

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

**CARACTERIZAÇÃO CITOMORFOLÓGICA, CULTURAL,
MOLECULAR E PATOGÊNICA DE *Rhizoctonia solani* KÜHN
ASSOCIADO À SOJA NO BRASIL**

ROSELI CHELA FENILLE

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

BOTUCATU – SP
Fevereiro – 2001

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

**CARACTERIZAÇÃO CITOMORFOLÓGICA, CULTURAL,
MOLECULAR E PATOGÊNICA DE *Rhizoctonia solani* KÜHN
ASSOCIADO À SOJA NO BRASIL**

ROSELI CHELA FENILLE

Orientador: Prof. Dr. Nilton Luiz de Souza

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

BOTUCATU – SP
Fevereiro – 2001

**A DEUS,
AGRADEÇO**

*Ao meu pai **José Carlos** (in memoriam)*

OFEREÇO

*Á minha querida mãe **Adelina** e
ao meu padrasto **João Francisco**, pelo amor
e incentivo, tornando possível esta conquista,*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nilton Luiz de Souza pela orientação, incentivo, confiança e amizade tão importantes ao longo destes anos;

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

À Dra. Eiko Eurya Kuramae, pela inestimável colaboração na realização das análises moleculares descritas nesta tese, incentivo, confiança e amizade;

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Ceresini (Departamento de Biologia, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP), pela concessão dos isolados padrões dos grupos de anastomose e pelos esclarecimentos indispensáveis na execução dos experimentos;

Aos pesquisadores J. B. Sinclair (Universidade de Illinois, Urbana-Champaign, EUA), A. Ogoshi (Hokkaido University, Sapporo, Japão), L. J. Herr (The Ohio State University, Wooster, EUA), S. Naito (Tohoku National Agricultural Experiment Station, Morioka, Japão) e M. A. Cubeta (Duke University, North Carolina, EUA), pela concessão dos isolados padrões dos grupos de anastomose;

Ao pesquisador Dr. José Tadashi Yorinori (CNPSo - EMBRAPA) pela concessão de isolados do fungo analisados neste trabalho;

Ao Eng. Agr. Leandro Mussi pelo envio de material vegetal doente, que foi empregado na obtenção de isolados do fungo;

Ao meu Prof. de inglês e amigo Vital Water, pela revisão do summary;

Aos professores e funcionários do Departamento de Produção Vegetal – Setor Defesa Fitossanitária, pela receptividade;

Aos pós-graduandos e estagiários pela amizade e companheirismo: Luciana, Denise, César, Maurício, Janaína, Vicente, Ângelo, Malu e Rosa;

Às queridas amigas Aldenise, Ana Paula, Jaqueline, Graciela, Rita, Natália, Andrea e Cidinha, pelos momentos agradáveis, companheirismo e grande carinho;

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

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

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	X
1 RESUMO.....	1
2 SUMMARY.....	3
3 INTRODUÇÃO.....	5
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	8
4.1 Taxonomia do gênero <i>Rhizoctonia</i>	8
4.2 Classificação e caracterização de <i>Rhizoctonia solani</i>	10
4.3 Importância de <i>Rhizoctonia solani</i> como patógeno.....	21
4.4 Importância da identificação de grupos de anastomose.....	26
4.5 Aplicação da biologia molecular em estudos de grupos de anastomose de <i>Rhizoctonia solani</i>	31
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
5.1 Estabelecimento de coleção de isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp. da soja e manutenção de culturas.....	37
5.1.1 Isolamento a partir de tecidos vegetais infectados.....	37
5.1.2 Coleção de isolados.....	38
5.1.3 Preservação dos fungos.....	40
5.2 Determinação de características citológicas específicas de <i>Rhizoctonia</i> spp. e <i>Rhizoctonia solani</i>	42
5.2.1 Número médio de núcleos por célula.....	42

	Página
5.3 Caracterização de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> com relação ao grupamento de anastomose.....	43
5.4 Determinação de características culturais de <i>Rhizoctonia solani</i>	45
5.4.1 Temperaturas mínima, ótima e máxima para crescimento micelial.....	45
5.4.2 Temperatura letal.....	45
5.4.3 Requerimento de tiamina.....	47
5.4.4 Produção de escleródios.....	48
5.5 Formação da fase teleomórfica.....	49
5.6 Patogenicidade de <i>Rhizoctonia solani</i> à soja.....	49
5.7 Caracterização dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> por marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	53
5.7.1 Extração de DNA total.....	53
5.7.2 Reações de RAPD.....	55
5.8 Análise dos resultados.....	56
6 RESULTADOS.....	58
6.1 Estabelecimento de coleção de isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp. da soja	58
6.2 Determinação de características citológicas específicas de <i>Rhizoctonia</i> spp. e <i>Rhizoctonia solani</i>	58
6.2.1 Número médio de núcleos por célula.....	59
6.3 Caracterização de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> com relação ao grupamento de anastomose.....	62

	Página
6.4 Determinação de características culturais de <i>Rhizoctonia solani</i>	68
6.4.1 Temperaturas mínima, ótima e máxima para crescimento micelial.....	68
6.4.2 Temperatura letal.....	71
6.4.3 Requerimento de tiamina.....	73
6.4.4 Produção de escleródios.....	75
6.5 Formação da fase teleomórfica.....	79
6.6 Patogenicidade de <i>Rhizoctonia solani</i> , dos grupos AG-1 IA, AG-2-2 IIIB e AG-4, à soja.....	82
6.7 Caracterização dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> por marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	89
7 DISCUSSÃO.....	97
8 CONCLUSÕES.....	112
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
1 Características de grupos de anastomose de <i>Rhizoctonia solani</i>	16
2 Relação de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Rhizoctonia</i> spp. de soja, mantidos na micoteca do Departamento de Produção Vegetal – Setor Defesa Fitossanitária, FCA, UNESP, Botucatu-SP.....	39
3 Relação de grupos de anastomose de <i>Rhizoctonia solani</i> mantidos na micoteca do Departamento de Produção Vegetal – Setor Defesa Fitossanitária, FCA, UNESP, Botucatu-SP.....	41
4 Grupos de anastomose de <i>Rhizoctonia solani</i> relatados como patógenos em soja..	44
5 Análise química dos solos utilizados no experimento.....	50
6 Seqüência dos ‘primers’ usados em reações de RAPD para determinar similaridade genética entre isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> listados no Quadro 2 e grupos de anastomose padrões.....	55
7 Condição nuclear de isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp. de soja.....	60
8 Reação de anastomose de hifas entre isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> , obtidos de soja no Brasil, com os isolados AG-4 HGI, AG-4 HGII, AG-4 HGIII e AG-2-2 IIIB.....	65
9 Reação de anastomose de hifas entre isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> , obtidos de soja no Brasil, com o isolado AG-1 IA.....	67
10 Temperaturas mínima, máxima e ótima para crescimento micelial e, taxa máxima de crescimento micelial (TMCM), na temperatura ótima, de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> de soja e de isolados de grupos de anastomose padrões.....	70

Quadro	Página
11 Temperatura letal à sobrevivência de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> de soja e isolados padrões de grupos de anastomose, em função da idade das culturas.....	72
12 Requerimento de tiamina para crescimento micelial apresentada por isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> dos grupos de anastomose AG-1 IA e AG-2-2 IIIB em função do pH do meio de cultura.....	73
13 Requerimento de tiamina para crescimento micelial apresentada por isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> de soja e por isolados dos grupos de anastomose AG-1 IA, AG-2-2 IIIB, AG-4 HGI e AG-4 HGII.....	74
14 Comparação das estruturas sexuais de <i>Thanatephorus cucumeris</i> entre grupos de anastomose de <i>Rhizoctonia solani</i>	80
15 Reação da soja cv. FT Cristalina a isolados de <i>R. solani</i> dos AG-2-2 IIIB e AG-4, em solo com diferentes valores de pH.....	82
16 Reação da soja cv. Xingu a isolados de <i>R. solani</i> do AG-1 IA, sob condições de casa de vegetação.....	85
17 Reação da soja cv. Xingu a isolados de <i>R. solani</i> do AG-1 IA, em inoculação em folhas destacadas.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Condição nuclear de isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp. de soja, A e B – binucleado; C e D - multinucleado (n – núcleo; s – septo; x 300).....	61
2 Distribuição das células quanto ao número de núcleos, em isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> de soja.....	62
3 Aspecto cultural de isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp. obtidos de soja e tipo de escleródios produzidos. A – isolado binucleado; B – isolado SJ 02; C – isolado SJ 01; D e E – escleródios tipo ‘sasakii’ produzidos pelo isolado SJ 19; F – escleródios tipo ‘sasakii’ produzidos pelo isolado padrão AG-1 IA - H5-519.....	64
4 Anastomose de hifas (região indicada) entre isolados de <i>Rhizoctoni solani</i> de soja e isolados padrões dos grupos de anastomose [A (x 400)- SJ 02 x AG-4 HGI; B (x 200)- SJ 03 x AG-4 HGI; C (x 200)- SJ 01 x AG-4 HGII; D (x 200)- SJ 05 x AG-4 HGI; E (x 200)- SJ 29 x AG-1 IA]. A – reação do tipo C3; B-E – reações do tipo C2.....	66
5 Porcentagem e viabilidade dos escleródios por classe de tamanho, produzidos pelos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> de soja e padrão, pertencentes ao AG-4....	76
6 Porcentagem e viabilidade dos escleródios por classe de tamanho, produzidos pelos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> de soja e padrão, pertencentes ao AG-2-2 IIIB.....	77

Figura	Página
7 Porcentagem e viabilidade dos escleródios por classe de tamanho, produzidos pelos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> de soja e padrão, pertencentes ao AG-1 IA.....	78
8 Estruturas sexuais de <i>Thanatephorus cucumeris</i> (anamorfo <i>Rhizoctonia solani</i>). A (x 200)– início da formação de himênio; B (x 200) e C (x 400) – himênio; D e E (x 400)- basídias com basidiósporos presos aos esterígmata; F (x 400)– basidiósporos, alguns germinando; G (x 400)– basídia somente com esterígmata (b – basidiósporo; ba – basídia; es – esterígmata; tg – tubo germinativo).....	81
9 Infecção em plântulas de soja cv. FT-Cristalina causada por <i>Rhizoctonia solani</i> (A – isolado do AG-2-2 IIIB; B e C – isolados do AG-4). A plântula da esquerda, nas três figuras, é proveniente de tratamento sem inoculação.....	83
10 Distribuição dos isolados de <i>R. solani</i> do AG-1 IA em relação ao índice de severidade em soja cv. Xingu, sob diferentes condições de inoculação.....	87
11 Infecção em folhas de soja cv. Xingu causadas por isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA (A e B: inoculação em folhas destacadas; C: inoculação em planta inteira em casa de vegetação; ni – folha não inoculada).....	88
12 Padrão de bandas gerado pelo polimorfismo de DNA amplificado ao acaso com o ‘primer’ OPP-15, entre isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> . MW – marcador molecular Ladder 1kb, 1=SJ01, 2=SJ02, 3=SJ03, 4=SJ05, 5=SJ07, 6=AG-2-2 IIIB, 7=AG-4 HGI, 8=AG-4 HGII, 9-70=SJ13-SJ80 (Quadro 2), 71=AG-1 IA.	90

Figura	Página
13 Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, baseado no Coeficiente Simple Matching, a partir das bandas obtidas por RAPD com os ‘primers’ OPA-09, OPA-13, OPP-12 e OPP-15, em análises de isolados de <i>R. solani</i> de soja e isolados padrões de grupos de anastomose.	91
14 Padrão de bandas gerado pelo polimorfismo de DNA amplificado ao acaso com os ‘primers’ OPP-03 e OPP-11, entre isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> . MW – marcador molecular Ladder 1kb, 1=SJ 01, 2=SJ 02, 3=SJ 03, 4=SJ 05, 5=AG-4 HGI, 6=AG-4 HGII e 7=AG-4 HGIII.....	92
15 Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, baseado no Coeficiente Simple Matching, a partir das bandas obtidas por RAPD com os ‘primers’ OPP-03, OPP-10, OPP-11, OPP-14, OPP-17, OPP-18 e OPP-19, em análises de isolados de <i>R. solani</i> de soja e isolados padrões de grupos de anastomose.....	93
16 Padrão de bandas gerado pelo polimorfismo de DNA amplificado ao acaso com os ‘primers’ OPP-15 e OPA-13, entre isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> . MW – marcador molecular Ladder 1kb, 1=SJ 07, 2=AG-2-1, 3=AG-2-2 IIIB, 4=AG2-2 IV e 5=AG-2-3.....	94
17 Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, baseado no Coeficiente Simple Matching, a partir das bandas obtidas por RAPD com os ‘primers’ OPA-13, OPP-12, OPP-15 e OPP-17, em análises de isolados de <i>R. solani</i> de soja e isolados padrões de grupos de anastomose.....	94

Figura	Página
18 Padrão de bandas gerado pelo polimorfismo de DNA amplificado ao acaso com o 'primer' OPP-17, entre isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> . MW – marcador molecular Ladder 1kb, 1=SJ16, 2=SJ19, 3=SJ20, 4=SJ24, 5=SJ26, 6=SJ28, 7=SJ34, 8=SJ50, 9=SJ57, 10=SJ67, 11=AG-1 IA, 12=AG-1 IB e 13=AG-1 IC	95
19 Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, baseado no Coeficiente Simple Matching, a partir das bandas obtidas por RAPD com os 'primers' OPA-09, OPA-13, OPP-14 e OPP-17, em análises de isolados de <i>R. solani</i> de soja e isolados padrões de grupos de anastomose.....	96

1 RESUMO

Rhizoctonia solani representa um patógeno de importância econômica mundial nas áreas de cultivo da soja. Pode estar associado a vários sintomas como tombamento, podridão de raízes e hipocótilos e mela ou requeima da soja. No Brasil, os níveis de danos pela mela em soja variam de 31 a 60%, em lavouras dos Estados do Norte e Nordeste. *R. solani* está dividido em 14 grupos de anastomose (AG), que diferem quanto aos aspectos culturais, virulência e fisiologia. Desta forma, objetivou-se caracterizar AG de *R. solani* associados à soja no Brasil. Dentre 73 isolados analisados quanto a condição nuclear, 6 foram binucleados e 67 multinucleados. Os isolados multinucleados (*R. solani*) foram caracterizados através de anastomose de hifas, temperaturas limites para crescimento micelial, requerimento de tiamina, temperatura letal, produção de escleródios e comparações por RAPD. Através de anastomose de hifas, 4 isolados causadores de tombamento e podridão de hipocótilos foram caracterizados como AG-4. Análises de RAPD permitiram verificar que três, desses quatro isolados, pertenciam ao AG-4 HGII, e o outro ao AG-4 HGI. Através da fusão de hifas com AG-2-2 IIIB, crescimento a 35°C e auxotrofismo para tiamina, foi

caracterizado um isolado, causador de tombamento e podridão de raízes e hipocótilos. Sessenta e dois isolados, causadores de mela, realizaram anastomose de hifas com o AG-1 IA apresentando em média 19,3 mm/dia de crescimento radial , formando escleródios tipo ‘sasakii’, característicos desse subgrupo. O enquadramento desses isolados no subgrupo IA foi confirmado pela análise de RAPD entre os isolados de *R. solani* de soja e padrões dos subgrupos do AG-1. Estruturas sexuais de *Thanatephorus cucumeris* (anamorfo *R. solani*) foram produzidas por um isolado do AG-1 IA, em condições de estufa biológica à temperatura de $28\pm 1^{\circ}\text{C}$. Os isolados dos AG-4 e AG-2-2 IIIB foram patogênicos em plântulas de soja cv. FT-Cristalina, causando tombamentos, podridões de raízes e de hipocótilos. O isolado do AG-2-2 IIIB causou lesões extensas, com fendilhamento e exposição do córtex, diferente da infecção pelos isolados do AG-4. Os isolados do AG-1 IA causaram queima foliar em plantas adultas de soja cv. Xingu, tanto em casa de vegetação quanto em inoculações em folhas destacadas, porém os resultados obtidos com as duas metodologias de inoculação não se correlacionaram.

Palavras-chave: queima foliar, tombamento, podridão de hipocótilo, virulência em folha destacada, RADP.

CITOMORPHOLOGICAL, CULTURAL, MOLECULAR AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION OF *Rhizoctonia solani* KÜHN ASSOCIATED WITH SOYBEAN IN BRAZIL. Botucatu, 2001. 138p. Tese (Doutorado em Agronomia / Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: ROSELI CHELA FENILLE

Adviser: NILTON LUIZ DE SOUZA

2 SUMMARY

Rhizoctonia solani represents a pathogen economically important in all soybean-growing areas in the world. It causes pre- and post-emergence damping-off, root and hypocotyl rot and foliar blight of soybean. Foliar blight has resulted in yield losses of 31-60% in North and Northeast of Brazil. *R. solani* is divided into 14 anastomosis groups (AG), that differ in cultural appearance, virulence, physiology and genetic. The aim of this study was to characterize *R. solani* isolates associated with soybean in Brazil. Among seventy-three *Rhizoctonia* isolates examined according to nuclear condition, six were binucleate and sixty-seven were multinucleate. The multinucleate isolates (*R. solani*) were characterized according to anastomosis group, limit temperature to radial growth, thiamine requirement, lethal temperature, sclerotia production and molecular marker RAPD. Four isolates, cause of damping-off and hypocotyl rot, belonged to AG-4. RAPD analysis showed that among four isolates of AG-4, three grouped with HGII and one belonged to HGI subgroup. Other isolate, cause of damping-off and root and hypocotyl rot, growth at 35°C in the dark and thiamine auxotrophic, belonged to AG-2-2 IIIB. Sixty-two isolates, cause of foliar blight, belonged to

AG-1 IA. The mean radial growth rate was 19,3 mm/day and producing sasakii-type sclerotia, characteristic to the IA subgroup. RAPD analysis among *R. solani* AG-1 IA isolates of the soybean and anastomosis group testers, corroborate the characterization in IA subgroup. Perfect-stage *Thanatephorus cucumeris* (anamorph *Rhizoctonia solani*) was produced by one AG-1 IA isolate, in incubator at $28\pm 1^{\circ}\text{C}$. The AG-4 and AG-2-2 IIIB isolates were pathogenic in soybean seedlings cv. 'FT-Cristalina', under greenhouse condition, causing damping-off and root and hypocotyl rot. The AG-2-2 IIIB isolate caused large lesions and cortex tissue exhibition, distinct of the infection caused by AG-4 isolates. The AG-1 IA isolates caused foliar blight in adult soybean plants cv. 'Xingu' in greenhouse condition and detached leaf virulence assay. The results of the two inoculation methods were not correlated.

Keywords: foliar blight, damping-off, hypocotyl rot, detached leaf virulence, RADP.

3 INTRODUÇÃO

A soja é a cultura de grãos mais importante do Brasil, gerando divisas da ordem de US\$ 3 bilhões anuais, o que diretamente afeta a balança comercial (Yorinori, 1996). Tal fato coloca o Brasil como o segundo maior produtor de soja no panorama mundial, perdendo somente para os Estados Unidos (Wrather et al., 1997).

As doenças estão entre os principais fatores que afetam o rendimento da soja, sendo responsáveis pelas grandes variações na produtividade de uma safra para a outra. No período de 1970 a 1998, mais de 40 doenças foram identificadas na cultura da soja no Brasil (Yorinori, 1998). Esse número continua aumentando com a expansão da soja para novas áreas e como consequência da monocultura. As perdas anuais de soja por doenças são estimadas em cerca de 15% a 20%, entretanto, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100%, individualmente (Embrapa, 1999).

Rhizoctonia solani Kühn representa um grupo de patógenos habitantes de solo, de grande importância econômica para a cultura da soja, sendo associado a várias

doenças como tombamento, podridão da raiz e da base da haste, morte em reboleira e mela ou requeima da soja (Embrapa, 1999).

As perdas por mela ou requeima da soja, ocasionadas por *R. solani*, aumentaram de 0,07%, na safra 93/94, para 0,22%, na safra 97/98, levando-se em consideração o total de perdas por doenças, que na safra 97/98 foi de 20,5% da produção total da cultura (Yorinori, 1998). Contudo, de acordo com Meyer & Yorinori (1999), em lavouras do Maranhão, Piauí, Tocantins, Pará e Roraima, os níveis de danos pela mela em soja variam de 31% a 60%.

Existe uma tendência de aumento na incidência de requeima em soja, visto a expansão da cultura para os Estados das regiões Norte e Nordeste (Maranhão, Piauí, Pará, Rondônia, Tocantins e Roraima), onde registrou-se na safra 98/99 um aumento de 5,82% na área plantada e, nos quais, as condições climáticas de temperatura e umidade elevadas são favoráveis a ocorrência da doença (Yorinori, 1998; Embrapa, 1999). Além disso, o aumento de áreas irrigadas no Cerrado, que possibilitam o cultivo da soja no outono/inverno para a produção de sementes, bem como de outras espécies como feijão, ervilha, tomate e melancia, que também são afetadas pela podridão radicular e mela de *Rhizoctonia*, são práticas que, possivelmente, contribuam para aumentar a importância do patógeno para a cultura, pois proporcionam potencial de inóculo para a safra seguinte de soja (Embrapa, 1999).

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

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

No Brasil, a descrição de grupos de anastomose que ocorrem na cultura da soja resume-se a citação de Bolkan & Ribeiro (1985) para o Distrito Federal, que constataram que um isolado de folhas e quatro isolados de hipocótilos de soja, foram compatíveis com o AG 1 e AG 4, respectivamente.

Desta forma, em função da grande importância econômica da soja para o país, do potencial que representa o patógeno para a cultura e, no intuito de fornecer subsídios para futuros estudos ecológicos e epidemiológicos de *R. solani* na cultura da soja, bem como para programas de melhoramento visando resistência ao patógeno, foi desenvolvido o presente trabalho de caracterização de grupos de anastomose de *R. solani* associados à soja no Brasil, a partir de caracteres morfológicos, culturais e patogênicos, em comparação à caracterização por marcadores moleculares RAPD.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Taxonomia do gênero *Rhizoctonia*

O gênero *Rhizoctonia* (DeCandolle, citado por Carling & Sumner, 1992) é um grande, diversificado e complexo grupo de fungos. Desde a constatação desse gênero, aproximadamente 120 espécies foram registradas. Contudo, muitas dessas espécies não se ajustaram dentro de *Rhizoctonia* como foram anteriormente descritas, nem dentro dos grupos definidos pelos critérios atuais, ou ainda, representam sinônimos de espécies já descritas (Ogoshi, 1996).

A importância desse gênero pode ser constatada através do número de publicações que referem-se a *Rhizoctonia* spp. Nos periódicos “Review of Applied Mycology” (volumes 1-48) e “Review of Plant Pathology” (volumes 49-73), o número de citações incluindo *Rhizoctonia* aumentou de 24, em 1922, para 241 em 1994. Cerca de 3% do total de citações em fitopatologia referem-se a *Rhizoctonia* (Ogoshi, 1996).

Muitos pesquisadores, incluindo Parmeter & Whitney (1970), Talbot (1970), Sneh et al. (1991) e Moore (1996), apresentam uma lista de sinônimos para *Rhizoctonia solani*: *R. alba*, *R. alii*, *R. fusca*, *R. gossypii*, *R. lupini*, *R. macrosclerotia*, *R. melongena*, *R. microsclerotia*, *R. napae*, *R. praticola*, *R. rapae*, *Sclerotium irregulare*, entre outros; e para *Rhizoctonia* binucleadas: *R. alpina*, *R. callae*, *R. candida*, *R. cerealis*, *R. fragaria*, *R. oryzae-sativae*, *R. pini-insignis*, *R. quercus*, *R. ramicola*, *Sclerotium deciduum*, *S. fumigatum*, e *S. oryzae-sativa*, entre outros.

Para que se proceda ao enquadramento de determinado fungo ao gênero anamorfo *Rhizoctonia*, várias características morfológicas devem ser consideradas, dentre as quais: a ramificação em ângulo reto observada próxima ao septo distal em hifas jovens; presença de um septo na ramificação da hifa próximo do seu ponto de origem; presença de septos do tipo doliporo; ramificações de hifas que são concêntricas em sua extremidade basal; ausência de grampos de conexão; ausência de conídios (células monilióides não são consideradas conídios); tecido esclerocial não diferenciado em membrana, córtex e medula (não é necessária a produção de escleródios, mas se presentes, tecido esclerocial não é diferenciado); ausência de rizomorfos; e como característica adicional, a fase teleomórfica deve pertencer ao Filo Basidiomycota (Parmeter et al., 1969; Parmeter & Whitney, 1970; Ogoshi, 1987; Carling & Sumner, 1992).

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

A maioria dos fungos do gênero *Rhizoctonia* são anamorfos de quatro gêneros de Basidiomycetes: *Thanatephorus* Donk., *Ceratobasidium* Rogers, *Waitea* Warcup &

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

4.2 Classificação e caracterização de *Rhizoctonia solani*

Thanatephorus cucumeris (Frank) Donk (teleomorfo de *Rhizoctonia solani* Kühn), pertence ao Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Classe Basidiomycetes, Ordem Ceratobasidiales, Família Ceratobasidiaceae (Hawksworth et al., 1995).

A classificação da espécie *R. solani* baseia-se em critérios morfológicos, fisiológicos, genéticos e patológicos, que permitem a divisão em grupos de anastomose (AGs) (Anderson, 1982; Ogoshi, 1987; Sneh et al., 1991; Vilgalys & Cubeta, 1994). Segundo Carling (2000) existem 14 AGs para *Rhizoctonia solani*: AG-1 a AG-13 e AG-BI. Além de AG, o conceito de grupos intraespecíficos (ISG) baseado em evidências de reação de anastomose, patogenicidade, morfologia e outros critérios, permitiu a diferenciação de 23 ISG dentre os AGs de *R. solani* (Carling, 2000). Esta separação em ISG é suportada por evidências obtidas em estudos serológicos, análise de ácidos graxos, eletroforese de proteínas e estudos de ácidos nucléicos.

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

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

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

As principais características morfológicas, fisiológicas e genéticas dos vários AG de *R. solani* estão descritas no Quadro 1, e a distribuição mundial e gama de hospedeiros, abaixo relacionadas:

- AG-1: grupo de distribuição mundial e subdividido em 3 subgrupos, baseados na morfologia da colônia e patogenicidade: AG-1 IA, AG-1 IB e AG-1 IC. A distinção clara entre os 3 subgrupos não é conseguida com reação de anastomose. AG-1 IA, também chamado tipo 2 ou tipo ‘sasakii’ (Carling & Sumner, 1992), é um patógeno de parte aérea causador de seca da bainha em arroz (Jones & Belmar, 1989), queima de folhas em milho, sorgo, feijão e soja (Yang et al., 1988) e bronzeamento em gramados (Martin & Lucas, 1984). Escleródios do tipo ‘sasakii’ têm aproximadamente 2-4 mm de diâmetro e quando maduros apresentam uma camada externa de células vazias e com parede espessa, que lhes confere a capacidade de boiar na água (Hashida & Kobayashi (1996). AG-1 IB, também chamado de tipo 1 ou tipo microesclerodial (Carling & Sumner, 1992), é patógeno de parte aérea causador de queima de folhas em arroz, feijão, soja (Jones & Belmar, 1989) e alface (Ozawa, 1977). AG-1 IC é patógeno de parte subterrânea e causa *damping-off* em cenoura (Grisham & Anderson, 1983), linho (Garza-Chapa & Anderson, 1966), soja e pinheiro (Parmeter et al., 1969).
- AG-2: grupo com distribuição mundial, subdividido de acordo com requerimento de vitamina, análise de seqüências do rDNA e patogenicidade, em 8 subgrupos: AG 2-1 (I, II

- e III), AG 2-2 (IIIB, IV e LP), AG 2-3 e AG 2-t. AG 2-1, também chamado de "winter crops type" (Carling & Sumner, 1992), é patógeno de parte subterrânea, causando *damping-off* em crucíferas (Watanabe & Matsuda, 1966), podridão de raiz em rabanete japonês (Homma & Ishii, 1984) e queima de folhas em tulipa (Nakatomi & Kaneko, 1971). AG 2-1 tipo I, inclui isolados japoneses e holandeses, o tipo II, isolados do Alasca e da Austrália e, o tipo III, isolados da Itália (Kuninaga & Carling, 2000). AG 2-2 IIIB, também chamado de "rush type" (Carling & Sumner, 1992), é patógeno tanto de parte subterrânea como de parte aérea, causando *damping-off* em beterraba (Watanabe & Matsuda, 1966) e crisântemo (Kajiwara & Sugata, 1971), bronzeamento em gramado (Hurd & Grisham, 1983) e seca falsa da bainha em arroz (Watanabe & Matsuda, 1966). AG 2-2 IV, chamado também de "root-rot type", como o anterior, pode ser patógeno de parte subterrânea e aérea, causador de seca e podridão de raiz em beterraba, podridão de raiz em muitas outras culturas e seca em gramado (Carling & Sumner, 1992). AG 2-2 LP é agente causal de "large patch" em gramados (Hyakumachi et al., 1998). O AG 2-3 é patógeno causador de queima foliar em soja, constatado no Japão (Naito et al., 1995).
- AG-3: grupo homogêneo sem subgrupos conhecidos, chamado de "potato type" (Watanabe & Matsuda, 1966). Possui crescimento lento e, geralmente, é mais tolerante a baixas temperaturas que os demais AGs de *R. solani*. É patógeno de parte subterrânea causador de podridão de raiz e de tubérculos em batata (Carling & Sumner, 1992), e lesões foliares em tomate (Date et al., 1984), fumo (Meyer et al., 1990) e berinjela (Kodama et al., 1982), sendo restrito aos locais de cultivo destas.
 - AG-4: também chamado de "praticola type" (Parmeter & Whitney, 1970), pode ser subdividido em HG I, HG II e HG III, com base na homologia das seqüências de bases do

DNA, mas não em reação de anastomose. É patógeno de parte subterrânea e causa *damping-off* e podridão de raiz em várias culturas como, cebola (Yamamoto & Uehara, 1972), ervilha (Shehata et al., 1983), batata (Elango, 1986), feijão (Ceresini & Souza, 1997), soja (Muyolo et al., 1993a) e amendoim (Ceresini et al., 1996). Apresenta distribuição mundial (Carling & Sumner, 1992).

- AG-5: grupo homogêneo de patógeno de parte subterrânea, causador de podridão de raiz e de tubérculos em batata, mas é geralmente bem menos virulento que o AG-3 (Carling & Sumner, 1992). Pode causar, também, bronzeamento em gramados (Martin & Lucas, 1984) e podridão de raiz em feijão e soja (Naiki & Ui, 1981). Ocorre na Europa, Ásia e América do Norte (Carling & Sumner, 1992).
- AG-6: não é patogênico e ocorre somente no Japão (Kuninaga et al., 1979), sendo que alguns isolados podem apresentar-se como micorrizas em orquídeas (Uetake et al., 1988). Possui dois subgrupos: AG-6 HGI e AG-6 GV, que podem ser diferenciados com base na homologia das seqüências de bases do DNA (Kuninaga & Yokosawa, 1984b), mas não por reação de anastomose (Carling & Sumner, 1992).
- AG-BI: chamado isolado "bridging", ocorre no Japão (Kuninaga et al., 1979). Pode formar certos graus de anastomose com isolados dos AG-2, AG-3, AG-6, AG- 8 e AG-11 (Carling & Sumner, 1992; Carling et al., 1994). É patógeno de parte subterrânea, mas sua patogenicidade não é bem documentada (Carling & Sumner, 1992).
- AG-7: ocorre no Japão (Homma et al., 1983), sendo patógeno de parte subterrânea, causador de danos menores em algumas culturas (Carling & Sumner, 1992).
- AG-8: patógeno de parte subterrânea, causador do 'bare patch' em cereais (Neate & Warcup, 1985) e podridão de raiz em batata (Carling & Leiner, 1990). Ocorre na Austrália,

Nordeste dos EUA (Ogoshi et al., 1990) e U.K. (Burton et al., 1988). É subdividido em 5 subgrupos: ZG1-1, ZG1-2, ZG1-3, ZG1-4 e ZG1-5, de acordo com o padrão de isoenzimas pécticas (MacNish et al., 1993).

