



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE
***Rhizoctonia solani* Kuhn.**

CARLA VANESSA BORGES CASTRO

Belém-PA
2007



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Rhizoctonia solani Kuhn.**

CARLA VANESSA BORGES CASTRO

Dissertação, apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Biologia Vegetal Tropical, para obtenção do título de **Mestre**.

Orientador: **Prof^o Dr. Vicente Savonitti Miranda**

Co-Orientadores: **Ms. Luis Sebastião Poltronieri**

Prof^o Dr. Paulo Sérgio Torres Brioso

Belém-PA
2007

Castro, Carla Vanessa Borges Castro

Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Rhizoctonia solani* Kuhn / Carla Vanessa Borges Castro. – Belém, 2007.

67 f: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007.

1. *Rhizoctonia solani* 2. Caracterização Morfológica 3. Variabilidade Genética 4. Marcadores RAPD I. Título

CDD- 589.22



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Rhizoctonia solani Kuhn.**

CARLA VANESSA BORGES CASTRO

Dissertação, apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Biologia Vegetal Tropical, para obtenção do título de **Mestre**.

Aprovada em 13 de abril de 2007.

BANCA EXAMINADORA:

**Biólogo Prof^o. Dr. Vicente Savonitti Miranda
(Orientador)
Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA)**

**Eng^o Agrônomo Msc. Luiz Sebastião Poltronirei
(Co-Orientador)
Embrapa Amazônia Oriental**

**Eng^o Agrônomo Prof^o. Dr. Paulo Sérgio Torres Brioso
(Co-Orientador)
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)**

**Eng^o. Agrônomo Dr. Rafael Moysés Alves
Embrapa Amazônia Oriental**

**Eng^o. Agrônomo PhD. Cléber Novais Bastos
CEPLAC/ ERJOH**

**Eng^o. Agrônomo Reitor Dr. Marco Aurélio Leite Nunes
Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA)**

Agradeço a Deus, pela vida.

Aos meus pais **Sandra Borges Castro** e **Josafá Elias Castro**, os grandes responsáveis pela minha formação, pelo amor e carinho constantes, pela alegria, compreensão e incentivo durante toda a minha vida.

DEDICO

A minha irmã **Rúbia Castro**, ao meu querido filho que amo muito, **Cauê Vinícius Castro Leite**, pelo apoio, carinho, amor e torcida para o meu sucesso.

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho e de forma especial:

À **Deus**, pela vida e por nos conceder esta oportunidade de avanço, possibilitando o nosso aprimoramento profissional.

À Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), pela oportunidade da realização do curso.

À Embrapa Amazônia Oriental e Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela estrutura e oportunidade concedida na obtenção de novos conhecimentos.

A CAPES pelo auxílio financeiro, mediante a concessão de bolsa de Mestrado.

Ao Professor Dr. **Vicente Savonitti Miranda**, pela orientação, por ter me apoiado nos momentos mais difíceis, pela confiança e pela valiosa amizade.

Ao Professor **Dr. Paulo Sérgio Torres Brioso**, pelo apoio indispensável no desenvolvimento desta dissertação, pela atenção e paciência constantes e a quem tenho profundo agradecimento e admiração.

Ao Ms. **Luiz Sebastião Poltronieri**, pelas sugestões, apoio e ensinamentos, pelo exemplo profissional.

Ao Reitor Dr. Marco Aurélio Leite Nunes (UFRA), ao Dr. Cléber Novais Bastos (CEPLAC), Dr. Rafael Moysés Alves (EMBRAPA) e ao Dr. Paulo Sérgio Albuquerque (CEPLAC), pelas valiosas considerações feitas nesta dissertação.

Ao Coordenador do curso de Mestrado em Agronomia da UFRA, Professor Dr. Antonio Rodrigues Fernandes pela sincera dedicação ao curso.

A todos os professores do curso de Pós-graduação da UFRA, pelos valiosos ensinamentos.

A Enia Carvalho, pelo otimismo e ensinamentos em todas as etapas conduzidas no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

A pesquisadora, da Embrapa Amazônia Oriental, Dra. Socorro Padilha, pelo fornecimento dos dados sobre Genética Molecular.

Aos grandes amigos Fernanda Moura, Nadilma Liberato e, em especial Jessivaldo Galvão pela valiosa amizade, carinho, incentivos dados nos momentos difíceis e valiosas sugestões e sempre será um amigo importante.

A minha grande amiga de curso Iulla Naiff, pelos incentivos, apoio nos momentos difíceis e pela agradável convivência na Embrapa Amazônia Oriental.

iii
À D. Regina Gomes, ex-secretária do curso de Pós-graduação em Agronomia pelo pronto atendimento e incentivos.

Aos técnicos do Laboratório da Embrapa Amazônia Oriental, em especial a D. Carmem Costeira, Raimundo Nonato e José Souza, pelo apoio, auxílio e dedicação.

Aos meus amigos estagiários, bolsistas do Laboratório de Fitopatologia e Genética molecular da EMBRAPA: Ana Carla, Tatiana, Davi e Isaías, pelo companheirismo e alegrias compartilhadas que resultaram num reforço de nossa amizade.

Em especial, grande amiga de Laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental, Sivaney Ferreira que esteve ao meu lado, principalmente nas interpretações de resultados e pela valiosa amizade.

A todos os colegas de curso, pela troca de experiência e momentos de descontração.

À minha mãe, minha irmã e Amanda pela acolhida e por terem sido mãe de meu filho Cauê Vinícius nas horas que não pude estar presente.

À minhas tias e primas: Aninha, Suely, Solange, Dayanna e Danielle, pelos grandes incentivos e apoio. E ao meu afilhado Ryan pelo carinho.

A todos que contribuíram, direta e indiretamente, para realização deste trabalho.

“Em ti, SENHOR, confio; nunca me deixes confundido. Livra-me pela tua justiça”.

SL 31:1

BIOGRAFIA DO AUTOR

Carla Vanessa Borges Castro, filha de Josafá Elias Castro e Sandra Borges Castro, nascida na cidade de Belém, estado do Pará no dia 18 de Julho de 1980.

No ano de 2004, recebeu o diploma de Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal Rural da Amazônia.

Em 2005, iniciou o curso de pós-graduação em nível de Mestrado em Agronomia, área de concentração Biologia Vegetal Tropical para obtenção do título de Mestre.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1- INTRODUÇÃO	17
2- REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 - <i>Rhizoctonia</i> spp.	19
2.2 – Sintomatologia	22
2.2.1 – Queima de folhas	22
2.2.2 – Podridões de Estacas	22
2.2.3 – Tombamento de mudas	22
2.3- Caracterizações da doença em algumas culturas	23
2.3.1- Pimenta do Reino	23
2.3.2- Amendoim	23
2.3.3- Gramíneas	24
2.3.4- Eucalipto	24
2.3.4.1– Ocorrência e distribuição geográfica do patógeno	24
2.3.5- Feijão	25
2.3 - Métodos de Controle	26
2.4 - VARIABILIDADE GENÉTICA VIA RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)	27
2.5 - MEDIDAS PARA ESTIMAR A DIVERSIDADE	30
3 - MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 - Material Biológico	31
3.2- Meios de cultura	32
3.2.1- Meio Batata Dextrose Agar (BDA)	32
3.2.2- Meio BD líquido	32
3.2.3- Cultivo do Fungo	32
3.3- Isolamento e Repicagem do patógeno	33

