6.3 Caracterização cultural de isolados de *Thanatephorus* sp. da seringueira e de mimosa

6.3.1 Características da colônia

Na caracterização cultural foi observada diferença nos padrões das colônias de cada isolado. Os isolados SER01, SER02, SER03 e SER07 apresentaram micélio de coloração variando em tons de marrom claro a escuro, com um crescimento micelial esbranquiçado, mais cotonoso e aéreo no centro da placa (Figura 1). Já os isolados SER06 e SER09 apresentaram um micélio de coloração marrom escuro, com um crescimento micelial na forma de pontuações esbranquiçadas (como primórdios de escleródios), distribuídas irregularmente em vários pontos da colônia. O isolado MIM1 apresentou micélio de coloração marrom, com um abundante crescimento micelial aéreo de cor branca, distribuída de forma regular por toda a placa. Nenhum dos isolados estudados mostrou formação de escleródios no período de 10 dias.

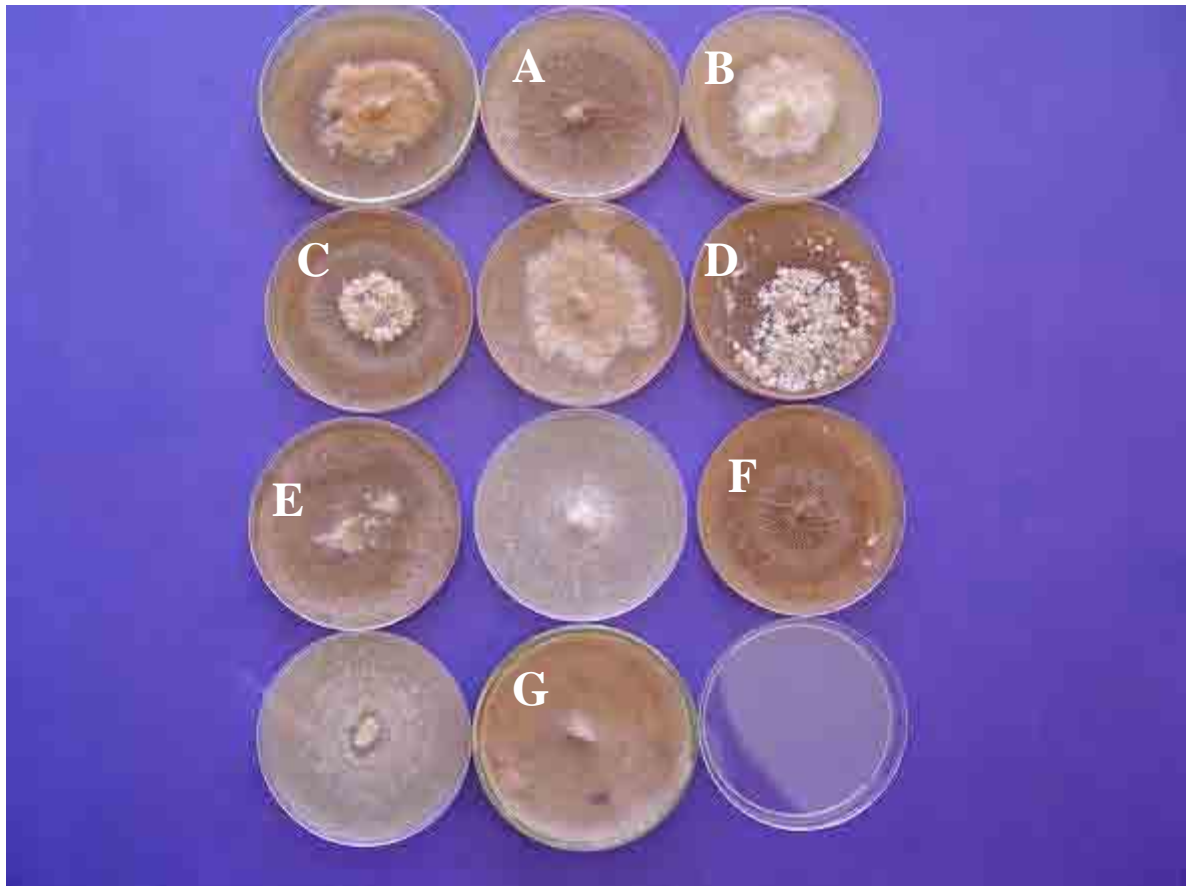


Figura 1. Aspecto de colônias de isolados de *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) causadores da mancha areolada da seringueira (SER) e de *Ceratobasidium* sp., agente causal da mancha foliar de mimosa (MIM), em meio de BDA, incubados a 25°C, na ausência de luz, após 10 dias de avaliação. **A**, SER 01; **B**, SER 02; **C**, SER 03; **D**, SER 06; **E**, SER 07; **F**, SER 09; **G**, MIM1.

6.3.2 Determinação do crescimento micelial em função da temperatura

No estudo de curvas de crescimento micelial radial, observou-se que praticamente todos os isolados apresentaram curvas de crescimento semelhantes, com temperatura ótima de 25°C (Figura 2 e 3). As temperaturas mínimas e máximas foram de 10 e 35°C, respectivamente (Quadro 2). Apenas os isolados SER01, SER06, MIM1, AG-1 IA e AG-1 IB cresceram à 35°C. Na temperatura de 40°C, nenhum dos isolados mostraram crescimento. Embora as temperaturas ótima, máxima e mínima sejam semelhantes às taxas de crescimento micelial variaram de 0,0 a 40,0 mm/dia. O isolado FJ 31.4 foi acrescentado a este teste para efeito de comparação com as características do isolado MIM1, já que também se trata de *Rhizoctonia* spp. binucleada.

Quadro 2. Taxas de crescimento micelial, temperaturas mínima, máxima e ótima e taxa máxima de crescimento (TMC), na temperatura ótima, de isolados de *Rhizoctonia solani* associados à seringueira, mimosa e feijão e de isolados padrões.

Isolado	Crescimento micelial ¹ (mm/dia)						Temperatura para crescimento micelial (°C)			TMC na temperatura ótima ± desvio padrão (mm/dia)
	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	Mínima	Ótima	Máxima	
SER 01	0,0	7,3	17,7	30,2	22,5	0,1	15	25	35	30,2 ± 0,80
SER 02	0,1	6,8	15,5	19,4	16,4	0,0	10	25	30	19,4 ± 1,04
SER 03	0,0	4,6	10,2	19,7	15,1	0,0	15	25	30	19,7 ± 0,39
SER 06	0,0	5,3	13,9	28,4	23,0	0,1	15	25	35	28,4 ± 0,58
SER 07	0,3	7,6	13,3	22,0	18,0	0,0	10	25	30	22,0 ± 0,82
SER 09	0,5	8,6	19,1	29,4	20,2	0,0	10	25	30	29,4 ± 0,62
MIM1	0,6	7,2	19,0	29,3	20,9	0,6	10	25	35	29,3 ± 0,66
FJ 31.4	2,4	5,3	8,5	12,3	11,4	0,0	10	25	30	12,3 ± 0,44
Padrões										
AG1-IA	0,6	4,8	19,4	26,1	23,6	0,8	10	25	35	26,1 ± 2,21
AG1-IB	2,3	11,9	34,3	40	30,6	0,8	10	25	35	40,0 ± 0,75
AG2-2IV	0,8	7,8	16,9	28,7	17,6	0	10	25	30	28,7 ± 0,82
AG2-3	0,0	0,4	1,6	5,3	0,5	0,0	15	25	30	5,3 ± 0,40

¹Média de 5 repetições

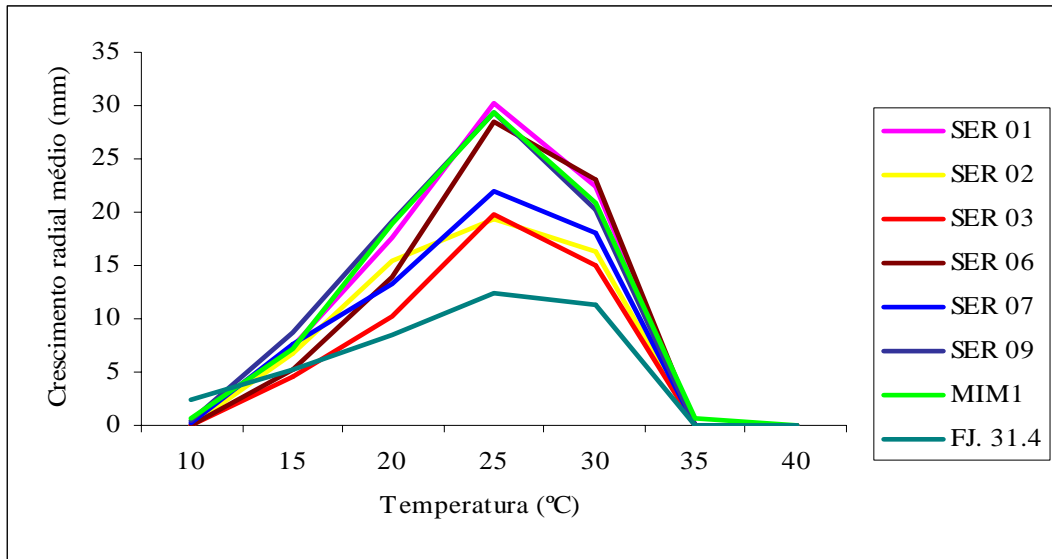


Figura 2. Curvas de crescimento micelial radial de isolados de *Rhizoctonia solani* associados à seringueira, mimosa e feijão, em função da temperatura.

