



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
CAMPUS INHUMAS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR (ITS-rDNA) DE
FUNGOS *RHIZOCTONIA* ISOLADOS DE SOLOS BRASILEIROS.**

Marília Oliveira Costa

Inhumas, 2018.



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS

CAMPUS INHUMAS

Coordenação de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Bacharelado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Marília Oliveira costa

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR (ITS-rDNA) DE
FUNGOS *RHIZOCTONIA* ISOLADOS DE SOLOS BRASILEIROS.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
IFG-GO / Campus Inhumas como parte dos
requisitos necessários para obtenção do título
Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Angel José Vieira Blanco

Inhumas, dezembro de 2018.



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
CAMPUS INHUMAS

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)

Costa, Marília Oliveira
C837 Caracterização morfológica e molecular (ITS-rDNA) de fungos
Rhizoctonia isolados de solos brasileiros. [Manuscrito] / Marília
Oliveira Costa. – – Inhumas, 2019.
46 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Angel José Vieira Branco.
Monografia (Graduação) – Instituto Federal de Educação,
Ciência e Tecnologia de Goiás, Campus Inhumas, Curso
Bacharelado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2019.
Bibliografia.

1. Fungo Rhizoctonia. 2. Genética molecular. I. Título.

CDD 574.8

Código 01.2019
Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Rodrigues de Souza,
CRB-1/1496.

Biblioteca Atena, Campus Inhumas
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAÇÃO
NO REPOSITÓRIO DIGITAL DO IFG - ReDi IFG**

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Digital (ReDi IFG), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IFG.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| ☐ Tese | ☐ Artigo Científico |
| ☐ Dissertação | ☐ Capítulo de Livro |
| ☐ Monografia – Especialização | ☐ Livro |
| ☒ TCC - Graduação | ☐ Trabalho Apresentado em Evento |
| ☐ Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Marília Oliveira Costa
Matrícula: 20132030110185
Título do Trabalho: Caracterização morfológica e molecular (ITS-rDNA) de fungos Rhizoctonia isolados de solos brasileiros.

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: ☒ Não ☐ Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no ReDi/IFG: 20/02/19

O documento está sujeito a registro de patente? ☐ Sim ☒ Não
O documento pode vir a ser publicado como livro? ☐ Sim ☒ Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumprir quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás.

Inhumas 07/02/19
Local Data

Marília Oliveira Costa

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS

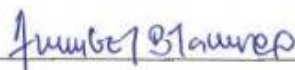
CAMPUS INHUMAS

MARÍLIA OLIVEIRA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR (ITS-rDNA) DE
FUNGOS *RHIZOCTONIA* ISOLADOS DE SOLOS BRASILEIROS.**

Monografia apresentada à banca examinadora da Coordenação de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás – Unidade de Ensino Descentralizada de Inhumas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Angel José Vieira Blanco

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás



Prof. Dr. Marlei de Fátima Pereira

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás



Prof. Dr. Luiz Fernando Nunes Rocha

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás

Inhumas
Dezembro/2018

RESUMO

Fungos do gênero *Rhizoctonia* constituem um complexo grupo taxonômico de fitopatógenos, compreendendo espécies multinucleadas como *Rhizoctonia zeae* e *Rhizoctonia orizae* tendo como teleomorfo *Waitea*, além de inúmeras espécies denominadas genericamente de *Rhizoctonia* binucleadas. Esse gênero de fungos se destaca por englobar organismos mundialmente distribuídos, encontrados tanto em solos agrícolas quanto em solos florestais, podendo ser atribuídos a eles sintomas de queima foliar, além de doenças em raízes e em outros órgãos das plantas que parasitam. Identificar e caracterizar fungos fitopatógenos do gênero *Rhizoctonia* torna-se relevante a partir do momento em que sintomas da sua presença começam a aparecer em plantas, nas diversas culturas em que podem se tornar hospedeiros. No presente trabalho, 47 isolados de fungos *Rhizoctonia* obtidos à partir de amostras de solos de diferentes regiões brasileiras, foram identificados através de métodos moleculares, caracterização morfológica e de coloração de núcleos, dos quais todos tiveram sua região genômica ITS-rDNA sequenciada com sucesso, confirmando a identidade de cada isolado. As três principais espécies de *Rhizoctonia* relacionados à fitopatógenos foram identificados nas diferentes áreas estudadas, com destaque para *R. solani* (AG4-HGI), cujos isolados corresponderam 25,5% das amostras analisadas. A coloração do micélio dos isolados variou entre tons de branco, laranja, marrom e a disposição dos escleródios em placa, assim como a condição nuclear dos isolados também apresentaram variabilidade. Os resultados aqui encontrados confirmam estudos anteriores e podem representar uma importante contribuição para o manejo e controle deste importante grupo de fitopatógenos.

Palavras-chave: Fungos, genética molecular, *Rhizoctonia solani*, ITS-rDNA.

ABSTRACT

Fungi of the genus *Rhizoctonia* constitute a complex taxonomic group of phytopathogens, comprising multinucleated species such as *Rhizoctonia zeae* and *Rhizoctonia orizae*, having as *Waitea* teleomorph, besides numerous species denominated generically of binucleate *Rhizoctonia*. This genus of fungi is distinguished by the inclusion of globally distributed organisms found in both agricultural soils and forest soils, which can be attributed to leaf-burning symptoms, as well as diseases of roots and other parasitic plant organs. Identifying and characterizing phytopathogenic fungi of the genus *Rhizoctonia* becomes relevant as soon as symptoms of their presence begin to appear in plants in the various cultures in which they can become hosts. In the present work, 47 isolates of *Rhizoctonia* fungi obtained from soil samples from different Brazilian regions were identified through molecular methods, morphological characterization and coloration of nuclei, all of which had their ITS-rDNA genomic region successfully sequenced, confirming the identity of each isolate. The three main *Rhizoctonia* species related to phytopathogens were identified in the different areas studied, with emphasis on *R. solani* (AG4-HGI), whose isolates corresponded to 25,5% of the samples analyzed. The color of the mycelium of the isolates varied between shades of white, orange, brown and the disposition of the sclerotia in plaque, as well as the nuclear condition of the isolates also presented variability. The results found here confirm previous studies and may represent an important contribution to the management and control of this important group of phytopathogens.

Keywords: Fungi, molecular genetics, *Rhizoctonia solani*, ITS-rDNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da distribuição espacial dos locais de coleta no território brasileiro.....	23
Figura 2. Gel de eletroforese contendo amostras de DNA extraídas de cepas de fungos utilizados neste estudo.....	26
Figura 3. Gel de eletroforese após adição de RNase às amostras de DNA extraídas de cepas de fungo utilizadas neste estudo.....	26
Figura 4. Gel de eletroforese contendo amostras de DNA amplificadas (ITS-rDNA) de fungos do gênero <i>Rhizoctonia</i> utilizadas neste estudo.....	27
Figura 5. A – B, <i>Waitea circinata</i> (A: variedade <i>zeae</i> , B: var. <i>circinata</i>	30
Figura 6. De A a F, <i>Rhizoctonia solani</i> (A: AG1-1A; B: AG1-1B; C: AG1-1D; D: AG1-1E; E: AG4-HGIII; F: AG4-HGI).....	30
Figura 7. De A a E, <i>Ceratobasidium</i> sp. (A: AG-A; B: AG-B; C: AG-F; D: AG-P; E: AG-R).....	31
Figura 8. Árvore filogenética contendo as sequências dos isolados de <i>Rhizoctonia Solani</i> , <i>Ceratobasidium</i> , e <i>Waitea Circinata</i> , identificados neste trabalho. Os isolados representados pelas cores azul escuro: AG4-HG1; Em azul: HG4-HGIII; Em azul claro: AG-F; Em lilás: AG-P; Em amarelo mostarda: AG-R; Em amarelo: AG1-1D; Em roxo: AG1-1B; Em marrom: AG1-1A; Em verde escuro: AG1-1E; Em verde claro: AG-A; Em rosa: AG-B; Em laranja: <i>Waitea circinata</i> var. <i>zeae</i> ; Em vermelho: <i>Waitea circinata</i> var. <i>circinata</i>	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação dos isolados utilizados neste trabalho com suas respectivas regiões de origem e o tipo de substrato/histórico de cultivo da área onde a amostra foi coletada....	21
Tabela 2 – Relação dos isolados utilizados com sua respectiva caracterização e identificação molecular.....	33
Tabela 3 – Distribuição dos isolados amostrados nas regiões agrícolas do Brasil por estado e por grupo de anastomose.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA: Batata dextrose Ágar

G.C: Grampo de conexão

A.G: Grupos de Anastomose

B.O.D: Demanda bioquímica de oxigênio

P.D: Potato dextrose

T.B.E: Tris/Borato/EDTA

N.C.B.I: National Center for Biotechnology Information

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	<i>Rhizoctonia</i> sp.	15
2.2	Sintomatologia	16
2.3	Métodos para identificação e classificação	16
2.4	Principais grupos de espécies de <i>Rhizoctonia</i>	17
3	OBJETIVOS	20
3.1	Objetivos gerais	20
3.2	Objetivos específicos	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1	Amostragem e isolamento das cepas	21
4.2	Morfologia de colônias e contagem de núcleos	24
4.3	Isolamento e quantificação de DNA genômico	24
4.4	Amplificação da região ITS e sequenciamento	26
4.5	Identificação molecular	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	Caracterização da morfologia das colônias	28
5.2	Identificação molecular	29
6	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

1. INTRODUÇÃO

Rhizoctonia é um complexo e diversificado gênero de fungos encontrados no solo, com ampla atividade ecológica e grande quantidade de hospedeiros (Burpee e Martin, 1992). Embora a grande maioria das espécies classificadas neste gênero seja constituída por organismos que parasitam raízes e outros órgãos vegetais (Ogoshi, 1987; Sneh, 1996), espécies saprófitas, simbiontes (González-Garcia *et al.*, 2006) e mutualísticas (Otero *et al.*, 2002) também fazem parte do grupo. *Rhizoctonia* spp. e são amplamente distribuídas pelo globo terrestre, podendo ser encontrados tanto em solos agrícolas quanto em solos sob vegetação nativa (González-Garcia *et al.*, 2006).