3. 4 – Teste de patogenicidade	35
3.4.1- Isolamento	35
3. 5- Obtenção do micélio para a extração do DNA genômico	36
3. 6- Extração do DNA dos isolados fúngicos	36
3. 7- Quantificação e diluição do DNA genômico	38
3. 8- Reação de RAPD	38
3. 9- Amplificação do DNA – RAPD	39
3.10- Preparo do gel 1,5%	40
3.11- Aplicação das amostras no gel de agarose	40
3. 12- Análise dos produtos e Visualização	41
3. 13- Análise computacional dos dados	41
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 – Crescimento micelial do patógeno	42
4.2 – Teste de patogenicidade	45
4.3 – Variabilidade Genética	48
5- CONCLUSÕES	53
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
CONSIDERAÇÕES FINAIS	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação dos 13 isolados de <i>R. solani</i> obtidos de diferentes plantas, para estudos da variabilidade genética por meio de marcadores RAPD.	31
Tabela 2	Composição do meio de cultura BDA (Batata- Destrose – Agar).	32
Tabela 3	Composição do meio de cultura BD líquido.	32
Tabela 4	Relação dos 22 isolados de <i>R. solani</i> de culturas diferentes, para estudos referentes ao crescimento micelial, patogenicidade, cloração das colônias, presença e/ou ausência de microescleródios.	33
Tabela 5	Relação dos 13 isolados de <i>R. solani</i> , e 1 isolado de <i>alternaria sp.</i> com suas respectivas identificações, para as reações RAPD.	37
Tabela 6	Resumo da análise de variância para o crescimento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> , oriundo de diferentes culturas à 25 ⁰ C por 3 dias.	42
Tabela 7	Crescimento micelial em diâmetro de <i>Rhizoctonia solani</i> oriundo de diferentes culturas à 25 ⁰ C por 3 dias, representados com seus respectivos grupos.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ataque do patógeno causando podridão radicular e ataque nas folhas na cultura do feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).	25
Figura 2	Repicagem de <i>Rhizoctonia solani</i> em meio de cultura BDA.	34
Figura 3	Folhas destacadas com pequenos ferimentos na superfície foliar, para as inoculações com os respectivos isolados. A e B - correspondem folhas de citrus (<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) e Bastão do Imperador (<i>Etilingera elatior</i> (Jach) R. M. Sim), com discos de 0,5 cm de diâmetro com micélio do fungo, respectivamente.	35
Figura 4	Folhas destacadas e inoculadas com discos de micélio, colocadas dentro de sacos plásticos transparentes e umedecidas para formação de uma câmara úmida.	36
Figura 5	Esquema da reação em cadeia da polimerase (PCR).	39
Figura 6	Aplicações das amostras de DNA no gel de agarose.	40
Figura 7	Crescimento micelial e coloração das colônias de <i>R. solani</i> oriundas de diferentes culturas à 25 ⁰ C durante 10 dias. A: isolado chama (<i>Cayaponia espelina</i> (Manso) Cogn), B: isolado bastão do imperador (<i>Etilingera Elatior</i> (Jach) R. M. Sim) e C: isolado teca (<i>Tectona grandis</i> L. F).	44
Figura 8	Formação de microescleródios de <i>Rhizoctonia solani</i> obtidos em meio de cultura BDA. Temperatura de 25 ⁰ C e umidade relativa em torno de 80%, durante 3 a 4 dias.	45
Figura 9	Sintomas típicos de queima foliar induzida por <i>R. solani</i> , observados em folhas de citrus (<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck), após 3 a 4 dias de inoculação. Temperatura de 24 ⁰ C e umidade relativa em torno de 80%.	46
Figura 10	Período de incubação (dias) nas plantas, até o aparecimento dos sintomas em folhas destacadas, com ferimentos e sem ferimentos, inoculadas com <i>Rhizoctonia solani</i> em condições laboratoriais. Temperatura de 24 ⁰ C e umidade relativa em torno de 80%.	47
Figura 11	Eletroforese em gel de agarose, mostrando o polimorfismo de <i>Rhizoctonia</i>	

solani, pela técnica de RAPD com o primers OPA 2.

48

Figura 12 Matriz de similaridade genética estimada pelo índice de *Jaccard*, para todos os isolados analisados de *Rhizoctonia solani*.

49

Figura 13 Dendrograma gerado pelo método de análise UPGMA para o coeficiente de *Jaccard*, a partir das 17 bandas polimórficas geradas pelo RAPD, dos 13 isolados de *Rhizoctonia solani* e 1 isolado de *alternaria* sp.

51

LISTA DE ABREVIATURAS

ADE:	Água Destilada Esterelizada
BDA:	Batata-Destrose-Agar
BD:	Batata- Destrose
RAPD:	Random Amplified Polymorphic DNA
PCR:	“ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ” análise pela reação em cadeia da polimerase
SJ:	Coefficiente de <i>Jaccard</i>
Embrapa:	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
OPA:	<i>Operon Technologies</i>
UV:	Luz ultravioleta
NTSYS:	<i>Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System</i> , versão 2, 02
UPGMA:	<i>Unweighted Pair Group Mean Average</i>
NaOH:	Hipoclorito de Sódio

RESUMO

Rhizoctonia solani é um fungo cosmopolita, com vasto número de hospedeiros, e causa importantes doenças na maioria das plantas cultivadas em todo o mundo. É uma espécie complexa, com muitos biótipos que diferem quanto à patogenicidade, aos hospedeiros, à distribuição na natureza e à aparência em meio de cultura. Em virtude da variabilidade existente nos sintomas produzidos por esse patógeno, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar morfológicamente 22 isolados e geneticamente 13 isolados de *Rhizoctonia solani* de diferentes culturas procedentes do Estado do Pará, Japão e Estados Unidos e 1 isolado de *alternaria* sp. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário vinculado a Área de Fitopatologia, do Departamento de Entomologia e Fitopatologia, do Instituto de Biologia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e na Embrapa Amazônia Oriental. Os parâmetros morfológicos analisados foram o crescimento micelial, presença e/ou ausência de microescleródios, a patogenicidade e coloração dos isolados. No estudo para caracterização genética foi utilizado marcadores moleculares do tipo RAPD. A partir de fragmentos de tecido foliar lesionado foi realizado a técnica do isolamento indireto em meio de cultura BDA para se obter colônias do fungo. Com relação ao crescimento micelial entre os isolados houve efeito significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, entre os 22 isolados, sendo que variaram entre 2,14 e 7,88 cm de diâmetro a 25⁰C após 3 dias de crescimento. A formação de microescleródios foi somente observada nos isolados brasileiros, fato não encontrado nos isolados referentes aos do Japão e Estados Unidos. Os isolados mostraram-se patogênicos quando inoculadas em folhas sadias. A análise molecular, o DNA extraído dos isolados com o *primer* OPA2 permitiu visualizar 17 bandas polimórficas com tamanhos que variavam entre 800 a 1800 pb, gerando 100% de polimorfismo entre os 14 isolados estudados. A similaridade entre as amostras, estimada pelo coeficiente de *jaccard*, foi de 21,71%, sendo gerado pelo método UPGMA, um dendrograma que permitiu agrupar os isolados em 7 grupos principais. Com base nas avaliações realizadas concluiu-se que há uma grande variabilidade morfológica e genética entre os isolados de *R. solani* analisados.

Palavras - chave: *Rhizoctonia solani*, Características Morfológica, Variabilidade Genética Marcadores RAPD.

ABSTRACT

Rhizoctonia solani is a cosmopolitan fungus, with vast number of hosts, and cause important diseases in the majority of the plants cultivated in the whole world. It is a complex specie, with many biotypes that they differ how much to the pathogenicity, the hosts, the distribution in the nature and the appearance in culture medium. In virtue of the existing variability in the symptoms produced for this pathogen, the objective of the present work was to characterize morphologically 22 and genetically 13 *Rhizoctonia solani* isolates of different cultures from the State of Pará, Japan and United States and 1 *Alternaria* sp isolate. The experiments had been lead in the Official Laboratory of Disease Control Diagnosis entailed to the Fitopatology Area, of the Entomology and Fitopatology Department, Institute of Biology, Federal University of Rio de Janeiro (UFRRJ) and in the Embrapa Eastern Amazonia. The analyzed morphologic parameters had been the micelial growth, presence and/or absence of microsclerotia, the pathogenicity and coloration of the isolates ones. In the study for genetic characterization it was used marking molecular RAPD. From fragments of damaged leaf tissue, the technique of the indirect isolation in BDA culture medium was carried through to get fungus colonies. With relation to the micelial growth between the isolates it had significant effect to the level of 5% of probability for test F, between the 22 isolates, being that they had varied between 2,14 and 7,88 cm of diameter 25⁰C after 3 days of growth. The formation of microsclerotia only was observed in the Brazilian isolates, fact not found in the isolates referring to Japan and United States. The DNA extracted from the isolates used in the RAPD test with the starter OPA2 allowed to visualize 17 polymorphic bands with sizes between 800 to 1800 pb, generating 100% of polymorphism among the 14 isolates studied. The similarity among the samples, esteem for the *jaccard* coefficient, it was of 21,71%, being it generated for method UPGMA, a dendrogram that allowed to group the isolates in 7 main groups. On the basis of the carried through evaluations concluded that it has a great morphologic and genetic variability among the *R. solani* isolates analyzed.

Keywords: *Rhizoctonia solani*, morphological characteristic, genetic variability, RAPD markers.

1- INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países mais rico do mundo em diversidade biológica de plantas, animais e microrganismos, além de possuir invejável acervo de recursos naturais edáficos, climáticos, hídricos e de revestimento florístico. É verdadeiramente esplendoroso o manancial de recursos genéticos autóctones existentes no Brasil, capaz de assegurar o uso sustentável do capital biótico e abiótico de forma vantajosa, com o emprego consciente do capital intelectual (MORALES; VALOIS, 2000).

Os recursos genéticos são considerados como conjunto de amostras populacionais de vegetais, animais e microrganismos, com objetivo de tornar disponíveis caracteres genéticos úteis, com valor atual e potencial (ARAGÓN, 1997).

A demanda na agropecuária por recursos genéticos necessita cada vez mais da utilização de métodos e processos biotecnológicos para alcançar o seu sucesso (MORALES; VALOIS, 2000).