- AG-9: ocorre no Alaska e Oregon. É patógeno fraco de parte subterrânea que pode atacar batata, couve-flor e linho (Carling et al., 1987). Este AG é subdividido em: TP e TX, de acordo com a homologia de seqüências de bases do DNA e requerimento de tiamina (Carling & Kuninaga, 1990).
- AG-10: ocorre no Nordeste do Pacífico em associação com pequenas culturas de grãos. É patógeno de parte subterrânea, sendo, principalmente, saprófita, com patogenicidade pouco documentada (Carling & Sumner, 1992).
- AG-11: este grupo foi documentado no Oeste da Austrália e em Arkansas (USA). É patógeno de parte subterrânea, infectando hipocótilo de *Lupinus angustifolius* L. e soja, principalmente (Carling et al., 1994).
- AG-12: grupo constatado na Austrália, como micorriza em orquídeas (Carling et al., 1998).
- AG-13: associado a podridão de raízes e hipocótilos de algodão, podendo também infectar couve-flor, rabanete e alface (Carling et al., 1999).

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

Quadro 1. Características de grupos de anastomose de *Rhizoctonia solani* (Sneh et al., 1991; Carling & Sumner, 1992; Naito et al., 1993; Carling et al., 1994; Carling et al., 1998).

Grupo de Anastomose	Frequência de fusão de hifas	Requerimento de vitaminas	Taxa de crescimento micelial	Temperatura ótima de crescimento	Escleródios	Homologia da seqüência de bases do DNA
AG 1						
Observação: subdividido de acordo com a formação de escleródios, com características culturais e homologia da seqüência de bases do DNA (hsb-DNA) mas não de acordo com a anastomose de hifas						
a) AG 1-IA (tipo “sasakii” ou AG 1 tipo 2 de Sherwood (1969)	capazes de fundir hifas com membros do AG-1	autotróficos para tiamina	30 mm/dia a 28-30°C	30°C	grandes, 2-4 mm ϕ , esféricos	alta (98-100%) com membros do grupo AG 1-IA; baixa (50-56%) com membros do grupo AG 1-IB
Anamorfase						
<i>Sclerotium irregulare</i>						
Teleomorfase						
<i>Thanatephorus cucumeris</i>						
b) AG 1-IB (tipo “web blight” ou AG 1 tipo 1 de Sherwood (1969)	capazes de fundir hifas com membros do AG-1	autotróficos para tiamina	–	–	pequenos de formato irregular	alta (96%) com membros do grupo AG 1-IB; baixa (50-56%) com representantes do grupo AG 1-IA
Anamorfase						
<i>Rhizoctonia microsclerotia</i>						
Teleomorfase						
<i>Thanatephorus cucumeris</i>						
c) AG 1-IC (tipo “winter crops” ou AG 1 tipo 3 de Sherwood (1969)	capazes de fundir hifas com membros do AG-1	autotróficos para tiamina	–	–	pequenos (0,2-0,8 mm ϕ), de formato arredondado	Não determinada em relação ao AG 1-IA e AG 1-IB
Teleomorfase						
<i>Thanatephorus cucumeris</i>						

(continua)

Quadro 1. (continuação)

Grupo de Anastomose	Frequência de fusão de hifas	Requerimento de vitaminas	Taxa de crescimento micelial	Temperatura ótima de crescimento	Escleródios	Homologia da sequência de bases do DNA
AG 2	capazes de fundir hifas com membros do AG-2, AG-BI, AG-8 e AG-11					
Anamorfase						
<i>R. solani</i> var. <i>brassicarum</i>						
Teleomorfase						
<i>Thanatephorus cucumeris</i>						
Observação: subdividido de acordo com a frequência de anastomose, com características culturais e hsb-DNA						
a) AG 2-1	alta (>50%) com membros do AG 2-1 baixa (<30%) com membros do AG 2-2	autotróficos para tiamina	13 mm/dia a 25°C	–	–	alta (100%) com membros do AG 2-1 (tipo “winter crops”) baixa (37,6-40,1%) com membros do AG 2-2 IIIB e do AG 2-2 IV (43-49%)
b) AG 2-2 IIIB	alta com membros do AG 2-2 e em baixa frequência com membros do AG 2-1	auxotróficos para tiamina	culturas podem crescer a 35°C	28°C	–	alta (98%) com membros do AG 2-2 IIIB (tipo “mat rush”), baixa (69-71%) com membros do AG 2-2 IV e muito baixa (38-40%) com membros do AG 2-1
c) AG 2-2 IV	alta com membros do AG 2-2 e em baixa frequência com membros do AG 2-1	auxotróficos para tiamina	culturas não podem crescer a 35°C	28°C	–	alta (100%) com membros do AG 2-2 IV (tipo “root rot”), baixa (69-71%) com membros do AG 2-2 IIIB e muito baixa com membros do AG 2-1 (43-49%)
d) AG 2-2 LP	–	–	culturas não podem crescer a 35°C	25°C	–	–
e) AG 2-3	capazes de fundir hifas com membros dos AG 2-3 e AG 2-1	auxotróficos para tiamina	–	–	–	–

(continua)

Quadro 1. (continuação)

Grupo de Anastomose	Frequência de fusão de hifas	Requerimento de vitaminas	Taxa de crescimento micelial	Temperatura ótima de crescimento	Escleródios	Homologia da sequência de bases do DNA
AG-3	capazes de fundir hifas com membros do AG-3, AG-BI e AG-8	autotróficos para tiamina	12 mm/dia a 25°C	–	–	alta (100%) com membros do AG-3
AG-4						
Anamorfase <i>R. praticola</i> ; <i>R. solani</i> var. <i>cichorii-endiviae</i> Teleomorfase <i>Thanatephorus praticola</i>						
Observação: subdividido de acordo com a forma dos escleródios e com a hsb-DNA						
a) AG-4 HGI	capazes de fundir hifas com membros do AG-4	autotróficos para tiamina	–	–	marrom escuros em BDA	alta (89-93%) com membros do AG-4 HGI e baixa (31-48%) com membros do AG-4 HGII
b) AG-4 HGII	capazes de fundir hifas com membros do AG-4	autotróficos para tiamina	–	–	cinza a marrom esbranquiçados em BDA	alta (89-100%) com membros do AG-4 HGII e baixa (31-48%) com membros do AG-4 HGI
AG-5						
Teleomorfase <i>T. cucumeris</i>	capazes de fundir hifas com membros do AG-5	auxotróficos para tiamina	–	–	–	alta (94-98%) com membros do AG-5

(continua)

Quadro 1. (continuação)

Grupo de Anastomose	Frequência de fusão de hifas	Requerimento de vitaminas	Taxa de crescimento micelial	Temperatura ótima de crescimento	Escleródios	Homologia da sequência de bases do DNA
AG-6	capazes de fundir hifas com membros do AG-6 e, em baixa frequência, com AG-8 e AG-BI					
Observação: subdividido de acordo com a hsb-DNA						
a) AG-6 HGI	–	autotróficos para tiamina	–	–	–	alta (92-98%) com membros do AG-6 HGI e baixa (48-63%) com membros do AG-6 GV
b) AG-6 GV	–	autotróficos para tiamina	–	–	–	baixa (55-66%) com membros do AG-6 GV e baixa (48-63%) com membros do AG-6 HGI
AG-7	capazes de fundir hifas somente com membros do AG-7	autotróficos para tiamina	–	–	–	alta (99%) com membros do AG-7
AG-8	alta (>50%) com membros do AG-8 e baixa (<30%) com membros do AG-2, AG-3, AG-6, AG-BI e AG-11	autotróficos para tiamina	–	–	–	–

(continua)

Quadro 1. (continuação)

Grupo de Anastomose	Frequência de fusão de hifas	Requerimento de vitaminas	Taxa de crescimento micelial	Temperatura ótima de crescimento	Escleródios	Homologia da sequência de bases do DNA
AG-9						
Observação: subdividido de acordo com o requerimento por tiamina e a hsb-DNA						
a) AG-9 TP	capazes de fundir hifas com membros do AG-9	autotrófico para tiamina	–	–	–	alta (>94%) com membros do AG-9 TP e baixa (78-87%) com membros do AG-9 TX
b) AG-9 TX	capazes de fundir hifas com membros do AG-9	auxotrófico para tiamina	–	–	–	alta (>94%) com membros do AG-9 TX e baixa (78-87%) com membros do AG-9 TP
AG-10	capazes de fundir hifas com membros do AG-10	–	–	–	–	–
AG-11	capazes de fundir hifas com membros do AG-11 e, em baixa frequência com membros dos AG-2, AG-8 e AG-BI	auxotrófico para tiamina	17,3 mm/dia a 25°C	–	0,5-2,0 mm	–
AG-12	capazes de fundir hifas com membros do AG-12	–	–	–	–	–
AG-BI	capazes de fundir hifas com membros do AG-BI, AG-2, AG-3, AG-6, AG-8 e AG-11	auxotróficos para tiamina	–	–	–	alta (91-97%) com membros do AG-BI

Embora o conceito de espécie biológica tenha sido amplamente aplicado em muitos outros grupos de basidiomicetos heterotáticos (Boidin, 1986), a relação de espécies biológicas a AG e ISG não é clara. As evidências obtidas com a sistemática molecular de *Rhizoctonia* sugerem que muitos AGs e ISG são geneticamente distintos e representam espécies biológicas (Vilgalys & Cubeta, 1994). O fato de cada AG ser isolado geneticamente, não ocorrendo intercruzamentos de populações, faz com que o conceito de AG possa ser considerado como uma unidade evolucionária (Anderson, 1982).

4.3 Importância de *Rhizoctonia solani* como patógeno

Rhizoctonia solani pode causar perdas consideráveis a várias plantas cultivadas comercialmente no Brasil, como pimentão (*Capsicum annuum* L.), seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.), soja [*Glycine max* (L.) Merr.], amendoimzeiro (*Arachis hypogaea* L.), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) (Campaci & Figueiredo, 1964; Yorinori, 1998; Almeida et al., 1980; Gasparato et al., 1981; Tanaka & Coqueiro, 1981; Bolkan & Ribeiro, 1985; Ceresini et al., 1996; Ceresini & Souza, 1997; Silveira et al., 2000).

Particularmente para a soja, que é a principal cultura de grãos do Brasil, totalizando, na safra 1998/99, 12.900.500 ha em área plantada, e uma produção de 31.241.200 toneladas, várias doenças já foram associadas a *R. solani*, dentre estas tombamento, morte em reboleira, podridão de raiz e da base da haste e mela ou requeima da soja (Embrapa, 1999).

Com relação aos sintomas provocados pelo patógeno na soja, pode ocorrer a podridão de sementes e plântulas em pré-emergência e o *damping-off* de pós-emergência, com tombamento das plântulas 30-35 dias após a emergência, sob condições de temperatura e umidade elevadas. As plântulas apresentam na região do colo e raízes, pequenas manchas encharcadas, as quais vão aumentando, e resultam em podridão seca, de coloração castanha a castanho-avermelhada. É comum o estrangulamento nesta região da haste, resultando em murcha, tombamento ou sobrevivência temporária com emissão de raízes adventícias acima da região afetada. Entretanto, as plantas frequentemente tombam antes da floração. A morte em reboleira ocorre em plantas adultas, em anos chuvosos, com temperaturas amenas (Almeida et al., 1997).

A mela ou requeima da soja, que frequentemente está associada a fase perfeita do fungo (*T. cucumeris*), pode afetar plantas em qualquer estágio de desenvolvimento, atingindo toda a parte aérea. Os sintomas são mais evidentes nas folhas, pecíolos e ramos laterais. Pequenas lesões encharcadas (lesões primárias) evoluem rapidamente para grandes manchas ou reboleiras. Ocorre a seca das partes afetadas, adquirindo estas uma coloração castanho-clara a castanho-escuro e folhas e pecíolos infectados ficam pendentes ao longo da haste ou caem sobre as plantas vizinhas, propagando a doença. É comum, sobre as plantas mortas, a formação de teias de micélio e abundantes microescleródios. Hastes e vagens infectadas apresentam lesões castanho-avermelhadas. Regiões quentes e úmidas são favoráveis ao desenvolvimento da doença (Almeida et al., 1997).

No caso da podridão negra da raiz e da base da haste, os sintomas iniciam-se a partir da fase inicial de desenvolvimento das vagens, com uma podridão castanha, aquosa, próximo ao nível do solo que estende-se para baixo e para cima, tornando-se

posteriormente negra. O sistema radicular adquire coloração castanho-escuro, o tecido cortical fica mole e solta-se com facilidade, expondo um lenho firme e de coloração branca a castanho-clara. Na parte superior, as plantas infectadas apresentam clorose, as folhas murcham e ficam pendentes ao longo da haste. A ocorrência da doença, até o momento, está restrita à Região do Cerrado e associada com anos de intensa precipitação (Almeida et al., 1997; Embrapa, 1999).

O controle de doenças causadas por *R. solani* em soja baseia-se em práticas culturais e proteção através do uso de fungicidas (Almeida et al., 1997). Como medidas culturais Almeida et al. (1997) citam: evitar semeadura adensada, controlar plantas daninhas, fazer rotação/sucessão de culturas com gramíneas, manter a adubação equilibrada, eliminar compactação do solo, evitar semeadura em solo encharcado e incorporação de restos culturais. O tratamento de sementes com fungicidas reduz a incidência de tombamentos (Almeida et al., 1997). Alguns fungicidas como azoxystrobin + óleo mineral, trifenil hidróxido, tebuconazole + tiofanato metílico são recomendados para o controle de mela ou requeima em soja (Utiamada et al., 1999; Utiamada et al., 2000).

Dados a respeito dos prejuízos ocasionados por *R. solani* à soja no Brasil são relatados por Yorinori (1998) e Meyer & Yorinori (1999). Segundo Yorinori (1998) as perdas estimadas na safra 1997/98, para mela ou requeima da soja, totalizaram 14.400 toneladas, num total de 6.440.600 toneladas de perdas com doenças. Entretanto, Meyer & Yorinori (1999) citam que no período de 1991/92 a 1997/98, os níveis de danos registrados para a mela ficaram entre 31 e 60%, em lavouras do Maranhão, Piauí, Tocantins, Pará e Roraima. Níveis de 60% de danos foram constatados em lavouras de Roraima (Meyer¹). Com relação às demais doenças causadas por *R. solani*, não existem estimativas de perdas.

¹ MEYER, M.C. (CNPSo - EMBRAPA, Campo Experimental de Balsas-MA). Comunicação pessoal, 2000.

Na Louisiana, Estados Unidos, Yang et al. (1990a) constataram perdas de até 30% nos plantios comerciais de soja, devido a queima da parte aérea causada por *Rhizoctonia*. Também nos Estados Unidos, Muyolo et al. (1993b) relataram perdas acima de 45 e 50% causadas pela podridão de raiz e mela da parte aérea, respectivamente, em cultivos de soja. Já na Indonésia, Naito et al. (1993), constataram que 60% do total de plantas que sobrevivem até o estágio de enchimento da vagem, apresentam podridão radicular causada por *Fusarium* spp. e *Rhizoctonia* binucleadas AG-E.

A importância da ocorrência da mela ou requeima do soja tende a aumentar nas próximas safras, visto a evolução da cultura na região do Corredor de Exportação Norte, no qual as condições de temperatura e umidade são favoráveis ao desenvolvimento do patógeno. Segundo Meyer & Machado (1999) a região produtora de soja, abrangendo o sul do Maranhão, sudoeste do Piauí, nordeste do Tocantins e leste do Pará, apresenta uma área agricultável estimada em 5 milhões de hectares. Leite (1999) estima que no Mato Grosso, norte de Goiás e Minas Gerais, oeste da Bahia, sul do Maranhão, sudoeste do Piauí, Tocantins, Rondônia e regiões do Pará, Roraima, Amapá e Amazonas, existe um potencial de 180 milhões de hectares para serem explorados por grãos.

Com relação a caracterização dos grupos de anastomose (AG) de *Rhizoctonia solani* que ocorrem no Brasil, considera-se pioneiro o trabalho de Bolkan & Ribeiro (1985). Esses autores descreveram AG de *R. solani* que ocorrem em várias culturas como, cevada, feijão, cenoura, café, algodão, alface, batata, amendoim, ervilha, arroz, seringueira, sorgo, soja, beterraba, trigo, entre outras. Na última década outras citações também trazem informações a respeito de grupos de anastomose que ocorrem no Brasil. Ceresini et. al. (1996) e Ceresini & Souza (1997) relataram a associação de *R. solani* AG-4

HGI à podridão de vagens em amendoazeiro e de AG-4 HGI e AG 2-2 IIIB ao feijoeiro no Estado de São Paulo, respectivamente. Silveira et al. (2000) constataram a ocorrência de AG-1 IB e AG-4, causando necrose e queima foliar em eucalipto. Entretanto, para a soja existe somente a citação de Bolkan & Ribeiro (1985), os quais relatam AG-1 e AG-4 associados a folhas e hipocótilos de soja, respectivamente.

Em outras regiões do mundo onde a soja é produzida vários grupos de anastomose têm sido relatados como patogênicos à cultura, dentre os quais: AG-1 IA (Atkins Jr. & Lewis, 1954; Jones & Belmar, 1989; Yang et al., 1990a e 1990b), AG-1 IB (Jones & Belmar, 1989; Atkins Jr. & Lewis, 1954; Muyolo et al., 1993a; Yang et al., 1990b), AG-1 IC (Parmeter et al., 1969), AG 2-2 IIIB (Liu & Sinclair, 1991 e 1992; Muyolo et al., 1993a), AG 2-3 (Naito et al., 1995), AG-4 (Bolkan & Ribeiro, 1985; Naito et al., 1993), AG-5 (Naiki & Ui, 1981; Tu & Chang, 1978) e AG-7 (Naito et al., 1993).

Queima da parte aérea ('aerial blight') causada por *R. solani* AG-1 IA foi constatada pela primeira vez na Louisiana (USA), em 1954 (Stroube, 1954) e, passou a ser considerada como epidêmica, em 1973, neste mesmo Estado (O'Neill et al., 1977).

No Texas, Estados Unidos, *R. solani* AG-1 IA e AG-1 IB foram constatados em cultivos de soja em rotação com arroz (Jones & Belmar, 1989). Yang et al. (1990a e 1990b), também relataram que *R. solani* AG-1 IA e AG-1 IB causam lesões foliares em soja na Louisiana. Constataram-se nesses campos, grande produção de microescleródios durante os meses de julho e agosto, produzidos por isolados do AG-1 IB e, também, observaram-se a fase teleomórfica do patógeno durante esses meses.

Muyolo et al. (1993a) determinaram que isolados de *R. solani* AG-2-2 IIIB são agentes causais de podridões de raízes e hipocótilos da soja em Ohio (USA) e, que o

AG-1 IB causa lesões foliares em soja, no Zaire. Também Liu & Sinclair (1991) constataram a associação de *R. solani* AG-2-2 à soja, em Illinois (USA), causando podridão de raízes e hastes e, anelamento na região do colo. Em função de características culturais e fisiológicas (crescimento a 35°C e auxotrofismo para tiamina), tais isolados correspondem, provavelmente, ao subgrupo AG-2-2 IIIB.

Em 1994, no Japão, um outro grupo de anastomose de *R. solani* foi constatado em soja, causando queima foliar, o AG-2-3. Os sintomas observados no campo pela infecção por este grupo de anastomose caracterizam-se por lesões primárias, pequenas e circulares, que sob condições de umidade evoluem para extensas necroses (lesões secundárias), de formato irregular, ao redor das lesões primárias. A presença das lesões primárias pode ser associada a infecção por basidiósporos produzidos pela fase teleomórfica (Naito et al., 1995).

Naito et al. (1993) relataram a ocorrência de *R. solani* AG-4 e AG-7 causando *damping-off* e podridões radiculares em cultivos de soja, na Indonésia, principalmente, durante a estação chuvosa.

R. solani AG-1 IC aparece como importante patógeno sob condições climáticas mais frias, tendo sido relatado como agente causal de podridões em plântulas de soja, no Canadá (Parmeter et al., 1969).

4.4 Importância da identificação de grupos de anastomose

A identificação de AG ou de ISG dentro de *R. solani*, a partir de 1937 por Schultz (Schultz, citado por Vilgalys & Cubeta, 1994), trouxe grandes contribuições para

o estudo da resistência de plantas ao patógeno, bem como para estudos epidemiológicos e ecológicos de várias doenças causadas por *Rhizoctonia*, gerando avanços no controle destas.

Após o estabelecimento de AG ou de ISG dentro de *R. solani*, o alvo para o melhoramento tornou-se mais claro e direcionado, visto que o patógeno causador de determinada doença numa planta sempre pertence a um AG ou ISG específico. Segundo Muyolo et al. (1993b) a seleção de germoplasma resistente tem sido facilitada pela classificação de isolados de *R. solani* em grupos de anastomose, dentro dos quais existem semelhanças quanto à patogenicidade e aos sintomas em certos hospedeiros.

Um exemplo da importância destes conceitos pode ser constatada em Muyolo et al. (1993b), os quais avaliaram o comportamento de vários cultivares de soja e feijão quanto à podridão de raízes e hipocótilos e à ‘web blight’. Em seus estudos, para a avaliação da resistência à podridão de raízes e hipocótilos empregou-se isolados do AG-2-2 e AG-4, enquanto que para a resistência à ‘web blight’, foi utilizado isolado do AG-1 IB. Esse mesmos autores salientaram, ainda, que existe um potencial para resistência a *R. solani* em soja (cultivares: ‘Asgrow 7986’, ‘Centennial’, ‘Hardee’, ‘RA 606’, ‘Pella’ e ‘Vickery’) e feijão (cultivar ‘Jackson Wonder’) e que, a identificação dos isolados quanto ao AG e padronização das técnicas experimentais são importantes na realização de futuras pesquisas.

Harville et al. (1996) também testaram 91 genótipos de soja quanto a resistência para queima foliar causada por *R. solani* (*Rhizoctonia* foliar blight), constatando promissores níveis de resistência nos cultivares ‘Buckshot 66’ e ‘Pioneer variety 9593’. Em seus estudos foram empregados isolados do AG-1 subgrupos IA e IB.

Segundo Jones & Belmar (1989) a temperatura ótima de crescimento, sensibilidade a fungicidas e condições favoráveis a sobrevivência de propágulos diferem entre

isolados dos subgrupos IA e IB do AG-1 e programas de melhoramento podem ser facilitados pela seleção apropriada de isolados.

Embora *R. solani* seja considerado um fungo com potencial para infectar uma ampla gama de hospedeiros, a ocorrência de especilização por hospedeiro tem sido relatada para vários grupos de anastomose. Como exemplo temos o AG-3, que predominantemente está relacionado a doenças em batata (Bandy et al., 1988; Carling & Leiner, 1990) e o AG-2-1, geralmente associado a couve-flor (Keijer et al., 1997). Em testes de patogenicidade recíproca, Keijer et al. (1997) constataram que isolados do AG-2-1 causavam doença em plântulas de couve-flor, mas não em tomate e isolados do AG-3 foram altamente virulentos em tomate e batata, mas pouco afetaram couve-flor. Nas combinações patogênicas (AG-2-1 e couve-flor, AG-3 e tomate) as hifas do fungo cresciam em direção ao hospedeiro, alinhavam-se às células da epiderme, formavam ramificações em forma de 'T' e 'almofadas' de infecção e, ocorria a penetração. Em combinações não patogênicas (AG-2-1 e tomate, AG-3 e couve-flor), as hifas do fungo cresciam em direção ao hospedeiro e sobre este, mas não ocorria adesão, que é o primeiro passo para o processo de infecção.

A severidade para cada tipo de sintoma produzido pelo ataque de *R. solani* pode variar em função do grupo de anastomose considerado. Muyolo et al. (1993a) testou 24 isolados do AG-2-2 IIIB e 12 isolados do AG-4, todos causadores de podridões de raízes e hipocótilos. Foram constatadas diferenças quanto a virulência entre os diferentes AG. Isolados do AG-2-2 IIIB foram mais virulentos em raízes, enquanto que isolados do AG-4 foram mais virulentos em hipocótilos.

Kousik et al. (1994) relataram que tanto AG-1 IA e IB de *R. solani*, como AG-1 IC, AG-4 e AG-5 podem formar ‘cushions’ de infecção em folhas de soja, entretanto, isolados de outros grupos de anastomose não formam tais estruturas.

Diferenças entre os AG e ISG podem ser também relacionadas com diferenças ecológicas e epidemiológicas (Ogoshi, 1987).

Naito et al. (1995) descreveram um tipo de doença foliar em soja causada por *T. cucumeris* (*R. solani* AG-2-3), constatada no Japão. Os sintomas desta doença assemelham-se mais às lesões foliares causadas por basidiósporos de *T. cucumeris* (*R. solani* AG-2-2 IV e AG-3) em beterraba e fumo, respectivamente, do que com os sintomas constatados na parte aérea da soja pela infecção de *R. solani* AG-1 IA e IB. Entretanto, a diferenciação entre o AG-2-3 e os AG-1 IA e IB dá-se não somente pelos sintomas observados, como também pelas características epidemiológicas. O AG-2-3 tem sua infecção realizada por basidiósporos, ao passo que o AG-1 IA e IB, causam infecção a partir de hifas.

Dados epidemiológicos, como por exemplo temperatura favorável à incidência, diferem entre grupos de anastomose. Kousik et al. (1995) relataram que a 35°C, isolados do AG-1 IA formam, significativamente, mais ‘cushions’ de infecção em folhas de soja, assim como maior severidade de doença, que isolados do AG-1 IB e outros grupos de anastomose. Já isolados do AG-5 causaram mais infecção em plântulas a 20°C que a 25-30°C. Estas diferenças permitem entender porque a mela ou requeima da soja, no Brasil, restringe-se às regiões mais quentes do país.

Conhecimentos ecológicos se fazem extremamente necessários, pois atualmente vários estudos vêm sendo realizados enfatizando-se o controle biológico, onde isolados de *Rhizoctonia* binucleadas ou de *R. solani* não patogênicos, são empregados no

controle de doenças causados por *Rhizoctonia* spp. (Ichielevich-Auster et al., 1985; Cardoso & Echandi, 1987a e 1987b; Cubeta et al., 1995). Segundo Herr (1988) isolados de *Rhizoctonia* spp. binucleados controlaram efetivamente a podridão da coroa e de raízes em beterraba açucareira, causadas por *R. solani* AG-2-2, quando aplicados em plantas com idade entre 5 e 10 semanas, reduzindo significativamente o índice de doença e aumentando o rendimento da cultura.

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

O conhecimento de qual o subgrupo do AG-1 que incide sobre soja é essencial para se entender a relação entre densidade de inóculo e incidência da doença e particularmente importante na tomada de decisão quanto a rotação de culturas e cultivos consorciados (Jones & Belmar, 1989).

R. solani AG-1 IA, além de causar queima da parte aérea em soja (Stroube, 1954), também causa queima da bainha em arroz (Webster & Gunnell, 1992) e a rotação arroz-soja pode contribuir para o aumento da incidência da doença em ambas as culturas (Harville et al., 1996). Isolados do AG-1 IA são, segundo Kousik et al. (1994), mais adaptados a infectar gramíneas, visto que dentre treze gramíneas testadas, doze apresentaram ‘almofadas’ de infecção formadas por isolados de tal subgrupo. Já, isolados do AG-1 IB, testados sobre as mesmas gramíneas, somente formaram ‘almofadas’ de infecção em sete

delas, pois tal subgrupo é considerado como patógeno preferencial em hortaliças (Ogoshi, 1987).

De acordo com Ploetz et al. (1985) em solo de área sob cultivo mínimo com consórcio centeio-soja, dentre nove grupos de anastomose de *R. solani* caracterizados, somente o AG-4 foi patogênico em plântulas de soja e centeio, em testes em casa de vegetação.

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

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

Progressos consideráveis têm sido possíveis pelo reconhecimento de ISG como unidades taxonômicas fundamentais dentro de diferentes grupos em *Rhizoctonia*. Vários estudos têm demonstrado a utilização dos conceitos de AG e ISG como indicadores de grupamento genético e a validação mais convincente de tais conceitos advém de estudos de sistemática molecular (Vilgalys & Cubeta, 1994).

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

A primeira demonstração clara que diferentes ISG são geneticamente distintos, vem dos estudos de Kuninaga e Yokosawa, que empregaram medidas espectrofotométricas de hibridização de DNA para estimar o relacionamento genético (Kuninaga & Yokosawa, 1982a; Kuninaga & Yokosawa, 1982b; Kuninaga & Yokosawa, 1983; Kuninaga & Yokosawa, 1984a; Kuninaga & Yokosawa, 1984b; Kuninaga & Yokosawa, 1985a; Kuninaga & Yokosawa, 1985b; Carling & Kuninaga, 1990). Utilizando outro método para medir a extensão de hibridização baseado em DNA marcado com isótopos, Vilgalys (1988) também demonstrou diferenças genéticas entre ISG de quatro grupos de anastomose diferentes.

Os valores de hibridização de DNA entre AG são tipicamente baixos, geralmente menores que 30%. Entretanto, a similaridade de DNA dentro de cada AG é, geralmente, bem mais alta (cerca de 70%), embora vários grupos de anastomose abriguem grupamentos anteriormente não detectáveis, com similaridade de DNA reduzida, incluindo AG-4 e AG-6, com pelo menos, dois ISG cada (Kuninaga & Yokosawa, 1984a, Vilgalys, 1988). Uma complementaridade reduzida de DNA tem sido observada também para diferentes ISG descritos dentro de AG-1, AG-2 e AG-9 (Kuninaga & Yokosawa, 1984a, Vilgalys, 1988). Os níveis de hibridização de DNA/DNA dentro da maioria dos ISG são, geralmente, altos (80-100% de similaridade), quando comparados com os níveis entre dois ISG, que são, geralmente, muito mais baixos (< 30%) (Vilgalys & Cubeta, 1994). Os resultados dos estudos de hibridização de DNA permitiram demonstrar que diferentes ISG pertencentes ao mesmo AG são geneticamente distintos (Vilgalys & Cubeta, 1994).

Em outros fungos, baixos níveis de similaridade de DNA como aqueles encontrados em *Rhizoctonia solani*, estão associados com isolamento reprodutivo e

especiação (Vilgalys & Johnson, 1987; Kurtzman, 1989) e, baseado nestas evidências, a maioria dos ISG representam um único grupo evolucionário (Vilgalys & Cubeta, 1994).

As diferenças genéticas entre ISG de *Rhizoctonia solani* também têm sido demonstradas através de análises de RFLP (Jabaji-Hare et al., 1990, Vilgalys & Gonzalez, 1990a e 1990b). Uma vantagem do método de RFLP em relação aos estudos de hibridização de DNA é a quantidade bem menor de DNA necessária para a análise (geralmente < 1µg), tornando possível o estudo de um grande número de isolados (os métodos de hibridização de DNA/DNA podem requerer, algumas vezes, mais de 1 mg de DNA total) (Vilgalys & Cubeta, 1994). Utilizando-se PCR para amplificar segmentos de genes homólogos de indivíduos diferentes, são possíveis análises de RFLP em amostras bem menores (< 1 ng de DNA) (Cubeta et al., 1991; Liu & Sinclair, 1992; Liu & Sinclair, 1993).