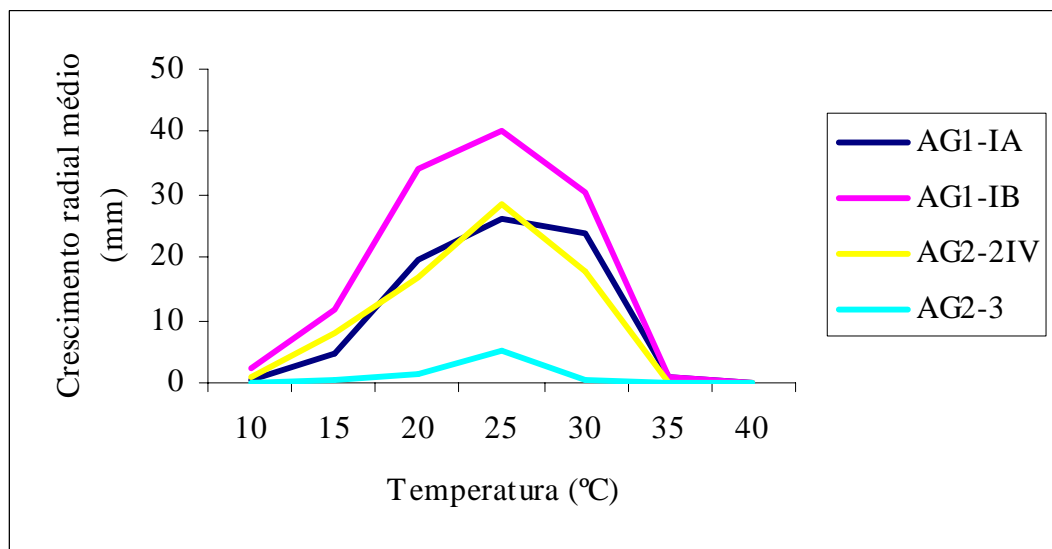


Figura 3. Curvas de crescimento micelial radial de isolados de *Rhizoctonia solani* pertencentes aos grupos de anastomose AG1-IA, AG1-IB, AG2-2 IV e AG 2-3, em função da temperatura.

6.3.3 Necessidade fisiológica de tiamina

No estudo da necessidade fisiológica de tiamina verificou-se que os isolados padrões AG-1 IA e AG-2-2 IV comportaram-se como auto e auxotróficos para tiamina, respectivamente, confirmando as observações de Carling & Sumner (1992) e, apresentaram relação B/A média (razão entre o crescimento em meio com tiamina e sem tiamina) de 0,98 e 41,33, respectivamente (Quadro 3). Segundo Carling et al. (1987), isolados com valores de relação B/A inferiores a 1,5 podem ser considerados autotróficos para tiamina. No presente trabalho, os isolados MIM1 e FJ 31.4, da mesma forma como o isolado padrão AG-1 IA, comportaram-se como autotróficos para tiamina, apresentando relação B/A média de 0,97 e 1,14. Os demais isolados de seringueira comportaram-se como auxotróficos apresentando uma ampla variação na relação B/A. Os isolados SER01 e SER02 apresentaram relação B/A média variando entre 12 e 13. Já os isolados de seringueira SER03, SER06, SER07 e SER09 mostraram valores para razão B/A média entre 20 a 23.

Quadro 3. Necessidade comparativa de tiamina entre isolados de *Rhizoctonia solani* da seringueira, mimosa, feijão e dos grupos de anastomose AG1- IA e AG2-2 IV.

Isolado	Massa seca de micélio \pm desvio padrão (mg)		
	Sem tiamina (A)	Com tiamina (B)	B/A
SER 01	22 \pm 2,9	300 \pm 3,7	13,0
SER 02	22 \pm 2,6	280 \pm 6,5	12,0
SER 03	13 \pm 2,3	319 \pm 3,0	23,0
SER 06	13 \pm 2,7	268 \pm 3,5	20,0
SER 07	13 \pm 1,6	301 \pm 4,5	22,0
SER 09	13 \pm 2,0	317 \pm 5,3	23,0
MIM 1	247 \pm 5,1	240 \pm 3,4	0,97
FJ 31.4	236 \pm 7,2	271 \pm 2,9	1,14
AG1-IA	229 \pm 8,6	226 \pm 8,4	0,98
AG2-2IV	6 \pm 1,0	248 \pm 5,2	41,0

6.4 Caracterização molecular baseada em seqüenciamento da região ITS-5,8S do DNA ribossomal nuclear

Quanto à caracterização molecular, o DNA dos seis isolados de seringueira e o de mimosa foram inicialmente submetidos à amplificação, via PCR e ao seqüenciamento de bases da região ITS-5,8S do rDNA. Os dados do seqüenciamento para os isolados SER01, SER02 e SER03 não foram satisfatórios, devido à ocorrência de heterogeneidade dos produtos de PCR. Em função de *R. solani* ser heterocário, em seu ciclo de vida é comum observar, para um mesmo locus analisado, a presença de mais de um alelo, o que assemelha-se à condição de heterozigoto (SNEH, 1991). Então uma alternativa é clonar tais produtos para a separação desses alelos e depois seqüência-los. Assim, os produtos de PCR da região ITS-5,8S dos isolados SER01, SER02 e SER03 foram clonados. Os dados obtidos foram comparados com seqüências depositadas no banco de dados do NCBI por meio da ferramenta BLASTN. Constatou-se similaridade das seqüências de bases da região ITS-5,8S rDNA dos isolados de seringueira com seqüências de diversos isolados pertencentes ao grupo de anastomose AG2-2 IV depositadas no GenBank®/NCBI. Observou-se também similaridade entre a seqüência do isolado de mimosa com os de *Rhizoctonia* spp. binucleada do grupo de anastomose AG-R.

6.5 Análise filogenética

No Quadro 1 estão apresentados os 15 isolados obtidos do material vegetal procedente da segunda amostragem, oriunda de uma série de hospedeiros cultivados ou nativos da Amazônia Oriental (Pará) e do Acre. Todos esses hospedeiros apresentaram sintomas típicos de mancha foliar de *Thanatephorus* sp. Sintomas da infecção foliar de plantas de *Citrus* sp. pelo patógeno podem ser observados na Figura 6.

A determinação do grupamento de anastomose destes isolados foi efetuada com base apenas na análise filogenética. A inferência filogenética da região ITS-5,8S do rDNA de

Thanatephorus sp. e de *Ceratobasidium* sp. é considerada uma ferramenta confiável na discriminação entre grupos de anastomose (GONZALES et al., 2001).

No estudo das relações filogenéticas foram incluídas seqüências de bases da região ITS-5,8S do rDNA da maioria dos grupos de anastomose de *R. solani* (*Thanatephorus* sp.) e de *Rhizoctonia* spp. binucleadas (*Ceratobasidium* sp.) já descritos e depositadas no banco de dados do NCBI/GenBank®. Os haplótipos mundiais de *Thanatephorus* sp. determinados com base em sítios polimórficos detectados ao longo da região ITS-5,8S do rDNA estão apresentados no Quadro 4 e descritos quanto aos polimorfismos no Quadro 5. Já os haplótipos mundiais de *Ceratobasidium* sp. são apresentados no Quadro 6 e descritos quanto aos polimorfismos no Quadro 7.

As relações filogenéticas, baseadas em análise Bayesiana (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001), entre haplótipos da região ITS-5.8S do rDNA obtidos da amostra de distintos hospedeiros na Amazônia indicou que pelo menos quatro grupos de anastomose de *R. solani*, além do AG 2-2, estão associados com manchas foliares nos seguintes hospedeiros: o AG-1 IB em café e repolho; o AG ID em maracujá (isolado BEL59, de Belém), feijão, vindicá e pimenta-do-reino; o AG-2-2 em maracujá (isolados BEL88.1 e BEL88.2, de Benevides) e o AG-4 HGI em capim *Brachiaria*, abóbora, urucum e jambú (Quadro 8; Figura 4). Em citros, no Acre, detectou-se a ocorrência de um provável novo grupo de anastomose. A análise filogenética indicou posicionamento distinto dos haplótipos da região ITS-rDNA dos isolados de citros em relação aos demais AGs já descritos no mundo (Figura 4).

É a primeira vez que se descreve, no Brasil, a ocorrência do grupo de anastomose AG-1 ID em diversos hospedeiros.

Confirmou-se, também, pela análise filogenética (Figura 4) que os isolados de seringueira pertencem ao AG 2-2. Entretanto, estes ocuparam um ramo distinto aos dos AG-2-

2 IV, AG-2-2 LP e AG-2-2 IIIB. Isto é uma indicação de que, possivelmente, trata-se também de um novo grupo de anastomose dentro do complexo AG-2-2.

Basseto (2006), em seu trabalho de dissertação de Mestrado, por meio de análise Bayesiana, encontrou suporte para nomear os isolados de seringueira em um novo grupo de anastomose associado à mancha areolada da seringueira: o AG2-2 Hb.

Por análise Bayesiana das relações filogenéticas entre haplótipos da região ITS-5.8S de todos os grupos de anastomose de *Rhizoctonia* spp. binucleadas (*Ceratobasidium* sp.) confirmou-se que o isolado binucleado de *Rhizoctonia* sp. obtido de *Mimosa* sp. pertence ao mesmo clado do grupamento de anastomose AG-R (Figura 5). O haplótipo associado aos isolados de *Citrus* sp. não apresentou relação filogenética com quaisquer dos AGs de *Rhizoctonia* spp. binucleadas. A este novo grupo de anastomose de *R. solani* propomos a denominação temporária de AG-CT.

Quadro 4. Haplótipos mundiais de *Thanatephorus cucumeris* (grupos de anastomose de *Rhizoctonia solani* multinucleadas) determinados com base em polimorfismos detectados em seqüências de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA*.