De uma maneira geral, a variabilidade genética é obtida de forma mais expressiva nos centros de origem e de diversidade das espécies, ou mesmo em linhagens preliminares ou avançadas, ou em cultivares elites ou primitivas. Para a satisfação dessa demanda é imprescindível que os bancos de germoplasma sejam bem caracterizados e avaliados, tanto em termos de caracteres qualitativos quanto quantitativos. A caracterização de coleções de germoplasma pode ser realizada através de marcadores moleculares que permitem a detecção de polimorfismo em nível de DNA (SAIKI et al., 1988).

Pode-se afirmar que a biotecnologia é uma ferramenta que não somente aumenta a eficiência nos organismos utilizados, mas, principalmente, oferece novas possibilidades para uma melhor exploração dos recursos oferecidos pela biodiversidade, transformando-se assim em alternativas para o desenvolvimento sustentável (MORALES; VALOIS, 2000).

A diversidade biológica ou biodiversidade é freqüentemente relacionada com a diversidade de espécies, embora apresente um profundo relacionamento ecológico e evolucionário (FALK, 1990). De fato, biodiversidade é a variabilidade apresentada pelos organismos vivos, dentro de espécies, entre espécies e ecossistemas (UNEP, 1992). Conseqüentemente, é a variação que ocorre sob três enfoques: genes, espécies e ecossistemas (McNEELY et al., 1990). Assim, diversidade genética é o somatório da informação genética existente nos organismos que constituem a flora, a fauna e a microbiota que, se adequadamente identificada e capturada, passa a constituir os recursos genéticos, fonte da variação genética disponível ou variabilidade genética (MORALES; VALOIS, 2000).

A variabilidade genética poderá transformar-se em fonte de recursos estratégicos necessários para o sucesso dos programas de desenvolvimento e com grande demanda internacional. Entretanto, seu valor apresenta-se aparentemente reprimido pelo desconhecimento de suas perspectivas socioeconômicas para o agronegócio. Assim, embora seja imperativo identificar a diversidade genética disponível e amostrá-la com o intuito de conservá-la, ao mesmo tempo é preciso, caracterizá-la, avaliá-la e torná-la disponível. (McNEELY et al., 1990).

Técnicas biotecnológicas como *Randon Amplified Polimorphic DNA* (RAPD), ou seja, *Polimorphic DNA Amplificado Aleatoriamente* constituem instrumentos para caracterizar e avaliar o germoplasma mais rapidamente e com maior eficiência. É considerada uma das técnicas que vem sendo mais utilizada na caracterização das espécies eucariotas e procaríotas, tendo sido desenvolvida por Williams et al. (1990). Essa técnica é uma das variantes da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que utiliza um “único” iniciador (*primer*) composto por dez pares de bases de seqüências nucleotídicas arbitrárias, tendo, portanto, sua seqüência alvo desconhecida (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), ao contrário das outras que requerem informações prévias de seqüência de DNA alvo, para a amplificação.

Sua utilização possibilitou a detecção de vários polimorfismos em diferentes populações e/ou indivíduos através da presença ou ausência dos produtos de amplificação (WILLIAMS et al., 1990; FAIRBANKS et al., 1991). Essa técnica devido a sua relativa simplicidade, rapidez e baixo custo, têm atraído muitos pesquisadores e é considerada a mais empregada com o intuito de estudar a diversidade genética de vários fungos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A caracterização por meio de marcadores moleculares, combinada à obtida por descritores morfológicos e agronômicos, parece mais apropriada para o estudo de diversidade em bancos e coleções de germoplasma. Mesmo assim, em alguns casos, podem ocorrer discrepâncias, sugerindo que padrões evolutivos morfológicos e moleculares sejam distintos. Em coleções de germoplasma, essa técnica quantifica e visualiza a diversidade, identifica genótipos desejáveis e grupos de similaridade que possam se constituir duplicatas e, ainda, otimiza seus manejos pela identificação dos caracteres mais informativos para serem empregados na caracterização e melhoramento genético (CRUZ et al., 2004A).

Análises genômica têm sido muito utilizadas para estudos com fungos, como por exemplo, em *Rhizoctonia solani*, com a finalidade de avaliar a variabilidade genética entre e dentro de populações, de modo a fornecer subsídios aos programas de melhoramento. Esse

fungo representa um grupo economicamente importante e geneticamente diverso de patógenos de solo que ocorrem em várias espécies de plantas em todo o mundo (VILGALYS; CUBETA, 1994).

Com base no exposto, este trabalho teve como objetivos:

- Caracterizar morfológicamente 22 isolados de *Rhizoctonia solani*, através do crescimento micelial *in vitro*, presença e/ou ausência de microescleródios, teste de patogenicidade e coloração dos isolados e;
- Avaliar variabilidade genética de 13 isolados de *Rhizoctonia solani* e 1 isolado de *alternaria sp.*, utilizando-se marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- *Rhizoctonia sp.*

O gênero *Rhizoctonia* foi descrito pela primeira vez pelo micologista francês De Candolle, em 1815, como sendo um fungo não esporulante que ataca, preferencialmente, raízes e que produz filamentos de hifas a partir de escleródios (SNEH et al., 1991). O qual é classificado como Mitosporic Fungi, Hyphomycetes, forma ordem Agonomycetales por não produzir esporos em sua fase assexuada. Outra classificação considerando Agonomycetes como forma-classe e Mycelia Sterilia como forma-ordem (PEREIRA, 1997).

O micélio é caracterizado pela ramificação em ângulo reto com septação imediatamente e após o ramo, constrição na base da ramificação e septo doliporo. A fase sexuada deste fungo é *Thanatephorus cucumeris*, classificado no reino Fungi, filo Basidiomycota, ordem Ceratobasidiales, Ceratobasidiaceae (BUTLER; BOLKAN, 1973, ANDERSON, 1982; ADAMS, 1988).

Segundo Botelho et al. (2001), *Rhizoctonia solani* é um fungo cosmopolita, com vasto número de hospedeiros, e causa importantes doenças na maioria das plantas cultivadas em todo o mundo. É uma espécie complexa, com muitos biótipos que diferem quanto à patogenicidade, aos hospedeiros, à distribuição na natureza e à aparência em meio de cultura. Relatos sobre isolados de *Rhizoctonia*, fitopatogênicos ou saprofíticos, não descritos em nível específico, são comuns na literatura devido às dificuldades na identificação impostas por limitações morfológicas e taxonômicas do gênero, tais como:

- (i) Ausência de esporos assexuais,
- (ii) Instabilidade na morfologia de culturas e escleródios, em função de variações nas condições de cultivo (PARMETER; WHITNEY, 1970),
- (iii) Ampla variabilidade morfológica, sendo que há espécies constituídas por diferentes grupos de isolados com afinidade para efetuar anastomose de hifas entre si (OGOSHI, 1987),
- (iv) Necessidade de métodos específicos para se induzir estruturas basidiais *in vitro* (CARLING; SUMMER, 1992),
- (v) Desconhecimentos dos teleomorfos para algumas espécies anamórficas (STALPERS; ANDERSEN, 1996).

O fungo sobrevive saprofiticamente no solo, infectando plantas nativas, ou em estágio de dormência, como micélio e escleródios. Esses propágulos são detectados no solo com relativa facilidade, porém de difícil quantificação. Geralmente, encontram-se nas camadas superficiais do perfil do solo, principalmente nos primeiros 10 cm, devido à dependência de oxigênio (CARDOSO, 1994).

Os sintomas apresentados pela espécie de *Rhizoctonia solani* variam extensamente e são confundidos facilmente com os sintomas das doenças produzidas por outros patógenos. Atuam em regiões de temperaturas elevadas e chuvas freqüentes acompanhadas de alta umidade (95%), que o tornam de primordial importância dentre os fatores limitantes ao cultivo de várias culturas, cuja maioria são plantas cultivadas, como beterraba, pepino, cenoura, berinjela, melão, tomate, melancia, repolho, alface, feijão, soja, figo, algodão, feijão-caupi e arroz, além de plantas nativas (MATZ, 1917, MATZ, 1921, ATKINS e LEWIS 1952, ZAUMEYER e THOMAZ 1957, Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas 1962, DANIELS 1963, FLENTJE et al. 1963 a, LUKE et al. 1974, Cooperación..1978).

Este fungo representa um grupo economicamente importante e geneticamente diverso de patógenos de solo que ocorrem em espécies de plantas em todo o mundo (VILGALYS; CUBETA, 1994).