O ataque de *Rhizoctonia* spp. em diversas espécies de plantas importantes para a alimentação humana, está ricamente documentado na literatura especializada, onde é possível observar descrições de sintomas como podridão da raiz, talos e frutos, tombamento e ferrugem foliar (Ogoshi, 1987). Plantas produzidas em grande escala na agricultura brasileira como arroz, feijão, soja e milho estão entre os principais hospedeiros desses fungos (Chaijuckam e Davis 2010; Godoy-Lutz *et al.*, 2003; González, 2013; Summer e Minton, 1989). Em lavouras de soja no Brasil, por exemplo, já foram registradas perdas de até 60% da produção por ferrugem foliar associada a espécies de *Rhizoctonia* (Fenille *et al.*, 2003).

A biologia desse fungo é bastante complexa e seu ciclo reprodutivo passa por um estágio assexuado (anamorfo) e outro sexuado (teleomorfo) o que dificulta sua identificação, classificação, caracterização e consequentemente, a organização sistemática estável e definitiva do gênero. Embora a condição nuclear possa ser facilmente utilizada para classificar espécies com base na quantidade de núcleos presentes em hifas vegetativas (binuclear e multinuclear), o método mais utilizado na classificação destes organismos é baseado na anastomose de hifas, e as diferentes espécies reunidas em grupos de anastomose (AGs) (Sneh *et al.*, 1991).

A identificação de *Rhizoctonia* baseada em Grupos de Anastomose – AG – foi proposta por Matsumoto *et al.*, (1932) e colaboradores há aproximadamente 90 anos e implica que isolados que possuem a habilidade de se fundir, são geneticamente relacionados e pertencem

a um mesmo AG (González. 2013). Embora este método ainda seja válido atualmente e de nos últimos anos ter sido corroborado por dados genéticos (Carling *et al.*, 2002; González-Garcia *et al.*, 2006; Sharon *et al.*, 2008), reações de anastomose nem sempre são bem definidas, pois há isolados que geneticamente se posicionam de maneira intermediária entre dois AGs, podendo assim fundir suas hifas com ambos. Além disso, alguns isolados podem, inclusive, perder a capacidade relacionada à fusão de suas hifas (Sharon *et al.*, 2008) e assim dificultar a definição de sua posição sistemática em algum AG.

Novas metodologias atualmente disponíveis têm contribuído de maneira decisiva na organização sistemática do gênero *Rhizoctonia*. Técnicas moleculares utilizando a região intergênica do DNA ribossomal (ITS-rDNA), associadas a ferramentas de informática têm sido úteis na identificação e classificação de espécies e AGs, permitindo assim reconstrução das relações filogenéticas do grupo, auxiliando na determinação de linhagens evolutivas independentes e na inferência de sua respectiva história evolutiva (Ceresini *et al.*, 2010; Ciampi *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2006; Kunitani *et al.*, 2000; Sharon *et al.*, 2006; 2008).

Segundo Vilgays e Cubeta (1994) existem três principais grupos de *Rhizoctonia* associados a doenças de plantas: O complexo *R. solani*, que inclui espécies multinucleadas tendo *Thanatephorus* como seu teleomorfo; e *R. zeae* e *R. oryzae*, tendo como teleomorfo *Waitea*; *Rhizoctonia* binucleadas, que corresponde ao teleomorfo *Ceratobasidium*. Mas recentemente outros anamorfos de *Waitea* foram acrescentados a este gênero, cuja classificação se dá por “variedades” e não por grupos de anastomose, como *Waitea circinata* variedade *circinata* (Leiner e Carling 1994; Roberts 1999, Vilgays e Cubeta 1994), além de dois outros anamorfos recentemente relacionados à *Waitea circinata*: variedade *prodigus* e variedade *agrostis* (Kammerer *et al.*, 2011; Toda *et al.*, 2007).

A proposta deste trabalho foi contribuir no processo de identificação e caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp., uma vez que estas ações auxiliam no correto manejo das áreas onde esses fungos tenham sido observados. Informações obtidas a partir da ocorrência e distribuição de fungos *Rhizoctonia* em áreas de produção agrícola podem ajudar a restringir a disseminação desses organismos e seus consequentes impactos em lavouras do Brasil. Dessa

forma, pretendeu-se com este trabalho identificar e caracterizar isolados do gênero *Rhizoctonia* e seus respectivos grupos de anastomose e variedades, obtidos de amostras de solos oriundas de áreas de produção agrícola no Brasil.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. *Rhizoctonia* sp.

Fungos do gênero *Rhizoctonia* foram descritos primeiramente por De Candolle um micologista francês do século XIX, como causador de doenças ligadas ao solo, atacando preferencialmente raízes de plantas. É um fungo habitante natural do solo, considerado um patógeno agressivo, apresentado como uma ameaça às plantas, e também às sementes. Possui a capacidade de sobreviver saprofiticamente em fragmentos de cultura e no solo, sendo encontrado nas camadas mais superficiais do solo, devido à dependência de oxigênio principalmente nos primeiros 10 cm da superfície (Castro, 2007).

É um grupo de fungos grandioso, amplamente diversificado e bastante complexo, causador de doenças que geram perdas consideráveis de diversas culturas comerciais importantes no Brasil e no mundo. Podem infectar plantas em qualquer estágio do ciclo vegetativo, principalmente as partes da planta que estão em contato direto com o solo (raízes), causando uma série de doenças à cultura. Esses organismos apresentam uma enorme capacidade de sobrevivência a diversos fatores abióticos, se mantendo vivos na forma de escleródios ou hifas em plantas (Nakatani, 2006).

Em locais de condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento e crescimento do patógeno, como regiões de temperaturas elevadas, com chuvas frequentes e índice de alta umidade (95%) as perdas de produção das culturas podem variar de 31% a 60%, essas condições se tornam de primordial importância, sendo estes fatores limitantes ao cultivo de várias culturas em diversas regiões do Brasil (Nakatani, 2006; Castro, 2007).

Os escleródios são estruturas compostas por um aglomerado de hifas normalmente de forma arredondadas ou alongadas, em geral encontrados nas cores preta e marrom, de consistência sólida, desempenhando papel importante na sobrevivência do fungo por longos períodos. Podem sobreviver facilmente de um ano para o outro, espessado em plantas e em restos de cultura, sem a presença de nutrientes, e de nenhum fator que possibilite seu crescimento, o que dificulta ainda mais o controle deste no meio em que habita. Tendo em vista que possui um

período de vida estendido, pode ser disperso localmente por ventos, chuvas e pela movimentação do ser humano ou de trânsito de animais e implementos agrícolas (Castro, 2007).

2.2. Sintomatologia

Os sintomas característicos causados por este patógeno variam numa enorme gama, e por isso são confundidos facilmente com sintomas de doenças causadas por outros patógenos. Dentre os mais incidentes incluem podridão das raízes, amarelamento gradual, queima e murchamento foliar, morte em reboleira, mela das folhas ou caule da planta, tombamento mais conhecido como *Damping off*, queima da bainha e desfolha da planta, entre outros (Nakatani, 2006; Medeiros *et al.*, 2015).

Os principais sintomas causados ocorrem na fase inicial de desenvolvimento da planta. São decorrentes da doença como podridão das raízes, lesões deprimidas e escuras no hipocórito, abaixo e ao nível do solo, resultando posteriormente em murcha, ou tombamentos das plântulas ou *damping off* (Castro, 2007).

Como exemplo, a soja uma das principais culturas de grãos do Brasil, várias doenças já foram associadas a *R. solani* dentre elas, podridão das raízes e da base da haste, morte em reboleira, mela ou requeima da planta e da soja (Embrapa, 2005).

2.3. Métodos para identificação e classificação

Diversas pesquisas foram desenvolvidas anteriormente para identificar e classificar essa espécie, e estudos sobre a variabilidade patogênica foram baseados em critérios morfológicos, genéticos e de anastomose de hifas.

1 - Morfológicos:

- A) Que visam à identificação através da inspeção visual para a caracterização das colônias quanto à coloração de micélio que é a massa ou o conjunto das hifas que formam o corpo ou colônia do fungo.

- B) Presença/ausência e disposição de escleródios.
- C) Condição nuclear que se dá pela contagem do número de núcleos por célula, separando os isolados em dois grandes grupos: binucleados e multinucleados.

2 - Genéticos:

- D) Através da amplificação de região do rDNA (ITS), patológicos em várias espécies de plantas com sintomas característicos.

E por fim o mais utilizado para classificação *Rhizoctonia* são os:

3 - Grupos de anastomose (GA):

Fundamentado nos estudos desenvolvidos no decorrer de várias décadas, devido à complexidade sobre o histórico de vida deste fungo, pode-se afirmar que seja uma espécie geneticamente heterogênea, com subgrupos geneticamente isolados, que são os denominados grupos de anastomose (Sanfuentes et al., 2007).

O critério atual de maior importância para se identificar e classificar as diversas espécies de *Rhizoctonia*, é através da reação de anastomose de hifas. Essa reação se dá pela possibilidade de divisões sub-específicas, com a capacidade de fusão de hifas entre diferentes isolados da mesma espécie, tendo a habilidade de se reconhecer e se fundir, gerando uma nova unidade evolucionária representando populações geneticamente isoladas e não intercruzáveis (Meyer, 2002; Castro, 2007).

O conhecimento sobre os grupos e subgrupos de anastomose tem uma enorme importância na tentativa de elucidar e estabelecer graus de similaridade entre eles, compreendendo a distribuição das espécies e a diversidade genética destes sobre escala espacial e potencial da propagação e dispersão, deste patógeno (Sartorato, et al., 2006).

2.4. Principais grupos de espécies de *Rhizoctonia*

Dentre as espécies descritas anteriormente, *R. solani* (*Thanathephorus cucumeris*) é reconhecidamente de maior importância e maior incidência em uma ampla gama de hospedeiros,

causando doenças em várias culturas importantes no mundo todo, infectando sementes, raízes, frutos, folhas, colo e haste das plantas (Nakatani I, 2006; Goulart *et al.*, 2011).

No Brasil *R. solani* já foi anteriormente relatada provocando doenças e perdas consideráveis a várias plantas cultivadas comercialmente, como pimentão (*Capsicum annuum* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merr.), amendoimzeiro (*Arachis hypogaea* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) (Fenille, 1999; Nakatani, 2006).