Haplótipos mundiais (filogenia de <i>Thanatephorus</i>)	Freqüência	Grupo de anastomose	Código da seqüência	Isolados	Hospedeiro	Local de origem	Fonte de isolados ou depositário das seqüências**
H1	01	AG-8	AB000011	A68	-	Japão	S. Kuninaga
H2	01	AG-9	-				
H3	02	AG-12	AF153803	CH1	-	Australia, Sydney	E.J. Pope
		AG-12	AF153807	WDa	-	Australia, Sydney	E.J. Pope
H4	14	AG-1 IA	AB000010	1A A-10	-	Japão	S. Kuninaga
		AG-1 IA	DQ173048	AG-1 IArJ	Arroz	Japão, Tohoku	M. B. Ciampi
		AG-1 IA	AJ000199	IMI 360366	-	Reino Unido	A. Johanson
		AG-1 IA	AJ000200	IMI 360021	-	Reino Unido	A. Johanson
		AG-1 IA	AJ000197	IMI 358761	-	Reino Unido	A. Johanson
		AG-1 IA	AF308631	Cuba2	Feijao	EUA, Lincoln	G. Godoy-Lutz
		AG-1 IA	DQ173047	AG-1 IAmJ	Milho	Japão, Tohoku	M. B. Ciampi
		AG-1 IA	DQ173063	SJ047	Soja	Brasil	M. B. Ciampi
		AG-1 IA	AY270011	SJ067	Soja	Brasil, Goiania	R.C. Fenille
		AG-1 IA	DQ173064	SJ048	Soja	Brasil	M. B. Ciampi
		AG-1 IA	DQ301757	SJ057	-	Holanda	A.K. Nakatani
		AG-1 IA	AB000016	1A Cs-Gi	-	Japão	S. Kuninaga
		AG-1 IA	AB000017	1A Cs-Ka	-	Japão	S. Kuninaga
		AG-1 IA	AF354097	2Rs	Arroz	EUA	D. Gonzalez
H5	01	AG-1 IC	AF354058	3Rs	<i>Pinus</i>	Canada	D. Gonzalez
H6	01	AG-1 IA	AF354060	1Rs	Soja	EUA	D. Gonzalez
H7	01	AG-7	AF354100	91ST8057-2A RSA	Solo	EUA	D. Gonzalez
H8	03	Desconhecido	H38,H48, H52	H38, H48, H52	<i>Citrus</i> sp.	Brasil, Rio Branco	P. C. Ceresini
H9	01	AG-2-3	-				
H10	01	AG-5	-				
H11	01	AG-2-2 IIIB	-				
H12	08	Desconhecido	SER1_a, SER2_a, SER2_b, SER3_a, SER3_b, SER6, SER7, SER9	SER1, SER2, SER3, SER6, SER7, SER9	Seringueira	Brasil, Manaus	A. P.S. Campos
H13	02	Desconhecido	BEL88.1, BEL88.2	BEL88.1, BEL88.2	Maracujazeiro	Brasil, Belém	L. S. Poltroieri
H14	01	Desconhecido	SER1_b	SER1	Seringueira	Brasil, Manaus	A. P.S. Campos
H15	01	AG-2-2 IIIB	AB054858	65-L-2	-	Japão	S. Kuninaga
H16	02	AG-2-2 IV	AB000014	IV BC-10	-	Japão	S. Kuninaga
			AF354117	16Rs	Beterraba	Japão	D. Gonzalez
H17	01	AG-2-2 IV	-				
H18	01	AG-2-2 IIIB	AF354116	15Rs	Junco	Japão	D. Gonzalez
H19	01	AG-2-2 LP	AB054866	48R	-	Japão	S. Kuninaga
H20	01	AG-5	AF354112	19Rs	Soja	Japão	D. Gonzalez
H21	01	AG-11	-				
H22	01	AG-11	AB019027	ROTH25	-	Japão	S. Kuninaga
H23	02	AG-4 HGII	AB000045	HG-II UHBC	-	Japão	S. Kuninaga
			AF354074	7Rs	Alfalfa	EUA	D. Gonzalez
H24	01	AG-4 HGII	-				
H25	01	AG-4 KHGII	-				
H26	01	AG-2-3	AB019025	237258	-	Japão	S. Kuninaga
H27	02	AG-4 HGIII	AF354075	44Rs	Beterraba	EUA	D. Gonzalez
			AF354076	45Rs	Beterraba	EUA	D. Gonzalez
H28	01	AG-2	AB054879	758C	-	Japão	S. Kuninaga
H29	01	AG-6 HGI	AF354102	70Rs	Solo	Japão	D. Gonzalez
H30	01	AG-9 TX	-				
H31	01	AG-3 PT	-				

Haplótipos mundiais (filogenia de <i>Thanatephorus</i>)	Frequência	Grupo de anastomose	Código da seqüência	Isolados	Hospedeiro	Local de origem	Fonte de isolados ou depositário das seqüências**
H32	02	AG-3 TB AG-3 TB	AB000005 AF153774	1614 1600NC	- Tabaco	Japão EUA, Carolina do Norte	S. Kuninaga E.J. Pope
H33	01	AG-2-1 (2-t)	AB054852	R144	-	Japão	S. Kuninaga
H34	01	AG-10	-				
H35	01	AG-9 TP	AB000046	TP V12M	-	Japão	S. Kuninaga
H36	01	AG-9	AF354109	65Rs	Batata	EUA	D. Gonzalez
H37	01	AG-9 TX	AB000037	TX S4R1	-	Japão	S. Kuninaga
H38	01	AG-10	AB019026	76107	-	Japão	S. Kuninaga
H39	01	AG-6 HGI	-				
H40	01	AG-4 HGI	AB000018	HG-I GM-3	-	Japão	S. Kuninaga
H41	03	Desconhecido	BEL54, BEL64b, BEL66	BEL54, BEL64, BEL66	Capim <i>Brachiaria</i> , urucum, e jambú	Brasil, Belém	L. S Poltronieri
H42	03	Desconhecido	BEL62a, BEL62b , BEL64a,	BEL62, BEL64	Abóbora e urucum	Brasil, Belém	L. S. Poltronieri
H43	02	AG-1 IB	AB000025 AB000038	1B 001-7 1B SFBV-1	- -	Japão Japão	S. Kuninaga S. Kuninaga
H44	12	AG-1 ID AG-1 ID AG-1 ID AG-1 ID AG-1 ID AG-1 ID AG-1 ID AG-1 ID	AB122125 AB122131 AB122127 AB122130 AB122132 AB122126 AB122129 AG-11D e os desconhecidos BEL59, BEL60, BEL61, BEL71	RCP1 RCP15 RCP4 RCP13 RCP21 RCP3 RCP11 BEL59, BEL60, BEL61, BEL71	Café Café Café Café Café Café Café Maracujazeiro, feijão, vindicá, e pimenta-do-reino	Japão Japão Japão Japão Japão Japão Japão Belém, Brasil	M. Hyakumachi M. Hyakumachi M. Hyakumachi M. Hyakumachi M. Hyakumachi M. Hyakumachi M. Hyakumachi L. S.Poltronieri
H45	01	AG-1 ID	AB122128	RCP7	Café	Japão	M. Hyakumachi
H46	02	Desconhecido	BEL56a, BEL68	BEL56, BEL68	Café, repolho	Brasil, Belém	L. S. Poltronieri
H47	01	Desconhecido	BEL56b	BEL56	Cafe	Brasil, Belém	L. S.Poltronieri
H48	01	AG-1 IB	AB000039	1B SHIBA-1	-	Japão	S. Kuninaga
H49	01	AG-4 HGI	AB000007	HG-I 78-23R-3	-	Japão	S. Kuninaga
H50	01	AG-6 GV	-				
H51	01	AG-6 GV	AF354104	75Rs	Solo	Japão	D. Gonzalez
H52	02	AG-3 AG-3	AB000023 AB000024	OKA-6 PKA-9	- -	Japão Japão	S. Kuninaga S. Kuninaga
H53	01	AGBI	AB054873	TE2-4	-	Japão	S. Kuninaga
H54	01	AG-8	AF354069	(ZG1-4)88351	Cevada	Australia	D. Gonzalez
H55	01	AG-8	AF153795	93444.3	Solo	Australia	E.J. Pope
H56	01	AG-8	AF153799	93462	Solo	Australia	E.J. Pope
H57	03	AG-3 PT AG-3 PT AG-3 PT	AF354106 AF354107 AB019007	42Rs 5Rs 30983	Batata Batata -	EUA EUA Japão	D. Gonzalez D. Gonzalez S. Kuninaga
H58	01	AG-3 PT	AB019019	Scl-24	-	Japão	S. Kuninaga
H59	04	AG-8 AG-8 AG-8 AG-8	AF354067 AF153798 AF153797 AF153796	(ZG1-2)SA50 95399 92638 93444.4	Aveia Solo Solo Solo	Australia Australia Australia Australia	D. Gonzalez E.J. Pope E.J. Pope E.J. Pope

* Baseando-se num total de 114 sítios polimórficos, após exclusão de inserções / deleções presentes ao longo da seqüência.

** A. Johanson, Pest Management Department, Natural Resources Institute, Central Avenue, Chatham Maritime, Chatham, Kent, ME4 4TB, Reino Unido.

A. K. Nakatani, Comparative Genomics and Bioinformatics, Centraalbureau voor Schimmecultures-Fungal Biodiversity Center, Uppsalalaan 8, Utrecht 3584CT, Holanda.

A. P. S. Campos, UNESP - Campus de Ilha Solteira, Depto de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos, Ilha Solteira, SP, Brasil.