Utilizando-se a técnica de ‘Southern Blotting’ com fragmentos ‘anônimos’ de DNA nuclear clonados de um isolado do AG-3, Jabaji-Hare et al. (1990) demonstraram que grupos específicos de RFLP poderiam ser detectados somente quando as sondas de DNA clonadas eram hibridizadas com membros de seus próprios ISG. Cubeta et al. (1992) também observaram padrão semelhante de grupos específicos de hibridização, utilizando sondas de DNA nuclear randômicas que hibridizavam para um dos três dos ISG classificados dentro do AG-4. A hibridização específica por clones de DNA randômico, neste caso, pode ser atribuída diretamente aos baixos níveis de complementaridade de DNA que existe entre diferentes ISG. Sondas de DNA específicas para cada ISG poderiam ser geradas utilizando-se fragmentos de DNA randômico de cada ISG e, combinadas a outras técnicas como PCR, possibilitariam diagnósticos mais rápidos de ISG (Vilgalys & Cubeta, 1994).

Análises de RFLP de DNA amplificados por PCR poderiam, também, ajudar a compreender as diferenças genéticas dentro e entre ISG, com a vantagem que o RFLP, neste caso, pode ser observado diretamente após a eletroforese (Vilgalys & Cubeta, 1994).

Utilizando uma combinação de PCR e análise de restrição, Liu & Sinclair (1992 e 1993) e Liu et al. (1993), examinaram uma porção de um rDNA repetido codificando para uma sequência interna transcrita (ITS), separando as regiões maiores do código no rDNA. Baseado na análise de restrição de seqüências ITS de uma grande amostra de isolados de campo, os padrões de variação do rDNA revelaram, pelo menos, seis ISG dentro do AG-1 e cinco ISG dentro do AG-2 (Liu & Sinclair, 1992 e 1993). As evidências para os cinco ISG detectados dentro do AG-2 são suportadas também pelos dados de uma porção do gene rRNA mitocondrial (Liu & Sinclair (1992), assim como por dados de isoenzimas (Liu et al., 1990; Liu & Sinclair, 1992).

Kanematsu & Naito (1995) utilizando-se da técnica de PCR para amplificar regiões ITS do rDNA, que foram posteriormente digeridas com quatro enzimas de restrição, conseguiram caracterizar o subgrupo AG-2-3 de *R. solani*, causador de queima foliar em soja, o qual mostrou-se geneticamente distinto dos demais subgrupos do AG-2.

Segundo Liu et al. (1993), cerca de 25 grupos podem estar presentes no complexo *R. solani*, baseando-se nos padrões de restrição de fragmentos ITS. Kuninaga et al. (1997) sugerem que análises de regiões ITS do rDNA podem ser valiosas na diferenciação de subgrupos de AG, pois os mesmos constataram que a homologia de seqüência de regiões ITS foram de 96% para isolados do mesmo ISG, de 66-100% para isolados de diferentes ISG dentro do mesmo AG, e de 55-96% para isolados de diferentes AGs. Contudo, de acordo com

Vilgalys & Cubeta (1994), deve-se tomar cuidado na equiparação da diversidade de rDNA com o conceito de ISG, já que muitos grupos de rDNA propostos ainda não foram estudados utilizando-se outro critério.

Diferenças genéticas entre ISG também têm sido demonstradas utilizando-se o método de marcadores de polimorfismo de DNA amplificados ao acaso (RAPD) desenvolvido por Welsh et al. (1990) e Williams et al. (1990). Duncan et al. (1993) descobriram que marcadores RAPD eram viáveis para diferenciação entre ISG australianos no complexo *R. solani*, assim como entre diferentes isolados dentro de alguns ISG. Através de análises com marcadores RAPD, Yang et al. (1995), conseguiram diferenciar isolados do AG-8 ZG1 de isolados do ZG2, atualmente designado como ZG1-5 (MacNish et al., 1993), contudo, isolados dos subgrupos do ZG1 não puderam ser diferenciados, pelo marcador utilizado. Segundo Toda et al. (1999), considerável variabilidade foram constatadas entre isolados de diferentes AGs, na análise de produtos amplificados por RAPD.

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

A simplicidade e rapidez na utilização de marcadores RAPD, poderiam tornar este método bastante útil para a caracterização de *Rhizoctonia* spp., não fossem os problemas com confiança e reprodutibilidade, onde os resultados entre diferentes laboratórios nem sempre são comparáveis (Lessa & Applebaum, 1993).

Uma outra ferramenta utilizada para estimar variabilidade e delimitar ISG no complexo *R. solani*, é o estudo de polimorfismo de proteínas através de análises de isoenzimas.

Laroche et al. (1992) demonstraram a utilização de dados de isoenzimas para diferenciar isolados de campos de batata pertencentes ao AG-3 e AG-9. Os padrões de variação de isoenzimas entre os isolados do AG-3 proporcionaram evidenciar três subgrupos dentro do AG-3. Segundo Liu et al. (1990) e Liu & Sinclair (1992), os estudos de isoenzimas possibilitaram diferenciar, pelo menos, cinco ISG dentro do AG-2. Também MacNish et al. (1993), utilizaram estudos de isoenzimas pécnicas para caracterizar cinco zimogramas diferentes dentro do AG-8 de *R. solani*, correspondendo a diferentes ISG.

5 MATERIAL E MÉTODOS

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

5.1.1 Isolamento a partir de tecidos vegetais infectados

Plantas de soja com sintomas de podridão de raiz e de colo foram coletadas em regiões produtoras da cultura, no estado de São Paulo. Os materiais foram coletados em visita a propriedades na região de Taquarituba-SP, onde a cultura foi implantada em sistema de cultivo convencional e sob plantio direto. Plantas oriundas da região de Santa Bárbara-SP, com lesões no caule, obtidas junto a “Clínica Fitopatológica” do Departamento de Produção Vegetal – Setor Defesa Fitossanitária, também foram processadas para isolamento.

Plantas adultas, já na fase de formação de vagens, com sintomas de queima de folhas e lesões em pecíolos, foram coletadas junto a propriedades da região de Lucas do Rio Verde-MT, por intermédio do Eng^o. Agr^o. Leandro Mussi.

As plantas com lesões na raiz e colo foram lavadas separadamente em água, e secas ao ar. Amostras de tecidos (cerca de 4mm²), tanto de raiz e colo, como de folhas, foram cortadas assepticamente das margens das lesões e transferidas para placas contendo o meio de cultura KHMP [KH₂PO₄, 1,0 g; MgSO₄.7H₂O, 0,50 g; KCl, 0,50 g; Fe₂SO₄.7H₂O, 0,01 g; NaNO₂, 0,2 g; chloramphenicol, 0,05 g; ágar, 20 g; água destilada, q.s.p. 1000 ml; após esterilização, em autoclave, a 121°C/30': estreptomomicina, 0,05 g; metalaxyl (Ridomil 25 WP), 0,24 g; prochloraz (Sportak 45), 0,0005g], modificação do meio de Ko & Hora (1971) pela substituição de fenaminosulf (Dexon) por metalaxyl (Ceresini et al., 1996) e adição de prochloraz (Castro et al., 1988). As placas contendo as amostras foram mantidas a 28°C, no escuro. Após 48 horas, evidenciando-se o crescimento micelial típico de *Rhizoctonia* spp., fragmentos de hifas foram transferidos individualmente para meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) (Tuite, 1969), com oxitetraciclina na concentração de 50µg/ml. Transferências de fragmentos de hifas foram repetidas até a obtenção de culturas puras uniformes.

Isolados de *Rhizoctonia* spp. oriundos de soja cultivada em Minas Gerais e Paraná, gentilmente cedidos pelo pesquisador Dr. José Tadashi Yorinori (CNPSo-EMBRAPA, Londrina), também foram introduzidos à coleção de isolados de *Rhizoctonia* spp. da soja.

5.1.2 Coleção de isolados

No Quadro 2 é apresentada a relação de isolados de *Rhizoctonia* spp. e de *R. solani* de soja, mantidos na coleção da micoteca do Departamento de Produção Vegetal – Setor Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP, Botucatu-SP.

Quadro 2. Relação de isolados de *Rhizoctonia solani* e *Rhizoctonia* spp. de soja, mantidos na micoteca do Departamento de Produção Vegetal – Setor Defesa Fitossanitária, FCA, UNESP, Botucatu-SP.

Número do isolado na coleção	Sintomas (Variedade-idade)	Procedência (Proprietário - Local)	Data
SJ 01*	-	São Gotardo - MG	1994
SJ 02*	cv. OC 16	Ponta Grossa - PR	1996
SJ 03*	-	Londrina - PR	1996
SJ 05, 06, 07 e 08**	Podridão de colo (Cultivo/ plantio direto: feijão-trigo-soja - cv. FT Abiara - $\pm$ 20 DAE***)	José de Faveri - Taquarituba-SP	11/97
SJ 10	Podridão de colo (Cultivo/ plantio direto: milho-soja - cv. FT Abiara - $\pm$ 20 DAE)	Ney Alves - Taquarituba-SP	11/97
SJ 11 e 12	Podridão de colo (plantas com vagens em formação)	Santa Bárbara-SP	12/97
SJ 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21 e 22	Queima de folhas (cv. Garça Branca - 95 dias)	Alécio Sachsser - Faz. Tucano - Lucas do Rio Verde-MT	02/98
SJ 23, 24 e 26	Lesão em pecíolo (cv. Xingu - 113 dias)	Osmar Antonio Carlot – Faz. Carlot - Lucas do Rio Verde-MT	02/98
SJ 27, 28, 29, 30 e 31	Queima de folhas (cv. Xingu - 113 dias)	Osmar Antonio Carlot – Faz. Carlot - Lucas do Rio Verde-MT	02/98
SJ 33, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 e 44	Lesão em pecíolo (cv. FT-108 - 108 dias)	Valdir Schwarz - Faz. Itaipú - Lucas do Rio Verde-MT	02/98
SJ 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80	Queima de folhas (cv. FT-108 - 108 dias)	Valdir Schwarz - Faz. Itaipú - Lucas do Rio Verde-MT	02/98
SJ 81	Lesão em colo (plantas com vagens formadas)	Ney Alves - Taquarituba-SP	03/98

* Isolados cedidos pelo Dr. J. T. Yorinori (CNPSo-EMBRAPA-Londrina)

** Todos os números devem ser precedidos pela sigla SJ (soja)

*** DAE (dias após a emergência)

5.1.3 Preservação dos fungos

Os isolados obtidos de soja, bem como os isolados dos grupos de anastomose padrões de *Rhizoctonia solani* (Quadro 3), são preservados em tubos de cultura contendo BDA e óleo mineral (Tuite, 1969), em frascos de penicilina com água destilada esterilizada (Figueiredo, 1967) e em grãos de arroz segundo metodologia modificada de Sneh & Adams (1996). Frascos de 250ml com tampa de rosca contendo grãos de arroz, água destilada e chloramphenicol, na concentração de 250µg/ml, foram levados ao fogo até iniciar fervura. Em seguida, após descanso por 10 minutos, a água foi retirada dos frascos, e estes foram autoclavados duas vezes a 121°C/1 h, com um período de 24 horas de repouso entre as autoclavagens. Os grãos foram então transferidos para tubos plásticos com tampa de rosca para vedação, e submetidos a nova autoclavagem a 121°C/1h. Após descanso por 24 horas, fragmentos de micélio dos isolados, obtidos da periferia de culturas incubadas a 28°C por três dias, no escuro, foram transferidos para os tubos, e incubados a 26°C durante 10-14 dias, no escuro. Concluída a colonização total dos grãos, os tubos foram colocados em dessecador por cerca de 15 dias, objetivando a retirada da umidade, a fim de aumentar o tempo de preservação dos isolados. Os tubos foram colocados a temperatura de -20°C.

Os isolados dos grupos de anastomose padrões foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Paulo Cesar Ceresini (FE/UNESP/Ilha Solteira-SP), que os introduziu através da intermediação do CENARGEM - EMBRAPA. Os isolados introduzidos foram procedentes de coleções mantidas pelos pesquisadores J. B. Sinclair (Universidade de Illinois, Urbana-Champaign, EUA), A. Ogoshi (Hokkaido University, Sapporo, Japão), L. J. Herr (The Ohio State University, Wooster, EUA), S. Naito (Tohoku National Agricultural

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

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

Experiment Station, Morioka, Japão) e M. A. Cubeta (Duke University, North Carolina, EUA).

5.2 Determinação de características citológicas específicas de *Rhizoctonia* spp. e *Rhizoctonia solani*

5.2.1 Número médio de núcleos por célula

Esta determinação foi feita contando-se o número de núcleos em cada uma de 20 células jovens em lâminas de vidro para microscopia contendo camada fina de ágar-água (AA) a 3%. Essas lâminas foram preparadas de forma semelhante à técnica da lâmina de vidro para microscopia [adaptada por Ceresini et al. (1996) das técnicas de Herr & Roberts (1980) e Kulik & Dery (1992)] descrita para identificação de anastomose de hifas, diferente apenas pela não execução de pareamento entre isolados. As lâminas de vidro foram lavadas em solução de detergente, enxaguadas e secas ao ar. Posteriormente, foram colocadas no interior de placas de petri de 90 x 20mm sobre papel de filtro cortado nas dimensões da lâmina. Os conjuntos de lâminas foram autoclavados a 121°C/30 min. Assepticamente, com auxílio de uma pipeta, as lâminas foram cobertas com AA a cerca de 90°C, a fim de formar uma camada fina de ± 1 mm de espessura. Um disco de BDA obtido da margem de uma cultura nova de um isolado a ser identificado foi repicado para a lâmina. O conjunto foi incubado a 25°C/40-48 horas, no escuro.

Após incubação as lâminas foram tratadas com formaldeído 3%, por dois minutos, enxaguadas com água destilada esterilizada, por um minuto e secas com papel

adsorvente. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com solução 1ppm, em água destilada, do corante DAPI (4',6'diamidino-2-phenyl-indole), por 5 minutos, sendo após, lavadas com água destilada esterilizada por 3 minutos, para retirada do excesso de corante do ágar e das hifas. Após retirado o excesso de água, adicionou-se sobre a camada de gel uma gota de glicerina, e sobre esta uma lamínula de 20 mm². As observações foram feitas em microscópio sob luz ultravioleta a 160 e 300X de aumento (Martin, 1987; Kulik & Dery, 1992).

5.3 Caracterização de isolados de *Rhizoctonia solani* com relação ao grupamento de anastomose

Os isolados de *R. solani* representantes dos grupos de anastomose (AG-1 a AG-9 e AG-11) foram pareados com os isolados de *R. solani* obtidos de soja tomando-se como base os relatos da literatura a respeito dos grupos de anastomose associados a cultura da soja (Quadro 4), bem como pelos aspectos morfológicos das culturas em BDA, além da coloração e tamanho dos escleródios.

A anastomose de hifas foi determinada pela técnica da lâmina de vidro para microscopia [adaptada por Ceresini et al. (1996) das técnicas de Herr & Roberts (1980) e Kulik & Dery (1992)] descrita no item 5.2.1. Um disco de BDA+oxitetraciclina (50µg/ml) obtido da margem de uma cultura nova de um isolado a ser identificado e outro de um dos isolados padrões de *R. solani* com AG conhecido foram posicionados a 2cm um do outro sobre a lâmina de vidro com fina camada de AA a 3% e pH 8,5. O conjunto foi incubado a 25°C/40 horas, no escuro.

Quadro 4. Grupos de anastomose de *Rhizoctonia solani* relatados como patógenos em soja.

Grupo de Anastomose	Doenças ocasionada	Referência
AG 1, não especificado quanto ao subgrupo	podridão de raízes	NAIKI & UI (1981)
AG 1-IA	queima de folhas	BOLKAN & RIBEIRO (1985)
	queima de plântulas “leaf blight”	YANG et al. (1990)
		ATKINS Jr. & LEWIS (1954); JONES & BELMAR (1989); YANG et al. (1988 e 1990)
AG 1-IB	“web blight” e “leaf blight”	JONES & BELMAR (1989)
	“leaf blight”	ATKINS Jr. & LEWIS (1954); MUYOLO et al. (1993a e b); YANG et al. (1990)
AG 1-IC	“damping-off”	PARMETER et al. (1969)
AG 2-2 IIIB	podridões da coroa, raízes e lesões no caule	LIU & SINCLAIR (1991 e 1992)
	podridões de hipocótilos	MUYOLO et al. (1993a e b)
AG 2-3	“leaf blight”	NAITO et al. (1995)
AG 4, não especificado quanto ao subgrupo	podridões de hipocótilos	BOLKAN & RIBEIRO (1985)
	“damping-off”	NAITO et al. (1993)
AG 5	podridão de raízes	NAIKI & UI (1981)
	não descrita, apenas associação ao hospedeiro	TU & CHANG (1978)
AG 7	“damping-off”	NAITO et al. (1993)

Quando as hifas dos isolados estavam se interseptando, adicionou-se, sobre o centro da lâmina, uma gota de solução de safranina O de Bandoni 0,03% e, após, uma gota de solução aquosa de KOH a 3% (modificado de Yamamoto & Uchida, 1982), sobrepondo-se então uma lamínula de vidro, sendo o excesso de corante retirado com papel de filtro. As observações foram feitas em microscópio sob campo claro a 200 e 400X de aumento (Liu & Sinclair, 1991).

Foram consideradas hifas compatíveis quando se observou conexão de paredes celulares acompanhada de fusão das células em anastomose e morte de algumas das células em cada hifa envolvida na fusão (reação categoria 2) ou, fusão de paredes celulares e plasmalema das hifas em anastomose (reação categoria 3) (Carling & Leiner, 1990).

5.4 Determinação de características culturais de *Rhizoctonia solani*

5.4.1 Temperaturas mínima, ótima e máxima para crescimento micelial

Foram determinadas através da incubação por 48 horas em estufa biológica, no escuro, numa amplitude de 5-45°C, em intervalos de 5°C. As comparações foram efetuadas em placas de 9cm de diâmetro, contendo meio de BDA + oxitetraciclina (50 µg/ml), para o centro das quais transferiu-se discos de micélio obtidos das margens de culturas crescidas em BDA+oxitetraciclina a 25°C/48 h, no escuro. Cada experimento constou de 5 repetições em um delineamento inteiramente casualizado.

5.4.2 Temperatura letal

Este referencial é considerado como sendo a menor temperatura capaz de reduzir em 90 a 100% a sobrevivência de fungos e foi determinado de acordo com metodologia empregada por Lefèvre & Souza (1993), com variação na idade dos isolados de *R. solani* [dias que os frascos com substrato (3 partes de esterco curtido de curral, 1 parte de areia lavada e 2% de farelo de aveia, com 30 ml de água para cada 100 ml de substrato seco ao

ar) permaneceram na incubadora após a repicagem]. Os testes foram realizados em banho térmico. O substrato foi retirado assepticamente do frasco com auxílio de uma espátula e colocado em tubos esterilizados na quantidade de, aproximadamente, 6 cm³/tubo. Com auxílio de um bastonete de algodão todas as partículas aderentes à parede do tubo foram removidas, evitando a existência de fragmentos não imersos quando o tubo foi introduzido no banho. Imediatamente antes do tratamento foi adicionada água destilada esterilizada nos tubos, de modo que o substrato ficasse saturado, sem bolhas de ar, proporcionando melhor condutividade térmica.

Para monitoramento da temperatura no interior dos tubos, foi montado um tubo padrão de cultura, idêntico aos tubos usados nos tratamentos. Nesse tubo foi colocada a mesma quantidade de substrato, água destilada e um termômetro aferido com o termômetro do banho térmico. Quando o termômetro do banho térmico indicava a temperatura desejada, o tubo padrão (com termômetro) e os tubos com substrato a serem tratados foram introduzidos no banho, de modo que todo o substrato ficasse submerso. No momento em que a temperatura do tubo padrão atingia a temperatura desejada, foi iniciada a contagem de 30 minutos de tratamento.

Após a permanência por 30 minutos, em imersão, no banho a dada temperatura, o conteúdo do tubo de cultura foi vertido assepticamente em placa de petri esterilizada, contendo papel de filtro para absorção do excesso de água. O substrato foi então revolvido e espalhado por toda a placa. Em seguida 20 fragmentos foram transferidos, com auxílio de pinça com ponta fina, para 4 placas de petri (5 fragmentos/placa) com BDA+ oxitetraciclina (50 µg/ml). Da mesma forma 4 placas receberam fragmentos de substrato colonizado, porém sem tratamento térmico, representando o controle. As placas foram

armazenadas à 26°C, no escuro, por tempo suficiente para indicar se houve sobrevivência do fungo àquela dada temperatura. Foi verificada a porcentagem de fragmentos que apresentou crescimento do fungo. As temperaturas testadas variaram em intervalos de 2,5°C em uma amplitude de 40,0 a 52,5°C.

5.4.3 Requerimento de tiamina

Foi determinada para isolados de *R. solani* de soja com AG conhecido utilizando-se o meio de GASP [D-glucose, 10g; L-asparagina, 2g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5g; KH_2PO_4 , 1g; $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0,2mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1mg; água destilada e deionizada, q.s.p. 1000ml; ágar, 20g] descrito por Ogoshi & Ui (1979) e metodologia adaptada por Johnk & Jones (1993) onde culturas novas de cada isolado cresceram separadamente neste meio, à 26°C no escuro.

Anteriormente à determinação do requerimento de tiamina foi verificado o efeito das condições de cultivo (pH do meio de GASP – original-4,7 e corrigido para 7,0) sobre o crescimento de isolados padrões autotróficos e auxotróficos para tiamina. Um disco de cultura de cada isolado, crescido em meio basal de GASP, foi transferido para 50ml de meio de GASP líquido com ou sem hidrocloreto de tiamina (10^{-5}M), em frasco de Duran de 250ml. Quatro frascos foram preparados para cada isolado, distribuídos em um agitador horizontal e incubados por 15 dias a temperatura de cerca de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ a 120 rpm, no escuro. Após esse período, a massa micelial de cada isolado foi separada do meio de cultura através de filtração a vácuo e seca em estufa a 65°C/48 horas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições. Foi comparada a massa micelial seca dos

isolados, determinando-se a relação entre massa micelial produzida em meio com tiamina/massa micelial produzida em meio sem tiamina (Lui & Sinclair, 1991).

5.4.4 Produção de escleródios

Conforme metodologia descrita por Viana & Souza (1997), para produção de microescleródios de *Macrophomina phaseolina*, procedeu-se a produção de escleródios em meio de cultura BDA com 0,7% de ágar. Para cada placa de petri contendo meio de cultura foi transferido um disco de 5mm de diâmetro obtido de cultura de *R. solani* crescida por 48 horas em meio de BDA + oxitetraciclina (50 µg/ml), no escuro, sendo estas mantidas a 26°C/30 dias, no escuro. O experimento foi delineado de forma inteiramente casualizada com 5 repetições.

Para quantificação dos escleródios formados, meio de cultura contendo os escleródios e água destilada esterilizada foram agitados em liquídificador, em velocidade média, por 1 minuto. Para que os escleródios maiores não fossem quebrados durante o processo de separação, realizou-se a retirada destes com pinça, assepticamente, antes da agitação em liquídificador. Em seguida o conteúdo foi transferido para peneiras com aberturas de 0,850, 0,600, 0,425 e 0,250 mm. Todos os escleródios foram ressuspensos em água e transferidos para conjunto de funil de büchner e kitassato contendo papel de filtro para filtração a vácuo. A viabilidade de escleródios por classe de tamanho para os isolados de *R. solani* foi determinada transferindo-se 50 escleródios de cada classe para 5 placas de petri de 9cm de diâmetro contendo meio de BDA + oxitetraciclina (50 µg/ml) (10 escleródios/placa). A quantificação da proporção de escleródios germinados foi determinada após incubação a

26°C/48 h. O número de escleródios em cada classe foi estimado pela contagem dos escleródios com auxílio de microscópio estereoscópio.

5.5 Formação da fase teleomórfica

A fase sexual foi induzida através da inoculação de folhas de soja enraizadas, mantidas em frascos de vidro em estufa incubadora. Folíolos de soja com algodão umedecido na base, acondicionados em placas de petri, foram mantidos em estufa incubadora tipo B.O.D. com temperatura ajustada para 26°C e fotoperíodo de 12 horas. Após enraizamento, tais folíolos foram transferidos para vidros de penicilina contendo água e os conjuntos foram colocados em recipientes de vidro de 5 litros. Suspensão de micélio (proporção de 10:1) foi utilizada para inoculação. A umidade dentro do recipiente foi mantida pela aspersão de água, quando necessário, e os conjuntos foram mantidos em estufa incubadora a 28-29°C e fotoperíodo de 12 horas. Após aparecimento dos sintomas da doença, monitorou-se a formação de himênio, basídias e basidiósporos.

5.6 Patogenicidade de *Rhizoctonia solani* à soja

Os isolados obtidos de hipocótilo ou raízes foram inoculados nas plantas hospedeiras, sob condições de casa de vegetação, utilizando-se substrato de crescimento areno-orgânico, constituído por 3 partes de esterco curtido peneirado, 1 parte de areia lavada e 2% de farelo de aveia (p/v), umedecido com água destilada na proporção de 30ml de água para cada 100ml de substrato seco ao ar. Foram colocados cerca de 200ml desse

substrato por frasco de vidro transparente (soro fisiológico de 350ml), tampado com rolha de borracha furada ao centro, na qual se introduziu um tubo de vidro vazado, vedando-se com tampão de algodão. Procedeu-se a autoclavagem destes por duas vezes, durante uma hora a 121°C, com um período de 24 horas entre as autoclavagens.

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

Foram utilizados vasos de 18 cm de diâmetro na parte superior e formato cônico, com capacidade para 1500ml de solo. Realizaram-se inoculações em dois tipos de solo, solo natural retirado de barranco e solo com calagem e correção da saturação de bases (Quadro 5). Do volume total, 500ml para cada vaso, foi retirado para inoculação.

Quadro 5. Análise química dos solos utilizados no experimento.

	pH	M.O.	P resina	mmol _c /dm ³						V
	CaCl ₂	g/ dm ³	mg/dm ³	H + Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	%
Sem correção	4,5	6	2	20	0,2	3	1	5	25	19
Com correção	5,9	44	209	24	3,2	66	29	98	121	80

Os isolados de *R. solani* foram incorporados pela mistura do substrato areno-orgânico contido nos frascos, com 500ml de solo, na proporção de 1% (peso/volume - peso do substrato por volume de solo). Após homogeneização, em sacos plásticos, o solo inoculado foi retornado aos vasos. Posteriormente, 10 sementes de soja da cv. FT Cristalina

foram semeadas em cada vaso, sendo estes mantidos em casa de vegetação, com temperatura ajustada para $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Sempre que necessário os vasos foram molhados, de modo a manter a umidade dentro da capacidade de campo. Foram incluídos vasos contendo plantas não inoculadas com o patógeno representando o controle do experimento, bem como padrão para cálculo da porcentagem de germinação das sementes. O delineamento foi inteiramente casualizado, com 5 repetições.

Os isolados da parte aérea foram testados quanto a agressividade, sob duas condições: em plantas cultivadas em vasos e em ensaios em folhas destacadas, de acordo com as metodologias descritas por Bolkan & Ribeiro (1985) e por Muyolo et al. (1993a), respectivamente.

A agressividade em planta inteira foi realizada em plantas de soja cv. Xingu com idade aproximada de 47 dias, cultivadas em vasos plásticos contendo solo natural, sob condições de casa de vegetação, nas quais realizou-se adubação de cobertura com yogen nº 2, de acordo com o recomendado para a cultura. A inoculação se deu através da deposição, na região central da folha, de um disco de micélio do isolado a ser testado, obtido de cultura crescida em BDA + oxitetraciclina ($50\text{ }\mu\text{g/ml}$) por 48 horas a 26°C , no escuro. Após a inoculação, toda a bancada contendo os vasos com as plantas inoculadas foi coberta com filme plástico transparente, que foi mantido até o momento da avaliação, visando manter as condições de umidade. Foram inoculadas três folhas por planta, duas plantas por vaso e dois vasos por isolado. Folhas inoculadas de forma semelhante, no entanto, com discos somente com BDA + oxitetraciclina ($50\text{ }\mu\text{g/ml}$), serviram como testemunha.

No teste de agressividade em folhas destacadas utilizou-se folhas de plantas, da mesma cultivar, com aproximadamente 55 dias, cultivadas sob as mesmas

condições daquelas empregadas no teste de virulência em planta inteira. Folhas sadias e com bom aspecto nutricional foram lavadas com solução aquosa de hipoclorito de sódio 0,3% por 3 segundos e enxaguadas por duas vezes com água deionizada esterilizada. Cada trifólio foi colocado em placa de petri de 15 cm de diâmetro, com papel de filtro no fundo, umedecido, sendo o conjunto placa + papel de filtro, previamente autoclavado a 121°C/30 minutos. Para o centro do trifólio repicou-se um disco de micélio do isolado a ser testado, obtido de cultura crescida em BDA + oxitetraciclina (50 µg/ml) por 48 horas a 26°C, no escuro. A placa foi vedada com filme plástico, no intuito de manter a umidade, e acondicionada em estufa biológica com temperatura ajustada para 26°C, e fotoperíodo de 12 horas. Foram inoculados três trifólios por isolado. Folhas inoculadas com discos contendo somente BDA + oxitetraciclina (50 µg/ml), serviram como testemunha.

A avaliação da severidade dos isolados obtidos de hipocótilo e raiz foi efetuada aos 14 dias após inoculação e semeadura, através de um índice de doença (ID) baseado numa escala de notas variável de 0 a 7 (modificada de Davey & Papavizas, 1959 e Chung et al., 1988). A escala de notas engloba os seguintes níveis de doença:

- 0 = plantas sem infecção visível;
- 1 = plantas com descoloração típica do caule, cotilédones e raízes;
- 2 = plantas com lesões pequenas;
- 3 = plantas com lesões largas;
- 4 = plantas com lesões extensas (50% do caule);
- 5 = plantas completamente aneladas;
- 6 = *damping-off* de pós-emergência;
- 7 = *damping-off* de pré-emergência.

Para os isolados da parte aérea, a avaliação da severidade foi efetuada 5 dias após inoculação, utilizando-se índice de doença (ID) baseado numa escala de notas com cinco níveis (Bolkan & Ribeiro, 1985):

0 = sem sintomas aparentes;

1 = 1-25% da superfície do folíolo com área necrosada;

2 = 26-50% da superfície do folíolo com área necrosada;

3 = 51-75% da superfície do folíolo com área necrosada;

4 = mais de 75% da superfície do folíolo com área necrosada.

Cada folíolo do trifólio foi avaliado separadamente.

Foi efetuado o reisolamento do patógeno em algumas das plantas inoculadas, para confirmação da presença do patógeno como causador dos sintomas.

5.7 Caracterização dos isolados de *Rhizoctonia solani* por marcadores moleculares

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

5.7.1 Extração de DNA total

Utilizou-se o protocolo aprimorado para *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium oxysporum* (Kuramae-Izioka, 1997), onde três discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro foram retirados de culturas crescidas em BDA + oxitetraciclina (50 µg/ml), mantidas por 3-4 dias a 26°C, no escuro, e colocados em tubos 50ml contendo 30ml de meio líquido batata-dextrose. Estes foram incubados durante 10 dias, no escuro, a 26°C.

Os micélios dos isolados foram lavados três vezes com água destilada esterilizada, secos em SpeedVac e armazenados a -20°C até a extração do DNA.