Espécies de *Ceratobasidium* sp. foram observadas, pela primeira vez, na década de 90, em áreas agrícolas de São Paulo onde eram cultivados amendoim, feijão e soja (Basseto, 2008). Espécies deste gênero em sua fase anamórfica são coletivamente denominadas de *Rhizoctonia* binucleadas, estando proximamente relacionadas à *Thanatephorus cucumeris* (Stalpers & Andersen, 1998). São importantes patógenos de plantas Amazônicas, normalmente causando uma doença denominada mal-do-fio, popularmente conhecida por mancha areolada (Souza *et al.*, 2009; Gaino *et al.*, 2010).

O gênero *Ceratobasidium* é atualmente classificado em 16 grupos de anastomose, se subdivide em subgrupos de acordo com características culturais e frequência de anastomose. Doenças causadas por espécies de *Ceratobasidium* já foram descritas afetando diversas famílias de plantas e culturas de importância econômica como o chá (*Camellia sinensis*), caqui (*Diospyrus kaki*), graviola (*Annona muricata*), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), pimenta do reino (*Piper nigrum*), cacau (*Theobroma cacao*), citros (*Citrus* sp.), café (*Coffea arabica*), manga (*Mangifera indica*), abacate (*Persea atriearicarpa*), seringueira (*Hevea brasiliensis*), nim (*Azadirachta indica*), mogno africano (*Khaya ivorensis*), coco (*Cocos nucifera*), banana (*Musa* sp.) e outras plantas ornamentais arbustivas como *Ficus* sp, *Mussaenda alicia*, *Codiaeum* sp. e *Ixora coccinea* (Silva, 2013; Blanco, 2016).

O gênero *Waitea* se divide em três importantes variedades, *Waitea circinata*. var. *oryzae*, *Waitea circinata*. var. *zeae* e *Waitea circinata*. var. *circinata*, com base nas diferenças de morfologia do seu estado vegetativo. *Rhizoctonia oryzae* e *Rhizoctonia zeae* são anamorfos atribuídos aos teleomorfos *Waitea circinata*. var. *oryzae* e *Waitea circinata*. var. *zeae*, respectivamente. O nome anamórfico de *Waitea circinata*. var. *circinata* ainda não foi atribuído

(Martins, 2018; Blanco, 2016).

Waitea circinata var. *circinata* apresentam micélio de coloração laranja e escleródios apresentam forma globosa escura; *Waitea circinata* var. *oryzae* apresentam coloração laranja a salmão, e escleródios de forma irregular. *Waitea circinata* var. *zeae* apresentam coloração de laranja a marrom, e escleródios em forma regulares de até 1 mm de diâmetro (Toda *et al*, 2007; Fiky *et al.*, 2011).

As espécies pertencentes ao gênero *Waitea* são patógenos que, geralmente, causam doenças e danos comercialmente significativos em plantas da família *Poaceae*, como arroz, milho e têm sido relatadas como os organismos causadores da maioria das doenças em gramados (Martins, 2018).

De maior importância dentro do gênero *Waitea* é a variedade *zeae* apresentando diversos hospedeiros como: arroz, beterraba, cebola, milho, cevada e trigo (Martins, 2018; Blanco, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Utilizar de métodos moleculares e observações de padrões morfo-nucleares para identificar e caracterizar isolados de *Rhizoctonia* spp. recuperados de amostras de solos provenientes de regiões agrícolas brasileiras.

3.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Isolar, selecionar e repicar isolados de *Rhizoctonia* spp. à partir de amostras de solo provenientes de diferentes regiões do Brasil;
- Extrair o DNA, amplificar e sequenciar a região ITS - rDNA dos isolados selecionados;
- Utilizar ferramentas de bioinformática para tabular os dados oriundos do sequenciamento genético;
- Aplicar softwares específicos para análises de bioinformática;
- Realizar contagem do número de núcleos em hifas vegetativas de cada isolado e caracterizar sua coloração e disposição de escleródios.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostragem e Isolamento das Cepas

Os fungos utilizados neste estudo foram isolados a partir de amostras de solo coletadas em diferentes áreas agrícolas do Brasil, abrangendo os estados de Bahia, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Roraima e Tocantins. As amostras de solos utilizadas pertencem a EMBRAPA arroz e feijão, cuja sede está localizada no município de Santo Antônio de Goiás, Estado Goiás, onde estão armazenadas em câmara frigorífica. A utilização destas amostras foi previamente autorizada por pesquisadores responsáveis pela coleção de culturas desta unidade da EMBRAPA. A relação dos municípios sede, as quais pertencem às áreas de coleta pode ser observada na Tabela 1. A distribuição espacial dos locais de coleta no território brasileiro está apresentada na Figura 1.

Tabela 1. Relação dos 48 isolados utilizados neste trabalho com suas respectivas regiões de origem e o tipo de substrato/histórico de cultivo da área onde a amostra foi coletada

Isolado	Região de coleta		Substrato/histórico de cultivo
	Município	Estado	
CNPAF-0006	Ibiá	MG	Feijão-Batata
CNPAF-0010	Guarda Mor	MG	Feijão
CNPAF-0011	São Gotardo	MG	Milheto
CNPAF- 0063	Formoso	GO	Feijão
CNPAF-0064	Jussara	GO	Solo
CNPAF-0073	Rio Paranaíba	MG	Cenoura
CNPAF-0093	Gurupi	TO	Milho-Crotalaria-Feijão
CNPAF- 0099	Araguari	MG	Soja-Sorgo
CNPAF-0101	Ibiá	MG	Feijão
CNPAF-0119	Guamiranga	PR	Feijão-Aveia
CNPAF-0125	Guamiranga	PR	Feijão

CNPAF-0126	Guamiranga	PR	Soja-Feijão-Aveia
CNPAF-0132		MG	Feijão
CNPAF-0133	Jataí	GO	Solo
CNPAF-0152	Guamiranga	PR	Feijão
CNPAF-0156	Santo Antônio de Goiás	GO	Solo
CNPAF-0164	Jataí	GO	Solo
CNPAF-0166	Cristalina	GO	Feijão
CNPAF-0167	São Gotardo	MG	Alho
CNPAF-0169	Jataí	GO	Solo
CNPAF-0171	São João da Aliança	GO	Feijão
CNPAF-0174	Guamiranga	PR	Fumo-Feijão-Aveia
CNPAF-0179	Araguari	MG	Soja-Sorgo
CNPAF-0183	Guamiranga	PR	Feijão
CNPAF-0186	Imbituva	PR	Feijão-Milho
CNPAF-0192	Montes Claros	GO	Feijão
CNPAF-0193	Guamiranga	PR	Feijão-Aveia
CNPAF-0195	Ipiranga	PR	Solo
CNPAF-0197	Santo Antônio de Goiás	GO	Solo
CNPAF-0201	São João da Aliança	GO	Feijão
CNPAF-0202	São João da Aliança	GO	Feijão
CNPAF-0203	Jataí	GO	Solo
CNPAF-0204	Wenceslau Bráz	PR	Feijão-Milho
CNPAF-0206	São João da Aliança	GO	Feijao
CNPAF-0207	Guamiranga	PR	Feijão
CNPAF-0216	Sorriso	MT	Feijão
CNPAF-0217	Sorriso	MT	Feijão
CNPAF-0218	Sorriso	MT	Feijão
CNPAF-0223	Sorriso	MT	Feijão
CNPAF-0226	Cristalina	GO	*
CNPAF-0228	Cristalina	GO	*
CNPAF-0230	Cristalina	GO	*
CNPAF-0231	Santo Antônio de Goiás	GO	*
CNPAF-0234	Santo Antônio de Goiás	GO	Feijão

CNPAF-0247	Boa Vista	RR	*
CNPAF-0251	Boa Vista	RR	*
CNPAF-0268	*	BA	*
CNPAF-0277	*	BA	*

*Informação não disponibilizada



Figura 1. Mapa da distribuição espacial dos locais de coleta no território brasileiro.

As cepas foram isoladas adaptando-se o protocolo descrito por Paulitz e Schroeder (2005). Palitos de dente foram autoclavados e posteriormente inseridos em 200g de solos, dispostos em recipientes plásticos de polipropileno, identificados e incubados durante cinco dias a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Os Palitos colonizados durante o período de incubação foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura ágar-ágar com cloranfenicol (200

ppm). Após cinco dias, as colônias com características morfológicas típicas do gênero *Rhizoctonia* (Sneh *et al.*, 1991; 1996) foram repicadas e identificadas com o local de coleta e numeração sugerida para cada isolado em placas de Petri contendo meio BDA + cloranfenicol (200 ppm) e posteriormente incubadas também por cinco dias, a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.2. Morfologia de Colônias e Contagem de Núcleos

Os isolados foram analisados através de inspeção visual para a caracterização das colônias quanto à coloração de micélio, presença/ausência e disposição de escleródios, além do número de núcleos por célula analisada e contada em microscópio óptico. A caracterização morfológica dos isolados baseou-se nos critérios descritos por Sneh *et al.*, (1991; 1996).

Os procedimentos para visualização dos núcleos foram realizados através do preparo de microculturas. Fragmentos de micélio obtidos da periferia de colônias crescidas em placas de Petri contendo meio BDA a 25°C no escuro por 48 horas em estufa do tipo BOD, foram removidos e colocados individualmente na extremidade de cubos de BDA + cloranfenicol (200 ppm), com cerca de 0,5 cm, dispostos em lâminas de vidro esterilizada e colocadas dentro de placas petri fechadas com papel filme transparente. O conjunto foi incubado nas mesmas condições anteriormente e após o crescimento inicial das hifas na lamina de vidro, realizou-se a coloração dos núcleos com uma gota do corante “Safranina - O”, seguindo o protocolo descrito por Bandoni (1979) e foram cobertas com lamínulas de vidro. No microscópio óptico sob lente de 40x, foi contado o número de núcleos de células jovens de cada isolado, observando-se 10 células por lâmina e 10 lâminas para cada isolado.