D. E. Gonzáles, Sistemática Vegetal, Instituto de Ecología, A. C., Km 2.5 Antigua Carretera a Coatepec, Xalapa, Veracruz 91000, México.

E. J. Pope, Department of Microbiology (G08), The University of Sydney, Sydney, New South Wales 2006, Australia.

G. Godoy-Lutz, Plant Pathology, University of Nebraska-Lincoln, 406 Plant Sciences Hall, Lincoln, NE 68583-0722, EUA.

L. S. Poltronieri, EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém, Para.

M. B. Ciampi, UNESP - Campus de Jaboticabal, Depto. Tecnologia, Jaboticabal, SP, Brasil

M. Hyakumachi, Gifu University, Faculty of Agriculture; Yanagido 1-1, Gifu, Gifu, 501-1193, Japão.

P. C. Ceresini, UNESP - Campus de Ilha Solteira, Depto de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos, Ilha Solteira, SP, Brasil; Swiss Federal Institute of Technology – ETHZ, Institute of Integrative Biology, LFW B28, 8092 Zurich, Switzerland.

R. C. Fenille, Ministério da Agricultura, Goiânia, Goiás, Brasil.

S. Kuninaga, Health Sciences University of Hokkaido; Tohbetu, 1757, Ishikari-gun, Hokkaido 061-0293, Japão.

Quadro 6. Haplótipos mundiais de *Ceratobasidium* spp. (*Rhizoctonia* spp. binucleadas)

determinados com base em polimorfismos detectados em seqüências de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA.

Haplótipos mundiais (filogenia de <i>Ceratobasidium</i>)	Frequência	Grupo de anastomose	Código da seqüência	Isolados	Hospedeiro	Local de origem	Fonte de isolados ou depositário das seqüências*
H1	02	AGA	AF354092	C-662	-	Japão	D. Gonzalez
		AGBo	AF354091	SIR-2	Batata doce	Japão	D. Gonzalez
H2	02	AG-L	DQ279047	-	-	Holanda	A. K Nakatani
		AG-L	AF354093	FK02-1	Solo	Japão	D. Gonzalez
H3	02	Desconhecido	MIM1a	MIM1	Mimosa	Brasil, Manaus	A.P.S. Campos
		Desconhecido	MIM1b				
H4	02	S	-			Japão	M.Hyakumachi
		CAG-7	AF354084	BN22	<i>Pittosporum</i>	EUA	D. Gonzalez
H5	01	AGR	AJ427407	-	<i>Cucumis</i> sp.	EUA, Georgia	V. Gonzalez
H6	01	E				Japão	M.Hyakumachi
H7	01	CAG-6	AF354083	BN74	<i>Erigeron</i>	EUA	D. Gonzalez
H8	01	AG-E	DQ279013	-	-	Holanda	A. K Nakatani
H9	01	AG-C	DQ279046	-	-	Holanda	A. K Nakatani
H10	01	C				Japão	M.Hyakumachi
H11	01	CAG-4	AF354081	BN38	Soja	EUA	D. Gonzalez
H12	03	Desconhecido	H038, H048, H052	H038, H048, H052	<i>Citrus</i> sp.	Brasil, Rio Branco	P. C. Ceresini
H13	01	Desconhecido	SER1_a	SER1	Seringueira	Brasil, Manaus	A.P.S. Campos
H14	01	AGD	AF354090	C-610	-	Japão	D. Gonzalez
H15	01	Q	-			Japão	M.Hyakumachi
H16	01	AG-Q	DQ279061	-	-	Holanda	A. K Nakatani
H17	01	CAG-1	AF354086	BN1	Gramado	EUA	D. Gonzalez
H18	01	AG-D	DQ279060	-	-	Holanda	A. K Nakatani
H19	01	I	-			Japão	M.Hyakumachi
H20	03	AGU	AB196666	MWR-22	<i>Rosa hybrida</i>	Japão	M.Hyakumachi
		AGU	AB196664	MWR-20	<i>R. hybrida</i>	Japão	M.Hyakumachi
		AGU	AB196665	MWR-24	<i>R. hybrida</i>	Japão	M.Hyakumachi
H21	01	P				Japão	M.Hyakumachi
H22	01	AG-P	DQ279015	-	-	Holanda	A. K Nakatani
H23	01	CAG-3	AF354080	BN31	Amendoim	EUA	D. Gonzalez
H24	01	F				Japão	M.Hyakumachi
H25	01	CAG-5	AF354082	BN37	Pepino	EUA	D. Gonzalez
H26	01	AG-F	DQ279014	-	-	Holanda	A. K Nakatani
H27	01	AG-I	DQ279064	-	-	Holanda	A. K Nakatani
H28	01	AG-Bb	AJ000193	IMI 375130	-	Reino Unido	A.Johanson
H29	01	AG-Bb	DQ279058	-	-	Holanda	A.K Nakatani
H30	01	AG-Ba	DQ279059	-	-	Holanda	A.K Nakatani
H31	01	AG-S	AJ427400	-	<i>Pittosporum</i> sp	EUA,Florida	V. Gonzalez
H32	01	G	-			Japão	M.Hyakumachi
H33	01	AG-G	DQ279049	-	-	Holanda	A. K Nakatani
H34	01	AGBa	AF354088	C-460	Arroz	Japão	D. Gonzalez
H35	01	AG-K	DQ279056	-	-	Holanda	A. K Nakatani
H36	01	AGQ	AF354095	C-620	Solo	Japão	D. Gonzalez
H37	01	AGO	AF354094	FK06-2	Solo	Japão	D. Gonzalez
H38	01	AG-O	DQ279045	-	-	Holanda	A. K Nakatani
H39	01	AGBo	DQ279057	-	-	Holanda	A. K Nakatani
H40	01	AGH	AF354089	STC-9	Solo	Japão	D. Gonzalez
H41	01	AGH	DQ279065	-	-	Holanda	A. K Nakatani
H42	03	AGT	AB196662	3Iba-1000	<i>R. odorata</i>	Japão	M.Hyakumachi
		AGT	AB196661	4Oit-800	<i>R. odorata</i>	Japão	M.Hyakumachi
		AGT	AB196663	1Fuk-600	<i>R. odorata</i>	Japão	M.Hyakumachi
	01	AGA	DQ279052	-	-	Holanda	A. K Nakatani

- * A. Johanson, Pest Management Department, Natural Resources Institute, Central Avenue, Chatham Maritime, Chatham, Kent, ME4 4TB, Reino Unido.
- A. K. Nakatani, Comparative Genomics and Bioinformatics, Centraalbureau voor Schimmecultures-Fungal Biodiversity Center, Uppsalaalaan 8, Utrecht 3584CT, Holanda.
- A. P. S. Campos, UNESP - Campus de Ilha Solteira, Depto de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos, Ilha Solteira, SP, Brasil.
- D. E. Gonzáles, Sistemática Vegetal, Instituto de Ecología, A. C., Km 2.5 Antigua Carretera a Coatepec, Xalapa, Veracruz 91000, México.
- M. Hyakumachi, Gifu University, Faculty of Agriculture; Yanagido 1-1, Gifu, Gifu, 501-1193, Japão.
- P. C. Ceresini, UNESP - Campus de Ilha Solteira, Depto de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos, Ilha Solteira, SP, Brasil; Swiss Federal Institute of Technology – ETHZ, Institute of Integrative Biology, LFW B28, 8092 Zurich, Switzerland.