Para extração do DNA total, os micélios foram triturados com auxílio de pistilo e almofariz em nitrogênio líquido e, após, ressuspensos com 700 µl de tampão de extração (100mM Tris, pH8,0, 50mM EDTA, pH 8,0, 500mM NaCl, 20% sodium dodecyl sulfate). O homogeneizado foi incubado por 30 minutos a 65°C, em banho-maria, sob agitação. Adicionou-se 500 µl de acetato de potássio 5M às amostras e estas foram colocadas em banho de gelo por 30 minutos, sendo realizada a inversão a cada 5 minutos. Centrifugou-se as amostras por 10 minutos a 12.000 rcf. O sobrenadante foi extraído mais uma vez com clorofórmio:álcool isoamílico (25:1). Em cada amostra foi adicionado um volume de isopropanol para precipitar o DNA, sendo realizada nova centrifugação por 10 minutos a 12.000 rcf. O 'pellet' foi lavado com 700 µl de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos. Secou-se o 'pellet' em SpeedVac por 10 minutos. O DNA foi dissolvido em 1/10 TE (10mM Tris, pH 8,0, 1mM EDTA) e tratado com 40 µg/ml de RNase DNase-free a 37°C, durante 3 horas. A quantificação do DNA foi feita em GenQuant (Pharmacia). Foi lida a razão A_{260nm}/A_{280nm} de todas as amostras de DNA para determinar a qualidade do DNA, a qual estava entre 1,7 e 1,9 indicando que estes estavam livres de proteínas e carboidratos. Todas as amostras de DNA foram mantidas a -20°C até o momento das reações de RAPD (polimorfismo de DNA amplificados ao acaso).

5.7.2 Reações de RAPD

Os ‘primers’ utilizados para as reações de RAPD foram OPP-03, OPP-10, OPP-11, OPP-12, OPP-14, OPP-15, OPP-17, OPP-18, OPP-19, OPA-02, OPA-03, OPA-17 e OPA-20, provenientes dos ‘kits’ A e P da Operon (Operon Technologies Inc. Alameda, CA) (Quadro 6). Os procedimentos para as reações da RAPD foram basicamente aqueles descritos por Williams et al. (1990). Foram utilizadas placas de ELISA com 96 células para as reações, onde cada uma continha 10X tampão PCR, 1,5mM MgCl₂; 2,5mM de cada um dos quatro dNTPs, 5 ng de “primer”, 5ng de DNA genômico e 1,0 unidade de *Taq* DNA polimerase. O volume de 20 µl de reação foi coberto com 30 µl de óleo mineral. Para as amplificações, o termociclador foi programado para um ciclo a 96°C por 2 min., seguido de 35 ciclos a 96°C por 1 min., 35°C por 1 min., 72°C por 1,5 min., e um ciclo a 72°C por 5 min.

Quadro 6. Sequência dos ‘primers’ usados em reações de RAPD para determinar similaridade genética entre isolados de *Rhizoctonia solani* listados no Quadro 2 e grupos de anastomose padrões.

Código-OPERON	Sequência (5’ para 3’)
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-17	GACCGCTTGT
OPA-20	GTTGCGATCC
OPP-03	CTGATACGCC
OPP-10	TCCCGCCTAC
OPP-11	AACGCGTCGG
OPP-12	AAGGGCGAGT
OPP-14	CCAGCCGAAC
OPP-15	GGAAGCCAAC
OPP-17	TGACCCGCCT
OPP-18	GGCTTGGCCT
OPP-19	GGAAGGACA

Em cada tubo contendo 20µl de reação e em 200 ng do marcador molecular Ladder 1Kb foi adicionado 4,0µl de tampão de carregamento (40% de sacarose e 0,25% bromofenol azul) (Sambrook et al., 1989). Os produtos de RAPD e o marcador molecular foram separados em gel de agarose a 1,5% em TBE (0,1M de Tris-HCl, 0,1M de ácido bórico, 0,02mM de EDTA, pH 8,3) contendo 10 mg/ml de brometo de etídio (Sambrook et al., 1989), numa voltagem aproximada de 5V/cm de gel. Os géis foram fotografados e impressos em aparelho 'Eagle Eye' em preto e branco, para análise.

5.8 Análise dos resultados

Os dados citomorfológicos, culturais e fisiológicos foram comparados através das médias e pela distribuição de frequência ou positividade/negatividade dos fenômenos observados.

Dados referentes a patogenicidade foram submetidos à análise de variância pelo teste F de Snedecor, e ao teste de Tukey para comparação de médias, ao nível de probabilidade de 5%. Os dados de patogenicidade dos isolados causadores de queima da parte aérea foram comparados através de correlações simples, empregando-se o Teste t para se determinar a significância dos coeficientes de correlação de Pearson (Pimentel Gomes, 1982).

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

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

A distância genética entre os isolados de *R. solani* de soja e padrões de anastomose foi determinada pelo coeficiente Sample Matching.

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

6 RESULTADOS

6.1 Estabelecimento de coleção de isolados de *Rhizoctonia* spp. da soja

Estabeleceu-se uma coleção representativa de isolados de *Rhizoctonia* spp. associados à cultura da soja, no Brasil. Além dos isolados SJ 01, SJ 02 e SJ 03, procedentes das regiões de São Gotardo-MG, Ponta Grossa e Londrina-PR, respectivamente, conseguidos junto ao CNPSO-EMBRAPA-Londrina, outros 70 isolados foram obtidos de plantas de soja. Dentre esses, seis foram obtidos de plantas com sintomas de podridão no colo, coletadas em três diferentes áreas na região de Taquarituba-SP, e dois procedentes da região de Santa Bárbara-SP. Os outros 62 isolados foram obtidos de plantas com sintomas de queima de folhas e lesões em pecíolos, procedentes de três áreas distintas na região de Lucas do Rio Verde-MT (Quadro 2).

6.2 Determinação de características citológicas específicas de *Rhizoctonia* spp. e *Rhizoctonia solani*

6.2.1 Número médio de núcleos por célula

Inicialmente determinou-se a condição nuclear de todos os isolados, visto ser esta uma característica primária a ser considerada, para enquadrar *Rhizoctonia* spp. em dois grupos: espécies binucleadas e multinucleadas. *Rhizoctonia solani* é caracterizada como uma espécie multinucleada (Sneh et al., 1991).

Os isolados SJ 06, SJ 08, SJ 10, SJ 11, SJ 12 e SJ 81 apresentaram em média de 1,8 a 2,3 núcleos/célula, sendo que a maioria das células examinadas continham 2 núcleos (Quadro 7, Figura 1).

Os demais isolados (67 no total) apresentaram uma média variando de 7,1 (isolado SJ 03) a 21,7 (isolado SJ 64) núcleos/célula (Quadro 7). A maioria das células apresentaram em média 8-23 núcleos, entretanto, houve uma variação de 3-32, no número de núcleos/célula. A condição multinucleada das células pode ser visualizada na Figura 1.

Os isolados obtidos de plantas com lesões no colo (SJ 01, SJ 02, SJ 03, SJ 05 e SJ 07) apresentaram em média 7,1 a 12,3 núcleos/célula (Quadro 7) e mais de 50% das células avaliadas apresentaram de 7 a 10 núcleos (Figura 2). Dentre os isolados procedentes de plantas com sintomas de queima da parte aérea, a média variou de 7,6 a 21,7 núcleos/célula (Quadro 7), sendo a distribuição da porcentagem de núcleos por célula mais homogênea (Figura 2).

Quadro 7. Condição nuclear de isolados de *Rhizoctonia* spp. de soja¹.

Isolado	Núcleos/célula		Variação (min-max)	Isolado	Núcleos/célula		Variação (min-max)
	Média ²	Desvio ³			Média	Desvio	
SJ 01	10,8	2,9	6-19	SJ 45	19,4	5,2	11-29
SJ 02	8,8	2,4	5-14	SJ 46	14,4	4,6	8-27
SJ 03	7,1	1,0	6-9	SJ 47	15,6	5,3	6-26
SJ 05	9,7	1,7	6-13	SJ 48	12,8	4,1	5-20
SJ 06	2,2	0,6	2-4	SJ 49	18,3	3,2	11-24
SJ 07	12,3	2,6	8-16	SJ 50	16,9	5,0	8-24
SJ 08	1,8	0,4	1-2	SJ 51	16,5	5,7	8-26
SJ 10	2,0	0,3	1-3	SJ 52	14,9	4,5	8-24
SJ 11	2,0	0,0	2-2	SJ 53	16,2	4,8	10-26
SJ 12	2,0	0,0	2-2	SJ 54	13,8	5,0	5-22
SJ 13	12,7	5,6	6-22	SJ 56	16,2	4,2	7-22
SJ 14	12,6	6,6	5-25	SJ 57	13,7	3,8	7-19
SJ 15	12,9	3,4	6-16	SJ 58	14,8	4,5	8-27
SJ 16	20,1	3,6	14-26	SJ 59	13,9	4,1	8-22
SJ 19	17,4	5,2	9-25	SJ 60	18,2	5,3	10-28
SJ 20	21,2	5,6	9-30	SJ 61	17,5	6,9	6-27
SJ 21	21,0	3,8	14-26	SJ 62	8,5	2,5	4-13
SJ 22	18,1	3,6	11-23	SJ 63	14,4	9,1	4-32
SJ 23	10,1	1,9	8-15	SJ 64	21,7	4,6	14-27
SJ 24	10,4	4,2	5-17	SJ 65	15,3	5,1	8-26
SJ 26	14,2	4,6	9-23	SJ 66	13,8	5,2	6-25
SJ 27	19,9	4,8	11-29	SJ 67	14,3	6,0	7-28
SJ 28	18,7	3,1	15-25	SJ 68	8,2	3,4	3-17
SJ 29	17,4	4,0	8-26	SJ 69	9,9	6,0	3-21
SJ 30	12,5	3,6	6-18	SJ 70	14,9	4,8	9-24
SJ 31	16,7	3,9	11-23	SJ 71	11,0	3,3	7-20
SJ 33	9,8	2,4	6-16	SJ 72	17,0	5,9	7-29
SJ 34	14,7	3,6	9-20	SJ 73	14,6	5,1	7-25
SJ 36	10,5	2,5	7-16	SJ 74	12,4	4,1	7-24
SJ 37	13,8	3,6	8-20	SJ 75	16,8	3,1	13-23
SJ 38	9,9	2,9	5-20	SJ 76	16,2	4,9	8-26
SJ 39	7,6	1,5	6-11	SJ 77	17,8	6,3	9-27
SJ 40	15,7	7,6	8-29	SJ 78	16,0	4,6	10-23
SJ 41	16,4	5,2	6-25	SJ 79	17,6	7,1	8-30
SJ 42	13,1	4,9	4-25	SJ 80	13,8	6,5	4-26
SJ 43	16,5	6,3	6-25	SJ 81	2,3	0,6	1-3
SJ 44	14,0	3,8	9-23				

¹ Isolados cultivados em lâmina de vidro com camada fina de AA, a 25°C, por 40-48 horas, sob ausência de luz;² Média de 20 células; ³ Desvio padrão da média.

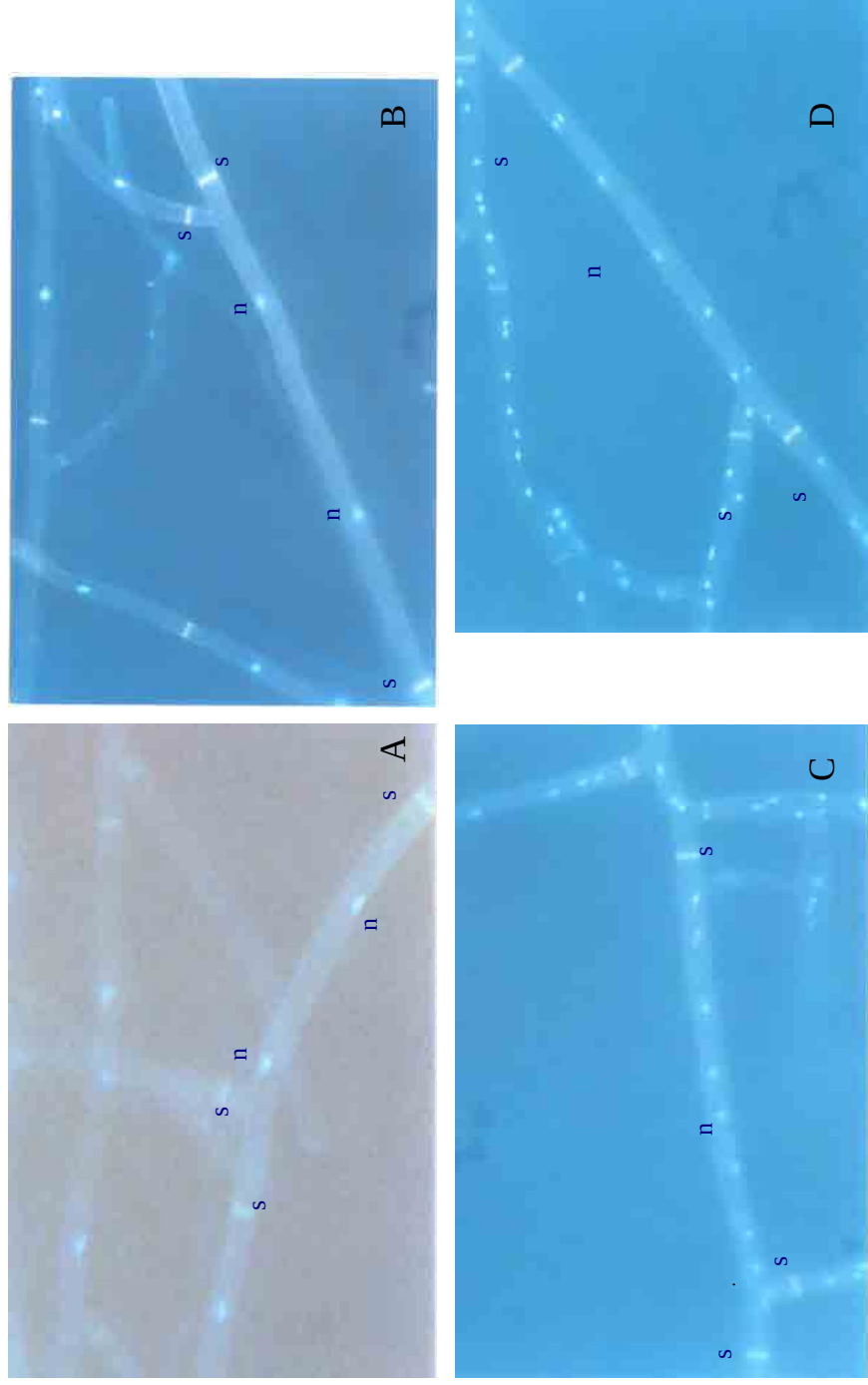


Figura 1. Condição nuclear de isolados de *Rhizoctonia* spp. de soja, A e B – binucleado; C e D - multinucleado (n – núcleo; s – septo; x 300) .

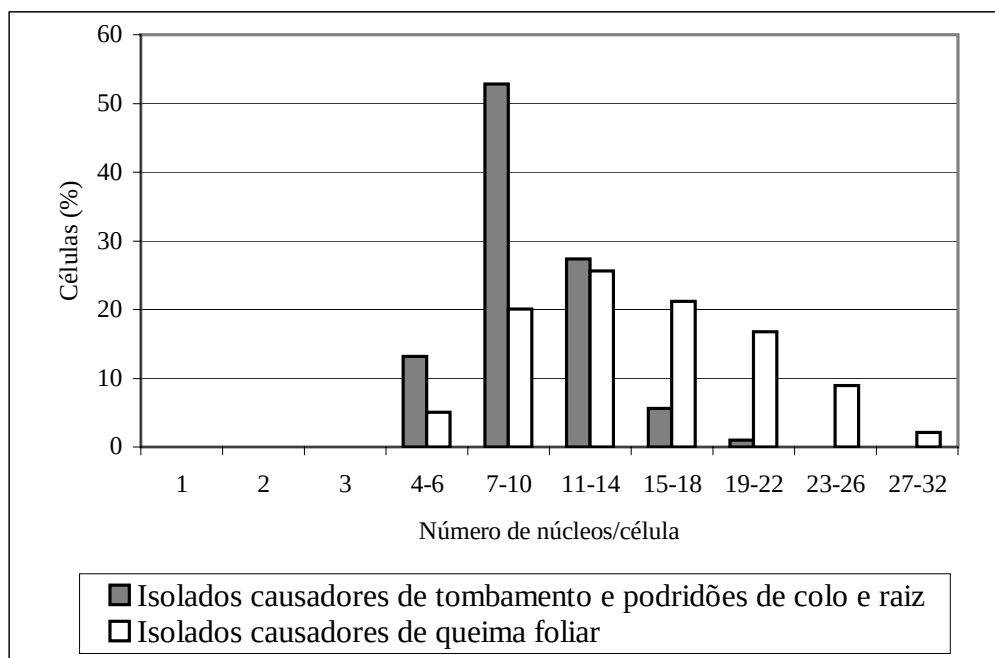


Figura 2. Distribuição das células quanto ao número de núcleos, em isolados de *Rhizoctonia solani* de soja.

6.3 Caracterização de isolados de *Rhizoctonia solani* com relação ao grupamento de anastomose

Os pareamentos foram realizados levando-se em consideração as informações obtidas na literatura (Quadro 4), bem como pelo aspecto morfológico das culturas em meio de BDA.

De acordo com Parmeter et al. (1969), Naiki & Ui (1981), Bolkan & Ribeiro (1985), Lui & Sinclair (1991 e 1992), Muyolo et al. (1993a e 1993b) e Naito et al. (1993) (Quadro 4), pelos sintomas observados nas plantas de soja das quais obteve-se os

isolados SJ 01, SJ 02, SJ 03, SJ 05 e SJ 07 (Quadro 2), alguns grupos de anastomose de *R. solani* podem estar associados, dentre os quais: AG-1 IC, AG-2-2 IIIB, AG-4, AG- 5 e AG-7.

Como o aspecto das colônias dos isolados de soja acima referidos, em meio de BDA, foram semelhantes ao crescimento dos isolados do AG-4 (Figuras 3B-C), optou-se por iniciar os pareamentos com isolados representantes dos AG-4 HGI, AG-4 HGII e AG-4 HGIII de *R. solani*.

De acordo com os critérios estabelecidos por Carling & Leiner (1990), a reação dos isolados SJ 02 e SJ 03 com ambos os isolados AG-4 HGI e AG-4 HGII foi considerada positiva. Os isolados SJ01 e SJ05 apresentaram reação de anastomose positiva com o AG-4 HGI. Anastomose de hifas também foi constatada quando os isolados SJ 01, SJ 02 e SJ 03 foram pareados com o isolado do AG-4 HGIII (Quadro 8). As Figuras 4A-D ilustram claramente a reação de anastomose, entre isolados de *R. solani* de soja e isolados padrões de grupos de anastomose. O isolado SJ 07 não efetuou anastomose com o isolado do AG-4 HGI, isto é, a reação foi negativa (Quadro 8).

Em função do aspecto cultural do isolado SJ 07 ser semelhante ao do isolado AG-2-2 IIIB, em meio de cultura BDA, realizou-se o pareamento entre tais isolados. Foi constatada reação de anastomose positiva entre o isolado SJ 07 e o representante do AG-2-2 IIIB (Quadro 8).

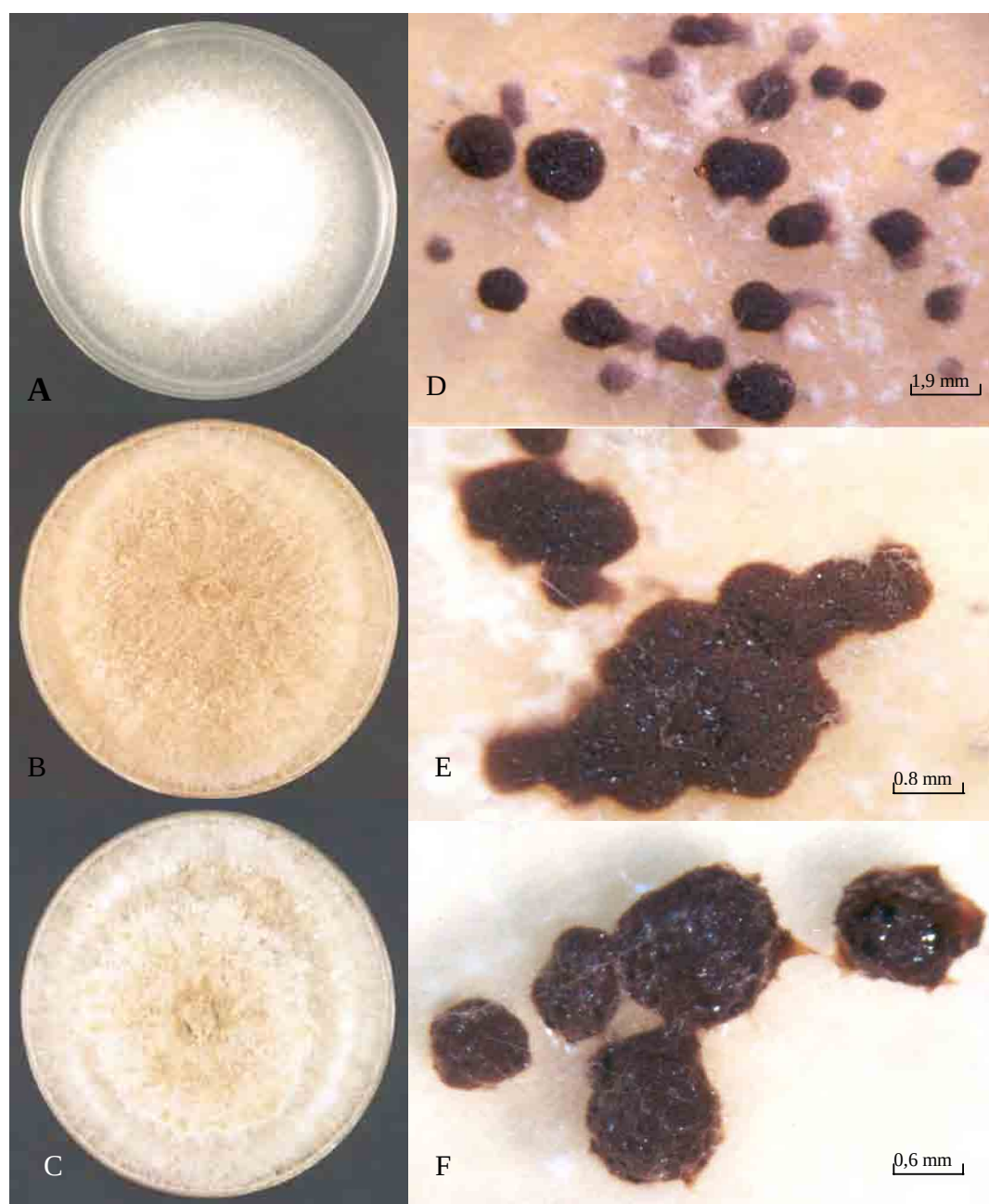


Figura 3. Aspecto cultural de isolados de *Rhizoctonia* spp. obtidos de soja e tipo de escleródios produzidos. A – isolado binucleado; B – isolado SJ 02; C – isolado SJ 01; D e E – escleródios tipo ‘sasakii’ produzidos pelo isolado SJ 19; F – escleródios tipo ‘sasakii’ produzidos pelo isolado padrão AG-1 IA - H5-519.

Quadro 8. Reação de anastomose de hifas entre isolados de *Rhizoctonia solani*, obtidos de soja no Brasil, com os isolados AG-4 HGI, AG-4 HGII, AG-4 HGIII e AG-2-2 IIIB.

Isolado	Número de pares de hifas em anastomose	Reação (+ ou-) com o isolado AG-4 HGI
SJ 01	58	+
SJ 02	31	+
SJ 03	14	+
SJ 05	64	+
SJ 07	0	-
Isolado	Número de pares de hifas em anastomose	Reação (+ ou-) com o isolado AG-4 HGII
SJ 02	24	+
SJ 03	36	+
Isolado	Número de pares de hifas em anastomose	Reação (+ ou-) com o isolado AG-4 HGIII
SJ 01	2	+
SJ 02	9	+
SJ 03	17	+
Isolado	Número de pares de hifas em anastomose	Reação (+ ou-) com o isolado AG-2-2 IIIB
SJ 07	44	+

Com relação aos demais isolados, pela sintomatologia observada nas plantas de onde se realizou o isolamento, três grupos de anastomose já foram relatados, AG-1 IA, AG-1 IB e AG-2-3 (Quadro 4). No entanto, optou-se pela realização do pareamento dos isolados com o representante do AG-1 IA, em função das características culturais destes serem semelhantes, crescimento rápido em meio de cultura BDA a 26°C e, escleródios grandes (2-4 mm), esféricos e de coloração marrom escura a pretos (Figuras 3D-F).

Todos os isolados oriundos de plantas com sintomas de queima foliar e de pecíolo apresentaram reação de anastomose positiva com o representante do AG-1 IA (Quadro 9), sendo na maioria dos casos constatadas anastomoses imperfeitas (Figura 4E).

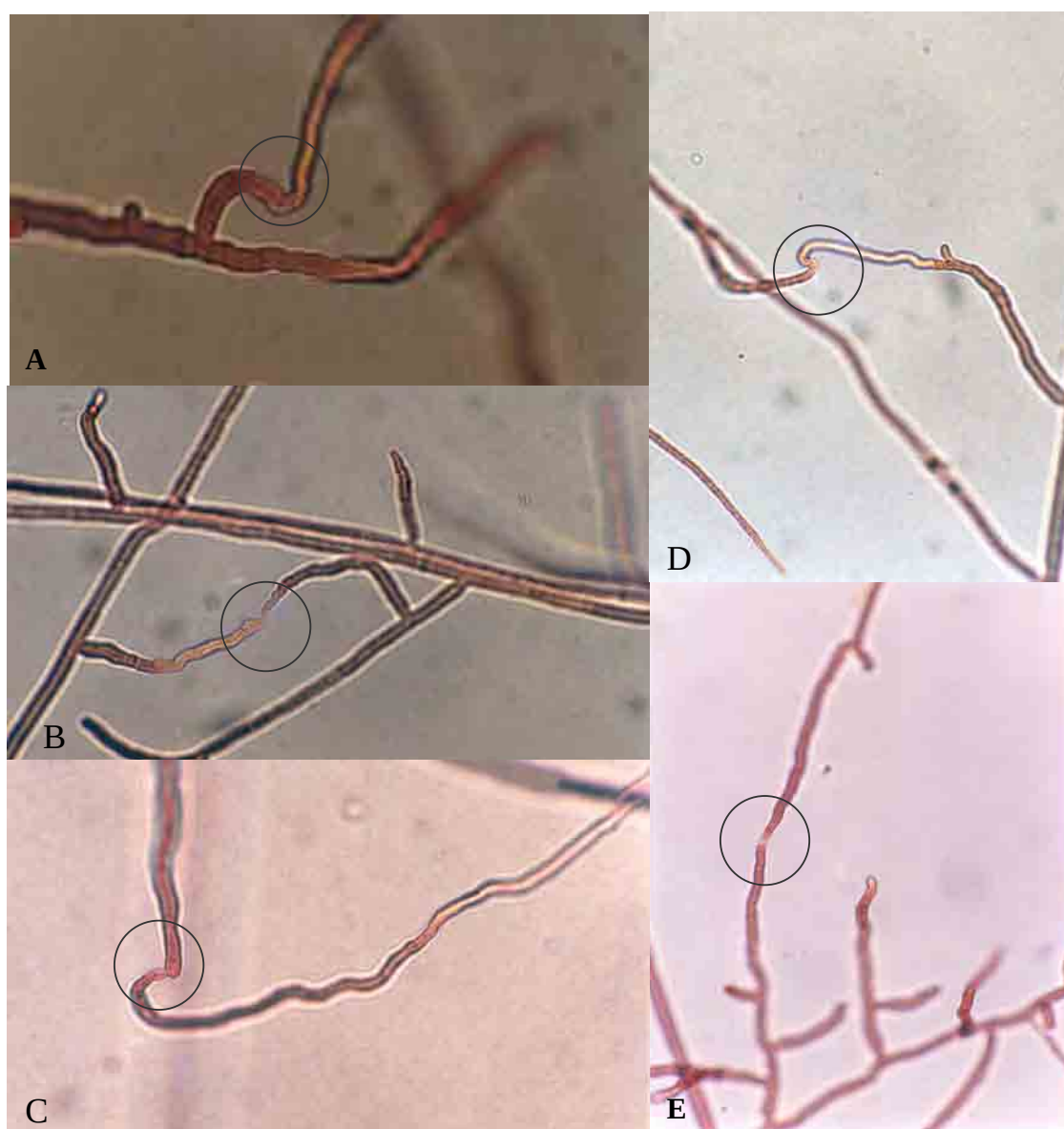


Figura 4. Anastomose de hifas (região indicada) entre isolados de *Rhizoctoni solani* de soja e isolados padrões dos grupos de anastomose [A (x 400)- SJ 02 x AG-4 HGI; B (x 200)- SJ 03 x AG-4 HGI; C (x 200)- SJ 01 x AG-4 HGII; D (x 200)- SJ 05 x AG-4 HGI; E (x 200)- SJ 29 x AG-1 IA]. A – reação do tipo C3; B-E – reações do tipo C2.

Quadro 9. Reação de anastomose de hifas entre isolados de *Rhizoctonia solani*, obtidos de soja no Brasil, com o isolado AG-1 IA.

Isolado	Número de pares de hifas em anastomose	Reação (+ ou-) com o isolado AG-1 IA	Isolado	Número de pares de hifas em anastomose	Reação (+ ou-) com o isolado AG-1 IA
SJ 13	50	+	SJ 53	46	+
SJ 14	37	+	SJ 54	42	+
SJ 15	32	+	SJ 56	47	+
SJ 16	31	+	SJ 57	45	+
SJ 19	57	+	SJ 58	43	+
SJ 20	42	+	SJ 59	33	+
SJ 21	34	+	SJ 60	71	+
SJ 22	47	+	SJ 61	39	+
SJ 23	43	+	SJ 62	25	+
SJ 24	49	+	SJ 63	57	+
SJ 26	36	+	SJ 64	53	+
SJ 27	36	+	SJ 65	53	+
SJ 28	52	+	SJ 66	47	+
SJ 29	54	+	SJ 67	119	+
SJ 30	25	+	SJ 68	32	+
SJ 31	50	+	SJ 69	64	+
SJ 33	46	+	SJ 70	104	+
SJ 34	49	+	SJ 71	47	+
SJ 36	28	+	SJ 72	35	+
SJ 37	40	+	SJ 73	67	+
SJ 38	36	+	SJ 74	35	+
SJ 39	40	+	SJ 75	36	+
SJ 40	51	+	SJ 76	72	+
SJ 41	51	+	SJ 77	48	+
SJ 42	54	+	SJ 78	46	+
SJ 43	56	+	SJ 79	32	+
SJ 44	42	+	SJ 80	30	+
SJ 45	60	+			
SJ 46	38	+			
SJ 47	49	+			
SJ 48	39	+			
SJ 49	27	+			
SJ 50	40	+			
SJ 51	49	+			
SJ 52	44	+			

6.4 Determinação de características culturais de *Rhizoctonia solani*

Foram analisados os cinco isolados causadores de podridões de raízes e de colo e 17 isolados causadores de queima da parte aérea, os quais foram escolhidos levando-se em consideração a procedência e sintomatologia (Quadro 2), de forma a ter-se representantes dos três locais de coleta e dos dois diferentes tipos de sintomas constatados nas plantas.

6.4.1 Temperaturas mínima, ótima e máxima para crescimento micelial

Além dos isolados de *R. solani* de soja, também determinou-se curvas de crescimento micelial radial, para os isolados pertencentes aos grupos de anastomose AG-1 IA, AG-1 IB, AG-1 IC, AG-2-1, AG-2-2 IIIB, AG-2-2 IV, AG-2-3, AG 4 HGI, AG 4 HGII, AG 4 HGIII, AG5 e AG 7.