O critério de classificação de *Rhizoctonia* spp. está baseado na citomorfologia da hifa, morfologia da cultura, morfologia do teleomorfo, e o padrão de anastomose ou não de hifas (SNEH et al., 1991). Embora *Rhizoctonia solani* seja um organismo muito importante, no Brasil informações sobre características dos isolados de *R. solani* associados a várias culturas são escassas. Caracterizado por ser extremamente polífago e apresentar grande capacidade saprofítica no solo, podem invadir as raízes das plantas, causando uma podridão levando até a morte. Os escleródios, abundantemente produzidos na natureza, quando a uma fase de alta

umidade segue-se um período seco (NEWMAN LUZ, 1978), e o micélio do fungo constituem o inóculo primário (GALINDO et al. 1983) que são disseminados localmente pelo vento, chuva e a movimentação do ser humano, animais e implementos agrícolas (WEBER, 1939; ONESIROSAN, 1975). Sementes infectadas também são importantes fontes de inóculo primário (ONESIROSAN, 1975).

O fungo sobrevive como escleródios ou hifas espessadas nas plantas. Os escleródios são responsáveis, também, por focos secundários de infecção (WEBER 1939; ONESIROSAN, 1975), ou podem permanecer no solo, servindo de inóculo primário para culturas subseqüentes (CARDOSO, 1981). Sobrevive de um ano para o outro em plantas e em restos de cultura. A penetração desse fungo se dá através das paredes celulares da epiderme da raiz ou hipocótilo com a subseqüente invasão, pelo micélio dos tecidos da planta, que acabam por serem degradados pela ação de enzimas ou toxinas (KRUGNER, 1980).

A tendência atual para classificação dos diversos isolados do *R. solani* é através da reação de anastomose de hifas. Essa reação tem explicações na taxonomia em virtude da possibilidade de divisões sub-específicas (PARMETER JUNIOR et al., 1969; SHERWOOD, 1969; PARMETER JUNIOR e WHITNEY, 1970).

A taxonomia deste fungo ainda não foi totalmente elucidada, devido à diversidade ultra-estrutural da espécie, atribuindo-se esta variação a inconsistência na caracterização do estágio assexuado do fungo, as dificuldades na produção de esporulação sexuada em condições controladas e á sua detecção na natureza (CARDOSO 1981).

Marcadores moleculares e bioquímicos complementam a identificação e a caracterização de isolados de *Rhizoctonia* (HALL, 1973; SNEH et al., 1991; VILGALYS e CUBETA, 1994). Vários estudos demonstraram o potencial da eletroforese de proteínas e isoenzimas na caracterização de grupos de anastomose em *Rhizoctonia* spp. (REYNOLDS et al., 1983; LIU et al., 1990; LIU & SINCLAIR, 1992; LIU e SINCLAIR, 1993; LIU et al., 1993).

2. 2 - Sintomatologia

2. 2. 1 – Queima de folhas

A queima de folhas em jardim clonal e no campo tem como sintomas uma coloração cinza nas áreas queimadas, ataque em reboleira, desfolha precoce tendo algumas folhas dependuradas nas hifas, e morte. Esses sintomas são precedidos pelo desenvolvimento de micélio epifítico ascendente nas hastes, galhos e ramos. Outro fato importante é que esses órgãos atacados ficam repletos de escleródios, os quais são a estrutura de resistência do patógeno (REZENDE e FERREIRA, 1992; FERREIRA, 1991).

2. 2. 2 – Podridões de Estacas

A podridão de tem como sintomas as lesões escuras que geralmente progridem da base para o ápice da estaca, e em alguns casos podem existir lesões intercalares, ou seja, lesões delimitadas acima e abaixo por tecidos sadios (FERREIRA, 1989).

2.2.3 – Tombamento de mudas

O tombamento de mudas está mais associado a plantios realizados por sementes do que por estacas. Comumente essa doença se manifesta em pré e pós-emergência. No tombamento em pré-emergência, as mudas aparecem mortas com folhagens murchas ou secas, dependendo do estágio em que são observadas. Outros sintomas são as lesões que anelam a haste das mudas e possuem coloração variando de marrom-arroxeadas a marrom-escuras. Nas sementeiras a doença ocorre na forma de reboleira e atinge o nível do coleto. Um sintoma facilmente observado a olho nú é o anelamento que ocorre na proximidade do coleto, especialmente nas mudas mais desenvolvidas que possuem lesões mais escuras na haste (FERREIRA, 1989).

2. 3- Caracterizações da doença em algumas culturas

2. 3. 1- Pimenta do Reino

Segundo Duarte e Albuquerque (2005), a doença afeta plantas de pimenteira-do-reino em viveiros ou jardim clonal. Distingue-se da queima-do-fio por causar sintomas em reboleiras e por não formar fios de micélio por meio dos quais as folhas se prendem aos ramos. A doença inicia a partir de lesões diminutas de cor parda envolvidas por um halo de cor púrpura. Com a evolução parte da folha ou toda a folha torna-se necrosada. Na face inferior observam-se hifas entrelaçadas formando uma tênue teia. Quando folhas secas se desprendem, ficam aderidas às folhas saudáveis pela ação do orvalho ou de chuva, iniciando novas infecções. Nas hastes causa lesões e queima dos tecidos. Se as inflorescências e espigas são atingidas ocorre queima e queda de flores e frutos.

2.3.2- Amendoim

Rhizoctonia solani Kuhn causa no amendoim, morte de sementes, damping-off de pré e pós-emergência, podridões de raízes e de vagens e queima de folhas em plantas adultas. No Estado de São Paulo tem sido mais frequentemente relatada como damping-off, podridões de vagens e de ginóforos. Devido a sua alta frequência e às condições favoráveis em São Paulo, pode-se afirmar que constitui um dos mais sérios problemas. (BARRETO E SCALOPPI, 1999). Os sintomas são:

- Manifesta-se na forma de damping-off de pré ou pós-emergência, ocasionando o tombamento.
- As hastes próximas do solo podem ser atacadas pelo fungo, que causa lesões circulares, marrons e podem matar o ramo.
- *R. solani* pode infectar ainda os ginóforos, impedindo a formação de vagens.
- Se a infecção é mais tardia, o fungo causa podridão das vagens, evidente só próximo da colheita.
- Esta podridão se manifesta por uma mancha parda a preta, tomando parcial ou totalmente a casca da vagem.
- Em muitos casos, a vagem fica chocha ou com sementes mal formadas, menores, enrugadas e desbotadas (BARRETO E SCALOPPI, 1999).

2.3.3- Gramíneas

De acordo com Verzignassi e Fernandes (2001), o Brasil tem nítida vocação para a pecuária e já conta com cerca de 100 milhões de hectares de pastagens cultivadas compostas, principalmente, por gramíneas do gênero *Brachiaria*, especialmente *B. decumbens* e *B. brizantha*. Estes extensos monocultivos representam um risco ao equilíbrio do ecossistema, facilitando a propagação de pragas e doenças.

Mais recentemente, e em áreas com precipitação anual superior a 1.800 mm (norte de Mato Grosso, Rondônia e Acre) foram constatados danos severos em *Brachiaria spp.* causados por *R. solani*. No Estado do Pará, em 2001, foi constatada a morte de *B. brizantha* cv. Marandu causada pelos fungos *Pythium perillum* associado a *R. solani*, atingindo cerca de 60 mil hectares. *R. solani* foi também detectado causando damping-off em plântulas de *Stylosanthes scabra* em Mato Grosso do Sul (VERZIGNASSI E FERNANDES, 2001).

2.3.4- Eucalipto

2.3.4.1– Ocorrência e distribuição geográfica do patógeno

Em Kerella, Índia, *Rhizoctonia solani* Kühn, foi relatada como um dos principais patógenos em viveiros florestais (SILVEIRA, 1996). Na maioria das regiões brasileira a mesma espécie predomina em *Eucalyptus spp.*, causando queima de folhas em jardim clonal e no campo, mela de estacas e tombamento de mudas (SANTOS et al., 1996; REZENDE e FERREIRA, 1992; FERREIRA 1991; CARVALHO et al., 1989; ALFENAS et al., 1988). Embora, outras espécies já tenham sido relatadas (SILVEIRA, 1996; FERREIRA et al., 1995).

A queima de folhas foi relada pela primeira vez no Brasil por ALFENAS et al. (1988), em jardim clonal na região de Belo Oriente, Minas Gerais.

Em 1989, CARVALHO et al. (1989) e VITTI et al. (1989), relataram como *Rhizoctonia* sendo um dos patógenos mais associados com a queda na porcentagem de enraizamento de estacas de eucalipto em casas de vegetação, devido à podridão de estacas.

Conforme FERREIRA (1991), houve nesse ano uma severa queima de folhas em plantas híbridas entre *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, causadas por linhagens esclerodiais de *R. solani* em jardim clonal e no campo, na região do Vale do Rio Jari, estado do Pará.

REZENDE e FERREIRA (1992) descreveram a ocorrência de queima de folhas, em jardim clonal e em plantações comerciais no Sul da Bahia, ocasionando desfolha precoce de árvores em reboleira de até 0,3 ha, e em algumas árvores a queima atingiu até mais de quatro metros de altura. Novamente, SANTOS et al. (1996), relataram queima de folhas no município de Benevides, estado do Pará, em *E. urophylla* x *E. grandis*, procedência Jari e Albas.