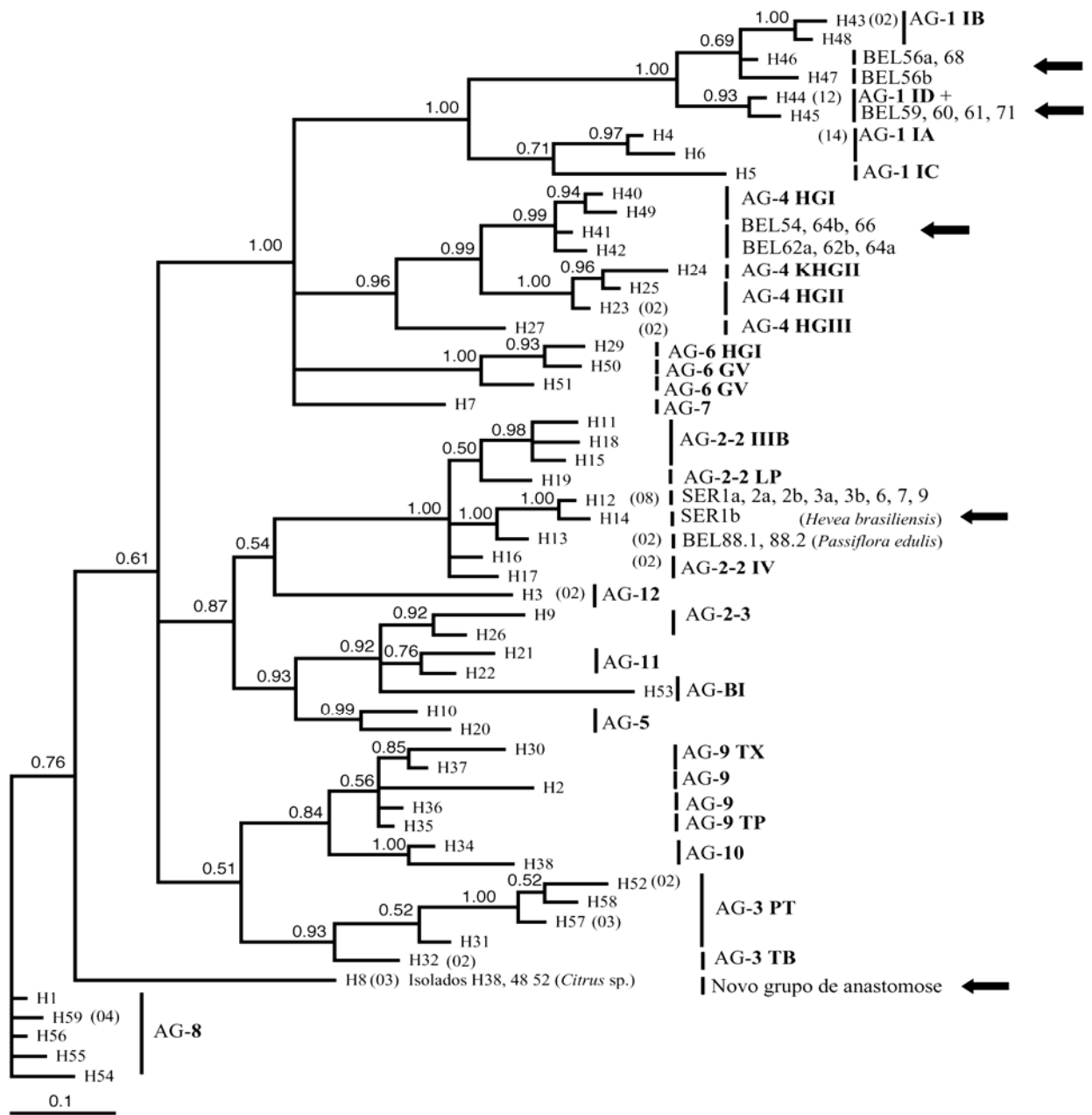


Figura 4.

Figura 4. Árvore filogenética ilustrando as relações entre haplótipos da região ITS-5.8S dos grupos de anastomose de *Rhizoctonia solani* (AG-1 a AG-12 e AG-BI) e o grupo de isolados de *R. solani* obtido de *Hevea brasiliensis*, *Citrus* sp., *Passiflora edulis* e diversas outras espécies cultivadas ou nativas na Amazônia brasileira. Estas relações são baseadas no modelo K80 + G de evolução de bases de DNA. Valores de probabilidades posteriores (variando de 0 a 1.0) geradas por análise Bayesiana de MCMCMC são apresentados para os ramos principais. Valores próximos a 1.0 indicam elevada significância estatística para o respectivo ramo, avaliada em 11542 árvores num total de 3 milhões de árvores artificialmente geradas. A árvore é do tipo não enraizada. Os táxons são identificados pelo código do haplótipo mundial seguido pelo número de amostras e respectivo grupo de anastomose. As seqüências da região ITS-5.8S da maioria dos diferentes grupos de anastomose utilizadas para inferir as relações filogenéticas são oriundas do GenBank® (NCBI). Os **Quadros 4 e 5** descrevem os haplótipos das seqüências da região ITS-rDNA e os isolados de origem ou grupo de anastomose. As setas em negrito indicam os haplótipos dos isolados que se buscou identificar.

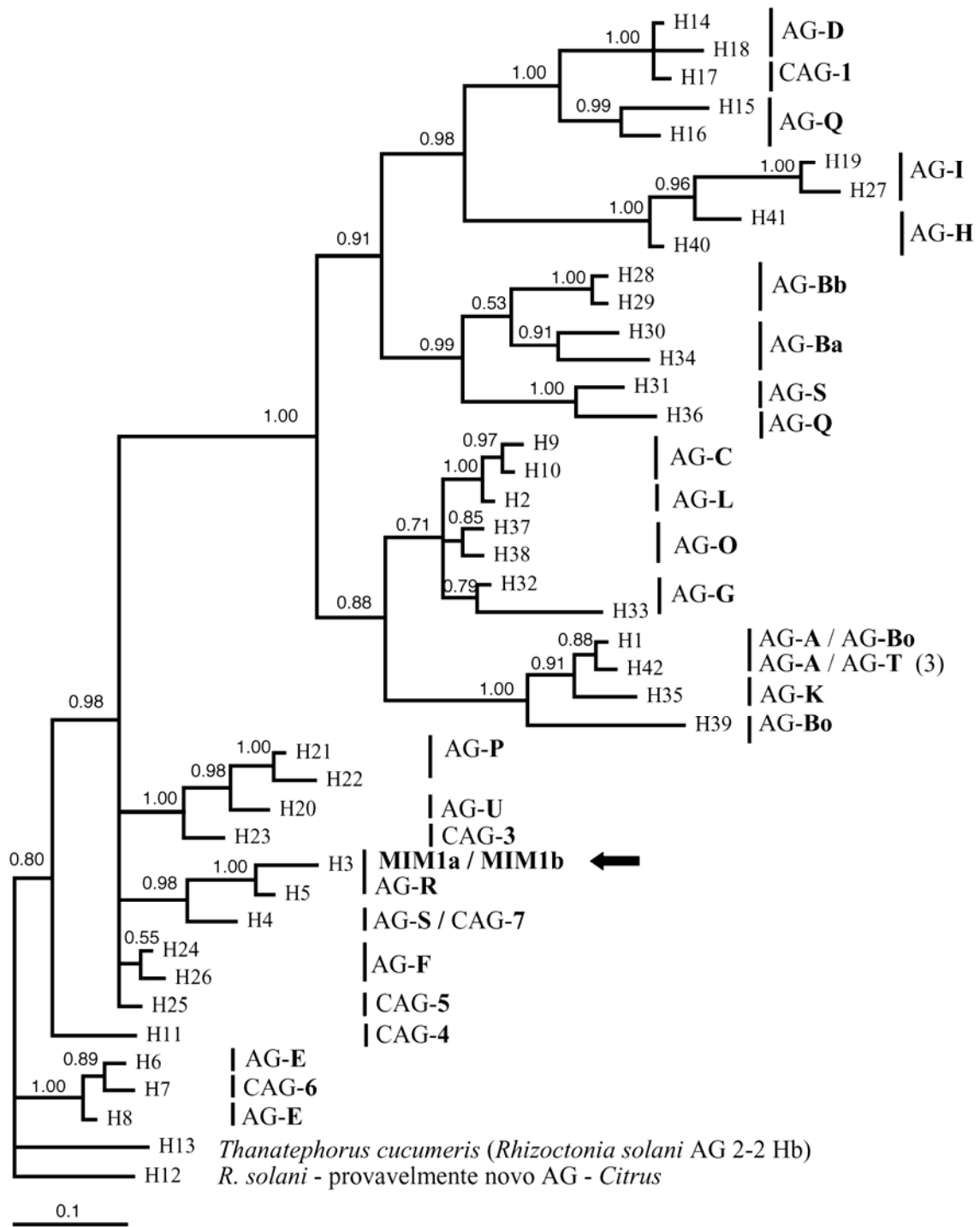


Figura 5.

Figura 5. Árvore filogenética ilustrando as relações entre haplótipos da região ITS-5.8S dos grupos de anastomose de *Ceratobasidium* sp. (*Rhizoctonia* sp. binucleadas AG-A a AG-U e CAG-1 a CAG-7) e o grupo de isolados de *Rhizoctonia* sp. binucleadas obtido de *Mimosa* sp., espécie nativa da Amazônia brasileira. Estas relações são baseadas no modelo HKY + G de evolução de bases de DNA. Valores de probabilidades posteriores (variando de 0 a 1.0) geradas por análise Bayesiana de MCMCMC são apresentados para os ramos principais. Valores próximos a 1.0 indicam elevada significância estatística para o respectivo ramo, avaliada em 11542 árvores num total de 3 milhões de árvores artificialmente geradas. A árvore foi enraizada com a seqüência da região ITS-5.8S de *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani* AG-2-2 da seringueira). Os táxons são identificados pelo código do haplótipo mundial de *Ceratobasidium* seguido pelo respectivo grupo de anastomose. As seqüências da região ITS-5.8S da maioria dos diferentes grupos de anastomose utilizadas para inferir as relações filogenéticas são oriundas do GenBank® (NCBI). Os **Quadros 6 e 7** descrevem os haplótipos das seqüências da região ITS-rDNA e os isolados de origem ou grupo de anastomose. A seta em negrito indica o haplótipo dos isolados que se buscou identificar.

Quadro 8. Relação de isolados de *Thanatephorus cucumeris* de espécies cultivadas ou nativas da Amazônia Ocidental e da Amazônia Oriental, caracterizados quanto ao grupamento de anastomose.

Isolados ^{a, b}	Data de isolamento	Hospedeiro, local de origem	Grupo de anastomose baseando-se em análise filogenética ^c
SER01	04/05/2003	Seringueira, Manaus	AG2-2
SER02	10/09/2003	Seringueira, Manaus	AG2-2
SER03	09/09/2003	Seringueira, Manaus	AG2-2
SER06	08/09/2003	Seringueira, Manaus	AG2-2
SER07	14/09/2003	Seringueira, Manaus	AG2-2
SER09	16/09/2003	Seringueira, Manaus	AG2-2
MIM1	04/05/2003	<i>Mimosa</i> spp., Manaus	AG-R
BEL54	24/08/2004	Capim <i>Brachiaria</i> , Paragominas	Próximo a AG-4 HGI
BEL56	19/08/2004	Café, Altamira	Próximo a AG-1 IB
BEL59	19/08/2004	Maracujá, Belém	AG-1 ID
BEL60	19/08/2004	Feijão, Tracateua	AG-1 ID
BEL61	19/08/2004	Vindicá, Belém	AG-1 ID
BEL62	23/09/2004	Abóbora, Belém	Próximo a AG-4 HGI
BEL64	01/12/2004	Urucum, Belém	Próximo a AG-4 HGI
BEL66	05/01/2003	Jambú (hortaliça folhosa), Santa Isabel	Próximo a AG-4 HGI
BEL68	23/09/2004	Repolho, Belém	Próximo a AG-1 IB
BEL71	13/01/2005	Pimenta-do-reino, Belém	AG-1 ID
BEL88.1	19/01/2005	Maracujá, Benevides	Próximo a AG-2-2 IV, porém em ramo distinto
BEL88.2			
H38	26/01/2005	Citros, Rio Branco	Ramo distinto de todos os demais AGs na árvore filogenética de <i>Rhizoctonia solani</i>
H48			
H52			

a. Isolados provenientes do Amazonas foram cedidos por Luadir. Gasparotto, Pesquisador da EMBRAPA- Amazônia Ocidental.

b. Fonte dos isolamentos de Belém, Pará: Dr. Luiz Sebastião Poltronieri, Pesquisador da EMBRAPA-Amazônia Oriental.

c. Determinado através da análise filogenética de seqüências da região ITS-5.8S do rDNA dos isolados de *Rhizoctonia solani* disponíveis (Figura 4 e 5).