A temperatura ótima para crescimento micelial dos isolados do AG-1 IB, AG-2-2 IIIB, AG-4 HGI e AG-4 HGIII, foi de 30°C (Quadro 10). Já para os isolados AG-1 IC, AG-2-1, AG-2-2 IV, AG-4 HGII e AG-5, a temperatura ótima de crescimento micelial foi 25°C (Quadro 10). Para o isolado AG-2-3 foi 20°C e para o AG-7 foi 35°C (Quadro 10). Dentre os três isolados do AG-1 IA analisados, a temperatura ótima para crescimento micelial, variou entre 25 e 30°C, para os isolados H5-519 e, H5-513 e H5-526, respectivamente (Quadro 10). A temperatura mínima para crescimento micelial, para todos os isolados dos grupos de anastomose testados, foi 10°C, exceto para os isolados do AG-2-1 e AG-2-3, que foi 5°C (Quadro 10). A temperatura máxima diferiu entre os isolados, sendo 40°C para os AG-4

HGIII e AG-7, 35°C para os AG-1 IA, AG-1 IB, AG-1 IC, AG-2-2 IIIB, AG-4 HGI, AG-4 HGII e AG-5 e, 30°C para os isolados do AG-2-1, AG-2-2 IV e AG-2-3 (Quadro 10).

As taxas máximas de crescimento micelial foram de 22,7-23,1 (AG-1 IA), 3,3 (AG-1 IB), 11,7 (AG-1 IC), 7,7 (AG-2-1), 17,8 (AG-2-2 IIIB), 7,5 (AG-2-2 IV), 8,7 (AG-2-3), 9,0 (AG-4 HGI), 11,4 (AG-4 HGII), 18,3 (AG-4 HGIII), 11,9 (AG-5) e 6,8 (AG-7) mm/dia (Quadro 10).

Os isolados de *R. solani* de soja SJ 01, SJ 02, SJ 03 e SJ 05, identificados como pertencentes ao AG-4 por anastomose de hifas, apresentaram perfis semelhantes quanto às temperaturas mínima e máxima, sendo essas, 10°C e 35°C, respectivamente (Quadro 10). Em relação a temperatura ótima para crescimento micelial, constatou-se diferenças entre os isolados. Para SJ 01 e SJ 03, a temperatura ótima para crescimento foi 25°C, já para SJ 02 e SJ 05, foi 30°C (Quadro 10). A taxa máxima de crescimento micelial para esses isolados variou de 15,8 a 19,0 mm/dia (Quadro 10).

O isolado SJ 07, apresentou como temperatura ótima para crescimento micelial radial 25°C, e as mínima e máxima, 10 e 35°C, respectivamente (Quadro 10). A taxa de crescimento micelial máxima foi 14,9 mm/dia.

Dos isolados identificados como pertencentes ao AG-1 IA, por anastomose de hifas, foram testados SJ 13, SJ 16, SJ 19, SJ 20, SJ 23, SJ 27, SJ 28, SJ 30, SJ 33, SJ 36, SJ 38, SJ 42, SJ 45, SJ 60, SJ 68, SJ 71 e SJ 80. Tais isolados apresentaram perfis semelhantes de crescimento micelial, cuja temperatura ótima foi 25°C, exceto para os isolados SJ 28, SJ 30, SJ 38 e SJ 80 que foi 30°C, e a mínima e máxima, foram 10°C e 35°C, respectivamente (Quadro 10), exceto para o isolado SJ 28, que apresentou como temperatura

mínima para crescimento, 15°C. A taxa máxima de crescimento micelial variou de 13,4 a 22,8 mm/dia (Quadro 10).

Quadro 10. Temperaturas mínima, máxima e ótima para crescimento micelial e, taxa máxima de crescimento micelial (TMCM), na temperatura ótima, de isolados de *Rhizoctonia solani* de soja e de isolados de grupos de anastomose padrões.

Isolado	Temperatura para crescimento micelial (°C)			TMCM na temperatura ótima (mm/dia)
	Mínima	Ótima	Máxima	
AG-1 IA –H5-513	10	30	35	23,1
AG-1 IA – H5-519	10	25	35	22,7
AG-1 IA – H5-526	10	30	35	23,1
AG-1 IB	10	30	35	3,3
AG-1 IC	10	25	35	11,7
AG-2-1	5	25	30	7,7
AG-2-2 IIIB	10	30	35	17,8
AG-2-2 IV	10	25	30	7,5
AG-2-3	5	20	30	8,7
AG-4 HGI	10	30	35	9,0
AG-4 HGII	10	25	35	11,4
AG-4 HGIII	10	30	40	18,3
AG-5	10	25	35	11,9
AG-7	10	35	40	6,8
SJ 01	10	25	35	15,9
SJ 02	10	30	35	19,0
SJ 03	10	25	35	15,8
SJ 05	10	30	35	18,0
SJ 07	10	25	35	14,9
SJ 13	10	25	35	14,8
SJ 16	10	25	35	22,8
SJ 19	10	25	35	16,3
SJ 20	10	25	35	18,1
SJ 23	10	25	35	15,2
SJ 27	10	25	35	20,0
SJ 28	15	30	35	15,7
SJ 30	10	30	35	13,4
SJ 33	10	25	35	21,3
SJ 36	10	25	35	22,2
SJ 38	10	30	35	17,5
SJ 42	10	25	35	21,8
SJ 45	10	25	35	22,0
SJ 60	10	25	35	21,2
SJ 68	10	25	35	21,4
SJ 71	10	25	35	22,3
SJ 80	10	30	35	22,1

6.4.2 Temperatura letal

Foram analisados os isolados de *R. solani* de soja e os isolados padrões dos grupos de anastomose AG-1 IA, AG-2-2 IIIB, AG-4 HGI e AG-4 HGII.

Em função da idade da cultura de cada isolado (tempo de colonização do substrato pelo isolado a 26°C, no escuro), constatou-se variação na temperatura letal. Entre os isolados representantes dos grupos de anastomose houve uma diferença quanto a temperatura letal (TL), para o isolado AG-1 IA a temperatura letal foi 47,5°C para as culturas com 21 e 34 dias de incubação, reduzindo-se para 45°C quando o isolado foi incubado por 42 dias. Com relação aos isolados padrões do AG-4, observou-se uma menor sensibilidade térmica a medida em que se aumentou o tempo de incubação. Em culturas com 21 e 34 dias a TL foi 47,5°C, passando a ser 50°C nas culturas incubadas por 42 dias (Quadro 11).

Com relação aos isolados de *R. solani* de soja, SJ 01 e SJ 03, identificados como pertencentes ao AG-4, a TL foi 50,0°C, independentemente da idade das culturas. Os isolados SJ 02 e SJ 05 tiveram comportamento semelhante ao dos isolados padrões do AG-4. Em culturas com 21 dias de incubação a TL foi 47,5°C, porém nas culturas incubadas por 34 e 42 dias, a TL passou a ser 50°C, exceção feita ao isolado SJ 05, cuja TL foi 47,5°C na cultura com 42 dias de incubação (Quadro 11).

O isolado SJ 07, assim como o isolado padrão AG-2-2 IIIB tiveram como TL, 50,0°C, independentemente da idade das culturas, com exceção para a cultura do isolado SJ 07 incubada por 34 dias, que teve como TL 47,5°C (Quadro 11).

Quadro 11. Temperatura letal à sobrevivência de isolados de *Rhizoctonia solani* de soja e isolados padrões de grupos de anastomose, em função da idade das culturas.

Isolado	Idade da cultura (dias de incubação)		
	21	34	42
AG-1 IA	47,5	47,5	45,0
AG-2-2 IIIB	50	50	50
AG-4 HGI	47,5	47,5	50
AG-4 HGII	47,5	50	50
SJ 01	50	50	50
SJ 02	47,5	50	50
SJ 03	50	50	50
SJ 05	47,5	50	47,5
SJ 07	50	47,5	50
SJ 13	50	50	50
SJ 16	47,5	47,5	47,5
SJ 19	47,5	45	45
SJ 20	50	50	45
SJ 23	45	47,5	45
SJ 27	47,5	47,5	47,5
SJ 28	47,5	47,5	47,5
SJ 30	50	47,5	47,5
SJ 33	50	50	50
SJ 36	50	47,5	47,5
SJ 38	50	50	50
SJ 42	50	50	50
SJ 45	50	47,5	50
SJ 60	50	50	50
SJ 68	50	50	47,5
SJ 71	50	50	50
SJ 80	50	47,5	47,5

Dentre os isolados de *R. solani* de soja pertencentes ao AG-1 IA, a TL variou entre os isolados e em função da idade das culturas. Os isolados SJ 19, SJ 20, SJ 30, SJ 36, SJ 68 e SJ 80 apresentaram perfis semelhantes ao do isolado padrão do AG-1 IA, onde houve uma redução na TL a medida em que se aumentava a idade das culturas. Os demais isolados apresentaram como TL, 47,5 ou 50°C, independentemente da idade das culturas, exceção feita os isolados SJ 23 e SJ 45 que apresentaram TL diferindo em função da idade das

culturas, porém sem seguirem o mesmo perfil apresentado pelo isolado padrão AG-1 IA (Quadro 11).

6.4.3 Requerimento de tiamina

Os isolados dos AG-1 IA e AG-2-2 IIIB comportaram-se como auto e auxotróficos para tiamina, respectivamente, em ambas as condições de pH (pH original do meio – 4,7, e corrigido para 7,0) (Quadro 12). A relação B/A foi $\leq 1,5$ para o isolado do AG-1 IA e, maior que 5,0 para o isolado do AG-2-2 IIIB. Como o pH do meio de cultura não afetou o comportamento dos isolados, optou-se por realizar os experimentos posteriores em meio com pH original, facilitando assim suas execuções.

Quadro 12. Requerimento de tiamina para crescimento micelial apresentada por isolados de *Rhizoctonia solani* dos grupos de anastomose AG-1 IA e AG-2-2 IIIB em função do pH do meio de cultura.

Isolado	Massa seca de micélio (mg)					
	pH 4,7			pH 7,0		
	Sem tiamina (A)	Com tiamina (B)	B/A	Sem tiamina (A)	Com tiamina (B)	B/A
AG 1 IA	86	62	0,7	44	66	1,5
AG 2.2 IIIB	10	51	5,4	9	65	7,6

Assim como o isolado padrão do AG-1 IA, os isolados padrões dos AG-4 HGI e AG-4 HGII comportaram-se como autotróficos para tiamina, apresentando relação B/A de 0,8 e 1,1, respectivamente (Quadro 13).

Com exceção do isolado SJ 07, auxotrófico para tiamina, os demais isolados de *R. solani* de soja comportaram-se como autotróficos para tiamina.

O isolado SJ 07 apresentou relação B/A igual a 8,0 (Quadro 13), valor superior ao apresentado pelo isolado padrão do AG-2-2 IIIB, em ambas as condições de pH do meio (Quadro 12).

Quadro 13. Requerimento de tiamina para crescimento micelial apresentada por isolados de *Rhizoctonia solani* de soja e por isolados dos grupos de anastomose AG-1 IA, AG-2-2 IIIB, AG-4 HGI e AG-4 HGII.

Isolado	Massa seca de micélio (mg)		B/A
	Sem tiamina (A)	Com tiamina (B)	
AG-1 IA	86	62	0,7
AG-2-2 IIIB	10	51	5,4
AG-4 HGI	180	140	0,8
AG-4 HGII	228	250	1,1
SJ 01	277	237	0,9
SJ 02	196	183	0,9
SJ 03	278	226	0,8
SJ 05	253	220	0,9
SJ 07	12	93	8,0
SJ 13	136	142	1,0
SJ 16	154	177	1,1
SJ 19	66	125	1,9
SJ 20	78	173	2,2
SJ 23	100	66	0,7
SJ 27	159	98	0,6
SJ 28	46	56	1,2
SJ 30	79	39	0,5
SJ 33	105	144	1,4
SJ 36	147	211	1,4
SJ 38	116	142	1,2
SJ 42	79	153	1,9
SJ 45	135	156	1,2
SJ 60	199	210	1,1
SJ 68	186	171	0,9
SJ 80	199	196	1,0

Para os isolados SJ 01, SJ 02, SJ 03 e SJ 05 a relação B/A foi 0,8-0,9 (Quadro 13), semelhante às constatadas para os isolados do AG-4. Os demais isolados de *R.*

solani de soja apresentaram uma variação maior na relação B/A, ficando os valores entre 0,5 e 2,2 (Quadro 13).

6.4.4 Produção de escleródios

Além dos isolados de *R. solani* de soja, avaliou-se a produção de escleródios pelos isolados padrões dos AG-1 IA, AG-2-2 IIIB, AG-4 HGI e AG-4 HGII.

No momento da separação dos escleródios por classes de tamanho foi realizado o teste de germinação, visando determinação da viabilidade desses escleródios.

Nas Figuras 5, 6 e 7 são apresentados os dados a porcentagem de escleródios por classes de tamanho e a porcentagem de escleródios viáveis em cada respectiva classe.

Todos os isolados de *R. solani* de soja do AG-4, bem como os isolados padrões AG-4 HGI e AG-4 HGII, apresentaram maior porcentagem de escleródios na classe de tamanho 0,425 a 0,250 (Figura 5). A segunda classe de tamanho que mais totalizou escleródios foi 0,600 a 0,425, ficando as duas classes de escleródios maiores com uma pequena porcentagem de escleródios (Figura 5). A viabilidade dos escleródios menores (0,425 – 0,250 mm) foi 100%, para todos os isolados (Figura 5). Os escleródios de tamanho intermediário tiveram viabilidade de 90 a 100%, exceto para o isolado AG-4 HGI que foi 72% (0,600 – 0,425 mm), e os escleródios maiores tiveram de 80 a 100 % de escleródios viáveis (Figura 5).

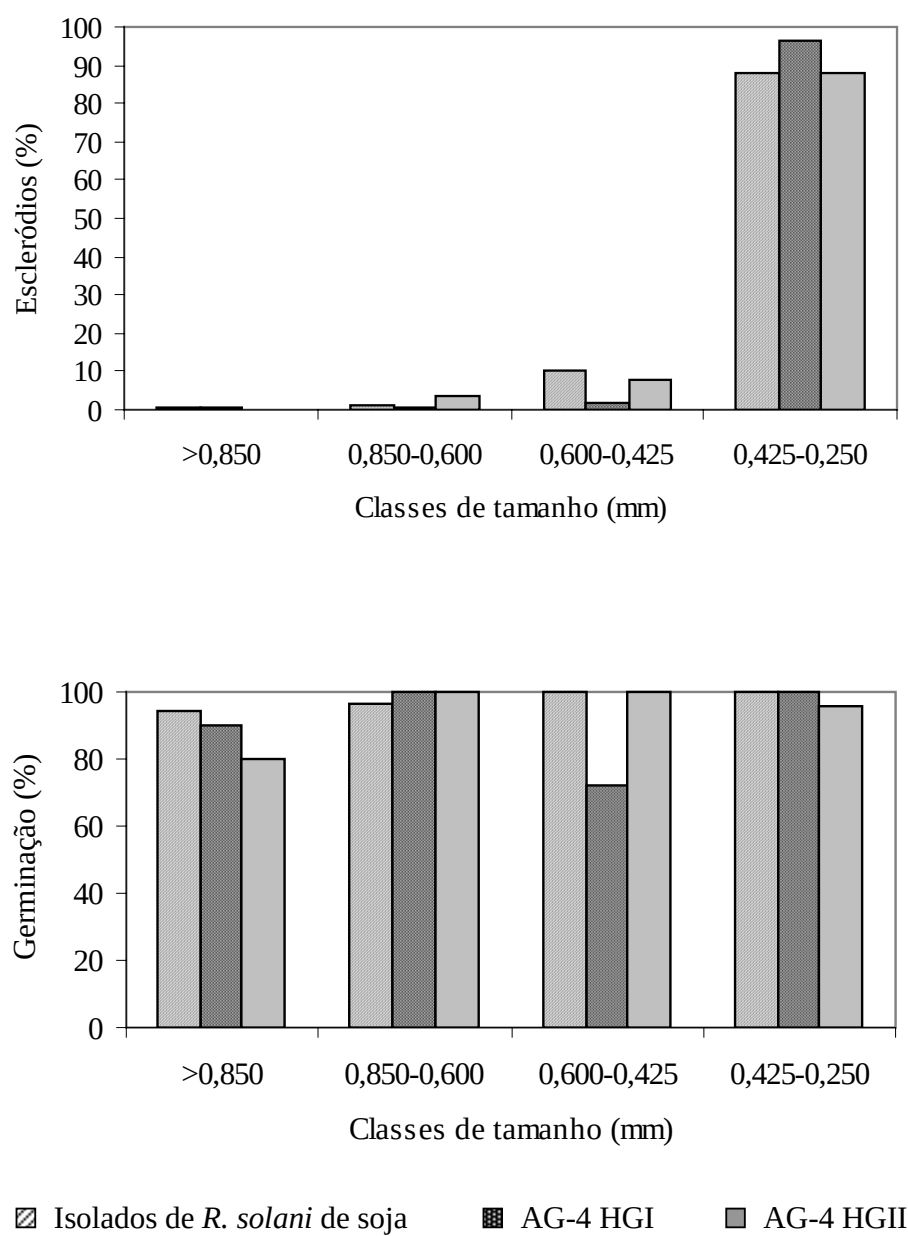


Figura 5. Porcentagem e viabilidade dos escleródios por classe de tamanho, produzidos pelos isolados de *Rhizoctonia solani* de soja e padrão, pertencentes ao AG-4.

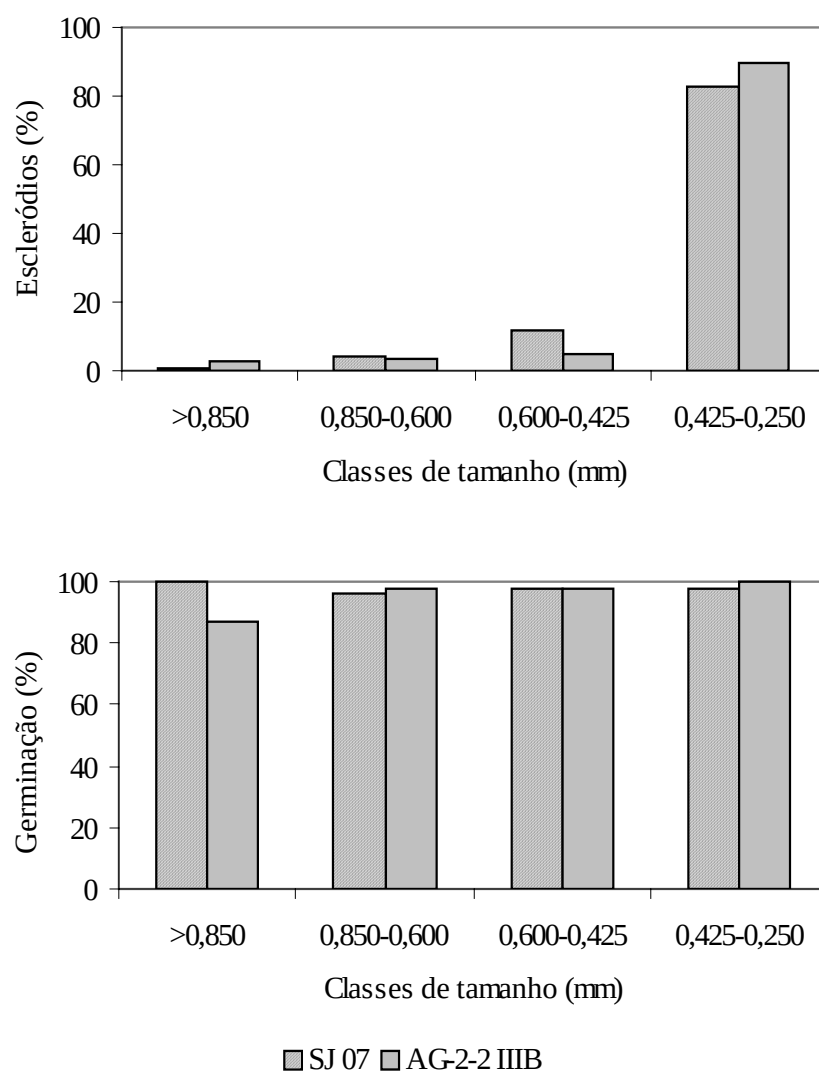


Figura 6. Porcentagem e viabilidade dos escleródios por classe de tamanho, produzidos pelos isolados de *Rhizoctonia solani* de soja e padrão, pertencentes ao AG-2-2 IIIB.

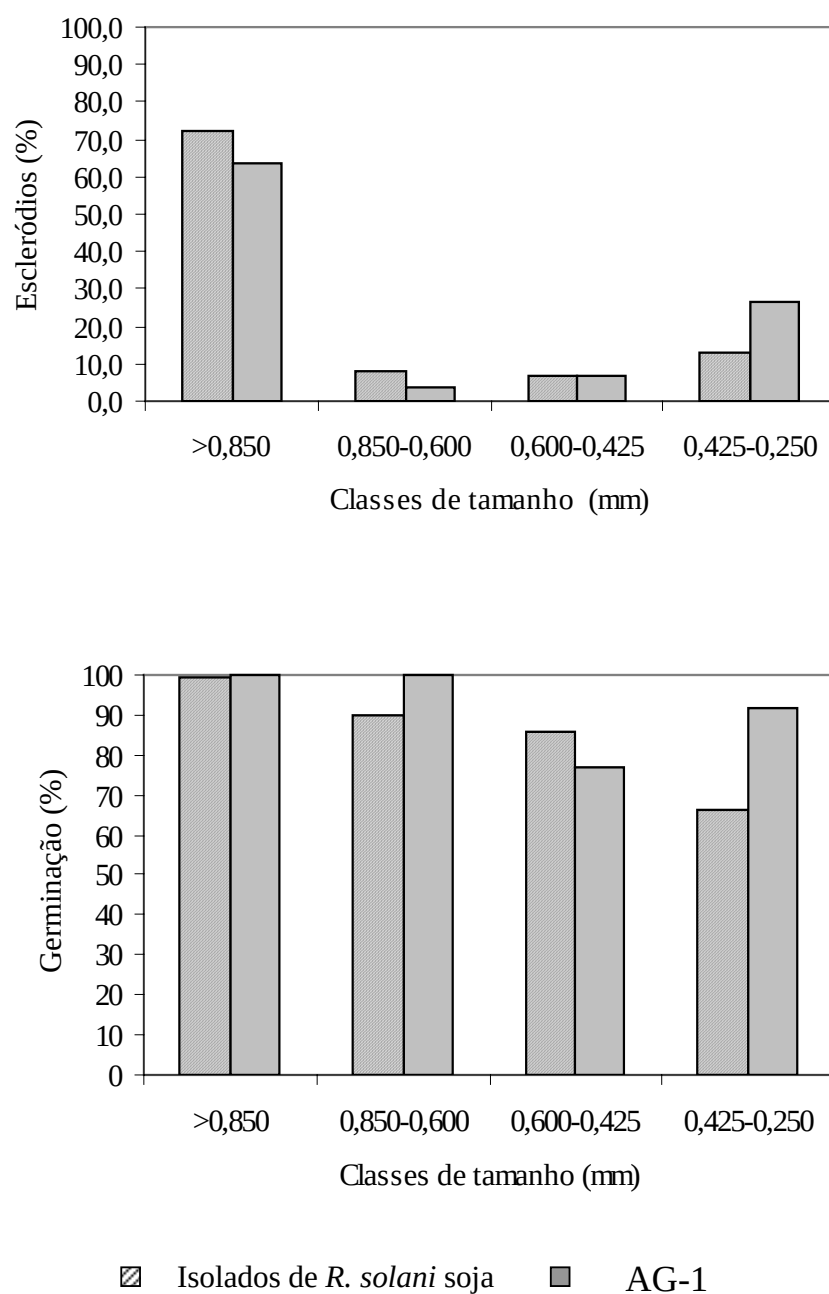


Figura 7. Porcentagem e viabilidade dos escleródios por classe de tamanho, produzidos pelos isolados de *Rhizoctonia solani* de soja e padrão, pertencentes ao AG-1 IA.

O isolado SJ 07 apresentou maior porcentagem de escleródios na classe de tamanho entre 0,425 e 0,250 mm, de maneira igual ao observado para o isolado padrão AG-2-2 IIIB (Figura 6). As duas classes de tamanho de escleródios maiores tiveram as menores porcentagem de escleródios (Figura 6). Entretanto, quanto a viabilidade, não constatou-se diferenças entre as porcentagem de germinação de escleródios das quatro classes de tamanho avaliadas, sendo os valores observados superiores a 95%, exceto para o isolado AG-2-2 IIIB, na classe $\geq 0,850$ mm, cujo valor foi 86,7% (Figura 6).

Os isolados causadores de mela apresentaram maior porcentagem de escleródios nos retidos na peneira de 0,850 mm (Figura 7). A viabilidade dos escleródios dessa classe de tamanho foi superior à viabilidade dos escleródios das demais classes, sendo 100 (Figura 7). A segunda classe de tamanho que mais apresentou escleródios foi de 0,425 a 0,250 mm (Figura 7), exceto para os isolados SJ 36 e SJ 38, que tiveram a segunda maior porcentagem de escleródios na classe de 0,850 a 0,600 mm. A viabilidade dos escleródios da classe 0,425 a 0,250 foi a pior, com cinco isolados apresentando menos de 50% dos escleródios viáveis.

6.5 Formação da fase teleomórfica

Observou-se formação de himênio, basídias e basidiósporos (Figura 8) pelo método da inoculação de folhas enraizadas mantidas em frascos de vidro em estufa biológica. Foi empregado na inoculação o isolado SJ 68, pertencente ao AG-1 IA. Após cerca de 10 dias da inoculação constatou-se a formação de himênio na superfície interna do frasco de vidro, dentro do qual as folhas inoculadas estavam. Três semanas após a inoculação foi

verificada a formação de basídias e basidiósporos. As basídias apresentaram comprimento-largura médio de 11-5,9 μm , e forma cilíndrica a subcilíndrica. As hifas suporte ou pedicelos das basídias apresentaram-se com diâmetro menor que das basídias, 3,7 μm em média. O número de esterígmas por basídia variou de 2-5, apresentando comprimento médio de 4,7 μm . Os basidiósporos apresentaram formato elipsóide, com tamanho médio de 4,4-3,6 μm e, hialinos. No Quadro 14 são apresentados os dados relativos ao tamanho de basídias e basidiósporos e, tamanho e número de esterígmas de representantes dos vários AG de *R. solani*, assim como do isolado SJ 68 de *R. solani* de soja.

Quadro 14. Comparação das estruturas sexuais de *Thanatephorus cucumeris* entre grupos de anastomose de *Rhizoctonia solani*.

Grupo de anastomose	Basídia		Nº/ basídia	Esterígma		Basidiósporo	
	Comprimento (μm)	Largura (μm)		Comprimento (μm)	Comprimento (μm)	Largura (μm)	
AG-1 ¹	10,1-20,0	7,2-11,3	2-5	3,1-17,2	5,4-11,8	3,9-7,2	
AG-2-1	8,6-23,3	4,9-10,7	1-5	4,9-18,4	6,0-9,7	3,4-6,8	
AG-2-2	7,8-20,4	5,9-11,8	1-5	4,9-34,9	5,8-13,1	2,9-6,9	
AG-3	7,8-20,4	5,9-11,8	1-5	4,9-19,6	6,8-11,3	3,9-7,3	
AG-4	6,9-21,6	6,9-11,8	1-4	4,9-25,5	5,9-12,7	3,4-7,4	
AG-5	6,8-17,5	5,8-10,8	2-4	4,9-23,5	3,9-9,8	2,9-6,4	
AG-6	7,5-17,0	5,5-10,0	3-5	4,5-18,8	5,0-10,0	2,8-5,2	
AG-7	11,0-27,5	6,5-11,0	1-4	5,0-18,0	6,5-13,0	4,0-8,5	
AG-BI	8,8-19,0	7,0-11,3	3-5	4,0-12,0	5,0-10,0	3,7-6,7	
AG-9	11,6-22,3	6,9-10,8	1-5	9,2-63,9	7,7-11,6	4,6-7,7	
AG-11	10,2-17,3	8-11,7	2-4	17,7-35,6	6,8-9,7	4,8-7,1	
SJ 68	10,5-12,2	5,7-6,5	2-5	4,2-5,5	3,6-5,5	2,9-4,6	

¹ AG-1 (Oniki et al., 1986); AG-2-1, AG-2-2, AG-3 e AG-4 (Ogoshi, 1973); AG-5 (Ogoshi, citado por Carling et al., 1987); AG-6 e AG-BI (Kuninaga et al., 1979); AG-7 (Homma et al., 1983); AG-9 (Carling et al., 1987); AG-11 (Carling et al., 1994).

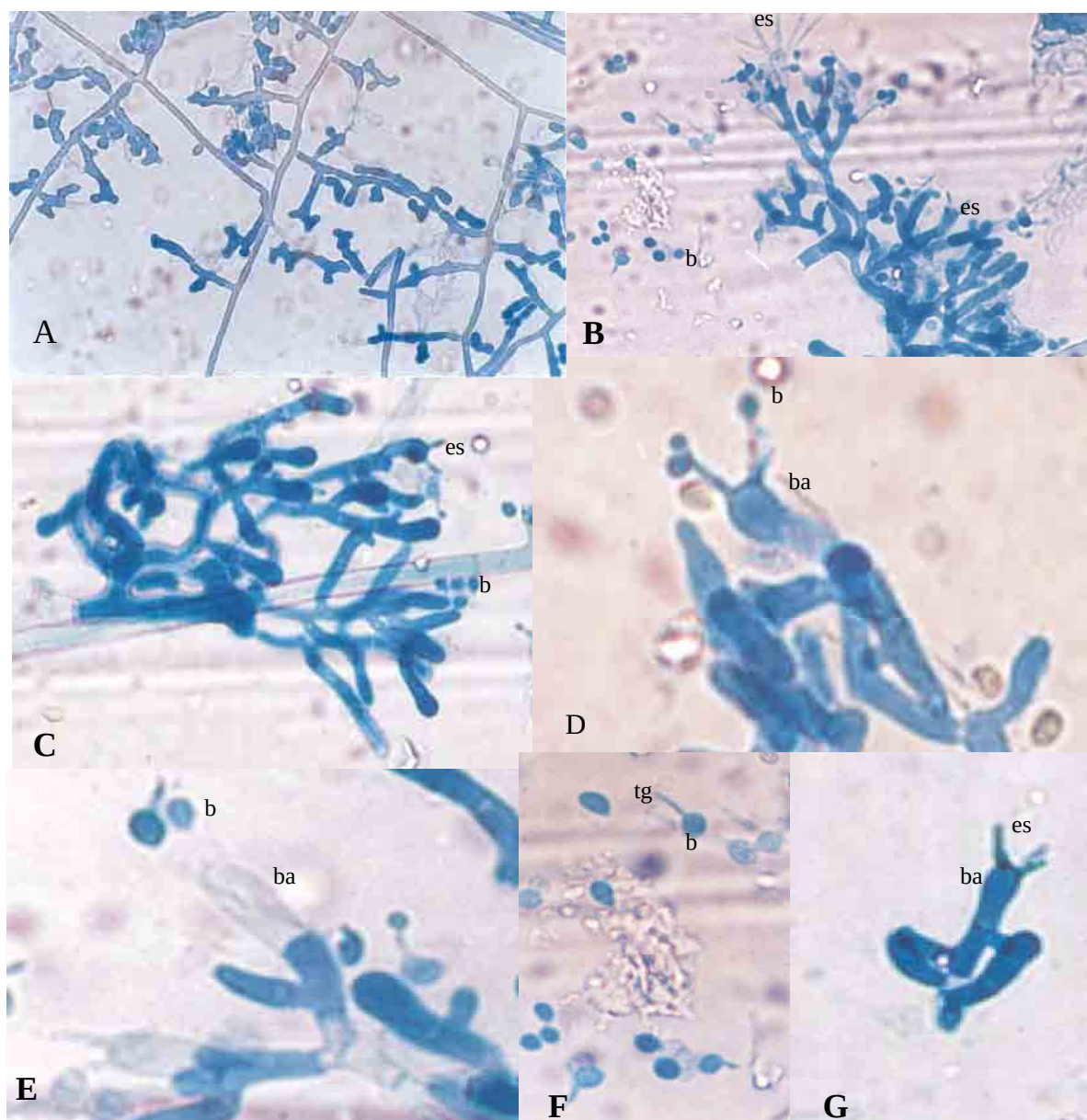


Figura 8. Estruturas sexuais de *Thanatephorus cucumeris* (anamorfo *Rhizoctonia solani*). A (x 200)– início da formação de himênio; B (x 200) e C (x 400)– himênio; D (x 400) e E (x 400) - basídias com basidiósporos presos aos esterígmata; F (x 400)– basidiósporos, alguns germinando; G (x 400) – basídia somente com esterígmata (b – basidiósporo; ba – basídia; es – esterigma; tg – tubo germinativo).