Rhizoctonia, mesmo no setor floresta, possui uma ampla gama de hospedeiro, onde é causadora de podridão de raízes, lesões em hastes, tombamento de mudas, manchas foliares, mela e queima de folhas (FERREIRA, 1989; CARVALHO et al., 1989; ALFENAS et al., 1988; CARVALHO et al., 1987).

3.3.5- Feijão

A doença Rizoctoniose e/ou podridão-radicular, mela ou murcha da teia micélica de *Rhizoctonia* (*Rhizoctonia solani* Kühn) em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) sendo uma das doenças radiculares mais comuns e de maior nocividade no Brasil (CARDOSO, 1990). Os danos que a doença causa a planta são: tombamento da cultura, cancro do talo, podridão radicular (Figura 1A), podridão da vagem, ataque das folhas (Figura 1B) e atraso na emergência e desenvolvimento da planta.



Figura 1: Ataque do patógeno causando podridão radicular e ataque nas folhas na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).

2.3 - Métodos de Controle

O controle inclui o emprego de semente de boa qualidade, o tratamento da semente com fungicidas e práticas culturais, como a rotação de culturas com espécies resistentes (gramíneas), a eliminação de restos culturais e a diminuição da profundidade de semeadura para permitir a emergência mais rápida das plântulas (VIEIRA; RAVA, 2000). É difícil e até mesmo anti-econômico, inviabilizando por exemplo o plantio da cultura do feijão, principalmente em áreas sob pivô central. O sistema radicular e a parte aérea da espécie são atacados pelo fungo, formando lesões que restringem o desenvolvimento das mesmas ou causam a sua morte (CARDOSO, 1990).

Uma das alternativas de controle para o patógeno seria o aproveitamento da supressividade natural a esse patógeno que ocorre em alguns solos. O potencial supressivo a vários patógenos de solo, reduzindo a manifestação de doenças mesmo sob alta densidade de inóculo e condições propícias ao desenvolvimento da doença, acontece em vários solos (COOK; BAKER, 1983).

Alguns fatores físico-químicos do solo, como o pH, atuam na supressividade de alguns solos a certos patógenos radiculares. Porém, quando se trata do mesmo ou de outro patógeno em solos diferentes, este caráter é modificado (WHIPPS, 1997). O pH é uma característica química muito variável e que se modifica em função de práticas como a calagem e aplicação de adubos acidificantes, os quais podem causar a perda ou a diminuição da supressividade natural de um solo.

Segundo Chet e Baker (1980), ao alterarem o pH inicial de um solo de 8,1 para 5,7 e 6,5, observaram uma menor incidência de tombamento causado por *R. solani* em plântulas de alfafa, beterraba e rabanete. Além disso, constataram que o fungo teve um melhor crescimento em meio de cultura com pH variando de 6,5 a 7,5. Baixos valores de pH também inibiram a ocorrência do patógeno em trigo e em centeio causado por *Gaeumannomyces graminis*, principalmente quando se utilizou uma adubação amoniacal (MARSCHNER, 1986). O controle de diversas doenças causadas por patógenos de solo, tais como *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Plasmodiophora brassicae* tem sido satisfatório com a aplicação de corretivos (PUNJA, 1989; citado por ZAMBOLIM e VENTURA, 1993). Altos níveis de alumínio trocável também estão relacionados com a supressividade natural de alguns solos a *R. solani* (KOBAYASHI; KO, 1985).

A presença de microrganismos antagônicos e competidores aos patógenos de solo permitem uma boa sanidade do sistema radicular das plantas ou a manutenção da população

destes em níveis não prejudiciais ao hospedeiro, em função de um tamponamento microbiano (HOMECHIN, 1991). Muitos microrganismos são isolados e relacionados com a supressividade de alguns solos (WHIPPS, 1997). Contudo, um solo biologicamente supressivo provavelmente não poderá ser explicado em termos de um único antagonista (REIS,1991).

2.4 - VARIABILIDADE GENÉTICA VIA RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

A caracterização molecular tem sido realizada com vários objetivos, dentre eles têm-se a quantificação da diversidade e a determinação da estrutura genômica. A interpretação da diversidade é feita por meio de uma medida de dissimilaridade, quase sempre visualizada por métodos de agrupamento. Já os níveis de variação genética podem ser obtidos por vários procedimentos, como pela análise de variância molecular. Marcadores moleculares permitem acessar o genótipo e a variabilidade do DNA das plantas e microorganismos, para identificarem polimorfismo e associar os genes de efeito maior (MILACH, 1998).

Tem-se observado o avanço de várias técnicas que permitem identificar variabilidade em nível de DNA. Pode-se verificar através do estudo de DNA, a existência de um grande número de marcadores genéticos polimórficos, os quais são amplamente utilizados na identificação de paternidade, no mapeamento genético e nos estudos evolucionários (BECKMANN, 1989; GIBSON e SMITH, 1989; WILLIAMS et al., 1990).

Após o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) por SAIKI et al. (1988), muitos estudos ao nível de marcadores moleculares tornaram-se possíveis ou simplificados. A reação envolve um processo cíclico, no qual a enzima DNA-polimerase permite que o DNA de uma região selecionada do genoma seja amplificado várias vezes, para qual são fornecidos os iniciadores (*primers* – oligonucleotídeos específicos).

Então, o ciclo se repete e em cada ciclo o número de cópias da seqüência alvo é duplicado, resultando numa amplificação exponencial (LANDDERGREN, 1993; ALBERT, 1997; SOUTO et al., 2000).

A técnica RAPD foi descrita, inicialmente, por dois grupos de pesquisadores: Williams et al. (1990), que a denominaram de *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) e por Welsh e McClelland (1990), com o nome de *Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction* (AP-PCR) (citados por MILACH, 1998). Embora as versões sejam distintas nos detalhes técnicos, são iguais no fundamento, pois se baseiam na amplificação de fragmentos de DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), seguida da separação desses fragmentos por

eletroforese em meio semi-sólido e visualização, com o auxílio da coloração em brometo de etídio e exposição em luz ultravioleta (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998).

Segundo Borém e Miranda (2005), esta técnica (PCR) consiste em extrair o DNA dos indivíduos a serem analisados e submetê-lo às reações de amplificação, utilizando-se um iniciador de polimerização do DNA diferente de cada vez. Um produto de amplificação é gerado para cada região cromossômica flanqueada por um par de sítios de iniciação, distanciada no máximo 5 kb (quilo bases nucleotídicas) uma da outra e na orientação apropriada. Indivíduos geneticamente distintos produzem diferentes padrões de fragmentos amplificados. O processo de amplificação de fragmentos consiste na desnaturação do DNA - molde, na hibridização do iniciador com a fita simples do DNA, com base na homologia de seqüência e na polimerização da seqüência complementar ao DNA - molde. Esse ciclo de separação das fitas da hélice dupla, hibridização e polimerização são repetidos inúmeras vezes com o objetivo de amplificar a seqüência reconhecida pelos iniciadores no genoma. Após a amplificação, os fragmentos são separados por eletroforese em gel de agarose. Para observação das bandas de DNA, o gel é corado com brometo de etídio e elas são visualizadas sob luz ultravioleta.

No caso do RAPD, o DNA a ser amplificado é desnaturado pelo aquecimento da amostra (a 94⁰ C). Na presença da DNA polimerase e de dNTPs, os iniciadores se hibridizam (a 55⁰ C) com seqüências específicas do DNA- molde, dando início à síntese (a 75⁰ C) do novo DNA. O primeiro ciclo é caracterizado por um produto de comprimento indeterminado, que se acumula em progressão aritmética. Entretanto, a partir do segundo ciclo são produzidos segmentos curtos, que se acumulam exponencialmente a cada ciclo sucessivo de amplificação, resultando em milhões de fragmentos após 20 a 40 ciclos (BORÉM e MIRANDA, 2005).

Diversas técnicas estão disponíveis para a detecção da variabilidade genética na seqüência do DNA, indicando polimorfismos existentes. GODOY (2005) diz que a utilização de técnicas moleculares permite a identificação de pontos de referência do DNA, denominados de marcadores genéticos.

Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade em nível de DNA, e assim variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos. (POLASTRE, 2002). Segundo MILACH (1997), as metodologias para identificar os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificadas em dois grupos: por hibridização ou por amplificação de DNA.

Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (Polimorfismo de

Comprimento dos Fragmentos de Restrição) e Minissatélites ou Locos VNTR (em inglês "*Variable Number of Tandem Repeats*"). Dentre os revelados por amplificação incluem o marcador do tipo: RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), Microsatélites e AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados).