Figura 6. Sintomas de mancha areolada em citros, sob condições naturais de Rio Branco, Acre.

6.6 Patogenicidade cruzada de isolados

No teste de patogenicidade cruzada à seringueira e à mimosa observou-se que todos os isolados de seringueira, quando inoculados em folhas de seringueira e mimosa, produziram sintomas característicos de mancha areolada e foliar respectivamente. O isolado oriundo de plantas de mimosa também produziu sintomas em folhas de seringueira e mimosa (Quadro 9 e Figura 7). Sintomas de mancha foliar de mimosa e de mancha areolada da seringueira, com infecção natural dos patógenos no Amazonas, podem ser observados na Figura 9.

Os isolados oriundos de uma série de hospedeiros distintos e pertencentes aos grupos de anastomose AG-1 IB e ID, AG-2-2, AG-4 HGI, bem como os isolados de citrus (de GA distinto em relação aos demais descritos para *R. solani* no mundo), também foram patogênicos à seringueira (Quadro 9). Os sintomas, semelhantes ao da mancha areolada, foram observados nas folhas do clone RRIM 600 de seringueira no 5º dia após a inoculação (Figura 8).

O reisolamento dos patógenos confirmou a sua atuação como agente casual da mancha areolada.

A seringueira hospeda não apenas um, mas sim vários grupos de anastomose de *R. solani* como agente causal da mancha areolada. Esses diferentes grupos de anastomose de *R. solani*, além de infectar plantas de seringueira, ocorrem também em diversas outras espécies vegetais, cultivadas ou nativas, o que implica em diversidade de fonte de inóculo para a sobrevivência e disseminação do patógeno da mancha areolada.

Estas informações trazem implicações importantes para o manejo da doença, especialmente para programas de melhoramento genético da cultura. Tais programas devem considerar as seguintes informações: a) Hoje, a mancha areolada é considerada a segunda enfermidade de maior importância para a seringueira na região Amazônica (CONDURÚ & STEIN, 1984); b) pelo presente trabalho, mais de um grupo de anastomose de *R. solani* é

capaz de infectar a seringueira. Portanto, dada o complexo de patógenos do grupo *Rhizoctonia* envolvidos com a mancha areolada, é necessário, selecionar variedades resistentes a mais de um grupo de anastomose.

Quadro 9. Relação de isolados de *Thanatephorus cucumeris* de espécies cultivadas ou nativas da Amazônia Ocidental e da Amazônia Oriental, caracterizados quanto a patogenicidade cruzada ao clone de seringueira RRIM 600 e em plantas de *Mimosa* spp.

Isolados ^{a, b}	Hospedeiro	Patogenicidade à seringueira	Patogenicidade à <i>Mimosa</i> spp.
SER01	Seringueira	+	+
SER02	Seringueira	+	+
SER03	Seringueira	+	+
SER06	Seringueira	+	+
SER07	Seringueira	+	+
SER09	Seringueira	+	+
MIM1	<i>Mimosa</i> spp.	+	+
BEL54	Capim <i>Brachiaria</i>	+	ND
BEL56	Café	ND	ND
BEL59	Maracujá	ND	ND
BEL60	Feijão	+	ND
BEL61	Vindicá	+	ND
BEL62	Abóbora	+	ND
BEL64	Urucum	+	ND
BEL66	Jambú (hortaliça folhosa)	+	ND
BEL68	Repolho	+	ND
BEL71	Pimenta-do-reino	+	ND
BEL88.1	Maracujá	+	ND
BEL88.2	Maracujá	+	ND
H38	Citrus	+	ND
H48	Citrus	+	ND
H52	Citrus	+	ND

a. Isolados provenientes do Amazonas foram cedidos por Luadir. Gasparotto, Pesquisador da EMBRAPA-Amazônia Ocidental.

b. Fonte dos isolamentos de Belém, Pará: Dr. Luiz Sebastião Poltronieri, Pesquisador da EMBRAPA-Amazônia Oriental.

Os símbolos + ou – indicam: (+) = Patogênico; (-) = Não Patogênico e ND = Não determinado a patogenicidade.

As parcelas experimentais foram repetidas cinco vezes e os experimentos foram repetidos duas vezes.

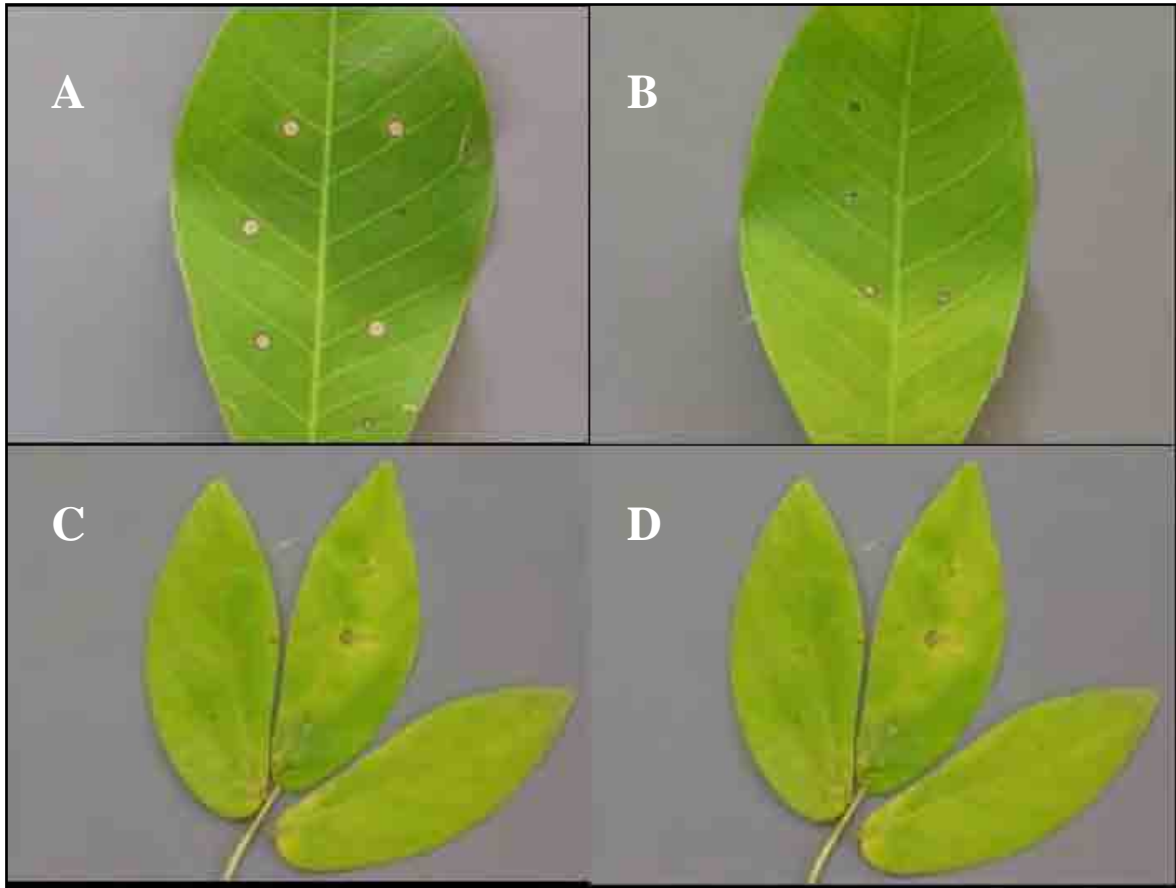


Figura 7. Sintomas de mancha areolada da seringueira com o isolados SR06 (A), MIM1 (B) e sintomas de mancha foliar em mimosa com os isolados SR06 (C) de *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) e MIM1 (D), de *Ceratobasidium* sp., cinco dias após a inoculação.