4.3. Isolamento e Quantificação de DNA Genômico

Após o crescimento da cultura pura em placa de petri contendo meio BDA + cloranfenicol (200 ppm), cada isolado obtido foi inoculado em meio líquido PD (potato dextrose) para multiplicação de micélio. De cada placa de petri foram retirados três discos de 5 mm de diâmetro e posteriormente transferidos para erlenmeyers de 50 mL, contendo 30 mL do meio, e

em seguida colocados em agitador magnético a 180 rpm, 28°C por sete dias para a obtenção do micélio. Após crescimento em meio líquido, o micélio de cada isolado foi filtrado através de um funil de “Buchner” em papel filtro, após ser completamente filtrado o micélio foi enrolado em papel alumínio, submersos em nitrogênio líquido para congelamento, e em seguida acondicionado primeiramente em um saco plástico, depois em um saco de papel, de forma a garantir a segurança do processo de identificação. Após esse procedimento, as amostras congeladas foram armazenadas em congelador - 6° C, até serem utilizadas para a extração de DNA.

O micélio obtido foi macerado em almofariz com nitrogênio líquido até se tornar pó. Acrescentou-se ao micélio em pó 0,8 ml do tampão de extração de DNA (Tris-HCl 100mM, NaCl 1,4 M, 0,02% β -mercaptoetanol, e EDTA 5mM pH 8,0), pré-aquecido a 65°C em banho-maria (Lopes et al. 2012). A solução foi mantida aquecida a 65 °C em banho-maria, durante 30 minutos e então centrifugada a 3000 x g durante 10 minutos. Após a centrifugação, foi coletado o sobrenadante e acrescentado 0,4 ml de fenol equilibrado em tampão Tris-HCl, pH 8,0 e 0,4 ml de clorofórmio e álcool isoamílico (49:1) e centrifugado a 3000x g por 10 minutos. Novamente, 0,8 ml de clorofórmio e álcool isoamílico (49:1) foram adicionados ao sobrenadante coletado e em seguida as amostras foram mais uma vez centrifugada por 3000 x g, por 10 minutos. O sobrenadante foi passado a outro tubo, onde foram adicionados 0,8 ml de isopropanol e mais uma vez centrifugado a 3000 x g por 10 minutos. O pellet de DNA foi lavado em solução de etanol 70% (v/v) e centrifugado a 3000 x g por 5 minutos e ressuspenso em 50 μ L de Tris-Edta.

As amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose (1,0%) utilizando-se 1g de agarose para cada 100 mL de solução TAE (Tris Acetato Edta). Adicionou-se brometo de etídio (5 μ L) ao gel após o derretimento. As amostras aplicadas ao gel foram compostas de 5 μ L de DNA, 5 μ L água miliq e 3 μ L de tampão de carregamento. Após eletroforese (30 minutos) o gel foi analisado sob luz ultravioleta em um transluminador para avaliar a qualidade final do DNA (Figura 2). Constatou-se após a eletroforese que as amostras apresentaram grandes quantidades de RNA, o que pode impactar as reações de PCR. Assim, foram adicionados 5 μ L de RNase a cada amostra para uma nova eletroforese. Esse procedimento melhorou a qualidade do DNA extraído, como pode ser observado na Figura 3.

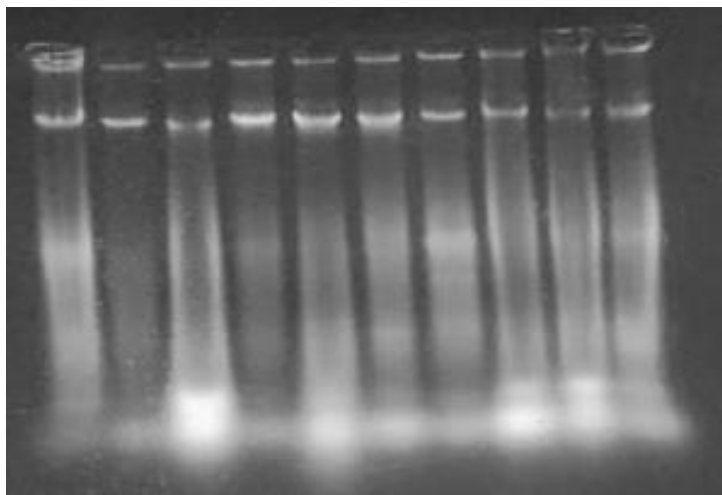


Figura 2. Gel de eletroforese contendo amostras de DNA extraídas de cepas fúngicas utilizadas neste estudo.

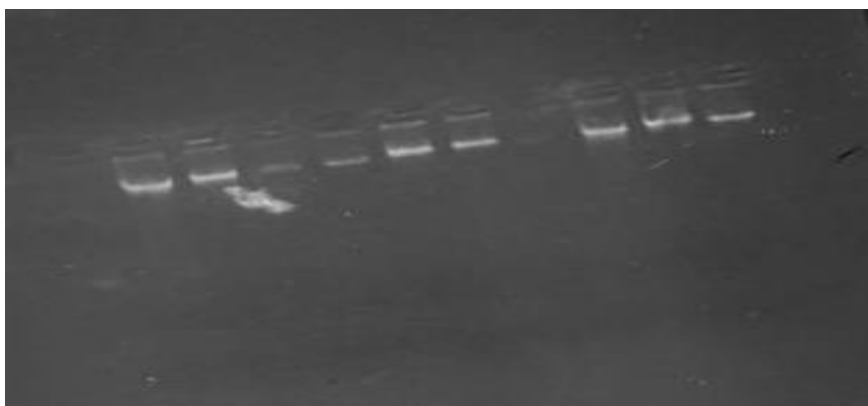


Figura 3. Gel de eletroforese após adição de RNase às amostras de DNA extraídas de cepas fúngicas utilizadas neste estudo.

4.4. Amplificação da Região ITS e Sequenciamento

A região ITS1-5.8S-ITS2 foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando a combinação dos primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') seguindo o protocolo descrito por White et al. (1990). Após amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2 % (Figura 4) e purificados utilizando o protocolo baseado em precipitação por Polietileno glicol (PEG) - 20% PEG, 2,5 M NaCl, 80% etanol e etanol puro. Os produtos da purificação foram usados na reação de sequenciamento utilizando DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing kit, da GE Healthcare®, de acordo com as instruções do fabricante e sequenciados na sede da Embrapa no Laboratório de Biotecnologia, utilizando sequenciador capilar ABI 3730 XL® (Applied Biosystems, Foster City, CA).

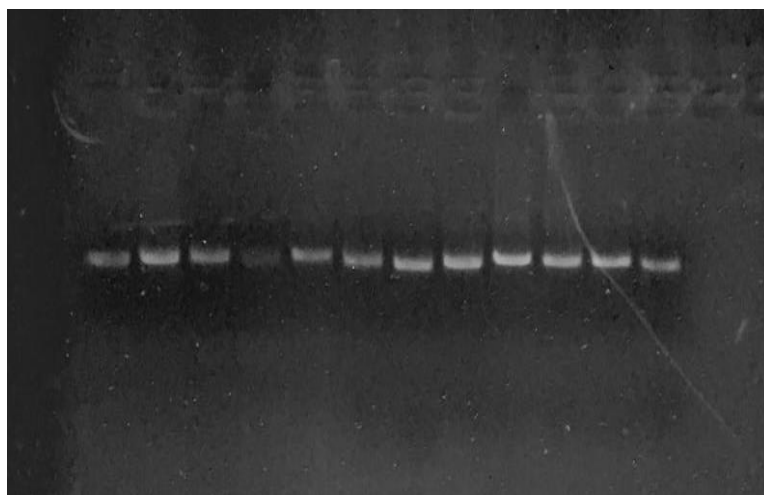


Figura 4. Gel de eletroforese contendo amostras de DNA amplificadas (ITS-rDNA) de fungos do gênero *Rhizoctonia* utilizadas neste estudo.

4.5. Identificação Molecular

As sequências obtidas foram tabuladas e então identificadas através do algoritmo *BLAST*, utilizando-se o banco de dados não redundante do NCBI, disponível em (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da Morfologia de Colônias

A coloração do micélio dos isolados avaliados no presente trabalho variou bastante entre os diferentes gêneros estudados. Em placa, isolados de *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) apresentou colônias de coloração que variavam entre o bege e o marrom escuro. Isolados de *Ceratobasidium* sp apresentaram-se brancos e também em diferentes tons de bege, com micélio de aspecto bastante pulverulento. A coloração dos isolados de *Waitea circinata* apresentou variação entre amarelo claro e laranja. Os padrões de coloração de micélio observados nos isolados estudados são compatíveis com descrições existentes na literatura para *Rhizoctonia* spp. (Sneh, 1991; Leiner; Carling *et al.*, 1994; Kammerer *et al.*, 2011; Muzhinji *et al.*, 2015).

A análise da condição nuclear dos isolados revelou que o número de núcleos por célula variou entre 2 a 7, encaixando-se portanto, dentro da amplitude de variação descrita por Meyer (2002) para o gênero *Rhizoctonia* de 3,9 a 16,8 núcleos por célula. Isolados identificados como *Waitea circinata* são todos multinucleados, tendo apresentado entre 4 e 6 núcleos por célula, com média de 4,9. Isolados identificados como *R. solani* (*Thanatephorus cucumeris*) também são multinucleados e apresentaram de 4 a 6 núcleos por célula, com média de 5,5. Isolados identificados como *Ceratobasidium* apresentaram-se multinucleados, com média de 4,8 núcleos por célula (Tabela 2).

A despeito de *Ceratobasidium* representar um grupo de espécies binucleadas, apenas o isolado CNPAF-201 apresentou dois núcleos por célula. Todos os demais isolados são multinucleados. Como discutido acima, espécies de *Ceratobasidium* são normalmente caracterizadas pela condição binucleada de suas células. Entretanto, tem se tornado relativamente comum encontrar relatos descrevendo isolados desse gênero com mais de dois núcleos por célula (Campos, 2006; Blanco *et al.*, 2018). Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de *Ceratobasidium* ser proximamente relacionado à *Thanatephorus*, cujas espécies possuem, caracteristicamente, células multinucleadas. Segundo Ceresine (2014), esses dois grupos podem ainda não ter passado por separação evolutiva completa. Análises filogenéticas utilizando a região

genômica ITS-rDNA demonstram que em muitas situações, isolados de ambos os gêneros agrupam-se no mesmo clado, evidenciando similaridades genéticas entre esses dois grupos (Blanco *et al.*, 2018; Gaino, *et al.* 2010; Nakatani, 2006). Lübeck (2004) cita trabalhos que descrevem a fusão entre hifas de isolados de *Ceratabosadium* e *Thanatephorus*, evidenciando que, de fato, esses gêneros ainda possuem relações genéticas que os aproximam.