A classe de marcadores identificados por amplificação de DNA com variações na PCR, em comparação com as técnicas que envolvem a hibridização de DNA, geralmente, é de custo relativamente menor, mais fácil e de menor tempo para a obtenção dos resultados (MILACH, 1998; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Williams et al. (1990) e Welsh e McClelland (1990) propuseram uma outra técnica para obtenção de polimorfismos de DNA, baseada na amplificação de seqüências de DNA ao acaso pela reação em cadeia de polimerase (PCR) com *primers* arbitrários, denominada de RAPD. O polimorfismo é detectado pela presença de um fragmento específico amplificado em um indivíduo comparado com a ausência do mesmo em outro indivíduo (WILLIAMS et al., 1990; FAIRKANKS et al., 1991). Como os sítios de ligação do iniciador estão distribuídos ao acaso pelo genoma, polimorfismos nestes sítios resultam em diferentes produtos de amplificação (BARDAKCI e SKIBINSKI, 1994).

A natureza molecular do polimorfismo RAPD não é inteiramente conhecida. Entretanto, evidências experimentais indicam que diferenças de apenas um par de base (mutações de ponto) são suficientes para causar a não complementaridade do iniciador (seqüenciador) de iniciação e assim impedir a amplificação de um segmento com o sítio (WILLIAMS et al., 1990). Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções de sítios de iniciação ou inserção que colocam dois sítios de iniciação adjacentes a uma distância acima daquela que a DNA polimerase é capaz de percorrer. Assim, o polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado (banda no gel) está presente ou ausente (POLASTRE, 2002).

Pela técnica de RAPD, a detecção de vários polimorfismos é simples, fácil, rápida e necessita de pequenas quantidades de DNA genômico (HU e QUIROS, 1991; WILLIAMS et al., 1990). Essa técnica tornou-se amplamente utilizada para a identificação de marcadores genéticos associados a determinados fenótipos para estudos de variabilidade genética, assim como para a identificação de organismos e na resolução de grupos taxonômicos (ROSATO et al., 2002).

Sua rapidez é uma das vantagens na caracterização de recursos biológicos quando comparada com as análises de isoenzimas ou RFLP (ANDERSEN e FAIRBANKS, 1991). A não discriminação dos heterozigotos é uma das desvantagens dessa técnica. Como os

marcadores RAPD se comportam como marcadores genéticos dominantes, não são possíveis distinguir se a presença de uma banda é gerada pela amplificação de um loco homozigoto ou heterozigoto (WILLIAMS et al., 1990).

A diversidade genética é a porção hereditária de uma variação possível de ser observada e mensurada (MORALES; VALOIS, 2000). Segundo esses autores, pode ser empregado como termo alternativo para representar a variação genética, indicando o somatório da informação genética conhecida e potencial. Logo, quantifica o número de genótipos possíveis de ser detectado em uma população ou em qualquer hierarquia. Assim sendo, a caracterização com o uso de marcadores moleculares tem sido útil, em virtude da diversidade, em nível molecular, ser bem maior que a morfológica (MÜHLEN, 1999).

2.5 - MEDIDAS PARA ESTIMAR A DIVERSIDADE

Há duas maneiras básicas para se inferir a diversidade genética: uma de natureza quantitativa e outra preditiva (CRUZ e CARNEIRO, 2003). Segundo esses autores, dentre os métodos quantitativos têm-se as análises dialéticas, mas, a aplicação não é apropriada, por ser extremamente trabalhosa e de alto custo. Já os métodos preditivos são viáveis e tomam por base as diferenças morfológicas, agrônômicas e moleculares, quantificando-as por alguma medida de dissimilaridade que expressa o grau de diversidade genética entre os genótipos. Assim, três medidas de dissimilaridades podem ser aplicadas para representar a diversidade em coleções de germoplasma, que se diferenciam com o tipo de variável obtida, ou seja, se quantitativas, binárias ou multicategóricas (CRUZ e CARNEIRO, 2003). Porém, independente da variável, essas medidas são freqüentemente interpretadas e visualizadas por técnicas multivariadas.

Para dados moleculares, onde se obtém uma matriz composta por dados binários, representados pelo número 0 (ausência) e 1 (presença de bandas), aplicam-se vários índices de similaridades que variam de 0 a 1, sendo as dissimilaridades obtidas de seus complementos (CRUZ et al., 2004; CRUZ e CARNEIRO, 2003). As propriedades matemáticas e genéticas dos coeficientes de dissimilaridades, obtidos de freqüências alélicas, e dos de similaridades, gerados de dados binários, empregados em marcadores moleculares, foram amplamente discutidas por REIF et al. (2005). Segundo esses autores, quando os dados são obtidos por marcadores que geram alelos não informativos ou são organizados em uma matriz binária, eles permitem a análise apenas pelo uso de coeficientes de similaridade e destacaram três deles como os mais importantes: o de coincidência simples (SSM), o de *Jaccard* (SJ) e o de

Dice (SD), sendo que os dois últimos não contabilizam valores nulos (00). Relataram, ainda, que complementos aritméticos desses coeficientes representam dissimilaridades ($d = 1 - S$), as quais têm propriedades de distâncias e que a dissimilaridade obtida pelo complemento aritmética do coeficiente de Dice (dD) também pode ser denominada de distância de Nei-Li.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material Biológico

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário vinculado a Área de Fitopatologia, do Departamento de Entomologia e Fitopatologia, do Instituto de Biologia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e na Embrapa Amazônia Oriental (Belém/ PA).

Foram fornecidos pelo Laboratório da UFRRJ 1 isolado de *alternaria* sp. e 2 isolados de *Rhizoctonia solani* do grupo de anastomose: AG4 e AG7, provenientes de solos do Japão e Estados Unidos, respectivamente e 11 isolados de *R. solani*, todos provenientes da parte aérea foliar de diferentes culturas (Tabela 1) pertencentes à micoteca da Embrapa (1°27'21"S e 48°30'16", com altitude de 10,8m). O clima local, segundo a classificação de *Koppen*, corresponde ao tipo quente e úmido (Afi), caracterizado por uma estação chuvosa com precipitação média de 2.740 mm, temperatura média de 26°C e umidade relativa do ar próxima de 80%.

TABELA 1: Relação dos 13 isolados de *R. solani* obtidos de diferentes plantas, para estudos da variabilidade genética por meio de marcadores RAPD.

CULTURAS	NOME CIENTÍFICO
ACÁCIA	<i>Acácia farnesiana</i> (L.) Willd.
BASTÃO DO IMPERADOR	<i>Etilingera elatior</i> (Jach) R. M. Sim
CAFÉ	<i>Coffea arábica</i> L.
CITRUS	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck
CUPUAÇU	<i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng.)
CHAMA	<i>Cayaponia espelina</i> (Manso) Cogn.
MELANCIA	<i>Citrullus vulgaris</i> Schrad
MILHO	<i>Zea mays</i> L

NIM	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss
PUERÁRIA	<i>Puerária phaseoloides</i> (Roxb.) Benth
RÚCULA	<i>Euruca sativa</i> (L.) Cav.
AG4	_____
AG7	_____

3.2- Meios de cultura

3.2.1- Meio Batata Dextrose Agar (BDA).

TABELA 2. Composição do meio de cultura BDA (Batata- Destrose - Agar).

Composição do meio de cultura	Quantidade
Batata	100 g
Agar	15 g
H ₂ O Destilada	200 ml

A batata foi cozida por 30 minutos em 200 mL de água e filtrada em gaze sendo adicionado o Agar. O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1 N, seguido de autoclavagem a 120⁰C durante 20 minutos.

3.2.2- Meio BD líquido.

TABELA 3. Composição do meio de cultura BD líquido.

Composição do meio de cultura	Quantidade
Batata	100 g
H ₂ O Destilada	200 ml

3.2.3- Cultivo do Fungo

Os isolados foram cultivados em meio batata-dextrose-ágar (BDA), a 25⁰C, e posteriormente repicados para meio líquido (MILLS et al., 1994) e mantidos sob agitação no escuro, durante 7 dias. Após isto, o micélio de cada isolado foi filtrado sob vácuo e recolhido para placas de *Petri* esterilizadas e liofilizados.

3. 3- Isolamento e Repicagem do patógeno

Os isolados foram obtidos a partir de folhas com sintomas característicos da doença (queima foliar) coletadas no estado do Pará, catalogadas e herborizadas no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental (Belém/PA). Após lavagem do material com água e sabão, foram efetuados pequenos cortes na região de transição da lesão e procedeu-se a desinfestação superficial em álcool 70% durante 30 segundos e em hipoclorito de sódio a 1,5% por um minuto, sendo em seguida lavados por duas vezes consecutivas em água destilada esterilizada (ADE). O procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. O material foi plaqueado em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) com o auxílio de uma pinça flambada. As placas foram vedadas com papel filme para se obter colônias de *Rhizoctonia solani* (Figura 2) visando estudos posteriores.

A Tabela 4 apresenta a relação das 22 isolados de *R. solani*, para estudos referentes à caracterização morfológica do respectivo patógeno. Os parâmetros a serem analisados são o crescimento micelial, patogenicidade, cloração das colônias, presença e/ou ausência de microescleródios.