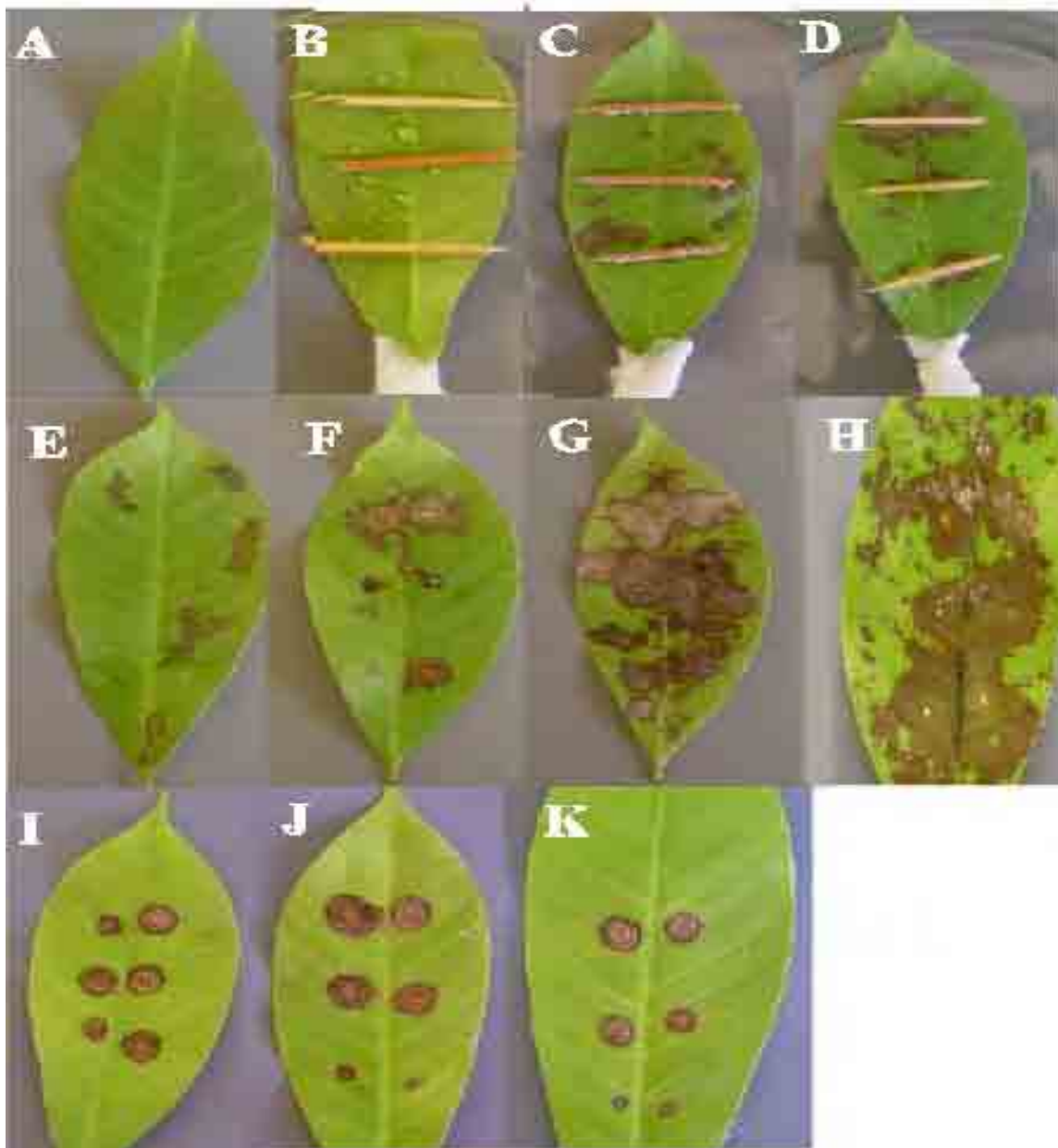


Figura 8. Sintomas de mancha areolada de *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) em folhas destacadas de seringueira, em condições de estufa incubadora. **A**, testemunha, sem palitos; **B**, testemunha com palitos; **C**, SER1 (seringueira, AG 2-2); **D** e **F**, BEL71 (pimenta-do-reino, AG 1 ID); **E**, BEL54 (capim *Brachiaria*, AG 4 HGI); **G**, BEL88.1 (maracujá, AG 2-2); **H**, BEL64 (urucum, AG 4 HGI); **I** (H38), **J** (H48) e **K** (H52) (*Citrus*, provavelmente um novo AG de *R. solani*).



Figura 9. Sintomas de mancha foliar de mimosa (A) e mancha areolada de seringueira (B), sob condições naturais do Amazonas. Material obtido de Luadir Gasparotto, Pesquisador Científico da EMBRAPA Amazônia Ocidental.

7. CONCLUSÕES

- 1) A hipótese de que isolados de *T. cucumeris* provenientes da região Amazônica, oriundos de seringueira, citros e outras espécies cultivadas ou nativas, pertencem a grupamentos de anastomose distintos foi aceita;
- 2) A seringueira, na Amazônia, pode hospedar além do grupo de anastomose de *R. solani* AG 2-2 (o mais frequentemente associado a mancha areolada), os seguintes grupos: AG-1 IB, AG-1 ID e AG-4 HGI;
- 3) Na Amazônia, em distintos hospedeiros, detectou-se os seguintes grupos de anastomose de *R. solani*: AG-1 IB em café e repolho; o AG-1 ID em maracujá, feijão, vindicá e pimenta-do-reino; AG 2-2 em maracujá e o AG-4 HGI em capim *Brachiaria*, abóbora, urucum e jambú;
- 4) Em citros, no Acre, detectou-se um novo grupo de anastomose de *R. solani* distinto dos demais relatados no mundo (AG-CT);

- 4) Detectou-se no Brasil, a primeira ocorrência do grupo de anastomose AG-1 ID em diversos hospedeiros;
- 5) Em seringueira, na região Amazônica, detectou-se um novo grupo de anastomose de *R. solani* dentro do complexo AG 2-2;
- 6) Na planta *Mimosa* spp., do Amazonas, detectou-se um isolado de *Rhizoctonia* spp. binucleado pertencente ao mesmo clado do grupo de anastomose AG-R;
- 7) Baseando-se nos testes de patogenicidade cruzada, aceitou-se a segunda hipótese de que isolados de *T. cucumeris* de hospedeiros distintos são patogênicos também à seringueira.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. C. Genetics of *Rhizoctonia* species. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE S.; NEATE, S.; DIJST, G. (Eds.). ***Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.101-116.

ALBUQUERQUE, F. C.; OLIVEIRA, A. F. F. Ocorrência de *Thanatephorus cucumeris* em feijão na região Transamazônica. **IPEAN**, Belém, 1973.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Bethesda, v.25, p.3389-3402, 1997.

AMORIM, D.S. **Elementos básicos de sistemática filogenética**. 2.ed. Ribeirão Preto: Holos, Editora e Sociedade Brasileira de Entomologia, 1997. 276 p.

AMORIM, D.S. **Fundamentos de sistemática filogenética**. 3.ed. Ribeirão Preto: Holos, Editora e Sociedade Brasileira de Entomologia, 2002. 156p.

ANDERSEN, T.F. A comparative taxonomic study of *Rhizoctonia* sensu lato employing morphological, ultra-structural and molecular methods. **Mycologia**, New York, v.100, 1996, p.1117-1128.

ANDERSON, N.A. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.20, p.329-374, 1982.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L.; INÁCIO, C.A. Princípios, estratégias e técnicas modernas para a taxonomia. In: AZEVEDO, J.L.; VAZOLLER, R.F. **Taxonomia microbiana**. Piracicaba, 31p. Disponível em: <<http://www.cria.org.br/cgee /documentos/microtax.doc>>. Acesso em: 20 mar. 2006.

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

BOLKAN, H. A.; RIBEIRO, W. R. C. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v.69, n.7, p.599-601, 1985.

CARBONE, I.; ANDERSON, J.B.; KOHN, L. Patterns of descent in clonal lineages and their multilocus fingerprints are resolved with combined gene genealogies. **Evolution**, v. 52, p. 11-21, 1999.

CARBONE, I.; KOHN, L.M. A microbial population-species interface: nested cladistic and coalescent inference with multilocus data. **Molecular Ecology** , Oxford, v.10, p. 947-964, 2001.

CARBONE, I.; KOHN, L.M. Inferring process from pattern in fungal population genetics. **Applied Mycology & Biotechnology**, Fungal Genomics, England, v. 4, p.30, 2004.

CARLING, D.E.; LEINER, R.H. Virulence of isolates of *Rhizoctonia solani* AG-3 collected from potato plant organs and soil. **Plant Disease**, Saint Paul, v.74, p.901-903, 1990.

CARLING, D.E.; LEINER, R.H.; KEBLER, K.M. Characterization of a new anastomosis group (AG-9) of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.77, p.1609-12, 1987.

CARLING, D. E.; SUMNER, D. R. *Rhizoctonia*. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1992. p.157-165.

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

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

CARPENTER, J. B. Plant pathology in the Division of Rubber Plant Investigations. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 190, Supl., p.60-66, 1950.

CARPENTER, J.B. **Target leaf spot of the Hevea rubber tree in relation to host development, infection, defoliation and control.** Washington: USDA, p.34, 1951. (Technical Bulletin, 1028).

CERESINI, P. C.; SOUZA, N. L. Associação de *Rhizoctonia* spp. binucleadas e de *R. solani* Kuhn GA 4 HGI e GA 2-2 III B ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.23, p.14-23, 1997.

CHEE, K. H.; WASTIE, R. L. The status and future prospects of rubber diseases in tropical America. **Review of Plant Pathology**, Farnham Royal, v.59, p.541-548, 1980.

CONDURÚ, J.M.H.; STEIN, R.L.B. Doenças da seringueira. In: CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM HEVEICULTURA, 14, 1984, Belém. **Curso de Especialização em Heveicultura...** Belém: [s.n], 1984a. v.1. p.1-2.

CONDURÚ, J.M.H.; STEIN, R.L.B. Doenças da seringueira. In: CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM HEVEICULTURA, 14, 1984, Belém. **Curso de Especialização em Heveicultura...** Belém: [s.n], 1984b. v.2. p.16-17.

COSTA-SOUZA, E.; BASSETO, M. A.; TAKADA, H. M., ZALA, M.; CERESINI, P. C.

Associação de *Ceratobasidium noxium* à queima-do-fio e reação do caquizeiro ao patógeno.