Não foi possível determinar a condição nuclear de oito isolados (CNPAF-0063, CNPAF-0101, CNPAF-0125, CNPAF-0171, CNPAF-0204, CNPAF-0218, CNPAF-0268, CNPAF-0277). Em alguns isolados a má formação de suas hifas não permitiu a visualização dos septos que separam as células. Alguns outros ou não cresceram, ou cresceram contaminados. Em ambas situações, o procedimento para quantificação dos núcleos foi repetido diversas vezes, mas sem resultados satisfatórios.

A formação dos escleródios em placa foi observada entre uma e duas semanas após o início da incubação (25° C). A disposição destas estruturas em placa variou entre a periferia e o centro, por vezes apresentando-se dispersos. Também foi possível observar que os escleródios apresentaram variação na cor (branco, laranja, bege, marrom e preto), no tamanho (microescleródios e macroescleródios), na forma (regular, irregular, globoso e pulverulento) e em quantidade por placa. (Figuras 5, 6 e 7). O grande polimorfismo relacionado aos escleródios demonstra a variabilidade superlativa encontrada no gênero *Rhizoctonia* e o imenso potencial evolutivos de suas espécies. O alto grau de polimorfismo visualizado em escleródios analisados neste trabalho é semelhante ao que normalmente é encontrado em isolados de *Rhizoctonia*, descritos em uma grande quantidade de trabalhos (Godoy-lutz *et al.*, 2008; Mora-Umana, 2013; Toda *et al.*,2007)

5.2. Identificação Molecular

Todos os isolados estudados tiveram sua identidade confirmada a partir da análise da região ITS-rDNA (via algoritmo Blast) e pertencem ao gênero *Rhizoctonia*. A descrição morfológica dos isolados e a identificação molecular através do BLAST-NCBI estão apresentadas na (Tabela 2). Dos 47 isolados identificados, 23 (48,9%) pertencem a espécie anamorfa

Rhizoctonia solani, que se apresentou em seis diferentes AGs (AG1-1A, AG1-1B AG1-1D, AG1-1E, AG4-HG-I e AG4-HG-III). O grupo com maior destaque foi o AG4-HG1 com 12 isolados (25,5%), seguido por AG1-1E com 6 (12,8%) dos isolados trabalhados. As Figuras 5, 6 e 7 apresentam os isolados representando os Grupos de Anastomose identificados.



Figura 5. A – B, *Waitea circinata* (A: variedade *zeae*, B: var. *circinata*).

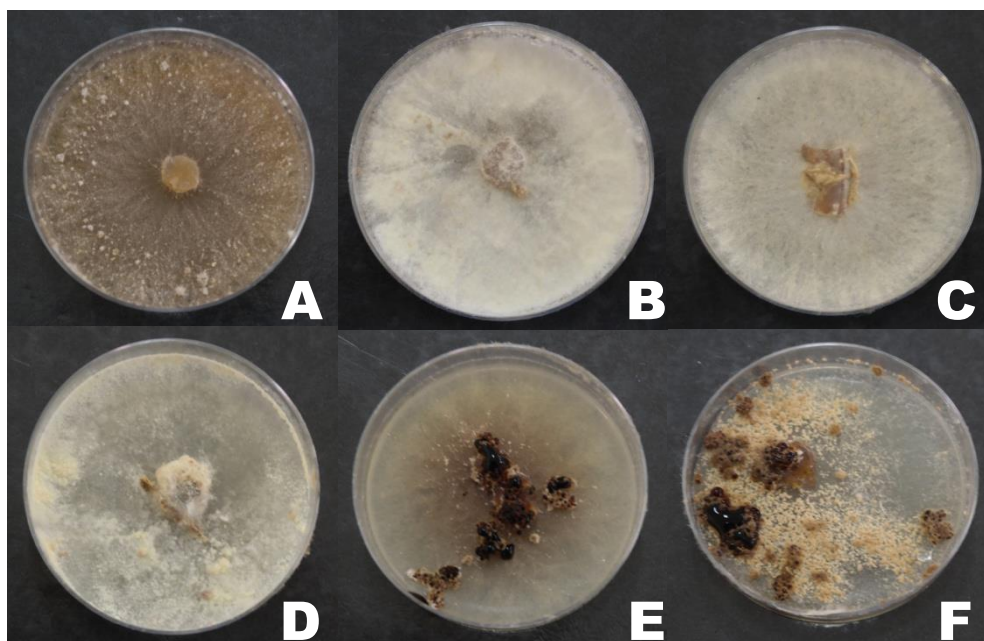


Figura 6. De A a F, *Rhizoctonia solani* (A: AG1-1A; B: AG1-1B; C: AG1-1D; D: AG1-1E; E: AG4-HGIII; F: AG4-HGI).

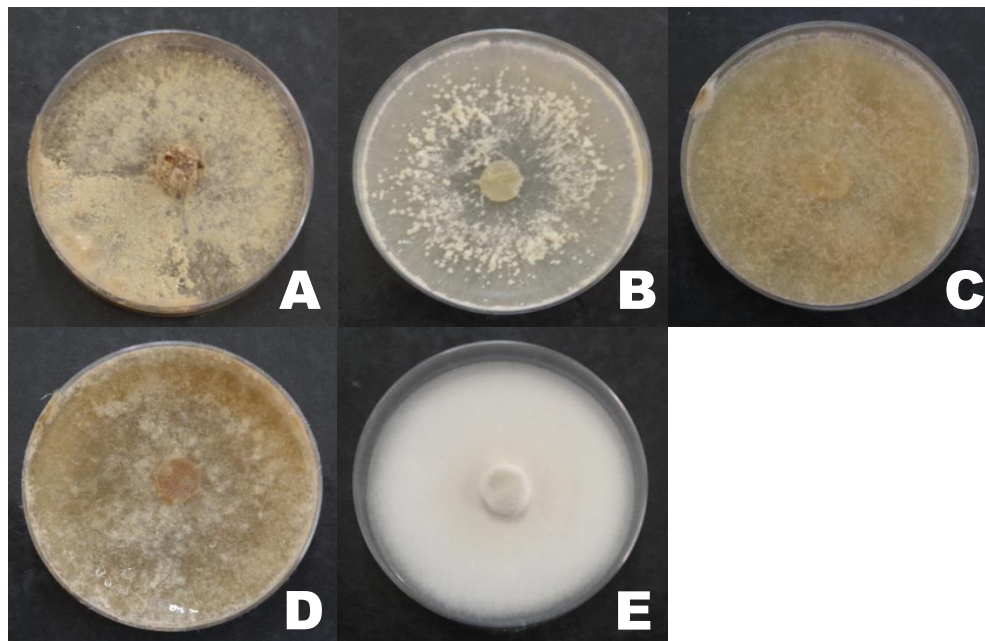


Figura 7. De A a E, *Ceratobasidium* sp. (A: AG-A; B: AG-B; C: AG-F; D: AG-P; E: AG-R).

Nas análises filogenéticas, (Figura 8) os agrupamentos formados entre as sequências dos isolados estudados e aquelas obtidas no NCBI confirmaram a identificação de quase todos os isolados, obtida através do algoritmo Blast. Em geral, os agrupamentos ocorreram entre isolados de um mesmo AG/variedade. Através dos resultados alcançados com a formação da árvore filogenética foi possível observar que a proximidade genética dos isolados pode estar sendo influenciada pela distância geográfica entre eles. Em muitos casos aparecem agrupamentos de isolados em estados que fazem divisa entre si, como Goiás com Minas Gerais, Goiás e Tocantins.

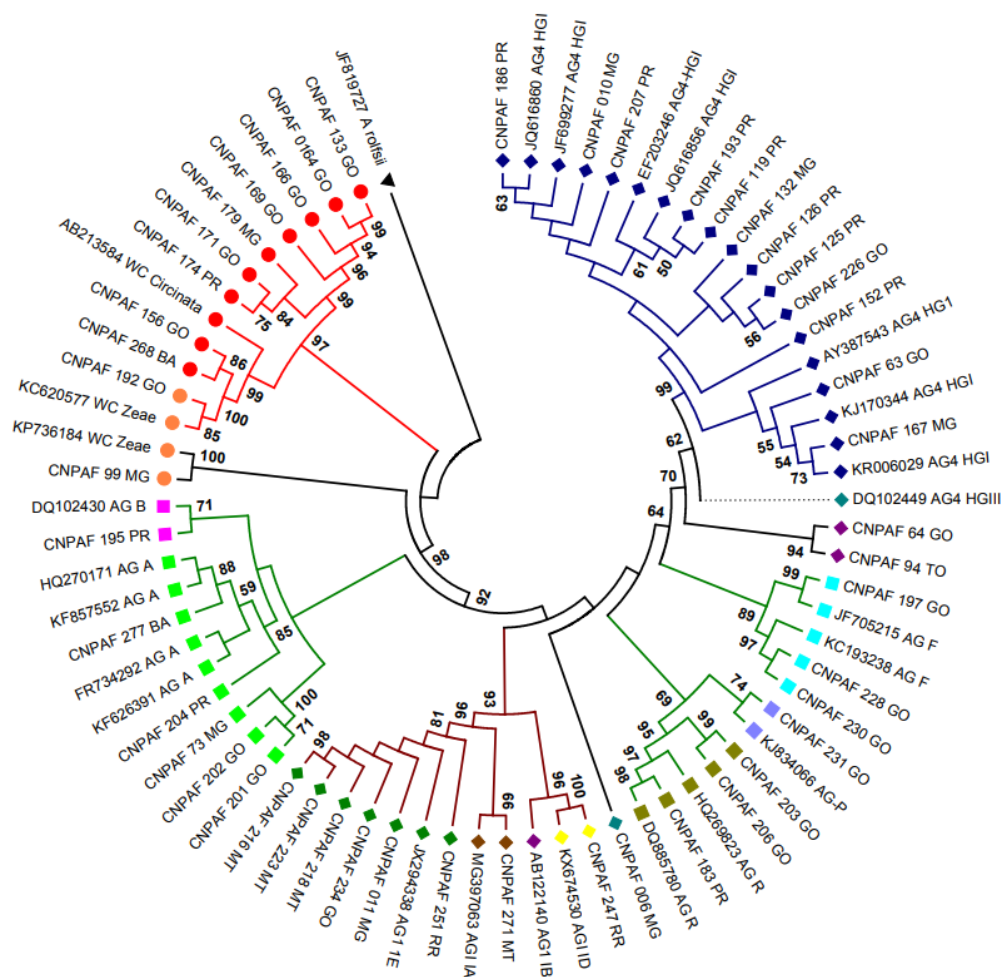


Figura 8. Árvore filogenética contendo as sequências dos isolados de *Rhizoctonia Solani*, *Ceratobasidium*, e *Waitea Circinata*, identificados neste trabalho. Os isolados representados pelas cores azul escuro: AG4-HG1; Em azul: HG4-HGIII; Em azul claro: AG-F; Em lilás: AG-P; Em amarelo mostarda: AG-R; Em amarelo: AG1-1D; Em roxo: AG1-1B; Em marrom: AG1-1A; Em verde escuro: AG1-1E; Em verde claro: AG-A; Em rosa: AG-B; Em laranjado: *Waitea circinata* var. *zae*; Em vermelho: *Waitea circinata* var. *circinata*;