6.6 Patogenicidade de *Rhizoctonia solani*, dos grupos AG 1-IA, AG-2-2 IIIB e AG-4, à soja

Devido ao fato da porcentagem de *damping-off* ter sido 100% para os isolados SJ 01, SJ 03 e SJ 05, numa primeira inoculação, além da redução no potencial de inóculo, que anteriormente tinha sido 1,5%, optou-se por realizar o teste de patogenicidade em solo com pH 4,5 e 5,9, visando obter dados de severidade que se apresentassem como lesões características da incidência do patógeno, sem que a incidência de *damping-off* de pré-emergência fosse muito elevada. Os dados de severidade do patógeno às plantas encontram-se no Quadro 15 e podem ser visualizados na Figura 9.

Quadro 15. Reação da soja cv. FT Cristalina a isolados de *R. solani* dos AG-2-2 IIIB e AG-4, em solo com diferentes valores de pH.

Isolado	Grupo de anastomose	Severidade ¹			Isolamento do patógeno (+ = positivo, - = negativo)
		Solo natural (pH 4,5)		Solo com correção (pH 5,9)	
SJ 01	AG-4	3,5	c ² B	6,2 a A	+
SJ 02	AG-4	4,1	bc A	4,1 b A	+
SJ 03	AG-4	5,7	ab A	6,1 a A	+
SJ 05	AG-4	6,0	a A	6,6 a A	+
SJ 07	AG-2-2 IIIB	3,4	c A	1,0 c B	+
Controle		0,1	d A	0,0 c A	-

¹Escala de notas de 0 a 7 (0 = plantas sem infecção visível, 1 = plantas com descoloração típica do caule, cotilédones e raízes, 2 = plantas com lesões pequenas, 3 = plantas com lesões largas, 4 = plantas com lesões extensas (50% do caule), 5 = plantas completamente aneladas, 6 = *damping-off* de pós-emergência, 7 = *damping-off* de pré-emergência)

² Variáveis seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

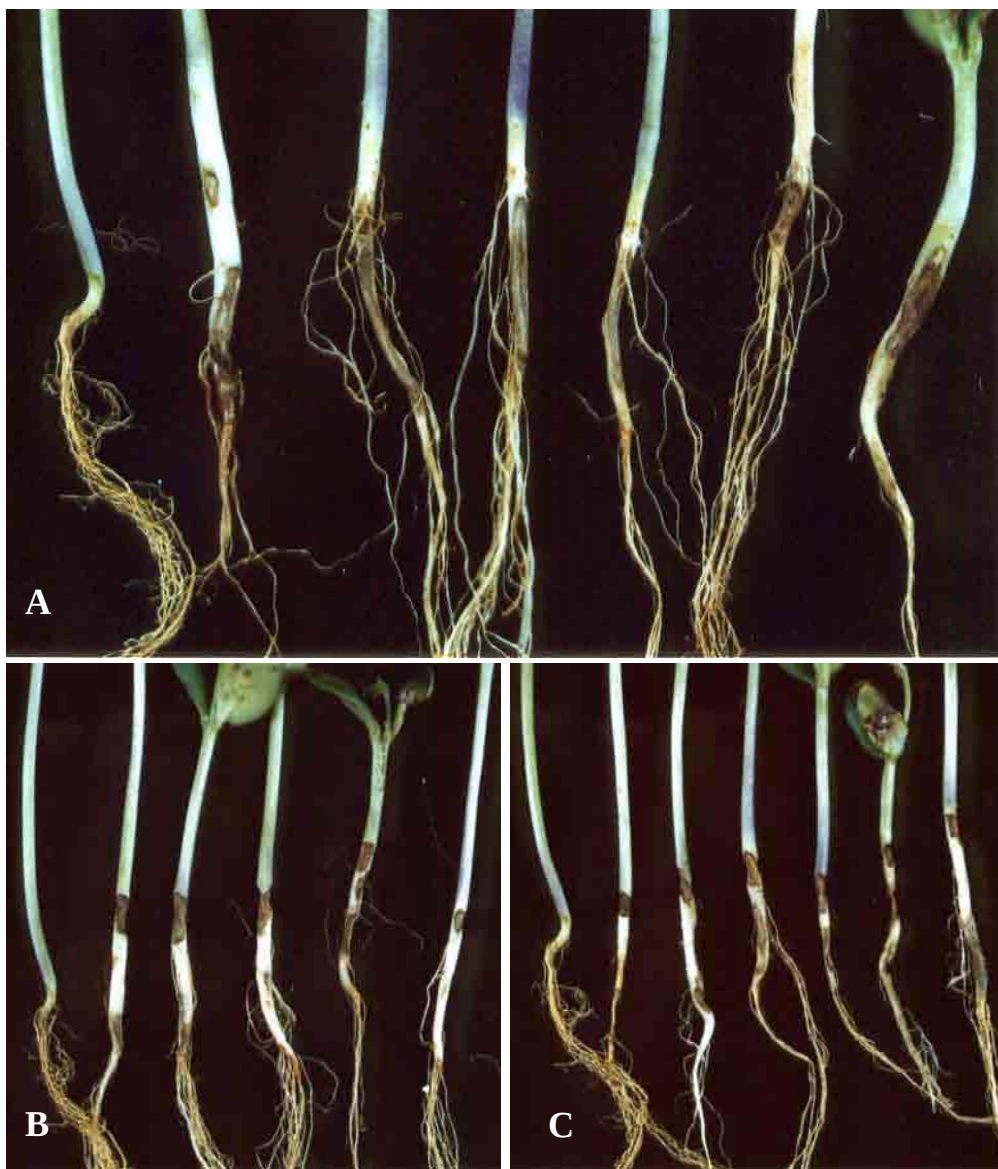


Figura 9. Infecção em plântulas de soja cv. FT-Cristalina causada por *Rhizoctonia solani* (A – isolado do AG-2-2 IIIB; B e C – isolados do AG-4). A plântula da esquerda, nas três figuras, é proveniente de tratamento sem inoculação.

Na inoculação em solo com pH mais elevado (5,9) constatou-se maior variação entre os índices de severidade dos isolados testados, sendo constatadas diferenças entre os valores registrados, com o isolado SJ 07 comportando-se como menos agressivo (Quadro 15). Já na inoculação em solo com pH 4,5, o nível de severidade entre os isolados foi mais uniforme. O isolado SJ 05 apresentou índice de severidade igual ao isolado SJ 03, o qual não diferiu do isolado SJ 02, que por sua vez foi também igual aos isolados SJ 01 e SJ 07 (Quadro 15).

Duas metodologias de inoculação foram testadas na determinação da patogenicidade dos isolados de *R. solani* do AG-1 IA, inoculação em planta inteira, em casa de vegetação, e inoculação em folha destacada, mantida em estufa biológica. A segunda metodologia foi empregada no intuito de facilitar a obtenção de dados, pois em estufa biológica as condições de temperatura e umidade são mais facilmente controladas e o espaço requerido em casa de vegetação, para cultivo das plantas a serem utilizadas na inoculação, é menor que na metodologia de inoculação em planta inteira. Os dados da severidade dos isolados às plantas de soja são apresentados nos Quadros 16 e 17 e a comparação entre as duas metodologias é apresentada na Figura 10. Os sintomas causados pela inoculação do patógeno sob as duas condições de inoculação podem ser visualizados na Figura 11.

Pela análise dos dados dos Quadros 16 e 17 é possível constatar que todos os isolados obtidos de plantas com sintomas de queima foliar, comportaram-se como patogênicos à soja, entretanto, verificaram-se diferenças significativas quanto a severidade da doença entre os isolados, nas duas condições de inoculação.

Quadro 16. Reação da soja cv. Xingu a isolados de *R. solani* do AG-1 IA, sob condições de casa de vegetação.

Isolado	Severidade ¹	Isolado	Severidade
SJ 73	2,1 a ²	SJ 77	0,8 cdefghi
SJ 50	2,0 ab	SJ 66	0,7 cdefghi
SJ 76	1,7 abc	SJ 74	0,7 cdefghi
SJ 80	1,6 abcd	SJ 48	0,7 cdefghi
SJ 29	1,5 abcde	SJ 24	0,7 cdefghi
SJ 47	1,5 abcdef	SJ 40	0,6 defghij
SJ 31	1,4 abcdefg	SJ 43	0,6 defghij
SJ 19	1,4 abcdefg	SJ 57	0,6 defghij
SJ 60	1,3 abcdefgh	SJ 42	0,6 defghij
SJ 34	1,3 abcdefghi	SJ 16	0,5 efghij
SJ 72	1,2 abcdefghi	SJ 65	0,5 efghij
SJ 56	1,2 abcdefghi	SJ 28	0,5 efghij
SJ 54	1,2 abcdefghi	SJ 45	0,5 fghij
SJ 39	1,1 abcdefghij	SJ 14	0,5 fghij
SJ 68	1,1 abcdefghij	SJ 41	0,4 ghij
SJ 51	1,1 abcdefghij	SJ 75	0,3 hij
SJ 53	1,0 abcdefghij	SJ 26	0,3 hij
SJ 71	1,0 abcdefghij	SJ 52	0,3 ij
SJ 36	1,0 abcdefghij	SJ 44	0,3 ij
SJ 38	1,0 abcdefghij	SJ 62	0,2 ij
SJ 13	1,0 abcdefghij	SJ 33	0,2 ij
SJ 78	1,0 abcdefghij	SJ 30	0,2 ij
SJ 61	1,0 bcdefghij	SJ 46	0,2 ij
SJ 64	0,9 cdefghij	SJ 67	0,1 ij
SJ 70	0,9 cdefghij	SJ 15	0,1 j
SJ 79	0,9 cdefghi	SJ 20	0,1 j
SJ 22	0,9 cdefghi		
SJ 37	0,9 cdefghi		
SJ 58	0,9 cdefghi		
SJ 27	0,8 cdefghi		
SJ 69	0,8 cdefghi		
SJ 21	0,8 cdefghi		
SJ 63	0,8 cdefghi		
SJ 23	0,8 cdefghi		
SJ 49	0,8 cdefghi		
SJ 59	0,8 cdefghi		

¹Escala de notas de 0 a 4 (0 = sem sintomas aparentes, 1 = 1-25% da superfície da folha com área necrosada, 2 = 26-50% da superfície da folha com área necrosada, 3 = 51-75% da superfície da folha com área necrosada, 4 = mais de 75% da superfície da folha com área necrosada)

²Variáveis seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Quadro 17. Reação da soja cv. Xingu a isolados de *R. solani* do AG-1 IA, em inoculação em folhas destacadas.

Isolado	Severidade ¹	Isolado	Severidade
SJ 21	3,2 a ²	SJ 28	1,2 bcdef
SJ 33	2,8 ab	SJ 66	1,2 bcdef
SJ 68	2,7 abc	SJ 54	1,2 bcdef
SJ 51	2,6 abcd	SJ 45	1,1 bcdef
SJ 60	2,6 abcd	SJ 72	1,1 bcdef
SJ 38	2,6 abcd	SJ 80	1,1 bcdef
SJ 34	2,4 abcde	SJ 22	1,0 bcdef
SJ 37	2,4 abcde	SJ 48	1,0 bcdef
SJ 31	2,3 abcde	SJ 62	1,0 bcdef
SJ 19	2,2 abcdef	SJ 52	0,9 cdef
SJ 14	2,1 abcdef	SJ 46	0,9 cdef
SJ 61	2,1 abcdef	SJ 78	0,9 cdef
SJ 16	2,1 abcdef	SJ 63	0,9 cdef
SJ 36	2,0 abcdef	SJ 67	0,9 cdef
SJ 27	2,0 abcdef	SJ 44	0,8 def
SJ 56	2,0 abcdef	SJ 23	0,8 def
SJ 79	2,0 abcdef	SJ 29	0,8 def
SJ 24	1,9 abcdef	SJ 50	0,7 ef
SJ 39	1,9 abcdef	SJ 58	0,7 ef
SJ 71	1,9 abcdef	JS 15	0,7 ef
SJ 47	1,9 abcdef	SJ 42	0,7 ef
SJ 69	1,8 abcdef	SJ 26	0,7 ef
SJ 70	1,8 abcdef	SJ 40	0,7 ef
SJ 57	1,8 abcdef	SJ 53	0,4 f
SJ 20	1,8 abcdef	SJ 43	0,4 f
SJ 65	1,7 abcdef	SJ 30	0,4 f
SJ 73	1,7 abcdef		
SJ 77	1,7 abcdef		
SJ 13	1,7 abcdef		
SJ 59	1,6 abcdef		
SJ 49	1,6 abcdef		
SJ 75	1,6 abcdef		
SJ 41	1,6 abcdef		
SJ 64	1,6 abcdef		
SJ 74	1,4 abcdef		
SJ 76	1,4 abcdef		

¹Escala de notas de 0 a 4 (0 = sem sintomas aparentes, 1 = 1-25% da superfície da folha com área necrosada, 2 = 26-50% da superfície da folha com área necrosada, 3 = 51-75% da superfície da folha com área necrosada, 4 = mais de 75% da superfície da folha com área necrosada)

²Variáveis seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

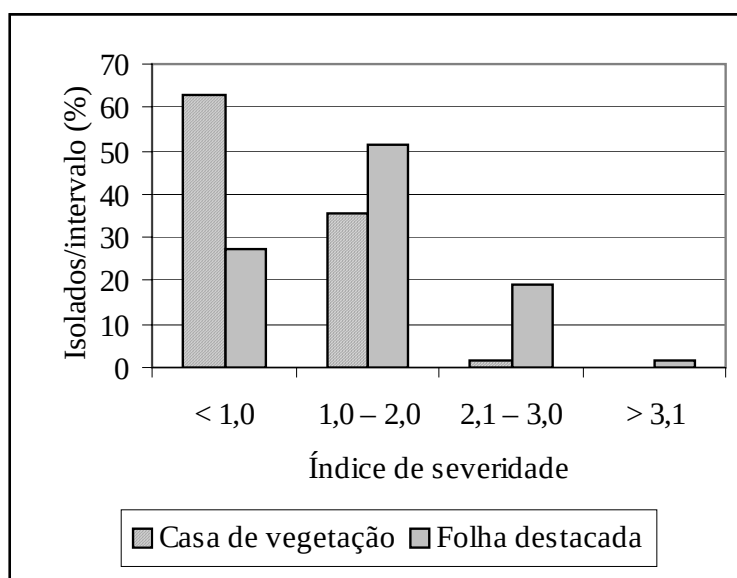


Figura 10. Distribuição dos isolados de *R. solani* do AG-1 IA em relação ao índice de severidade em soja cv. Xingu, sob diferentes condições de inoculação.

O comportamento quanto a agressividade entre os isolados não se manteve nas duas condições de inoculação. Somente os isolados SJ 19, SJ 31, SJ 34 e SJ 60 enquadraram-se dentre os dez isolados mais agressivos, nas duas condições de inoculação e, o isolado SJ 30 foi um dos menos agressivos em ambas as condições de inoculação.

A severidade média dos isolados na condição de casa de vegetação não ultrapassou 2,1 (isolado SJ 73), e em folha destacada a maior média de severidade observada foi 3,2 (isolado SJ 21) (Quadros 16 e 17).

Não foi constatada correlação significativa entre as duas metodologias de inoculação ($t = 1,3179$; $\text{prob} > t = 0,1847$).

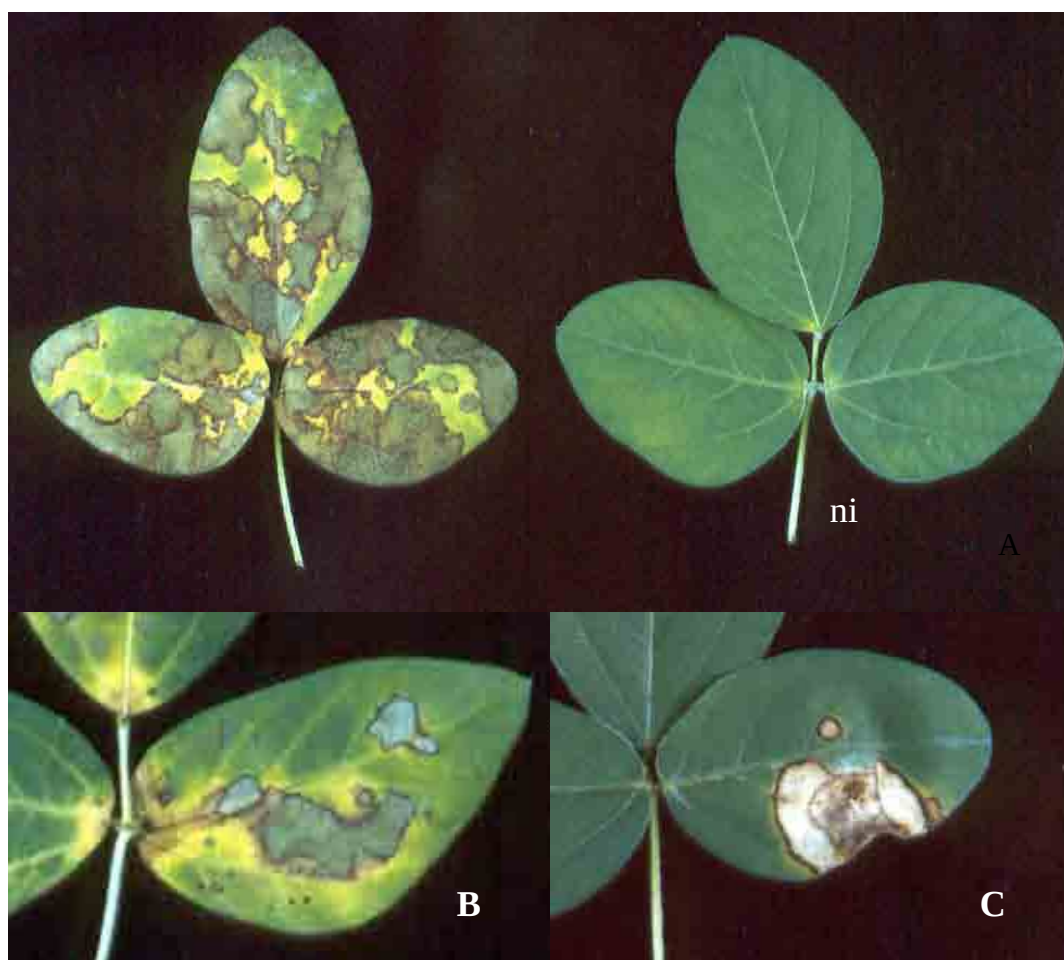


Figura 11. Infecção em folhas de soja cv. Xingu causadas por isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA (A e B: inoculação em folhas destacadas; C: inoculação em planta inteira em casa de vegetação; ni – folha não inoculada).

6.7 Caracterização dos isolados de *Rhizoctonia solani* por marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Primeiramente foram comparados através de RAPD todos os isolados de *R. solani* de soja, causadores de podridões de colo e raiz e queima da parte aérea e, os isolados padrões dos grupos de anastomose AG-4 HGI, AG-4 HGII, AG-2-2 IIIB e AG-1 IA.

Os quatro ‘primers’ utilizados (OPA-09, OPA-13, OPP-12 e OPP-15) revelaram polimorfismo entre os isolados de *Rhizoctonia solani* obtidos de soja e os isolados padrões. Foram analisadas 35 bandas polimórficas, o que permitiu obter 3 grupos geneticamente distintos. O primeiro grupo continha quatro isolados causadores de podridões de raízes e de colo e os isolados padrões AG-4 HGI e AG-4 HGII, sendo a similaridade genética entre estes de 78%. O segundo grupo continha todos os isolados causadores de queima foliar e o isolado padrão AG-1 IA, sendo 79% o grau de similaridade. No terceiro grupo ficou um isolado causador de podridão de raiz e colo e o isolado padrão AG-2-2 IIIB, cuja similaridade genética foi de 71%. A similaridade genética entre os três grupos foi de 53% (Figuras 12 e 13).

Cada um dos três grupos formados na análise anterior foram, individualmente, comparados através do marcador molecular RAPD com outros ‘primers’ randômicos. Nessas novas comparações, incluiu-se os outros ISG de cada grupo de anastomose.

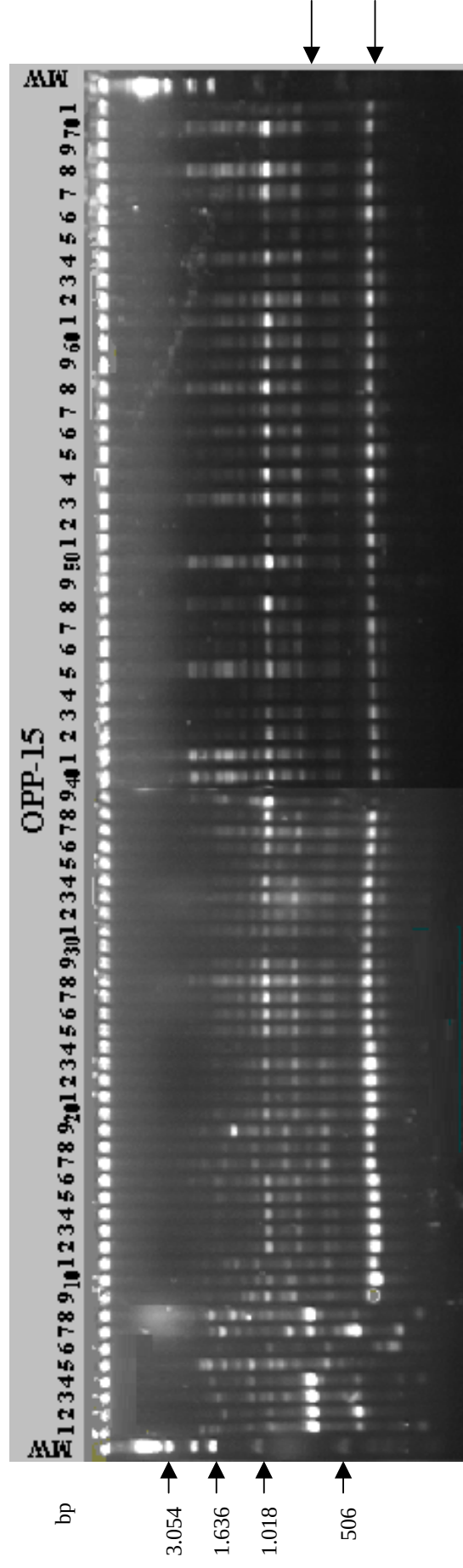


Figura 12. Padrão de bandas gerado pelo polimorfismo de DNA amplificado ao acaso com o 'primer' OPP-15, entre isolados de *Rhizoctonia solani*. MW – marcador molecular Ladder 1kb, 1=SJ01, 2=SJ02, 3=SJ03, 4=SJ05, 5=SJ07, 6=AG-2-2 IIIB, 7=AG-4 HGI, 8=AG-4 HGII, 9-70=SJ13-SJ80 (Quadro 2), 71=AG-1 IA.

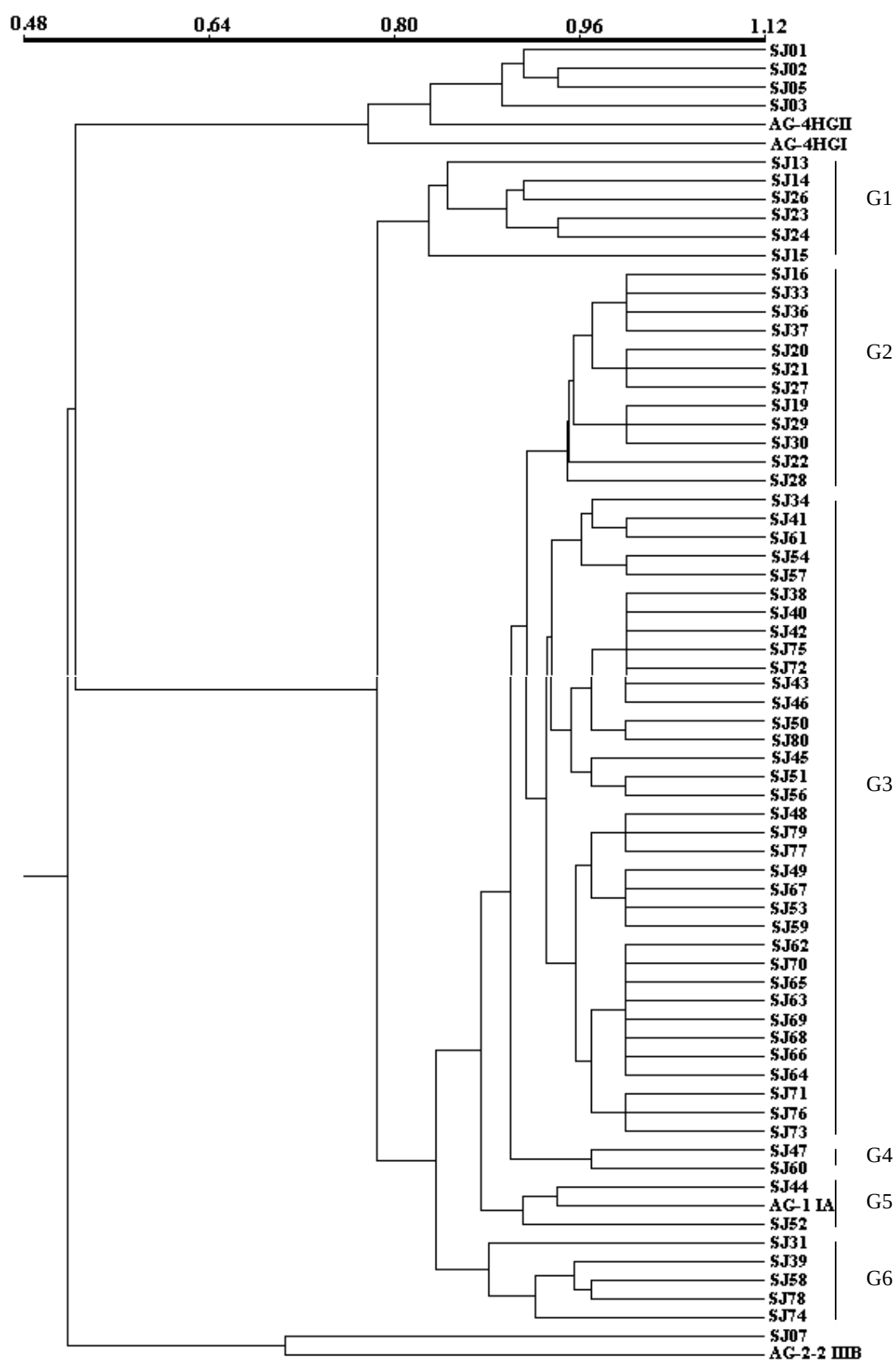


Figura 13. Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, baseado no Coeficiente Simple Matching, a partir das bandas obtidas por RAPD com os 'primers' OPA-09, OPA-13, OPP-12 e OPP-15, em análises de isolados de *R. solani* de soja e isolados padrões de grupos de anastomose.

Os isolados de *R. solani* de soja SJ 01, SJ 02, SJ 03 e SJ 05 foram comparados com isolados padrões do AG-4HGI, AG-4HGII e AG-4 HGIII, no intuito de esclarecer a qual destes subgrupos tais isolados pertenciam, visto que o critério de anastomose de hifas deixou dúvidas quanto à caracterização de tais isolados.

Foram empregados 7 ‘primers’ (OPP-03, OPP-10, OPP-11, OPP-14, OPP-17, OPP-18, OPP-19) (Figura 14), que permitiram obter 16 bandas polimórficas, agrupando os isolados em três grupos distintos. O primeiro grupo englobou os isolados SJ 01, SJ 02, SJ 05 e AG-4 HGII, com 78 % de similaridade genética. Num segundo grupo ficaram os isolados SJ 03 e AG-4 HGI, com 70 % de similaridade. O AG-4 HGIII ficou isolado dos demais isolados, apresentando similaridade genética de 36 % para com os demais (Figura 15).

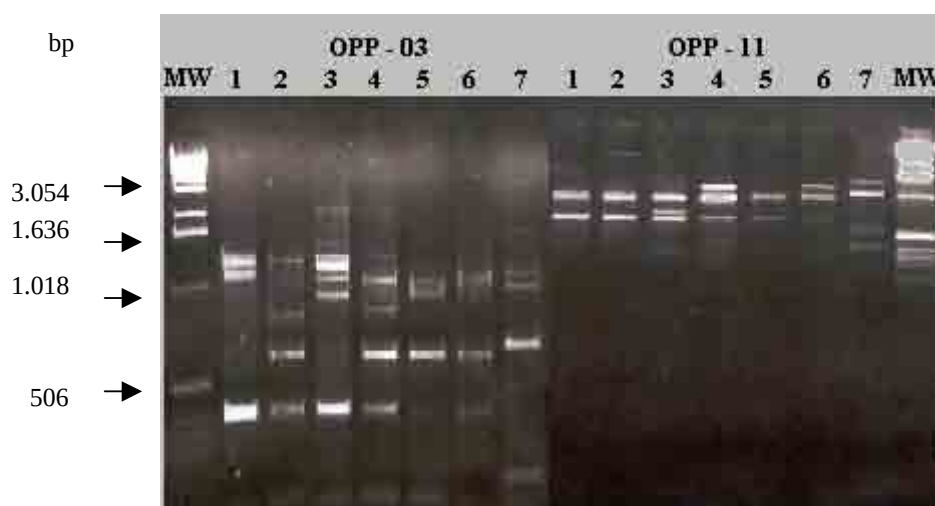


Figura 14. Padrão de bandas gerado pelo polimorfismo de DNA amplificado ao acaso com os ‘primers’ OPP-03 e OPP-11, entre isolados de *Rhizoctonia solani*. MW – marcador molecular Ladder 1kb, 1=SJ 01, 2=SJ 02, 3=SJ 03, 4=SJ 05, 5=AG-4 HGI, 6=AG-4 HGII e 7=AG-4 HGIII.