Summa Phytopathologica, Botucatu, v.32, Supl., p.S.77, 2006.

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

Phytopathology, St. Paul, v.87, p.480-484, 1997.

DESLANDES, J.A. Observações fitopatológicas na Amazônia. **Boletim Fitossanitário**, Rio de Janeiro, v.1, p.223-228, 1944.

DOOLITTLE, R.F.; FENG, D.F.; TSANG, S.C.G.; LITTLE, E. Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. **Science**, v.271, p. 470-477, 1996.

FAWCETT, G.L. *Pellicularia koleroga* on coffe in Puerto Rico. **Jornal of Agricultural Research**, Washington, v.2, p.231-233, 1914.

FENILLE, R. C. **Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado à soja no Brasil**. Botucatu, 2001. 138f. Tese (Doutorado em Concentração em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

FENILLE, R. C.; SOUZA, N. L.; KURAMAE, E. E. Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.108, p.783-792, 2002.

FERREIRA, F. A.; GASPAROTTO, L. Principais doenças florestais no Brasil. **Patologia Florestal**, Viçosa, v.1, p.326-332, 1989.

FURTADO, E.L. Doenças do chá. 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.257-260.

GASPAROTTO, L.; TRINDADE, D.R.; LIEBEREI, R. Sistema de avaliação da incidência da mancha areolada [*Thanatephorus cucumeris* (FRANK) DONK] em seringueira (*Hevea* spp.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.7, p.349-357, 1982.

GASPAROTTO, L.; FERREIRA, F. A.; LIMA, M. I. P. M.; PEREIRA, J. C. R.; SANTOS, A. F. **Enfermidades da seringueira no Brasil**. Manaus: EMBRAPA-CPAA, p.59-71, 1990. (Circular técnica 3).

GASPAROTTO, L.; SANTOS, A.F.; PEREIRA, J.C.R.; FERREIRA, F.A. **Doenças da seringueira no Brasil: mancha areolada**. Brasília: Embrapa - SPI; Manaus: Embrapa - CPAA, 1997. 168p.

GASPAROTTO, L.; HANADA, R. E.; ALBUQUERQUE, F. C.; LOURD, M. Mancha areolada causada por *Thanatephorus cucumeris* em mogno africano. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.26, p.660-661, 2001.

GOLDSTEIN, D.B.; LINARES, A.R.; CAVALLI-SFORZA, L.L.; FELDMAN, M.W. Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.92, p. 6723-6727, 1995.

GONZALES, D.; CARLING, D.E.; KUNINAGA, S.; VILGALYS, R.; CUBETA, M.A. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. **Mycologia**, New York, v.93, p.1138-1150, 2001.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, California, v.8, p.195-202, 1998.

GUTIERREZ, W.A.; SHEW, H.D.; MELTON, T.A. Sources of inoculum and management for *Rhizoctonia solani* damping-off on tobacco transplants under greenhouse conditions. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, p.S35, 1998.

HERR, L.J.; ROBERTS, D.L. Characterization of *Rhizoctonia solani* populations obtained from sugar beet fields with differing soil textures. **Phytopathology**, St. Paul, v.70, p.476-480, 1980.

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

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F.; MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, New York, v.17, p.754-755. 2001.

JAMES, T.Y.; MONCALVO, J.M.L.S.; VILGALYS R. Polymorphism at the ribosomal DNA spacers and its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*. **Genetics**, Austin, v.157, p.149-161, 2001.

JOHNK, J.S.; JONES, K. Characterization of *Rhizoctonia solani* by analysis of cellular fatty acids. **Phytopathology**, Saint Paul, v.83, p.278-83, 1993.

KUMAR, S.; RZHETSKY, A. Evolutionary relationships of eukaryotic Kingdoms. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.42, p.183-193, 1996.

KUNINAGA, S.; CARLING, D. E. Comparison of isolates of *Rhizoctonia solani* AG-2 and AG-BI based on anastomosis reactions, rDNA sequence analysis and pathogenic potential. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON RHIZOCTONIA, 3, 2000, Taichung. **Abstracts...** Taichung: Internacional Symposium on *Rhizoctonia*, 2000, p.23.

KURAMAE-IZIOKA, E.E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista UNIMAR**, Marília, v.19, p.683-689, 1997.

LIU, Z.; SINCLAIR, J.B. Isolates of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2-2 pathogenic to soybean. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, p.682-7, 1991.

LOURD, M.; BRAZ, M.L.A.; GASPAROTTO, L. Ocorrência da mancha areolada em citrus no município de Manaus-AM. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.9, p.135, 1984.

LYNCH, M. The age and relationships of the major metazoan phyla. **Evolution**, Lancaster, v.53, p.319-325, 1999.

MARCO, A.B. **Mancha areolada da seringueira (*Hevea brasiliensis*) na Amazônia: Evolução do Patógeno (*Thanatephorus cucumeris* / *Rhizoctonia solani* grupo de anastomose AG2-2 Hb) num Patossistema tropical**. Ilha Solteira, 2006. 45f. Dissertação (Mestrado em Sistema de Produção) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista.

MIYAKI, C.Y.; RUSSO, C.A.M.; PEREIRA, S.L. Reconstrução filogenética: introdução e o método da máxima parcimônia. In: MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. cap.9, p. 97-107.

NAITO, S.; MOCHIDA, H.; NAKAJIMA, T.; OHTO, Y. Infection with basidiospores of *Thanatephorus cucumeris* (AG-2-3 of *Rhizoctonia solani*) and development of soybean foliar blight lesions. **Annals of Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v.61, p.362-368, 1995.

NAITO, S. Basidiospore dispersal and survival. In: SNEH, B. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (Ed.). ***Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. Dordrecht: Kluwer Academic, p.197-205, 1996.

NEI, M.; TAKEZAKI, N. The root of the phylogenetic tree of human populations. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.13, p.170-177, 1996.

OGOSHI, A. & UI, T. Specificity in vitamin requirement among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. **Annals of Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v 45, p.47-53, 1979.

OGOSHI, A. Studies on the grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn with hyphal anastomosis, and on the perfect stage of groups. Bull. Ser. C., nº. 3. Natl. Inst. Agric. Sci., Tokyo, Japan. 1976 apud CARLING, D.E.; LEINER, R.H.; KEBLER, K.M. Characterization of a new anastomosis group (AG-9) of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v.77, p. 1609-1612, 1987.

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

PAPAVERO, N.; J. LLORENTE-BOUSQUET. Principia Taxonomica: una introducción a los fundamentos lógicos, filosóficos y metodológicos de las escuelas de taxonomía biológica. v. IV: el sistema natural y otros sistemas, reglas, mapas de afinidades y el advenimiento del tiempo en las clasificaciones: Bufón, Adanson, Maupertuis, Lamarck y Cuvier. **Universidad Nacional Autónoma de México**, México, 1994.

PEREIRA, R. DE C.A.; LEDO, F.J. DA S.; BERGO, C.L., SIVIERO, A. Evaluation of arabica and robusta coffee genotypes in western Amazonia. **Acta Amazonica**, Manaus, v.30, n.4, p.535-541, 2000.

PEREIRA, R.A.; TAKADA, H.M.; RIBEIRO, I.J.A.; BUENO, S.C.S.; YANAGISAWA, S.S.; FREIRE, I.L.C.; SANTOS, M.C.; THIMOTEO, V.S. Registro da queima dos fios (*Ceratobasidium* sp.) em caqui (*Diospyros kaki*) no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, n.36, v.28, Supl., p. 156, 2003. (Resumos).

POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; BENCHIMOL, R. L. Web blight (*Thanatephorus cucumeris*) on passion fruit in the state of Pará, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.24, p.92, 1999.

POSADA, D.; CRANDALL, K.A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, New York, USA, v.14, p.817-818, 1998.

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

RUSSO, C.A.M.; MIYAKI, C.Y. Reconstrução filogenética: Métodos geométricos. In: MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. cap.10, p. 108-116.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. cold spring harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987. 417p.

SATTA, Y.; KLEIN, J.; TAKAHATA, N. DNA archives and our nearest relative: the trichotomy problem revisited. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v.14, p.259-275, 2000.

SWOFFORD, D.L. **Phylogenetic Analysis Using Parsimony – PAUP**. Versão 4.0. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 128p.

SILVEIRA, S. F.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; SUTTON, J. C. Characterization of *Rhizoctonia* species associated with foliar necrosis and leaf scorch of clonally-propagated *Eucalyptus* in Brasil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.106, p.27-36, 2000.

SNEH, B.; ADAMS, G.C. **Culture preservation methods for maintaining genetic integrity of *Rhizoctonia spp.* isolates**. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (Ed.) *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Dordrecht: Kluwer academic, 1996. p.139-146.

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

TAYLOR, J.M.; JACOBSON, D.J.; FISHER, M.C. The evolution of asexual fungi: Reproduction, Speciation and Classification. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.37, p.197-246, 1999.

TRINDADE, D.R.; POLTRONIERI, L.S.; ALBUQUERQUE, F.C. Mancha areolada causada por *Thanatephorus cucumeris* em Laranjeiras no Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.22, p.115, 1997.

TRINDADE, D.R.; FURTADO, E.L. Doenças da seringueira. 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.628-641.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Bethesda, v.25, p.4876-4882, 1997.

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

VILGALYS, R. Genetic relatedness among anastomosis groups in *Rhizoctonia* as measured by DNA/DNA hybridization. **Phytopathology**, St. Paul, v.78, p.698-702, 1988.

VILGALYS, R.; CUBETA, M.A. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.23, p. 135-155, 1994.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J.; (Ed). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p.315-322.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v.87, p. 4576-4579, 1990.