Tabela 2. Relação de isolados utilizados com sua respectiva caracterização morfológica

Isolado	Identificação NCBI	Núcleos por célula	Coloração do micélio	Produção de escleródios
CNPAF-0006	<i>R. solani</i> - AG4-HGIII	4	Marrom claro	Periférica
CNPAF-0010	<i>R. solani</i> - AG4-HGI	6	Marrom	Ausente
CNPAF-0011	<i>R. solani</i> - AG1-IE	6	Marrom escuro	Disperso
CNPAF-0063	<i>R. solani</i> - AG4-HGI		Marrom escuro	Disperso
CNPAF-0064	<i>R. solani</i> - AG1-1B	4	Marrom	Central
CNPAF-0073	<i>Ceratobasidium</i> - AG-A	7	Branco	Ausente
CNPAF-0094	<i>R. solani</i> - AG1-1B	7	Marrom	Periférica
CNPAF-0099	<i>W. Circinata</i> - Zeae	5	Alaranjado	Ausentes
CNPAF- 0119	<i>R. solani</i> - AG4-HGI	6	Marrom	Ausentes
CNPAF-0125	<i>R. solani</i> - AG4-HGI		Marrom	Ausentes
CNPAF-0126	<i>R. solani</i> - AG4-HGI	6	Marrom	Ausentes
CNPAF-0132	<i>R. solani</i> - AG4-HGI	6	Marrom claro	Central
CNPAF-0133	<i>W. Circinata</i> - circinata	5	Alaranjado	Disperso
CNPAF-0152	<i>R. solani</i> - AG4-HGI	4	Marrom	Disperso
CNPAF-0156	<i>W. Circinata</i> - Zeae	5	Amarelo Claro	Ausentes
CNPAF-0164	<i>W. Circinata</i> - circinata	4	Alaranjado	Disperso
CNPAF-0166	<i>W. Circinata</i> - circinata	5	Alaranjado	Disperso
CNPAF-0167	<i>R. solani</i> - AG4-HGI	7	Amarelado	Disperso
CNPAF-0169	<i>W. Circinata</i> - circinata	6	Alaranjado	Ausentes
CNPAF-0171	<i>W. Circinata</i> - circinata		Alaranjado	Periférica
CNPAF-0174	<i>W. Circinata</i> - circinata	4	Alaranjado	Disperso
CNPAF-0179	<i>W. Circinata</i> - circinata	6	Amarelado	Disperso
CNPAF-0183	<i>Ceratobasidium</i> - AG-R	7	Marrom	Ausentes
CNPAF-0186	<i>R. solani</i> - AG 4 HG-I	6	Marrom	Ausentes
CNPAF-0192	<i>W. circinata</i> - Zeae	5	Amarelo Claro	Ausentes
CNPAF-0193	<i>R. solani</i> - AG 4 HG-I	5	Marrom	Periférica
CNPAF-0195	<i>Ceratobasidium</i> - AG-B	5	Marrom claro	Ausentes
CNPAF-0197	<i>Ceratobasidium</i> - AG-F	4	Branco	Ausentes
CNPAF-0201	<i>Ceratobasidium</i> - AG-A	2	Marrom claro	Ausentes
CNPAF-0202	<i>Ceratobasidium</i> - AG-A	6	Amarelo Claro	Ausentes
CNPAF-0203	<i>Ceratobasidium</i> - AG-R	6	Bege	Central

CNPAF-0204	<i>Ceratobasidium</i> - AG-A	*	Branco	Ausentes
CNPAF-0206	<i>Ceratobasidium</i> - AG-R	5	Bege	Ausentes
CNPAF-0207	<i>R. solani</i> - AG 4 HG-I	5	Marrom claro	Disperso
CNPAF-0216	<i>R. solani</i> - AG1-IE	6	Marrom claro	Disperso
CNPAF-0218	<i>R. solani</i> - AG1-IE	*	Marrom claro	Central
CNPAF-0223	<i>R. solani</i> - AG1-IE	4	Branco	Disperso
CNPAF-0226	<i>R. solani</i> - AG 4 HG-I	6	Marrom	Ausentes
CNPAF-0228	<i>Ceratobasidium</i> - AG-F	5	Marrom	Ausentes
CNPAF-230	<i>Ceratobasidium</i> - AG-F	6	Marrom	Ausentes
CNPAF-0231	<i>Ceratobasidium</i> - AG-P	5	Marrom	Ausentes
CNPAF-0234	<i>R. solani</i> - AG1-1E	5	Marrom claro	Disperso
CNPAF-0247	<i>R. solani</i> - AG1-1D	6	Marrom claro	Periférica
CNPAF-0251	<i>R. solani</i> - AG1-1E	4	Marrom claro	Central
CNPAF-0268	<i>W. circinata</i> - zae	*	Marrom claro	Ausentes
CNPAF-0271	<i>R. solani</i> – AG1-1E	*	Marrom claro	Disperso
CNPAF-0277	<i>Ceratobasidium</i> - AG-A	*	Marrom claro	Periférica

A maior parte dos isolados identificados como AGs de *R. solani* teve origem em amostras de solos coletados no estado do Paraná (30,4%), seguido por Minas Gerais (21,7%), Goiás (17,4%), e Mato Grosso (13,1%). Esses estados são grandes produtores de feijão (Brasil, 2015) e *R. solani*, um conhecido fitopatógeno do feijoeiro (Ceresine *et al.*, 1997; Nechet; Halfeld-Vieira, 2007). Isolados de AG1 e AG4 são a causa de sérias perdas de várias culturas, especialmente em feijão devido a doenças como podridão de raiz, tombamento, podridão de hipocótilo, da cápsula e dos frutos (ÇEBİ KILI.ÖĞLU e ÖZKOÇ, 2010).

Também foram identificados isolados de *R. solani* em amostras provenientes da Bahia, Roraima e Tocantins, que também são estados produtores de feijão. Assim como discutido por Blanco *et al.*, (2018), parece existir uma correlação entre a distribuição de espécies e AGs de *Rhizoctonia* e o tipo de cultura adotado nas diferentes regiões agrícolas brasileiras. Além disso, esses autores também discutiram a possibilidade de haver uma estratificação na distribuição latitudinal de AG1 e AG4 no território brasileiro. No presente trabalho esta observação foi

corroborada, tendo-se observado a predominância de isolados de AG4 em solos coletados mais ao Sul do país, enquanto isolados de AG1 foram predominantes em solos coletados mais ao Norte do Brasil (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição dos isolados amostrados nas regiões agrícolas do Brasil por estado e por grupo de anastomose/variedade

Gênero	AG/var.	ORIGEM							Nº de isolados		Frequência (%)	
									AG/var.	Gênero	AG/var.	Gênero
		BA	GO	MG	MT	PR	RR	TO				
<i>Waitea circinata</i>	var. <i>zeae</i>	1	2	1					4	11	8,5	23,4
	var. <i>circinata</i>		5	1		1			7		14,9	
<i>Ceratobasidium</i>	AG-A	1	2	1		1			5	13	10,6	27,6
	AG-P		1						1		2,1	
	AG-R		2			1			3		6,4	
	AG-B					1			1		2,1	
	AG-F		3						3		6,4	
<i>Rhizoctonia solani</i>	AG1-1A	1							1	23	2,1	48,9
	AG1-1B		1					1	2		4,3	
	AG1-1D						1		1		2,1	
	AG1-1E		1	1	3		1		6		12,8	
	AG4-HGI		2	3		7			12		25,5	
	AG4-HGIII			1					1		2,1	
TOTAL		3	19	8	3	11	2	1	47	47	100	100

Isolados de AG4 (AG4-HG-I e AG4-HG-III) já foram relacionados ao tombamento de plântulas e a mela do algodoeiro. Estudos sobre a ocorrência deste patógeno se deu principalmente nas regiões dos cerrados dos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas

Gerais, Goiás e Bahia, que confere a quatro dos estados amostrados neste trabalho (Goulart, *et al.*, 2011). Outro estudo cita novamente o grupo AG-4, atacando várias culturas de grande importância na economia agrícola do país, causando perdas significativas à soja, ao amendoim, ao feijão, ocorrendo também em hortaliças como batata, tomate, brócolis, espinafre, e frutas como, por exemplo, o melão (Silva-Barreto, *et al.*, 2010).

O gênero *Waitea circinata* representou 11 (23,4%) do total de isolados, (*Waitea circinata* var. *zeae* - (8,5%) e *Waitea Circinata* var. *circinata* – (14,9%). Mais de 90% destes isolados (Tabela 3) foram provenientes de amostras de solo coletadas em estados que estão entre os cinco maiores produtores nacionais de milho: Goiás, Minas Gerais e Paraná (Brasil, 2015). Plantas da família das gramíneas, a qual pertence o milho, são descritas como hospedeiras de variedades de fungos do gênero *Waitea* (Burpee e Martin, 1992).