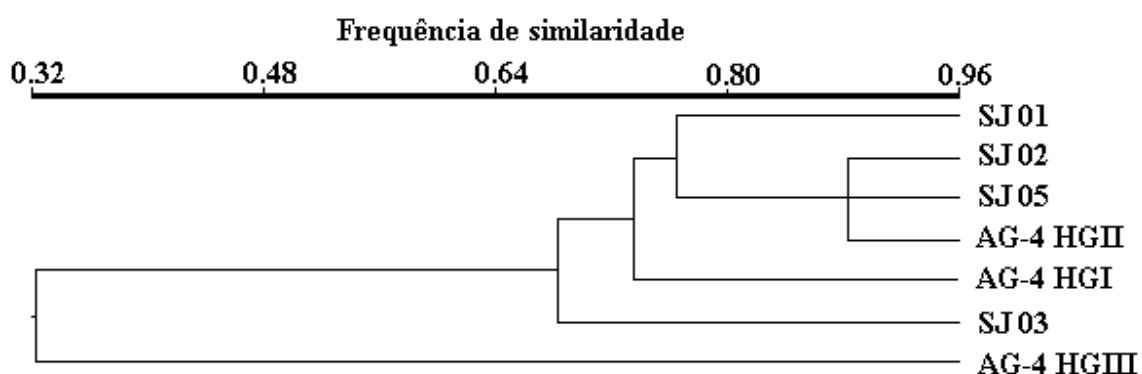


Figura 15. Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, baseado no Coeficiente Simple Matching, a partir das bandas obtidas por RAPD com os 'primers' OPP-03, OPP-10, OPP-11, OPP-14, OPP-17, OPP-18 e OPP-19, em análises de isolados de *R. solani* de soja e isolados padrões de grupos de anastomose.

O isolado SJ 07 foi comparado com isolados dos AG-2-1, AG-2-2 IIIB, AG-2-2 IV e AG-2-3, empregando-se 4 'primers' randômicos (OPA-13, OPP-12, OPP-15, OPP-17) (Figura 16). Foram geradas 39 bandas polimórficas que permitiram agrupar o isolado SJ 07 ao AG-2-2 IIIB, com 57 % de similaridade genética entre estes (Figura 17).

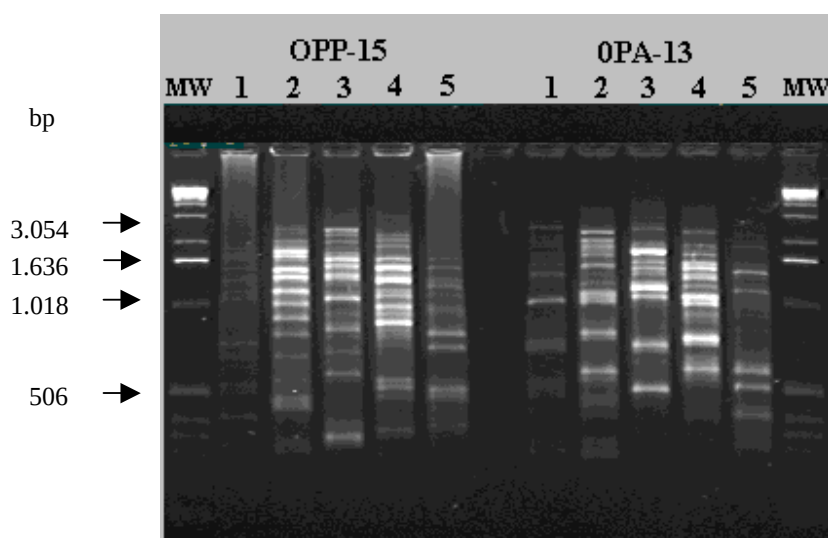


Figura 16. Padrão de bandas gerado pelo polimorfismo de DNA amplificado ao acaso com os 'primers' OPP-15 e OPA-13, entre isolados de *Rhizoctonia solani*. MW – marcador molecular Ladder 1kb, 1=SJ 07, 2=AG-2-1, 3=AG-2-2 IIIB, 4=AG2-2 IV e 5=AG-2-3.

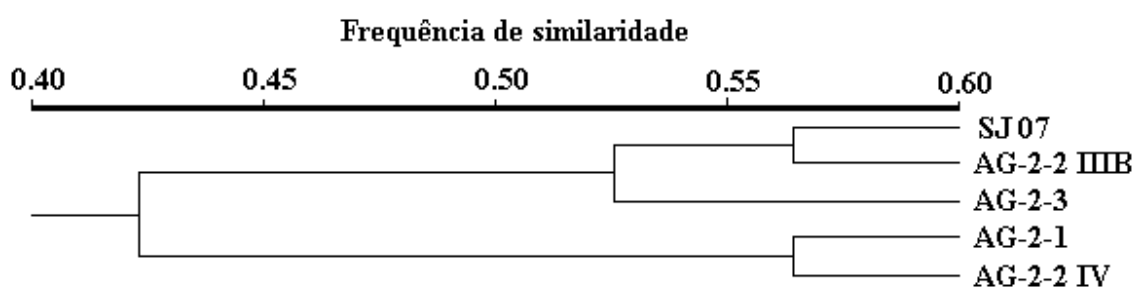


Figura 17. Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, baseado no Coeficiente Simple Matching, a partir das bandas obtidas por RAPD com os 'primers' OPA-13, OPP-12, OPP-15 e OPP-17, em análises de isolados de *R. solani* de soja e isolados padrões de grupos de anastomose.

Dentre os 62 isolados, causadores de queima da parte aérea, 10 foram comparados com os isolados padrões do AG-1, subgrupos IA, IB e IC. A escolha destes isolados foi determinada pela suas origens (Quadro 2), de maneira que se tivesse

representantes das três áreas das quais os isolados foram obtidos. Foram utilizados 4 ‘primers’ randômicos (OPA-09, OPA-13, OPP-14 e OPP-17) (Figura 18), gerando 23 bandas polimórficas. Os isolados de *R. solani* de soja agruparam-se ao isolado do AG-1 IA, sendo a similaridade genética entre estes de 67% (Figura 19).

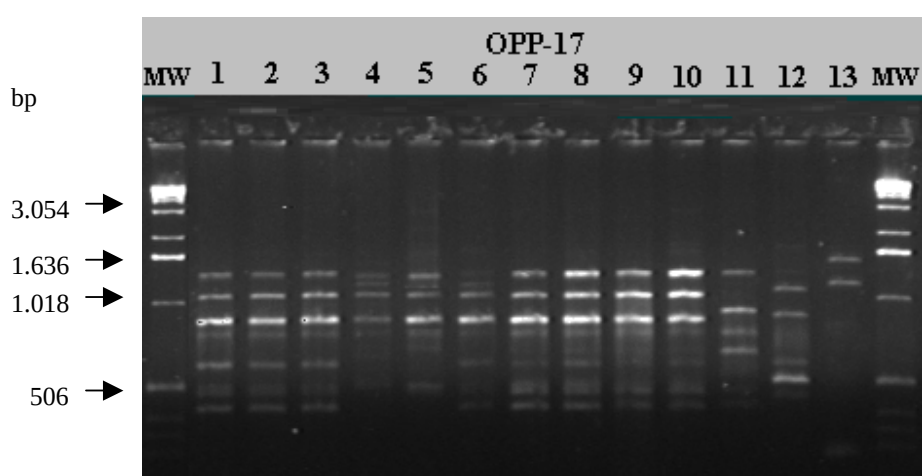


Figura 18. Padrão de bandas gerado pelo polimorfismo de DNA amplificado ao acaso com o ‘primer’ OPP-17, entre isolados de *Rhizoctonia solani*. MW – marcador molecular Ladder 1kb, 1=SJ16, 2=SJ19, 3=SJ20, 4=SJ24, 5=SJ26, 6=SJ28, 7=SJ34, 8=SJ50, 9=SJ57, 10=SJ67, 11=AG-1 IA, 12=AG-1 IB e 13=AG-1 IC.

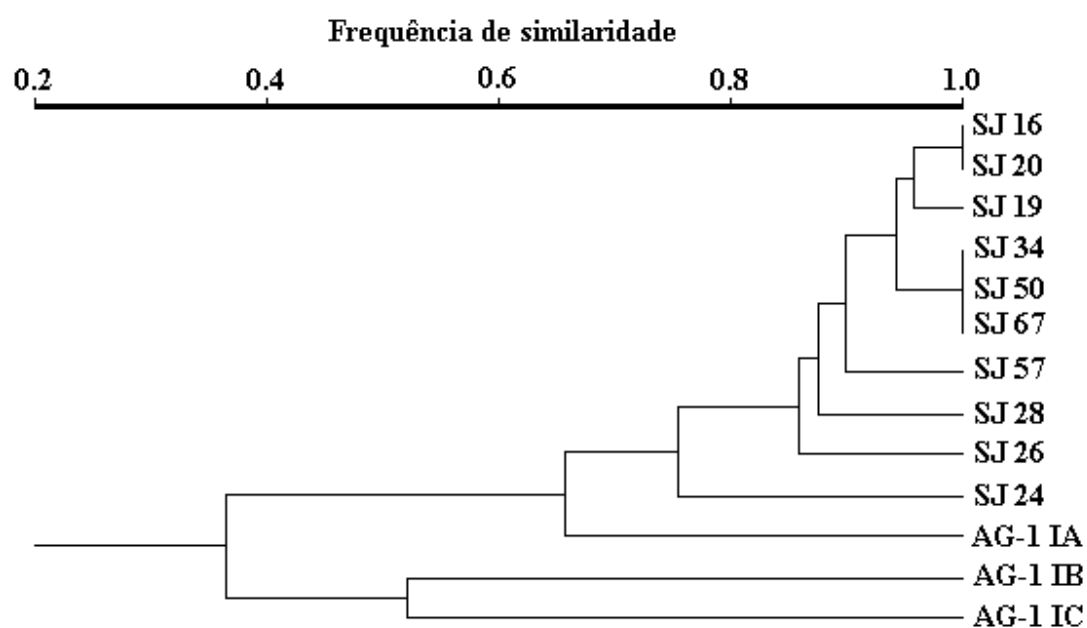


Figura 19. Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, baseado no Coeficiente Simple Matching, a partir das bandas obtidas por RAPD com os 'primers' OPA-09, OPA-13, OPP-14 e OPP-17, em análises de isolados de *R. solani* de soja e isolados padrões de grupos de anastomose.

7 DISCUSSÃO

A coleção de isolados estabelecida evidencia que *Rhizoctonia* spp. está associada, no Brasil, aos três tipos de sintomas, que segundo Embrapa (1999) podem ser causados por esse patógeno: tombamento e morte em reboleira, podridão de raiz e da base da haste e mela ou requeima da soja.

A ocorrência de *Rhizoctonia* spp. causando *damping-off* e podridões de colo e raiz, nos Estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais, assim como a constatação desse patógeno associado a mela ou requeima, em regiões do Mato Grosso (Quadro 2), deixa claro que o tipo de doença causado por esse patógeno é limitado por fatores climáticos e culturais.

A mela ou requeima, causada por *R. solani*, tem sua ocorrência condicionada por condições de altas temperaturas e umidade. Já o *damping-off* e podridões de colo e raiz são, principalmente, limitados por medidas como tratamento químico de sementes, rotação de culturas e manejo de restos culturais. Desta forma, o número reduzido de isolados, associados às podridões de colo e raiz, que foi conseguido, pode ser resultado de medidas empregadas no intuito de prevenir a incidência do patógeno.

Dentre os 73 isolados de *Rhizoctonia* spp. que foram obtidos, 8% foram caracterizados como *Rhizoctonia* spp. binucleados, sendo que todos eles estavam associados às plantas com sintomas de podridões de colo e raiz, representando 55% do total desses isolados.

Esta constatação vem de encontro ao relatado por Ceresini et al. (1996) e Ceresini & Souza (1997) que constataram que 89% e 47% dos isolados de *Rhizoctonia* spp. associados, respectivamente, à podridão de vagens em amendoimzeiro e à podridão de colo e raiz em feijoeiro, no Estado de São Paulo, foram binucleados. Ploetz et al. (1985) e Naito et al. (1993) também detectaram a associação de *Rhizoctonia* spp. binucleada à podridão de plântulas de soja, na Florida (USA) e Indonésia, respectivamente.

A ocorrência *Rhizoctonia* spp. binucleado é interessante, visto ser considerado antagonista potencial na redução dos efeitos deletérios das podridões causadas por *R. solani* em várias culturas e sistemas de cultivo, como por exemplo as podridões da coroa em milho, causada por *R. solani* AG-2-2 (Sumner & Bell, 1986), e as podridões de raízes em feijão e de vagens em amendoim induzidas por *R. solani* AG-4 em sistema múltiplo de cultivos com feijoeiro em rotação com amendoimzeiro (Sumner & Bell, 1994).

Os isolados de *Rhizoctonia* spp. binucleados apresentaram colônias de coloração branca em BDA, sem presença de áreas zonadas circulares, com poucos escleródios formados (Figura 3A). Segundo Sneh et al. (1991), tais características são comuns a isolados de *Rhizoctonia* spp. binucleados.

Os isolados multinucleados, caracterizados como *R. solani*, foram associados tanto às podridões de colo e raiz, como à mela ou requeima em soja. Todos os isolados associados à queima da parte aérea (mela) foram multinucleados, assim como

constatado para isolados causadores de queima da parte aérea em soja na Louisiana (O'Neill et al., 1977; Yang et al., 1990b), Texas (Jones & Belmar, 1989), e Ohio (Muyolo et al., 1993a), Estados Unidos, e no Zaire (Muyolo et al., 1993a).

De maneira geral os isolados causadores da mela apresentaram uma maior amplitude de variação no número de núcleos por célula e, tiveram uma porcentagem maior de células com mais núcleos (Figura 2). Estas observações podem estar associadas com aspectos epidemiológicos do patógeno e, poderão ser melhor correlacionadas a partir da caracterização dos grupos de anastomose associados a estes sintomas.

Uma outra diferença entre os isolados procedentes de plantas com lesões no colo e aqueles obtidos de folhas e pecíolos com sintomas de queima, é quanto ao aspecto cultural das colônias. Nos primeiros, as colônias são de coloração marrom camurça a escuro em BDA, e formam escleródios pequenos, marrom claro a escuros, já nos segundos as colônias são de coloração clara em BDA e formam escleródios grandes, marrom escuro a pretos (Figura 3B-F).

As características acima referidas, aliadas às informações recorridas na literatura, direcionaram os pareamentos realizados para se determinar o grupamento de anastomose dos isolados de *R. solani* de soja.

A constatação de anastomose de hifas entre os isolados SJ 01, SJ 02, SJ 03 e SJ 05 e os isolados padrões dos três subgrupos de anastomose do AG-4, impossibilitou que se enquadrasse tais isolados dentro de um subgrupo do AG-4 específico. Essa observação reflete o relatado por Sneh et al. (1991), segundo os quais a separação dos subgrupos HGI e HGII do AG-4, não se faz possível através do critério anastomose de hifas, visto que podem ocorrer anastomose de hifas entre os diferentes subgrupos do AG-4.

Um outro critério que segundo Sneh et al. (1991) pode ajudar na separação de subgrupos do AG-4, é a coloração de escleródios em meio de cultura de BDA. Entretanto, para os isolados de soja em estudo, tal critério não permitiu a separação de subgrupos, isto porque, provavelmente, a produção e a coloração de escleródios seja influenciada por condições de incubação e, tempo e condições de armazenamento dos isolados. Durante o cultivo, diferenças quanto ao meio de cultura, tipos de recipientes utilizados e regimes de temperatura, podem alterar a morfologia cultural de *R. solani* (Exner, 1953; Sherwood, 1969).

Os isolados SJ 01, SJ 02, SJ 03 e SJ 05 apresentaram taxas de crescimento micelial superiores às constatadas para os isolados representantes dos subgrupos do AG-4, embora tenham apresentado temperatura ótima para crescimento variando entre 25-30°C, da mesma forma que os isolados padrões.

Quanto ao requerimento de tiamina para crescimento, tais isolados, assim como os isolados padrões, comportaram-se como autotróficos. Foram constatados valores inferiores a 1,5 para a razão B/A (Quadro 13), que segundo Carling et al. (1987), são indicativos de isolados autotróficos para tiamina.

Os resultados obtidos para os isolados do AG-4, quanto ao tamanho de escleródios estão de acordo com o observado por Ceresini et al. (1996), que também obtiveram maior quantidade de escleródios, em isolados do AG-4 HGI, na classe de tamanho entre 0,250 e 0,300 mm.

No entanto, a caracterização dos isolados de soja que realizaram anastomose de hifas com isolados do AG-4, através de características culturais, não permitiu diferenciá-los quando aos subgrupos.

Desta forma, fica evidente que estes quatro isolados (SJ 01, SJ 02, SJ 03 e SJ 05), necessitam testes mais minuciosos para estabelecer-se a que subgrupos do AG-4 pertencem, pois o critério anastomose de hifas ainda deixa dúvidas quanto a isto. É provável que a aplicação de marcadores moleculares RAPD auxilie na diferenciação mais clara entre tais isolados.

A constatação de anastomose de hifas entre o isolado SJ 07 e o isolados do AG-2-2 IIIB é um indício de que tal isolado pertença a este AG, pois segundo Sneh et al. (1991), os diferentes subgrupos do AG-2 podem ser separados através do critério anastomose de hifas. A separação dos subgrupos dentro do AG2-2 pode ainda ser sustentada por caracteres culturais específicos dos subgrupos AG2-2 IIIB e AG2-2 IV.

O isolado SJ 07, assim como o isolado representante do AG-2-2 IIIB, comportaram-se como auxotróficos para tiamina, apresentando razão B/A, de 8,0 e 5,4, respectivamente (Quadro 13). Segundo Carling et al. (1987) isolados do AG-9 que apresentaram razão $B/A \geq 3,2$, foram considerados como auxotróficos para tiamina, já Yang et al. (1996) consideraram isolados auxotróficos para tiamina, também do AG-9, aqueles que apresentaram razão $B/A > 5,0$.

O fato do isolado SJ 07 ter se comportado como auxotrófico para tiamina, é indicativo de que este pertence ao AG-2-2, no entanto, o enquadramento deste no AG-2-2 IIIB pode ser corroborado através da análise da curva de crescimento de tal isolado. Além de apresentar taxa de crescimento micelial semelhante à do isolado padrão AG-2-2 IIIB, o isolado SJ 07 cresceu na temperatura de 35°C (Quadro 10) e, essa característica é importante na diferenciação entre os subgrupo AG-2-2 IIIB e AG-2-2 IV. Isolados do AG-2-2 IV não crescem a 35°C (Sneh et al., 1991).

A ocorrência de anastomose entre hifas de todos os isolados causadores de mela ou requeima e o isolado padrão do AG-1 IA, não pode, isoladamente, ser conclusiva de que tais isolados pertençam a este subgrupo do AG-1. Entretanto, aspectos culturais como, alta taxa de crescimento micelial e tipo de escleródios produzidos podem somar-se ao critério anastomose de hifas para embasar tais conclusões.

Pode ser constatado pelos resultados da curva de crescimento dos isolados causadores de mela, que as taxas de crescimento micelial máxima destes foram semelhantes às taxas dos isolados representantes do AG-1 IA e, muito superiores à taxa do crescimento micelial máxima constatada para o isolado do AG-1 IB (Quadro 10), que segundo Yang et al. (1990b), é o outro subgrupo do AG-1 que pode estar relacionado com queima foliar em soja.

Outra característica importante e, indicativa de que tais isolados pertencem ao AG-1 IA, é o tipo de escleródios produzidos por estes. Todos os 17 isolados caracterizados quanto a produção de escleródios, apresentaram acima de 60% dos escleródios retidos na peneira de 0,850 mm (Figura 7). Além destes isolados, todos os demais também associados ao sintoma de mela em soja, apresentavam escleródios grandes e esféricos, podendo ser caracterizados, segundo Sneh et al. (1991), como do tipo 'sasakii'.

Os isolados causadores de mela em soja, assim como o isolado padrão do AG-1 IA, comportaram-se como autotróficos para tiamina, mesmo com razão B/A variando de 0,5 a 2,2. Estes resultados são sustentados por dados obtidos para outros grupos de anastomose como, por exemplo do AG-9, onde razões de 3,1 serviram para caracterizar isolados como autotróficos e, somente razões acima de 5,0 é que determinaram, outros isolados do mesmo AG, como sendo auxotróficos para tiamina (Yang et al., 1996). Embora tal

critério não permita separar subgrupos do AG-1, é uma característica importante que deve ser somada, para a caracterização de tais isolados.

A formação de basídias e basidiósporos pelo isolado SJ 68, identificado como pertencente ao AG-1 IA, permitiu confirmar a associação de tal isolado ao estágio teleomórfico de *Rhizoctonia solani* Kühn, *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk. As dimensões das basídias, número e comprimento de esterígmas e dimensões dos basidiósporos, enquadram-se às medidas obtidas para as estruturas sexuais de *T. cucumeris*, dos vários grupos de anastomose de *R. solani* (Quadro 20). Entretanto, os valores obtidos nas várias medidas ficaram em faixas mais restritas, o que pode ter sido determinado pelo número pequeno de medidas tomadas, já que somente um isolado foi utilizado para a obtenção destes dados (Quadro 20).

Nas plantas de onde os isolados causadores de mela foram obtidos não se constatou a presença de estruturas sexuais. Isto pode estar associado às próprias características epidemiológicas do AG-1 IA, pois segundo Naito et al. (1995), a infecção desse grupo de anastomose dá-se a partir de hifas. Contudo, a confirmação da existência ou não de estruturas sexuais em infecções em soja no campo é uma informação que ainda deve ser levantada para o Brasil, já que segundo Pascual et al. (2000), em regiões quentes das Filipinas onde as condições de umidade mantêm-se durante todo o ano, basidiósporos de isolados do AG-1 IA são considerados como importante fonte de infecção. Essa informação é altamente relevante para a aplicação de medidas de controle químico, as quais podem ser direcionadas ao solo ou às plantas, assim como para a avaliação de fontes de resistência em plantas.

A caracterização dos isolados quanto a temperatura letal, embora não

sendo critério que permita identificar isolados quanto ao grupamento de anastomose, permitiu obter algumas informações que poderão ser correlacionadas com características epidemiológicas dos grupos de anastomose.

Os dados de temperatura letal constatados para os isolados de *R. solani* de soja de maneira geral permitiram enquadrá-los em dois grupos. Um primeiro, em que a sensibilidade térmica foi menor quando aumentou-se o tempo de incubação das culturas e, um segundo, onde ocorreu o contrário, quanto maior o tempo de incubação das culturas, maior foi a sensibilidade térmica dos isolados. Estes dois grupos englobam isolados com diferentes padrões ecológicos e epidemiológicos. No primeiro, encontram-se isolados causadores de *damping-off* e podridões de colo e raízes em soja pertencentes ao AG-4 e, no segundo, isolados causadores de queima foliar, pertencentes ao AG-1 IA.

O padrão constatado no grupo que engloba os isolados pertencentes ao AG-4 é semelhante ao constatado para os fungos habitantes de solo *Phytophthora* (Kasim, 1978) e *Rosellinia necatrix* (Sztejnberg et al., 1987), nos quais verificaram-se que quanto mais velha a cultura, maior a sua resistência ao calor. A formação de escleródios pode ter concorrido para a maior resistência ao calor dos isolados do AG-4, assim como sugerido por Sztejnberg et al. (1987), para isolados de *R. necatrix*, onde a formação de escleródios e outras estruturas que contenham melanina, podem ser a causa da resistência ao calor.

Silva et al. (1996) constataram que a temperatura letal micelial para isolado de *R. solani* de amendoimzeiro do AG-4 HGI foi 49°C, entretanto, ao contrário, foi constatada uma maior sensibilidade térmica do isolado a medida que aumentava a idade da cultura.

O teste de patogenicidade dos isolados causadores de *damping-off* e

lesões no colo permitiu constatar que os cinco isolados testados foram patogênicos a soja. Os valores de severidade na condição de pH 4,5 ficaram entre 3 e 6, o que corresponde na escala adotada a lesões grandes e *damping-off* de pós-emergência, respectivamente. Já na inoculação em solo com pH 5,9, os valores de severidade ficaram entre 1 e 7, indo desde descoloração do caule, cotilédones e raízes até, *damping-off* de pré-emergência. Esta observação permite inferir que a inoculação em solo com pH mais ácido representa melhor o teste de patogenicidade dos isolados, visto que os sintomas constatados nesta condição eliminam possíveis interferências de quaisquer outros patógenos, que por ventura estivessem presentes, já que o solo utilizado em ambos os testes não sofreu qualquer tipo de desinfestação química ou física.

De maneira geral, os isolados do AG-4 foram mais agressivos que o isolado do AG-2-2 IIIB, visto a condição de pH 5,9, onde o índice de severidade para o isolado do AG-2-2 IIIB foi 1, não diferindo significativamente do tratamento testemunha sem inoculação. Muyolo et al. (1993a) também constataram que isolados do AG-2-2 IIIB foram mais agressivos em raízes que em hipocótilos, ao contrário de isolados do AG-4, que foram mais agressivos em hipocótilos que em raízes.

Os sintomas causados pelo isolado de soja do AG-2-2 IIIB (Figura 9A) correspondem aos descritos por Liu & Sinclair (1991) para isolados do AG-2-2 IIIB, causadores de podridão de raiz em soja, em Illinois (USA) e, diferem dos sintomas observados pela infecção de isolados do AG-4 (Figuras 9B-C). Nas plântulas inoculadas com o isolado do AG-2-2 IIIB, as lesões foram mais extensas e ocorreu um fendilhamento, com exposição do córtex na área lesionada, assim como descoloração de raízes. As lesões causadas pelos isolados do AG-4 foram delimitadas, deprimidas e com bordos mais escuros, porém sem fendilhamento na área lesionada.

Os isolados SJ 05 (AG-4) e SJ 07 (AG-2-2 IIIB) foram obtidos numa mesma área de plantio direto, onde a sucessão empregada foi feijão-milho-soja. Tais grupos de anastomose são relatados por Ceresini & Souza (1997) como estando associados a feijoeiro, em regiões distintas do Estado de São Paulo. Este fato salienta a importância de se conhecer grupos de anastomose de *R. solani* incidente em cada cultura, quando da tomada de decisão sobre qual sucessão de culturas deve ser utilizada.

Na inoculação em casa de vegetação para avaliar a queima da parte aérea mais de 60% dos isolados apresentaram índice de severidade menor que 1. Já na inoculação em folhas destacadas, mais de 50% dos isolados tiveram a severidade no intervalo de 1-2 e, pelo menos um isolado apresentou índice de severidade maior que 3 (Figura 10). De maneira geral, o índice de severidade manteve-se abaixo de 2, independentemente da metodologia de inoculação empregada.

Não foi constatada correlação significativa entre as duas metodologias de inoculação testadas, o que pode impossibilitar o uso da inoculação em folha destacada em substituição a inoculação em planta inteira, em testes de seleção de isolados ou, ainda, em testes de seleção de resistência entre cultivares. Também Muyolo et al. (1993b) constataram ausência de correlação significativa para inoculação em planta inteira e folha destacada, em testes de resistência de cultivares de feijão das secas e feijão 'lima' a *R. solani* AG-1 IB, causador de 'web blight'. Por outro lado, os mesmos autores obtiveram correlação significativa entre as mesmas metodologias em testes de resistência de cultivares de soja.

Fatores como, condições experimentais, níveis de inóculo empregados e/ou resistência do cultivar, podem ter determinado as discrepâncias entre os resultados obtidos nas inoculações em casa de vegetação e em folhas destacadas.

Com relação às condições experimentais, na inoculação em casa de vegetação, a umidade relativa favorável ao desenvolvimento da doença foi mantida pela cobertura plástica na bancada durante todo o período entre inoculação e avaliação. Entretanto, devido a cobertura, a temperatura durante as horas mais quentes do dia manteve-se em torno de 35°C, o que pode ter afetado a evolução da doença, pois segundo Kousik et al. (1995), a temperatura ideal para se obter maior severidade de doença causada por *R. solani* AG-1 IA é de 25 a 30°C. Embora, estes mesmos autores tenham constatado que a 35°C, isolados do AG-1 IA formam, significativamente, mais ‘almofadas’ de infecção em folhas de soja e maior severidade de doença, que isolados do AG-1 IB e outros grupos de anastomose. Na condição de estufa biológica, o controle da temperatura a 26-27°C, assim como a manutenção da umidade elevada, permitiu que a evolução da doença fosse maior.

No que diz respeito ao tipo de inóculo empregado no teste de inoculação em planta inteira, no ensaio desenvolvido por Muyolo et al. (1993b), utilizaram-se aspersão com suspensão de micélio para a inoculação, ao passo que no presente experimento foi utilizado um disco de micélio. Segundo tais autores, resultados conflitantes têm sido obtidos em testes em que baixos (Warren, 1975) ou altos (Sumner, 1985) níveis de inóculo são empregados em seleção de cultivares de feijão das secas.

Por último, a existência de níveis de resistência a *R. solani* na cultivar empregada nos testes, pode ter somado às condições ambientais e ao tipo de inóculo empregado, concorrendo para os resultados obtidos. Muyolo et al. (1993b) constataram níveis de resistência moderada em três cultivares de soja (Belford, Gregg e RA 606), testados quanto a severidade da doença murcha da teia micélica, causada por *R. solani* AG-1 IB. Informações sobre o mecanismo de resistência envolvido, são segundo os mesmos autores limitadas,

entretanto, segundo Flentje (1957) e Flentje et al. (1963), substâncias inibidoras, originárias do hospedeiro, podem interromper a formação de ‘almofadas’ de infecção de *R. solani*, em plantas de rabanete, tomate e alface.

A comparação entre os isolados de *R. solani* obtidos de soja e os isolados padrões dos grupos de anastomose AG-1 IA, AG-2-2 IIIB, AG-4 HGI e AG-4 HGII através do marcador molecular RAPD possibilitou confirmar a similaridade genética entre os isolados de *R. solani* de soja brasileiros e os isolados padrões dos grupos de anastomose, recebidos dos Estados Unidos e Japão. Os três grupos gerados, corresponderam ao que foi determinado através da anastomose de hifas e outras características culturais.

Dentre os isolados causadores de mela, níveis de similaridade genética de 83% e 94% foram obtidos para os isolados que agruparam-se no G1 e G2, respectivamente (Figura 13). Tais isolados foram, na sua maioria, oriundos de duas das Fazendas, Tucano e Carlot (Quadro 2). Os isolados oriundos da terceira Fazenda, Itaipú, que totalizam 74% dos 62 isolados, dividiram-se em outros quatro grupos (Figura 13), num dos quais ficou o isolado padrão do AG-1 IA, onde a similaridade genética foi de 89-97%. A similaridade genética entre vários desses isolados foi de 100% e, muitos dos isolados que apresentaram tais níveis foram obtidos em fazendas diferentes, como por exemplo SJ 16, SJ 33, SJ 36 e SJ 37, o primeiro proveniente da Fazenda Tucano e os outros três da Fazenda Itaipú.

Os elevados níveis de similaridade genética apresentados por tais isolados são, possivelmente, reflexo da origem geográfica comum dos mesmos, já que estes foram provenientes de três fazendas na região de Lucas do Rio Verde-MT. Os resultados obtidos vêm de encontro ao relatado por Pascual et al. (2000), mencionando que isolados do AG-1 IA obtidos de diferentes hospedeiros, mas coletados de uma mesma área, apresentaram

acima de 80% de similaridade genética. Segundo Jabaji-Hare et al. (1990) dentro de AG de *R. solani* existem maiores relacionamentos genéticos entre isolados de origem geográfica comum, que entre isolados de áreas distantes geograficamente.

O nível de 79% de similaridade genética constatado entre os isolados causadores de mela em soja no Brasil e o isolado padrão do AG-1 IA, obtido do Japão, e oriundo de planta de milho (isolado H5-519, Quadro 3), condiz com dados de similaridade genética obtidos entre isolados do AG-1 IA oriundos de várias culturas como, feijão, soja, milho, algodão, *Rottboellia exaltata* (L.) L. f. (grama), café, caupi, cana-de-açúcar, arroz e sorgo, que foi 75% (Pascual et al., 2000).