TABELA 4- Relação dos 22 isolados de *R. solani* de culturas diferentes, para estudos referentes ao crescimento micelial, patogenicidade, cloração das colônias, presença e/ou ausência de microescleródios.

CULTURAS	NOME CIENTÍFICO
ACÁCIA	<i>Acácia farnesiana</i> (L.) Willd.
BASTÃO DO IMPERADOR	<i>Etilingera elatior</i> (Jach) R. M. Sim
BRACHIARIA	<i>Brachiaria brizantha</i> (Hochst. ex A. Rich)
CAFÉ	<i>Coffea arábica</i> L.
CAUPI	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.
CITRUS	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck
CUPUAÇU	<i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng.)
CHAMA	<i>Cayaponia espelina</i> (Manso) Cogn.
JAMBU	<i>Spilanthus Oleracea</i>
MARACUJÁ	<i>Passiflora incarnata</i> L.
MELANCIA	<i>Citrullus vulgaris</i> Schrad
MILHO	<i>Zea mays</i> L

NIM	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss
PEPINO	<i>Cucumis sativus</i> L.
PUERÁRIA	<i>Puerária phaseoloides</i> (Roxb.) Benth
REPOLHO	<i>Brassica oleracea</i>
RÚCULA	<i>Euruca sativa</i> (L.) Cav.
SOJA	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.
SORRISO DE MARIA	<i>Astertradescantii</i> L.
TECA	<i>Tectona grandis</i> L. F.
URUCUM	<i>Bixa orellana</i> L.
PIMENTA DO REINO	<i>Piper nigrum</i> L.

Cada isolado de *R. solani* foi semeado em 3 placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram mantidas em incubadora a uma temperatura constante de 25⁰C no escuro.

O crescimento micelial foi avaliado em intervalos de 24 horas, pela medição do diâmetro da colônia em dois sentidos diametralmente opostos, com auxílio de uma régua milimetrada.

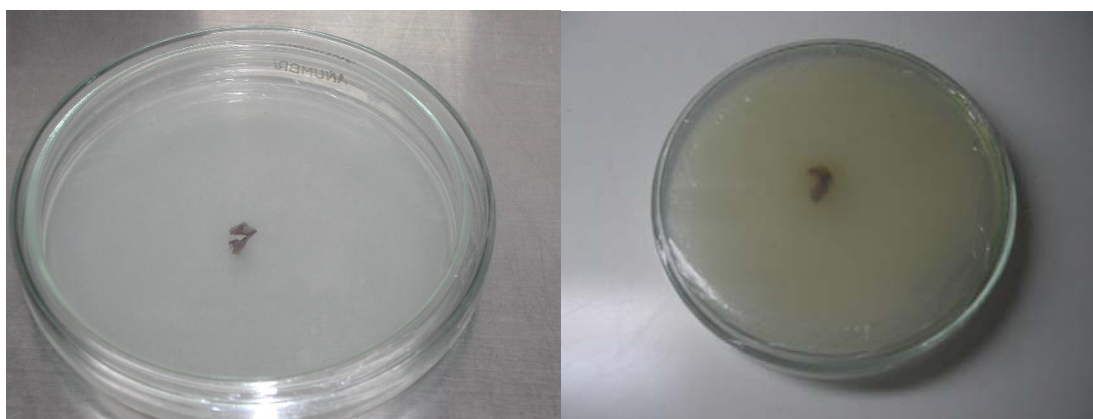


Figura 2: Repicagem de *Rhizoctonia solani* em meio de cultura BDA. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.

Os dados obtidos, com relação ao crescimento do micélio, foram submetidos à análise estatística utilizando o programa SISVAR, sendo a média dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade.

3.4 - Teste de patogenicidade

3.4.1- Isolamento

No teste de patogenicidade dos isolados fitopatogênico, avaliou-se a presença ou ausência de sintomas. Foram utilizadas folhas saudias destacadas de 22 plantas (Tabela 4), coletadas no campo e desinfetadas superficialmente com água e sabão.

Placas de *Petri* com 9 cm de diâmetros contendo meio BDA, foram retirados pequenos discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro, dos diferentes isolados fúngicos, colônias puras e depositados sobre as folhas, previamente desinfetadas e ferida com auxílio de uma agulha esterilizada, em pontos equidistantes. Para tratamento controle (testemunha) foram utilizados discos de BDA, porém sem o inoculo, e depositados na superfície foliar conforme ilustra a Figura 3.

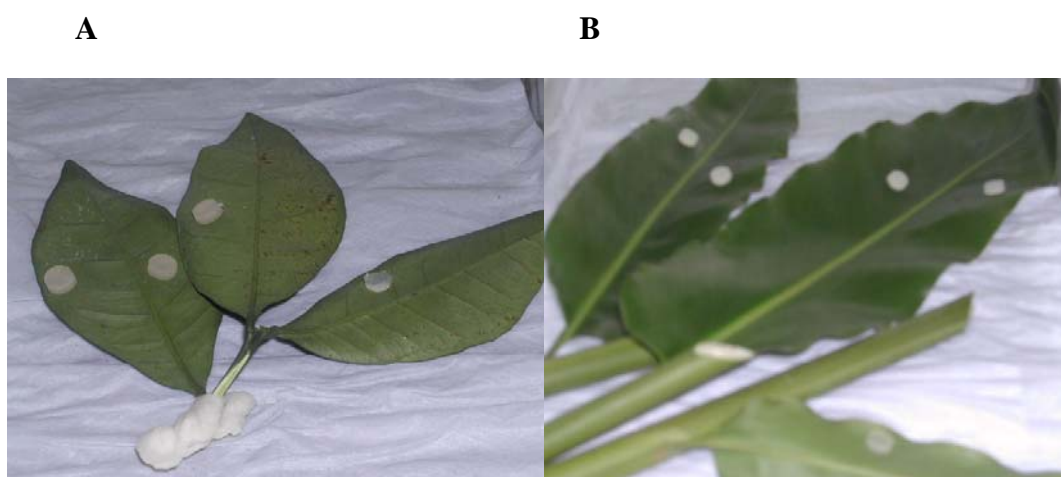


Figura 3: Folhas destacadas com pequenos ferimentos na superfície foliar, para as inoculações com os respectivos isolados. **A e B** - correspondem folhas de citrus (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e Bastão do Imperador (*Etlíngera elatior* (Jach) R. M. Sim), com discos de 0,5 cm de diâmetro com micélio do fungo, respectivamente. Embrapa Amazônia Oriental, Belém – PA, 2007.

Em seguida, as folhas inoculadas e testemunha (Figura 4) foram colocadas em temperatura de 24⁰C dentro de sacos plásticos transparentes e umedecidas com ADE para formar uma câmara úmida, para posterior análise. E com a base do pecíolo envolvido por algodão hidratado com água.

Diariamente foram feitas observações para registrar o período de incubação, caracterizado pelo espaço de tempo decorrido entre a inoculação e o aparecimento dos

sintomas.



Figura 4: Folhas destacadas e inoculadas com discos de micélio, colocadas dentro de sacos plásticos transparentes e umedecidas para formação de uma câmara úmida. Embrapa Amazônia Oriental, Belém – PA, 2007.

3. 5- Obtenção do micélio para a extração do DNA genômico

Após 4 dias de crescimento do fungo *Rhizoctonia solani* em placa de *petri*, três discos de micélio, de cada isolado, com aproximadamente 0,5 cm de diâmetro, foram transferidos para frascos de *Erlenmeyers* de 250 ml contendo 100 ml do meio líquido BD, a fim de obter-se o micélio do fungo. Em seguida, os *Erlenmeyers* foram colocados em um agitador horizontal com velocidade máxima de 143 rpm a uma temperatura que variava de 24^o a 27^oC por um tempo de 72 horas. Após quatro dias, o micélio foi coletado, coado em papel de filtro e colocado na bomba a vácuo.

As reações foram desenvolvidas de acordo com protocolo de Williams et. al. (1990).

3. 6- Extração do DNA dos isolados fúngicos

Para extração do DNA dos 14 isolados, conforme apresenta a Tabela 5, sendo que um isolado de *alternaria* sp, utilizou-se o produto DNazol. O DNA genômico foi extraído de 50 mg de micélio, previamente macerado em nitrogênio líquido, utilizando-se o protocolo de extração de Williams et al. (1990), com pequenas modificações.

TABELA 5. Relação dos 13 isolados de *R. solani*, e 1 isolado de *alternaria sp* com suas respectivas identificações, para as reações RAPD.