Blanco *et al.*, (2018) também identificaram fungos *Waitea* em áreas de produção de milho no Brasil e Poltronieri *et al.*, (2002), fizeram o primeiro relato sobre o ataque desses microrganismos à plantas de milho no país. De forma semelhante ao que acontece com isolados de *R. solani*, parece existir uma estreita relação entre a distribuição geográfica desses fungos em território nacional e o tipo de cultura estabelecido nos locais amostrados.

As doenças causadas por estes patógenos ocorrem mais frequentemente durante o clima quente e úmido, a temperaturas entre 28° C e 36° C, incitando ponto de queima da folha e da bainha (Fiky, *et al.*, 2011), temperaturas estas muito frequentes no estado de Goiás, região com maior quantidade de isolados amostrados. Apesar disso, esses fungos já foram identificados em países de diferentes condições climáticas (Demirci, 1998; Gutiérrez *et al.*, 2007; Li *et al.*, 1998; Telmadarrehei *et al.*, 2011).

O gênero *Ceratobasidium* representou 27,6% dos isolados amostrados, com os seguintes grupos de anastomose identificados: AG-A (10,6%), AG-F e AG-R (ambos - 6,4%) e AG-B e AG-P (ambos – 2,1 %). Dos cinco grupos de anastomose identificados neste trabalho, quatro deles estão diretamente relacionados às doenças causadas no feijoeiro comum são eles: AG-A, AG-F, AG-P e AG-R, somente o grupo AG-F se apresenta indiretamente ligado a esta cultura (Blanco, 2016). Todos os estados em que AGs de *Ceratobasidium* foram identificados são

grandes produtores de feijão, Goiás, Paraná, Minas Gerais, e Bahia, com uma receita bruta total para o feijão-carioca nas safras 2017/2018 de R\$ 2,08 bilhões (Mapa, 2018). Uma pesquisa do Sistema Faeg (2018) estimou que só esse ano fosse produzido um total de 21,67 milhões de toneladas de grãos só no estado de Goiás, e cerca de 60% dos isolados amostrados neste trabalho se concentraram neste estado.

De acordo com estudos de Souza, *et al.*, (2009), AGs de *Ceratobasidium* foram identificados afetando uma ampla variedade de culturas no mundo todo. Há relatos de doenças causadas por este patógeno em vários países da América como Argentina, Colômbia, Guianas, Venezuela, no Brasil, e outros países da América central, como também no México e EUA.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados alcançados neste estudo foi possível agrupar os isolados de *Rhizoctonia*, através da análise de sequência da região ITS, identificando seus específicos grupos de anastomose, e sua diversidade pelas regiões agrícolas do Brasil.

Foi possível observar também que os métodos aqui utilizados para identificação e caracterização com base na variabilidade genética de *R. solani*, como as características morfológicas e moleculares são eficazes quando utilizados para diferenciação fisiológica do fungo.

Considerando a importância deste grupo de fitopatógenos, bem como as perdas econômicas por eles impostas, é possível desde já utilizar as informações obtidas para orientar e contribuir com as estratégias de manejo adequadas e específicas, nas áreas em que cada AG ou variedade foram identificadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bandoni, R. J. Safranin O as a rapid nuclear stain for fungi. **Mycologia** 71:873- 501 874. 1979.

Basseto, Marco Antonio., Filho, Walter Veriano valério., Souza, Elaine Costa., Ceresini, Paulo Cezar.2008. O papel de *Rhizoctonia* spp. binucleadas na indução de resistência a mela da soja. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 2, p. 183-189.

Blanco, Angel José Vieira. **Identificação molecular e caracterização de isolados de fungos do gênero *Rhizoctonia* recuperados do cerrado agrícola do Brasil**. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016. Disponível em:<[https://pos.icb.ufg.br/up/101/o/Angel_Blanco_2016_tese_\(1\).pdf](https://pos.icb.ufg.br/up/101/o/Angel_Blanco_2016_tese_(1).pdf)>. Acesso em 18 out.2018.

Blanco, Angel José Vieira., Costa, Marília Oliveira., Silva, Roberto Nascimento., Albuquerque, Fábio Suzart de., Melo, Arthur Tavares de Oliveira., Lopes, Fabyano Alvares Cardoso., Steindorff Andrei Stecca., Ulhoa, Cirano José., Lobo-Junior, Murilo. Diversity and pathogenicity of *Rhizoctonia* species from brazilian cerrado. Diversity and Pathogenicity of *Rhizoctonia* Species from the Brazilian Cerrado. **Plant Disease**. 102: 773-781.2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do agronegócio: Brasil 2014/15 a 20124/25**: projeções de longo prazo. 6. ed. Brasília: AGE/Mapa, 2015. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/PROJECOES_DO_AGRONEGOCIO_2025_WEB.pdf>. Acesso em 15 jun. 2016.

Burpee, L., Martin, B. 1992. Biology of *Rhizoctonia* Species Associated with Turfgrasses. **Plant disease** 76 : 112-117.

Campos, Ana Paula da Silva de. **A complexa etiologia da mancha areolada de *Thanatephorus* sp. e/ou *Ceratobasidium* sp. em espécies cultivadas ou nativas da Amazônia**. Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”. Ilha Solteira, São Paulo, 2006. Disponível em:<<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/98850?locale-attribute=en>>. Acesso em 18 out. 2018.

Carling, D. E., Baird, R. E., Gitaitis, R. D., Brainard, K. A., Kuniaga, S. 2002. Characterization of AG-13, a Newly Reported Anastomosis Group of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology** 92: 893-899.

Carling, D. E., Kuniaga, S., Brainard, K. A. 2002. Hyphal Anastomosis Reactions, rDNA-Internal Transcribed Spacer Sequences, and Virulence Levels Among Subsets of *Rhizoctonia solani* Anastomosis Group-2 (AG-2) and AG-BI. **Phytopathology**, 92, 1: 43-50.

Castro, Carla Vanessa Borges. **Caracterização Morfológica e Molecular de isolados de *Rhizoctonia solani* Kuhn**. Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007. Disponível

em:< <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/61106/1/carla-castro.pdf>>. Acesso em: 23 set. 2018.

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

Ceresini, P. C., Gaino, A. P. S. C., Basseto, M. A., Gasparotto, L., Poltronieri, L. S 2010. Inferência filogenética revela a complexa etiologia das manchas areolada e foliar em seringueira e em outras espécies cultivadas na Amazônia. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 32, 3: 385-395.

Ceresini, P. C. 2014. *Rhizoctonia* como fitopatógeno: biologia e diversidade de *Rhizoctonia solani* em agroecossistemas tropicais e perspectivas do manejo da *rhizoctoniose* usando resistência de plantas. Pages 177 – 190 in: **Sanidade de Raízes**. 1ed. NEFIT – Núcleo de Estudos em Fitopatologia, São Carlos, SP.

Chaijuckam, P., Davis, R. M. 2010. Characterization of Diversity Among Isolates of *Rhizoctonia oryzae-sativae* from California Rice Fields. **Plant Disease** 946: 690-696.

Ciampi, M. B., Kuramae, E. E., Fenille., R. C. Meyer, M. C., Souza, N. L., Ceresini, P. C. 2005. Intraspecific Evolution of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA Associated with Soybean and Rice in Brazil based on Polymorphisms at the ITS-5.8S rDNA Operon. **European Journal of Plant Pathology**, 1132: 183-196.

Çebi Kılıçoğlu, M., Özkoç, İ. 2010. **Molecular characterization of *Rhizoctonia solani* AG4 using PCR-RFLP of the rDNA-ITS region**. Turk. J. Biol, 34: 261–269.

Demirci, E. 1998. *Rhizoctonia* species and anastomosis groups isolated from 574 barley and wheat in Erzurum, Turkey. **Plant Pathology**, 47, 1: 10-15.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de identificação de doenças de soja**. Londrina, Paraná, 2005.

Erper, I. Karaca, G. H. Turkkan, M.; Ozkoc, I. 2006. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. from onion in Amasya, Turkey. **Journal of Phytopathology**, 154: 75-79.

de la Cerda, K. A., Douhan, G. W., and Wong, F. P. 2007. Discovery and characterization of *Waitea circinata* var. *circinata* affecting annual bluegrass from the western United States. **Plant Disease**, 91:791-797.

Faeg, Sistema. **Goiás deve produzir 21,67 milhões de toneladas de grãos na safra 2017-18**. Disponível em:< <http://sistemafaeg.com.br/faeg/noticias/noticias/goias-deve-produzir-21-67-milhoes-de-toneladas-de-graos-na-safra-2017-18>>.

Fenille, R. C., Kuramae, E. E., Souza, N. L. 2003. Identification of *Rhizoctonia solani* Associated

with Soybean in Brazil by rDNA-ITS Sequences. **Fitopatologia Brasileira**, 28, 4: 413-419.

Fenille, Roseli., Souza, Nilton Luiz de. **Efeitos de materiais orgânicos e da umidade do solo na patogenicidade ao feijoeiro**. Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, v.34, n.10, p.1959-1967, out. 1999.

Fiky, Z. el., Fouly, H., Martin, B.2011.Genetic diversity of *Waitea circinata* var. *zeae* in south Carolina revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Egyptian Journal of Genetics and Cytology**, 40: 145-159.

Gaino, Ana Paula da Silva de Campo., Basseto Marco Antonio., Gasparotto, Luadir., Poltronieri, Luiz Sebastião., Ceresini, Paulo Cezar. Inferência filogenética revela a complexa etiologia das manchas areolada e foliar em seringueira e em outras espécies cultivadas na Amazônia. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 3, p. 385-395, 2010.

Godoy – Lutz, G., Steadman, J. R., Higgins, B., Powers, K. 2003. Genetic Variation Among Isolates of the Web Blight Pathogen of common bean. **Plant Disease**, 87, 7: 766-771.

Godoy-Lutz, G., Kuninaga, S., Steadman, J. R., Powers, K. 2008. Phylogenetic analysis of *Rhizoctonia solani* subgroups associated with web blight symptoms on common bean based on ITS-5.8S rDNA. **Journal of General Plant Pathology**, 615 74: 32–40.

González, M. D. 2013. Identification, molecular characterization, and evolution of group I introns at the expansion segment D11 of 28S rDNA in *Rhizoctonia* species. **Fungal Biology** 117: 623-637.