A comparação entre os isolados causadores de mela e os três subgrupos do AG-1, IA, IB e IC, permitiu confirmar os resultados obtidos através de caracteres culturais como, taxa máxima de crescimento micelial e tipo de escleródios. Os isolados de *R. solani* causadores de mela no Brasil que foram analisados no presente experimento são, seguramente, pertencentes ao subgrupo IA. Embora a similaridade genética entre os isolados obtidos de soja e o padrão AG-1 IA tenha sido, nesta segunda comparação, menor que na primeira, a similaridade entre estes isolados e os representantes dos subgrupos IB e IC foi menor que 40% (Figura 19). Além disso, os sintomas constatados eram característicos de infecções secundárias causadas por isolados do AG-1 IA, com micélio crescendo sobre os tecidos lesionados (Yang et al., 1990b), diferentes de sintomas causados por isolados do AG-1 IB que caracterizam-se por lesões pequenas e circulares, causadas pela infecção por microescleródios (Yang et al., 1988).

Na Louisiana (USA), Yang et al. (1990b) relataram a ocorrência de *R. solani* AG-1 subgrupos IA e IB causando lesões foliares em soja. Entretanto, o subgrupo IB

foi predominante nestas áreas, durante os dois anos estudados. Condições climáticas diferentes entre as regiões americana e brasileira, onde ocorre a doença, podem ser determinantes da diferença quanto a predominância de cada subgrupo do AG-1. O Estado da Louisiana apresenta latitude correspondente a do Estado do Rio Grande do Sul, onde não há registros da ocorrência de queima da parte aérea em soja causada por *R. solani*.

A similaridade genética entre o isolado SJ 07 e o isolado representante do AG-2-2 IIIB também foi menor na segunda comparação, onde os outros subgrupos do AG-2 foram incluídos. Entretanto, tais isolados mantiveram-se agrupados, corroborando os resultados anteriormente obtidos. A utilização do marcador RAPD para caracterizar este isolado quanto ao grupamento de anastomose reforçou os resultados obtidos por caracteres culturais e fisiológicos (crescimento a 35°C e auxotrofismo para tiamina).

Na análise onde os isolados de soja foram comparados com os três subgrupos de AG-4, três dos quatros isolados, agruparam-se ao AG-4 HGII, e o outro isolado ao AG-4 HGI (Figura 15). Entretanto, todos os isolados mantiveram-se na mesma ramificação do dendrograma gerado, separando-se somente do isolado representante do AG-4 HGIII (Figura 15). O marcador utilizado, RAPD, não permitiu detectar diferenças genéticas que separassem os isolados dos subgrupos HGI e HGII, de maneira mais clara. Talvez, uma análise empregando maior número de 'primers' permita detectar maiores diferenças genéticas entre estes subgrupos, já que segundo Cubeta et al. (1992) existe a possibilidade de utilização de sondas de DNA nuclear randômicas para separar os três ISG do AG-4. Esta separação é possível devido os baixos níveis de complementaridade de DNA que existem entre os diferentes ISG do AG-4 (Kuninaga & Yokosawa, 1984a). Yang et al. (1995) também não puderam diferenciar todos os subgrupos do ZG-1 do AG-8, através de marcadores moleculares

RAPD.

A identificação do AG-1 IA associado à mela e, dos AG-4 e AG-2-2 IIIB às podridões de raízes e colo e ao *damping-off*, vêm de encontro aos resultados obtidos por Muyolo et al. (1993a), os quais salientaram que isolados do AG-1 são primariamente patógenos foliares, enquanto que isolados do AG-2 e AG-4 são patógeno, primariamente, de raízes e hipocótilos.

Na comparação onde todos os isolados estavam presente, constatou-se que os isolados de *R. solani* de soja que agruparam-se ao isolado do AG-1 IA apresentaram pelo menos um fragmento comum para o ‘primer’ OPP-15 (Figura 12) e dois, para o ‘primer’ OPA-13. Outros dois fragmentos amplificados pelo ‘primer’ OPP-12 foram comuns a 59, dos 62 isolados obtidos de soja, e ao isolado padrão. Dentre os isolados de *R. solani* de soja que agruparam-se aos isolados representantes dos subgrupos do AG-4, também constatou-se a presença de fragmentos comuns, um para o ‘primer’ OPP-15 (Figura 12) e outro para o OPP-12.

Pascual et al. (2000) também relataram a existência de um ou dois fragmentos comuns em comparações por RAPD entre isolados do AG-1 IA, oriundos de várias fontes, embora os ‘primers’ randômicos empregados tenham sido diferentes daqueles utilizados no presente experimento.

A constatação desses fragmentos é extremamente interessante, pois sondas de DNA específicas para cada ISG poderiam ser geradas utilizando-se fragmentos de DNA randômico de cada ISG e, a combinação com outras técnicas de PCR, possibilitariam diagnósticos mais rápidos de ISG (Vilgalys & Cubeta, 1994).

8 CONCLUSÕES

No Brasil a podridão de raízes e de colo em soja é causada por *Rhizoctonia solani* AG-2-2 IIIB, AG-4 HGI e AG-4 HGII e a mela ou requeima é causada pelo AG-1 IA do patógeno.

Subgrupos do AG-2 são separados através de características culturais e fisiológicas.

Marcadores moleculares RAPD são consistentes na separação de ISG do AG-1 de *Rhizoctonia solani*.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

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

ALMEIDA, A.M.R., FERREIRA, L.P., YORINORI, J.T., SILVA, J.F.V., HENNING, A.A. Doenças da soja. In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. (Ed.) *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2, cap.61, p.642-64.

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

ATKINS Jr., G., LEWIS, W.D. *Rhizoctonia* aerial blight of soybean in Louisiana.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Faculdade de Ciências Agrônomicas. *Normas para a elaboração de dissertações e teses*. Botucatu, 1997. 35p.

Phytopathology, v.44, p.215-8, 1954.

BANDY, B.P., LEACH, S.S., TAVANZIS, S.M. Anastomosis group 3 is the major cause of *Rhizoctonia* disease of potato in Maine. *Plant Dis.*, v.72, p.596-8, 1988.

BOIDIN, J. Intercompatibility and the species concept in the saprobic basidiomycotina. *Mycotaxon*, v. 26, p.319-36, 1986.

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

BURTON, R.J., COLEY-SMITH, J.R., WAREING, P.W., GLADDERS, P. *Rhizoctonia oryzae* and *R. solani* associated with barley stunt disease in the United Kingdom. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, v.91, p.409-17, 1988.

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

CARDOSO, J.E., ECHANDI, E. Biological control of *Rhizoctonia* root rot of snap bean with binucleate *Rhizoctonia*-like fungi. *Plant Dis.*, v. 71, p.167-70, 1987a.

CARDOSO, J.E., ECHANDI, E. Nature of protection of bean seedlings from *Rhizoctonia* root rot by a binucleate *Rhizoctonia*-like fungus. *Phytopathology*, v.77, p.1548-51, 1987b.

- CARLING, D.E. Anastomosis groups and subsets of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RHIZOCTONIA, 3, 2000, Taichung. Abstracts... Taichung: International Symposium on *Rhizoctonia*, 2000. p.14.
- CARLING, D.E., KUNINAGA, S. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn: inter – and intragroup relatedness of anastomosis group 9. *Phytopathology*, v.80, p.1362-64, 1990.
- CARLING, D.E., LEINER, R.H. Virulence of isolates of *Rhizoctonia solani* AG-3 collected from potato plant organs and soil. *Plant Dis.*, v. 74, p.901-3, 1990.
- CARLING, D.E., SUMNER, D.R. *Rhizoctonia*. In: SINGLETON, L.L., MIHAIL, J.D., RUSH, C.M. (Ed.) *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. St. Paul: American Phytopathological Society, 1992. p.157-65.
- CARLING, D.E., LEINER, R.H., KEBLER, K.M. Characterization of a new anastomosis group (AG-9) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, v.77, p.1609-12, 1987.
- CARLING, D.E., KUNINAGA, S., LEINER, R.H. Relatedness within and among intraspecific groups of *Rhizoctonia solani*: A comparison of grouping by anastomosis and by DNA hybridization. *Phytoparasitica*, v.16, p.209-10, 1988.
- CARLING, D.E., ROTHROCK, C.S., MACNISH, G.C., SWEETINGHAM, M.W.,

- BRAINARD, K.A., WINTERS, S.W. Characterization of anastomosis group 11 (AG-11) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, v.84, p.1387-93, 1994.
- CARLING, D.E., POPE, E.J., BRAINARD, K.A., CARTER, D.A. Characterization of isolates of *Rhizoctonia solani*, including a new AG, that are mycorrhizal on an orchid in Australia. *Phytopathology*, v.88, supl., p.S13, 1998.
- CARLING, D.E., BAIRD, R.E., KUNINAGA, S., GITAITIS, R.D. Characterization of anastomosis group (AG) 13 of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, v.89, supl., p.S11, 1999.
- CASTRO, C., DAVIS, J.R., WIESE, M.V. Quantitative estimation of *Rhizoctonia solani* AG-3 in soil. *Phytopathology*, v.78, p.1287-92, 1988.
- CERESINI, P.C., FENILLE, R.C., SOUZA, N.L. Associação de *Rhizoctonia* spp. binucleadas e de *R. solani* Kühn GA 4 HGI à vagens de amendoineiro (*Arachis hypogaea*) no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathol.*, v.22, p.145-55, 1996.
- CERESINI, P.C., SOUZA, N.L. Associação de *Rhizoctonia* spp. binucleadas e de *R. solani* Kühn GA 4 HGI e GA 2-2 IIIB ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no estado de São Paulo. *Summa Phytopathol.*, v.23, p.14-24, 1997.
- CHUNG, Y.R., HOITINK, H.A.H., LIPPS, P.E. Interactions between organic-matter

decomposition level and soilborne disease severity. *Agric., Ecosyst. & Environ.*, v.24, p.183-93, 1988.

CUBETA, M.A., VILGALYS, R. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. *Phytopathology*, v.87, p.480-4, 1997.

CUBETA, M.A., ECHANDI, E., GUMPERTZ, M.L. Survival of binucleate *Rhizoctonia* species, biological control agents, in soil and plant debris under field conditions. *Biol. Control*, v.1, p.218-26, 1991.

CUBETA, M.A., GONZALEZ, D., VILGALYS, R., BRENNEMAN, T.B. Characterization of peanut isolates of *Rhizoctonia solani* from Georgia. *Phytopathology*, v.82, p.1114, 1992. (Abstract)

CUBETA, M.A., ECHANDI, E., SUN, M.L. Biological control of *Rhizoctonia* diseases with binucleates *Rhizoctonia* spp. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *RHIZOCTONIA*, 2, 1995, Noordwijkerhout. *Abstracts...* Noordwijkerhout: International Symposium on *Rhizoctonia*, 1995. p.134.

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

- DAVEY, C.B., PAPAIVIZAS, G.C. Effect of organic soil amendments on the *Rhizoctonia* disease of snap beans. *Agron. J.*, v.51, p.493-6, 1959.
- DeCANDOLLE, A.P. Memoire sur les rhizoctones, nouveau genre de champignons qui attaque les racines, des plantes et en particulier celle de la luzerne cultivee. *Mem. Mus. d'Hist. Nat.*, v.2, p.209-16, 1815 apud 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.157-65.
- DUNCAN, S., BARTON, J.E., O'BRIEN, P.A. Analysis of variation in isolates of *Rhizoctonia solani* by random amplified polymorphic DNA assay. *Mycol. Res.*, v.97, p.1075-82, 1993.
- ELANGO, F. The role of high temperature in the damping-off of true potato seedlings in the lowland tropics. *Trop. Agric.*, v.63, p.66-7, 1986.
- EMBRAPA *Recomendações técnicas para a cultura da soja na região central do Brasil 1999/2000*. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 226p. (Documentos, 132)
- EXNER, B. Comparative studies of four rhizoctonias in Louisiana. *Mycologia*, v.45, p.698-718, 1953.

- FIGUEIREDO, M.B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para a conservação de fungos patógenos de plantas. *Biológico (São Paulo)*, v.33, p.9-13, 1967.
- FLENTJE, N.T. Studies on *Pellicularia filamentosa* (Pat.) Rogers. I. Formation of the perfect stage. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, v.40, p.322-336, 1957.
- FLENTJE, N.T., STRETTON, H.M. Mechanisms of variation in *Thanatephorus cucumeris* and *T. praticolus*. *Aust. J. Biol. Sci.*, v.17, p.686-704, 1964.
- FLENTJE, N.T., DODMAN, R.L., KERR, A. The mechanism of host penetration by *Thanatephorus cucumeris*. *Aust. J. Biol. Sci.*, v.16, p.784-799, 1963.
- GARZA-CHAPA, R., ANDERSON, N.A. Behavior of single-basidiospore isolates and heterokaryons of *Rhizoctonia solani* from flax. *Phytopathology*, v.56, p.1260-8, 1966.
- GASPARATO, L., TRINDADE, D.R., LIEBEREI, R. Avaliação da resistência de clones de seringueira a mancha aureolada (*Thanatephorus cucumeris*). *Fitopatol. Bras.*, v.6, supl., p.555, 1981.
- GRISHAM, M.P., ANDERSON, N.A. Pathogenicity and host specificity of *Rhizoctonia solani* isolated from carrot roots. *Phytopathology*, v.73, p.1564-9, 1983.
- HARVILLE, B.G., RUSSIN, J.S., HABETZ, R.J. *Rhizoctonia* foliar blight reactions and seed

yields in soybean. *Crop Sci.*, v.36, p.563-6, 1996.

HASHIDA, T., KOBAYASHI, T. Rice diseases incited by *Rhizoctonia* species. 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.331-40.

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

HERR, L.J. Biocontrol of *Rhizoctonia* crown and root rot of sugar beet by binucleate *Rhizoctonia* spp. and *Laetisaria arvalis*. *Ann. Appl. Biol.*, v.113, p.107-18, 1988.

HERR, L.J., ROBERTS, D.L. Characterization of *Rhizoctonia solani* populations obtained from sugarbeet fields with differing soil textures. *Phytopathology*, v.70, p.476-80, 1980.

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

HOMMA, Y., YAMASHITA, Y., ISHII, M. A new anastomosis group (AG-7) of *Rhizoctonia solani* Kühn from Japanese radish fields. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v.49, p.184-90, 1983.

HURD, B, GRISHAM, M.P. *Rhizoctonia* spp. associated with brown patch of St. Augustinegrass. *Phytopathology*, v.73, p.1661-5, 1983.

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

ICHIELEVICH-AUSTER, M., SNEH, B., KOLTIN, Y., BARASH, I. Suppression of damping-off caused by *Rhizoctonia* spp., by non-pathogenic *R. solani*. *Phytopathology*, v.75, p.1080-4, 1985.

JABAJI-HARE, S.H., MELLER, Y., GILL, S., CHAREST, P.M. Investigation of genetic relatedness among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* using cloned DNA probes. *Can. J. Plant Pathol.*, v.12, p.393-404, 1990.

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

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

- KAJIWARA, T., SUGATA, S. On the damping-off of chrysanthemum by *Rhizoctonia*. *Rep. Soc. Plant Prot. Kanto*, v.18, p.74, 1971.
- KANEMATSU, S., NAITO, S. Genetic characterization of *Rhizoctonia solani* AG-2-3 by analyzing restriction fragment length polymorphisms of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v.61, p.18-21, 1995.
- KASIM, R. The effect of heat treatment on the survival of *Phytophthora* spp. in soil. *Pemberitaan lembaga Penelitian Tanaman Industri*, v.29, p.71-7, 1978.
- KEIJER, J., KORSMAN, M.G., DULLEMANS, A.M., HOUTERMAN, P.M., DE BREE, J., VAN SILFHOUT, C.H. *In vitro* analysis of host plant specificity in *Rhizoctonia solani*. *Plant Pathol.*, v.46, p.659-69, 1997.
- KO, W., HORA, K.F. A selective media for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology*, v.61, p.707-10, 1971.
- KODAMA, T., HORIMOTO, K., OGOSHI, A. On the brown spot of eggplants caused by *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (*Rhizoctonia solani*) AG-3. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v.48, p.356, 1982.
- KOUSIK, C.S., SNOW, J.P., BERGGREN, G.T. Factors affecting infection cushion development by *Rhizoctonia solani* AG-1 IA and IB on soybean leaves. *Plant Pathol.*,

v.43, p.237-44, 1994.

KOUSIK, C.S., SNOW, J.P., BERGGREN, G.T., HARVILLE, B.G. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* on soybean leaves and seedlings. *Plant Pathol.*, v.44, p.580-6, 1995.

KULIK, M.M., DERY, P.D. *Notes on the use of DAPI for determining the anastomosis group of isolates of Rhizoctonia solani*. Beltsville: USDA, 1992. 7p.

KUNINAGA, S., YOKOSAWA, R. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. I. Genetic relatedness within anastomosis group 1. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v.48, p.559-667, 1982a.

KUNINAGA, S., YOKOSAWA, R. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. II. Genetic relatedness within anastomosis group 2. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v.48, p.668-73, 1982b.

KUNINAGA, S., YOKOSAWA, R. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. III. Genetic relatedness within AG-3, AG-5, AG-7 and AG-BI. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v.49, p.647-52, 1983.

KUNINAGA, S., YOKOSAWA, R. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. IV. Genetic relatedness within AG-4. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v.50, p.322-30,

1984a.

KUNINAGA, S., YOKOSAWA, R. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. V. Genetic relatedness within AG-6. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v.50, p.346-52, 1984b.

KUNINAGA, S., YOKOSAWA, R. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. VI. Genetic relatedness among seven anastomosis groups. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v.51, p.127-32, 1985a.

KUNINAGA, S., YOKOSAWA, R. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. VII. Genetic relatedness between AG-BI and other anastomosis groups. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v.51, p.133-38, 1985b.

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

KUNINAGA, S., YOKOSAWA, R., OGOSHI, A. Some properties of anastomosis group 6 and BI in *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v.45, p.207-17, 1979.

KUNINAGA, S., NATSUAKI, T., TAKEUCHI, T., YOKOSAWA, R. Sequence variation of

the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. *Curr. Genet.*, v.32, p.237-43, 1997.

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

KURTZMAN, C.P. Impact of nucleic acid comparisons on systematic mycology. *Bot. J. Linn. Soc.*, v.99, p.3-10, 1989.

LAROCHE, J.P., JABAJI-HARE, S.H., CHAREST, P.M. Differentiation of two anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by isozyme analysis. *Phytopathology*, v.82, p.1387-93, 1992.

LEACH, L.D., GARBER, R.H. Control of *Rhizoctonia solani*. In: PARMETER Jr., R. (ed.) *Rhizoctonia solani: biology and pathology*. Berkeley: University California Press, 1970. p.189-98.

LEFÉVRE, A.F.V., SOUZA, N.L. Determinação da temperatura letal para *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* e efeitos da solarização sobre a temperatura do solo. *Summa Phytopathol.*, v.19, p.107-12, 1993.

LEITE, M.C. Novas fronteiras de produção e o intermodal de transporte. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE SOJA, Londrina, 1999. *Anais...Londrina: Embrapa Soja*, 1999. p.51-58. (Documentos, 124)

LESSA, E.P., APPLEBAUM, G. Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. *Mol. Ecol.*, v.2, p.119-29, 1993.

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

LIU, Z., SINCLAIR, J.B. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2. *Phytopathology*, v.82, p.778-87, 1992.

LIU, Z., SINCLAIR, J.B. Molecular differentiation of intraspecific groups within anastomosis group I of *Rhizoctonia solani*. *Can. J. Plant Pathol.*, v.15, p.272-80, 1993.

LIU, Z., NICKRENT, D.L., SINCLAIR, J.B. Genetic relationships among isolates of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 based on isozyme analysis. *Can. J. Plant Pathol.*, v.12, p.376-82, 1990.

LIU, Z., DOMIER, L.L., SINCLAIR, J.B. ISG-specific ribosomal DNA polymorphism of the *Rhizoctonia solani* species complex. *Mycologia*, v.85, p.795-800, 1993.

MACNISH, G.C., CARLING, D.E., BRAINARD, K.A. Characterization of *Rhizoctonia*

solani AG-8 from bare patches by pectic isozyme (zymogram) and anastomosis techniques. *Phytopathology*, v.83, p.922-7, 1993.

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

MARTIN, B. Rapid tentative identification of *Rhizoctonia* spp. associated with diseased turfgrasses. *Plant Dis.*, v.71, p.47-9, 1987.

MARTIN, S.B., LUCAS, L.T. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. and binucleate *Rhizoctonia*-like fungi from turfgrasses in North Carolina. *Phytopathology*, v.74, p.170-5, 1984.

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

MEYER, M.C., MACHADO, N.F. Evolução da cultura da soja no corredor de exportação norte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, Londrina, 1999. *Anais...*Londrina: Embrapa Soja, 1999. p.440. (Documentos, 124)

- MEYER, M.C., YORINORI, J.T. Incidência de doenças da soja em regiões tropicais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, Londrina, 1999. *Anais...*Londrina: Embrapa Soja, 1999. p.457. (Documentos, 124)
- MEYER, J.C., VAN WYK, R.J., PHILLIPS, A.J.L. *Rhizoctonia* leaf spot of tobacco in South Africa. *Plant Pathol.*, v.39, p.206-7, 1990.
- MOORE, R.T. The dolipore/parenthesome septum in modern taxonomy. 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.13-35.
- MUYOLO, N.G., LIPPS, P.E., SCHMITTHENNER, A.F. Anastomosis grouping and variation in virulence among isolates of *Rhizoctonia solani* associated with dry bean and soybean in Ohio and Zaire. *Phytopathology*, v.83, p.438-44, 1993a.
- MUYOLO, N.G., LIPPS, P.E., SCHMITTHENNER, A.F. Reactions of dry bean, lima bean, and soybean cultivars to *Rhizoctonia* root and hypocotyl rot and web blight. *Plant Dis.*, v.77, p.234-8, 1993b.
- NAIKI, T., UI, T. *Rhizoctonia* root rot of bean, soybean and adzukibean seedlings. *Mem. Fac. Agric. Hokkaido Univ.*, v.12, p.262-9, 1981.

- NAITO, S. Ecological rofe of basidiosporos of *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk in the incidence of foliage blight of sugar beets in Japan. *JARQ (Jpn. Agric. Res. Q.)*, v.23, 268-75, 1990.
- NAITO, S., MOHAMAD, D., NASUTION, A., PURWANTI, H. Soil-borne diseases and ecology of pathogens on soybean roots in Indonesia. *JARQ (Jpn. Agric. Res. Q.)*, v.26, p.247-53, 1993.
- NAITO, S., MOCHIDA, H., NAKAJIMA, T., OHTO, Y. Infection with basidiospores of *Thanatephorus cucumeris* (AG-2-3 of *Rhizoctonia solani*) and development of soybean foliar blight lesions. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v. 61, p. 362-8, 1995.
- NAKATOMI, Y., KANEKO, H. Ecology and control of leaf blight of tulip. *Plant Prot.*, v.25, p.191-4, 1971.
- NEATE, S.M., WARCUP, J.H. Anastomosis grouping of some isolates of *Thanatephorus cucumeris* from agricultural soils in South Australia. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, v.85, p.615-20, 1985.
- O'NEILL, N.R., RUSH, M.C., HORN, N.L., CARVER, R.B. Aerial blight of soybeans caused by *Rhizoctonia solani*. *Plant Dis. Rep.*, v.61, p.713-7, 1977.
- OGOSHI, A. On the perfect stage of anastomosis group AG-5 of *Rhizoctonia solani* Kühn.

Trans. Mycol. Soc. Jpn., v.14, p.67-74, 1973.

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

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

OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v.25, p.125-43, 1987.

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

OGOSHI, A., COOK, R.J., BASSETT, E.N. *Rhizoctonia* species and anastomosis groups causing root rot of wheat and barley in the Pacific Northwest. *Phytopathology*, v.80, p.784-8, 1990.

ONIKI, M., OGOSHI, A., ARAKI, T. Development of the perfect state of *Rhizoctonia solani*

Kühn AG-1. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v.52, p.169-74, 1986.

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

PARMETER, J.R., Jr., WHITNEY, H.S. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state.
In: PARMETER, J.R., Jr. (Ed.) *Rhizoctonia solani*: biology and pathology. Berkeley:
University of California Press, 1970. p.7-19.

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

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

PIMENTEL GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 10 ed. Piracicaba: Nobel, 1982.
430p.

PLOETZ, R.C., MITCHELL, D.J., GALLAHER, R.N. Characterization and pathogenicity of
Rhizoctonia species from a reduced-tillage experiment multicropped to rye and soybean in
Florida. *Phytopathology*, v.75, p.833-9, 1985.

ROHLF, F.J. *NTSYS-PC version 1.7 numerical taxonomy and multivariate analysis system*.

Setauket: Exeter Software Publ., 1992.

SAMBROOK, J., MANIATS, T., FRITSCH, E.F. *Molecular cloning: a laboratory manual*.

New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SCHULTZ, H. Vergleichende Untersuchungen zur Ökologie, Morphologie, und Systematik

der "Vermehrungspilzen". *Arb. Biol. Reichanst. Land Forswirtsch*, v.22, p.1-141, 1937

apud VILGALYS, R., CUBETA, M.A. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v.32, p.135-55, 1994.

SHEHATA, M.A., PFLEGER, F.L., DAVIS, D.W. Response of susceptible and moderately

resistant pea genotypes to interaction between *Rhizoctonia solani* and three other stem and root rot pathogens. *Plant Dis.*, v.67, p.1146-8, 1983.

SHERWOOD, R.T. Morphology and physiology in four anastomosis groups of

Thanatephorus cucumeris. *Phytopathology*, v.59, p.1924-9, 1969.

SILVA, S., CERESINI, P.C., SOUZA, N.L., AGUIAR, L.F. Sensibilidade térmica micelial e

esclerocial de isolados de *Rhizoctonia solani* GA 4 HGI. *Summa Phytopathol.*, v.22, p.252-6, 1996.

SILVEIRA, S.F., ALFENAS, A.C., FERREIRA, F.A., SUTTON, J.C. Characterization of

Rhizoctonia species associated with foliar necrosis and leaf scorch of clonally-propagated Eucalyptus in Brazil. *Eur. J. Plant Pathol.*, 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.139-46.

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

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

SUMNER, D.R. Virulence of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia*-like fungi on selected germ plasm of snapbean, lima bean and cowpea. *Plant Dis.*, v.69, p.25-7, 1985.

SUMNER, , D.R., BELL, D.K. Influence of crop rotation on severity of crown and brace root rot caused in corn by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, v.76, p.248-52, 1986.

SUMNER, , D.R., BELL, D.K. Survival of *Rhizoctonia* spp. and root diseases in a rotation of corn, snap bean, and peanut in microplots. *Phytopathology*, v.84, p.113-8, 1994.

- SZTEJNBERG, A., FREEMAN, S., CHET, I., KATAN, J. Control of *Rosellinia necatrix* in soil and in apple orchard by solarization and *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis.*, v.71, p.365-9, 1987.
- TALBOT, P.H.B. Taxonomy and nomenclature of the perfect stage. In: PARMETER Jr., J.R. (Ed.) *Rhizoctonia solani*: biology and pathology. Berkeley: University of California Press, 1970. p.20-31.
- TANAKA, M.A.S., COQUEIRO, G.R. *Thanatephorus cucumeris* (*Pellicularia filamentosa* (Pat.) Rogers) em viveiros de seringueira em Felixlândia, M.G. *Fitopatol. Bras.*, v.6, p.123-5, 1981.
- TODA, T., HYAKUMACHI, M., ARORA, D.K. Genetic relatedness among and within different *Rhizoctonia solani* anastomosis groups as assessed by RAPD, ERIC and REP-PCR. *Microbiological Res.*, v.154, p.247-258, 1999.
- TU, C.C., CHANG, Y.C. Studies on the anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn in Taiwan. *J. Agric. Res. China*, v.27, p.325-43, 1978.
- TU, C.C., KIMBROUGH, J.W. Systematics and phylogeny of fungi in the *Rhizoctonia* complex. *Bot. Gaz.*, v.139, p.454-66, 1978.
- TUITE, J. *Plant pathological methods: fungi and bacteria*. Minneápolis: Burgess, 1969.

239p.

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

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

UTIAMADA, C.M., SATO, L.N., OLIVEIRA, L.C., LOPES, J.C. Eficiência de fungicidas, em aplicação foliar, no controle da mela (*Thanatephorus cucumeris/Rhizoctonia solani*), na cultura da soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA CENTRAL DO BRASIL, Cuiabá, 2000. *Resumos...*Londrina: Embrapa Soja, 2000. p.80. (Documentos, 144)

VIANA, F.M.P., SOUZA, N.L. Efeito da temperatura e da tensão de água do substrato na germinação de microescleródios de *Macrophomina phaseolina*. *Summa Phytopathol.*, v.23, p.236-238, 1997.

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

- VILGALYS, R., CUBETA, M.A. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v.32, p.135-55, 1994.
- VILGALYS, R., GONZALEZ, D. Organization of ribosomal DNA in the basidiomycete *Thanatephorus praticola*. *Curr. Genet.*, v.18, p.277-80, 1990a.
- VILGALYS, R., GONZALEZ, D. Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms in *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, v.80, p.151-8, 1990b.
- VILGALYS, R., JOHNSON, J.L. Extensive genetic divergence associated with speciation in filamentous fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.84, p.2355-8, 1987.
- WARREN, H.L. Effect of inoculum concentration on resistance of lima bean to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, v.65, p.341-5, 1975.
- WATANABE, B., MATSUDA, A. Studies on the grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn pathogenic to upland crops. *Bull. App. Exp.*, v.7, p.1-131, 1966.
- WEBSTER, R.K., GUNNELL, P.S. *Compendium of rice diseases*. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 1992. 86p.
- WELSH, J., PETERSEN, C., McCLELLAND, M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucl.*

Acids Res., v.19, p.303-6, 1990.

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

WRATHER, J.A., ANDERSON, T.R., ARSYAD, D.M., GAI, J., PLOPER, L.D., PORTA-PUGLIA, A., RAM, H.H., YORINORI, J.T. Soybean diseases loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. *Plant Dis.*, v.81, p.107-10, 1997.

YAMAMOTO, D.T., UCHIDA, J.Y. Rapid nuclear staining of *Rhizoctonia solani* and related fungi with acridine orange and with safranin O. *Mycologia*, v.74, p.145-9, 1982.

YAMAMOTO, T., UEHARA, H. Seedling damping-off of welsh onion and the control. *Plant Prot.*, v.26, p.153-9, 1972.

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

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

- YANG, X.B., BERGGREN, G.T., SNOW, J.P. Seedling infection of soybean by isolates of *Rhizoctonia solani* AG-1, causal agent of aerial blight and web blight of soybean. *Plant Dis.*, v.74, p.485-8, 1990a.
- YANG, X.B., BERGGREN, G.T., SNOW, J.P. Types of *Rhizoctonia* foliar blight on soybean in Louisiana. *Plant Dis.*, v.74, p.501-4, 1990b.
- YANG, J., KHARBANDA, P.D., WANG, H., McANDREW, D.W. Characterization, virulence, and genetic variation of *Rhizoctonia solani* AG-9 in Alberta. *Plant Dis.*, v.80, p.513-8, 1996.
- YORINORI, J.T. *Cancro da haste da soja: epidemiologia e controle*. Londrina: EMBRAPA, 1996. 75p. (Circular Técnica, 14)
- YORINORI, J.T. Estratégias de controle das doenças da soja. *Correio Agrícola*, n.2, p.8-12, 1998.