Gonzalez, M. D., Cubeta, M. A., Vilgalys, R. 2006. Phylogenetic utility of indels within ribosomal DNA and beta-tubulin sequences from fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex. **Molecular Phylogenetic Evolution**, 40, 2: 459-470.

González-García, V., Portal-Onco, M. A., Rubio-Susan, V. 2006. Review: **Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia***. Span. J. Agric. Res. 4: 55-79.

Goulart, Augusto César Pereira., Assis, Joana Bernardes de., Ciampi Maisa Boff., Ceresini Paulo Cezar. Ocorrência de mela causada por *Rhizoctonia solani* AG4-HGI em plântulas de algodoeiro no Brasil. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 37, n. 1, p. 68-69, 2011.

Gutiérrez, S. A., Cúndom, M. A., Barrera, V., Gasoni, L. 2007. First record of *Rhizoctonia Zeae* on corn in Argentina. Australasian, **Plant Disease**, Notes, 2: 653 137-138.

Hall, T. 2014. **BioEdit v7.0.9**: Biological sequence alignment editor for Win95/98/2K/XP/7. Disponível em: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>. Acesso em: Agosto de 2018.

Kammerer, S. J., Burpee, L. L., Harmon, P. F. 2011. Identification of a New *Waitea circinata* Variety Causing Basal Leaf Blight of Seashore Paspalum. **Plant Disease**, 95, 5: 515-522.

Kuninaga, S., Carling, D. E., Takeuchi, T., Yokosawa, R. 2000. Comparison of rDNA-ITS Sequences between Potato and Tobacco Strains in *Rhizoctonia solani* AG-3. **Journal of General Plant Pathology**, 66: 2-11.

Kuznia, R. A.; Windels, C. E. 1994. *Rhizoctonia zeae* pathogenic to spring wheat 689 and sugar beet seedlings. **Phytopathology**, 84: 1159.

Leiner, R. H., Carling, D. E. 1994. Characterization of *Waitea circinata* (*Rhizoctonia*) isolated from agricultural soils in Alaska. *Plant Disease*, 78: 385-388.

Li, H. R., Wu, B. C., Yan, S. Q. 1998. Aetiology of *Rhizoctonia* in sheath blight of maize in Sichuan. **Plant Pathology**, 47: 16-21.

Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Geraldine, A. M. Brandão, R. S., Monteiro, V. 706 N., Lobo-Junior, M., Coelho, A. S. G., Ulhoa, C. J., Silva, R. N. 2012. Biochemical 707 and metabolic profiles of Trichoderma strains isolated from common bean 708 crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against Sclerotinia 709 sclerotiorum. **Fungal Biology**, 116: 815-824.

Lübeck, M. 2004. Molecular Characterization of *Rhizoctonia*. *Applied Mycology 712 & Biotechnology*, 4. **Fungal Genomes**, 205-224.

Mapa, Ministério Da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Monitoramento agrícola, 2018. Disponível em :<
<http://www.agricultura.gov.br/noticias/safra-de-graos-podera-atingir-227-9-milhoes-de-toneladas-em-2017-2018/AcompanhamentodaSafraBrasileiradeGros4Levantamento20172018.pdf>>. Acesso em: 1 dez. 2018.

Martins, Pâmela Ponce. **Identificação filogenética do complexo *Rhizoctonia solani* em coentro**. Universidade Federal do Piauí, Teresina 2018. Disponível em:<
[http://leg.ufpi.br/subsiteFiles/ppgm/arquivos/files/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20P%C3%A2mela\(1\).pdf](http://leg.ufpi.br/subsiteFiles/ppgm/arquivos/files/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20P%C3%A2mela(1).pdf)>. Acesso em: 18 out. 2018.

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.

Medeiros, A.C.; Melo, D.R.M.; Ambrósio, M.M.Q.; Nunes, G.H.S.; Costa, J.M.. Métodos de inoculação de *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina* em meloeiro (*Cucumis melo*). **Summa Phytopathologica**, v.41, n.4, p.281-286, 2015.

Meyer, Maurício Conrado. **Caracterização de *Rhizoctonia solani* Kuhn, agente causal da mela da soja [*Glycine max* (L.) MERRILL], seleção de genótipos e controle químico**.

Universidade Estadual Paulista paulista “Júlio Mesquita Filho”. Bocatú, São Paulo, 2002.
Disponível em:< <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/105446>>. Acesso em: 23 out. 2018.

Mora-Umaña, F., Barboza, N., Alvarado, R., Vásquez, M., Godoy-Lutz, G., Steadman, J.R., Ramírez, P. 2013. Virulence and Molecular Characterization of Costa Rican Isolates of *Rhizoctonia solani* from Common Bean. **Tropical Plant Pathology**, 38: 461-471.

Muzhinji, N., Truter, M., Woodhall, J. W., van der Waals, J. E. 2015. Anastomosis Groups and Pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and Binucleate *Rhizoctonia* from Potato in South Africa. **Plant Disease**, 99, 12: 1790 – 1802.

Natakani, Andreia Kazumi. **Diversidade genética de *Rhizoctonia* spp. e a análise de sequências multilocos**. Universidade Estadual paulista “Júlio Mesquita Filho”. Bocatú, São Paulo, 2006. Disponível em:< <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/105389>> Acesso em: 23 out. 2018.

NECHET, K.L. & HALFELD-VIEIRA, B.A. Caracterização de Isolados de *Rhizoctonia* spp., Associados à Mela do Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata*), Coletados em Roraima. **Fitopatologia Brasileira** 31:505-508. 2006.

NECHET, K.L. & HALFELD-VIEIRA, B.A. Reação de cultivares de feijão-caupi à mela (*Rhizoctonia solani*) em Roraima. **Fitopatologia Brasileira** 32:424-428. 2007.

Paulitz, T. C., Schroeder, K. L. 2005. A New Method for the Quantification of *Rhizoctonia Solani* and *R. oryzae* from Soil. **Plant Disease**, 89, 7: 767-772.

Poltronieri, L. S., Trindade, D. R., Albuquerque, F. C. 2002. *Rhizoctonia zeae* Causando Podridão em Milho no Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, 27, 4: 423-423

Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. **Annual Review of Phytopathology** 25, 1: 125-143.

Ogoshi, A., Cook, R. J., Bassett, E. N. 1990. *Rhizoctonia* species and anastomosis groups causing root rot of wheat and barley in the Pacific Northwest. **Phytopathology**, 80: 784-788.

Otero, J. T., Ackerman, J. D., Bayman, P. 2002. Diversity and Host Specificity of Endophytic. **American Journal of Botany** 89, 11: 1852–1858.

Roberts, P. 1999. ***Rhizoctonia-forming Fungi. A Taxonomic Guide***. Royal Botanic Gardens, Kew, London, UK.

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

- Sartorato, Aloísio., Nechet, Kátia L., Halfeld-Vieira, Bernardo A. 2006. Diversidade Genética de Isolados de *Rhizoctonia solani* coletados em Feijão-caupi no Estado de Roraima. **Fitopatologia Brasileira** 31:297-301.
- Sharon, M., Sneh, B., Kuninaga, S., Hyakumachi, M. 2006. The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp. using molecular and biotechnological methods compared with the classical anastomosis grouping. **Mycoscience**, 47: 299-316.
- Sharon, M., Sneh, B., Kuninaga, S., Hyakumachi, M., Naito, S. 2008. Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. **Mycoscience**, 49, 2: 93-114.
- Silva-Barreto, F.A.S.; Pereira, W.V.; Ciampi, M.B.; Câmara, M.P.S.; Ceresini, P.C.. Associação de *Rhizoctonia solani* Grupo de Anastomose 4 (AG-4 HGI e HGIII) à espécies de plantas invasoras de área de cultivo de batata. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.145-154, 2010.
- Sneh B., Burpee L., Ogoshi, A. 1991. **Identification of *Rhizoctonia* species**. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Sneh, B., Jjabi-Hare, S., Neate, S., and diijst, G., eds. 1996. ***Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control**. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Souza, E.C.; Basseto, M.A.; Boliani, A.C.; Takada, H.M.; Ceresini, P.C.. Patogenicidade cruzada de *Ceratobasidium* spp. do caqui (Diospyros kaki) e do chá (*Camellia sinensis*) e reação de cultivares de caqui ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.1, p.09-14, 2009.
- Silva, Renato Borelli. **Biologia de *Ceratobasidium* spp. associada à doença queima dos fios no chá (*Camellia sinensis* L.)**. Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”. Bocatú, São Paulo, 2013. Disponível em: < <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/97228> >. Acesso em: 23 out. 2018.
- STALPERS, J.A.; ANDERSEN, T.F. & GAMS, W. **Two proposals to conserve the names *Rhizoctonia* and *R. solani* (*Hyphomycetes*)**. *Taxon*, 47:725-726, 1998.
- Summer, D. R., Minton, N. A. 1989. Crop Losses in Corn Induced by *Rhizoctonia solani* AG-2-2 and Nematodes. **Phytopathology**, 79: 934-931.
- Pereira, Olinto Liparini., Kasuya, Maria Catarina Megumi., Rollemberg, Christtianno de Lima., & Chaer, Guilherme Montandon. Isolamento e Identificação de fungos micorrízicos rizoctonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 29:191-197, 2005.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski., A., Kumar, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis, Version 6.0. **Molecular Biology Evolution**, 30, 12: 2725-2729, 2013.

Telmadarrehei, T., Tajick Ghanbary, M. A., Rahimian, H., Rezazadeh, A., Javadi, M. A. 2011. Isolation and some pathologic properties of *Rhizoctonia zeae* from cultural soils of Golestan and Mazandaran Provinces, Iran. **World Applied Sciences Journal**, 14, 3: 374-377.

Thompson, J. D., Gibson T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins. D. G. 1997. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, 25: 4876-4882.

Toda, Takeshi., Hayakawa, Toshihiro., Mghalu, Joseph Mwafaida., Yaguchi, Shigeharu., Hyakumachi, Mitsuro. 2007. A new *Rhizoctonia* sp. closely related to *Waitea circinata* causes a new disease of creeping bentgrass. **Fungal diseases**, 73:379–387.

Vilgalys, R., Cubeta, M. A. 1994. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*, **Annual Review of Phytopathology**, 32: 135-155.

White, T. J., Bruns, S. Lee., Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. **Academic Press**, Inc., New York.