CULTURAS	Identificações dos Isolados/ RAPD
CHAMA	R1
RÚCULA	R2
BASTÃO DO IMPERADOR	R3
CUPUAÇU	R4
MELANCIA	R5
PUERÁRIA	R6
AG7	R7
AG4	R8
NIM	R9
CITROS	R10
<i>Alternaria sp.</i>	A11
MILHO	R12
ACÁCIA	R13
CAFÉ	R14

Após a formação de um pó, foi adicionado 600 μ L do produto DNAzol. e o macerado foi transferido imediatamente para um tubo de *ependorf* de 1,5 ml.

Em seguida foi levado ao Fisher Vortex Genie 2, por 5 minutos, e adicionou-se 600 μ L de um solvente orgânico CIA (Clorofórmio- Álcool Isoamílico - 24:1), sendo homogeneizado e centrifugado durante 10 minutos numa velocidade máxima de 12.000 rpm, para a separação das fases orgânicas e aquosas. E novamente os tubos foram colocados ao Fisher vortex Genie 2, durante 5 minutos.

A fase aquosa foi transferida cuidadosamente para um novo tubo (500 μ L), de modo que as duas fases formadas não fossem novamente misturadas. O sobrenadante foi transferido, e o DNA foi precipitado com etanol absoluto gelado a uma temperatura de 4^o C (450 μ L). Foram agitadas as amostras para formar uma emulsão homogênea, invertendo os tubos de seis a oito vezes e deixando-os em repouso em temperatura ambiente por cinco minutos.

Os tubos foram novamente centrifugados em uma microcentrífuga com a velocidade máxima de 12.000 rpm durante cinco minutos, para que o DNA fosse precipitado, formando o *pellet*. Posteriormente, fez-se a lavagem dos *pellets* com o mix concentrado: 1 volume de

DNAzol + 0,75 volume de etanol absoluto. Em seguida, adicionou-se 600 μL deste mix nas amostras e o *pellet* foi ressuspendido com o auxílio da ponteira. Foi realizada uma última centrifugação de cinco minutos a 12.000 rpm. Retirou-se cuidadosamente todo o etanol e os *pellets* foram colocados para secar por aproximadamente uma hora a 37⁰C em banho maria (DAIGGER. DRY BATH). Em seguida, foram adicionados 30 μL de água ultra-pura para posterior quantificação.

As amostras de DNA quantificadas foram armazenadas em um *freezer* à (-20⁰C) para uso nas reações de RAPD.

3. 7- Quantificação e diluição do DNA genômico

Os DNAs extraídos foram submetidos à eletroforese horizontal e quantificados em gel de agarose a 1%, visualizado em luz ultravioleta, a partir da comparação de concentrações crescentes de DNA *lambda* (20, 50, 100 e 200 ng/ μL). Utilizou-se 5 μL de DNA, adicionando-se 2 μL de tampão de carregamento e 4 μL de água destilada e autoclavada.

Após a quantificação, os DNAs foram diluídos a partir da amostra total com água destilada e autoclavada na concentração de trabalho, 5 ng/ μL . As alíquotas foram armazenadas a -20^o C.

A diluição do DNA foi realizada considerando-se a fórmula $C \cdot V = C1 \cdot V1$, onde:

C = é a concentração lida de DNA na quantificação;

V = é o volume desejado a ser pipetado do DNA concentrado;

C1 = é a concentração de trabalho correspondente a 5 ng/ μL ;

V1 = é o volume final correspondente a 500 μL .

3. 8- Reação de RAPD

O protocolo utilizado foi o descrito por Williams et al. (1990) com pequenas modificações. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 13 μL contendo água destilada autoclavada, tampão para PCR (20 mM de Tris HCl pH 8,0 e 50 mM de KCl), 2 mM de MgCl₂, 1 mM dNTP, BSA purificada (2,5 ng/ml), *primer* arbitrário 1,3 mM, 1 U.I. de *Taq polimerase* e 15 ng de DNA genômico.

3. 9- Amplificação do DNA – RAPD

A amplificação foi baseada em método descrito por Williams et al. (1990), usando um *primer* de dez pares de bases nucleotídicas, da marca *Operon Technologies Inc.*, Alameda, CA, EUA (OPA2 e OPA3), em tubos de 0,2 ml.

As amplificações foram realizadas em termociclador PCR Express HyBAID, sendo executados 40 ciclos de 92^o C a 1 minuto (desnaturação das fitas de DNA), 36^o C a 1 minuto (anelamento do iniciador), 72^o C a 2 minutos (extensão e polimerização pela enzima *Taq DNA-polimerase*), seguido de um ciclo final a 72^o C por 10 minutos, para a completa extensão dos produtos amplificados. A Figura 5 ilustra esquematicamente uma reação de PCR utilizada na obtenção de marcadores RAPD.

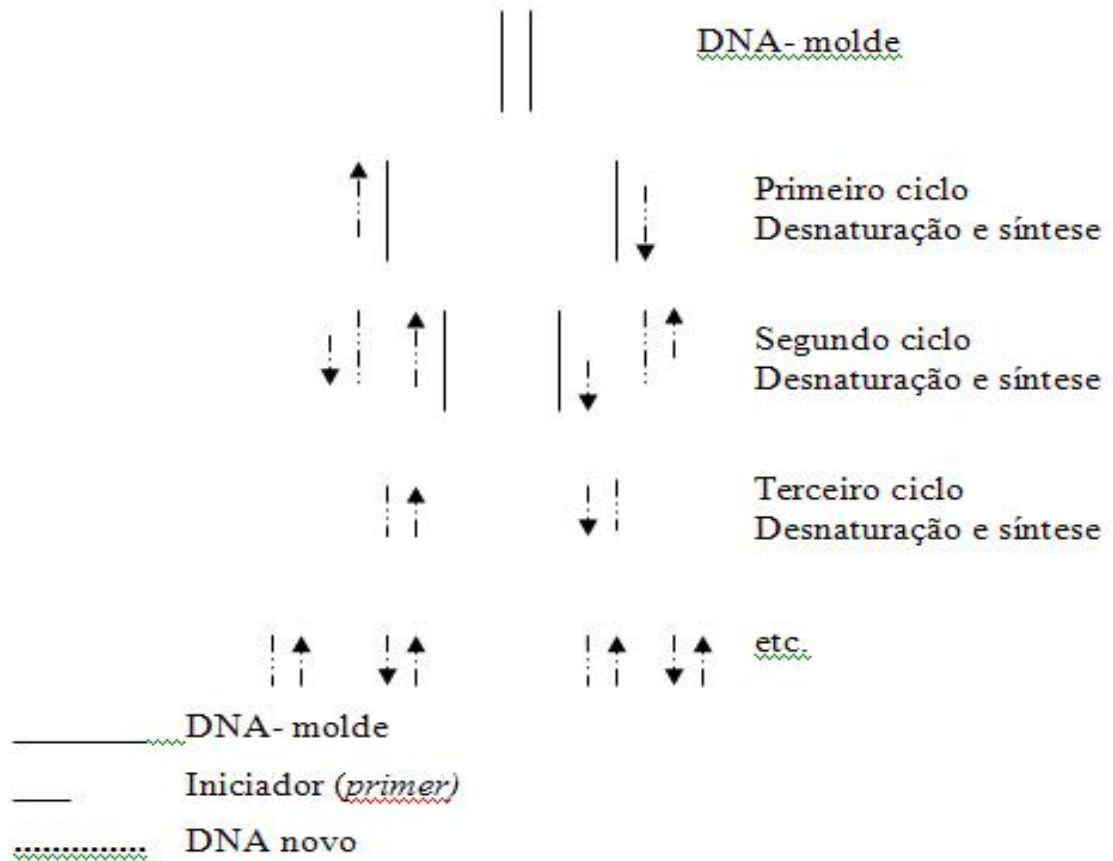


Figura 5: Esquema da reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.10- Preparo do gel 1,5%

Foram utilizados 1,5 g de agarose ultrapura em 100 mL de TAE 1X. Ferveu-se a suspensão em forno de microondas até que as partículas de agarose em suspensão ficassem invisíveis (cerca de três a quatro minutos). A completa dissolução de agarose foi alcançada agitando-se gentilmente o frasco em intervalos regulares durante o processo de fervura. Após a completa dissolução da agarose, a mistura foi colocada sob água para resfriamento até atingir uma temperatura entre 40⁰C a 60⁰ C e então acrescentado 15 µL de brometo de etídio (mg/ml).

Após o preparo, a solução foi vertida no suporte de gel, e em seguida, foram colocados dois pentes (cada um com 8 dentes) sendo um em uma das extremidades e o outro a cerca de dez centímetros de distância, formando “poços” ou canais onde foram aplicadas as amostras.

3.11- Aplicação das amostras no gel de agarose

As reações amplificadas foram retiradas do termociclador e carregadas com 1,5µL de tampão de carregamento 6x (azul de bromofenol). Foi aplicada em cada “poço” uma alíquota de 13 µL de cada amostra e 12 µL de DNA padrão (*Ladder*).

Após esta etapa o gel foi submerso na solução tampão colocado no tanque de aparato de eletroforese. O tampão de eletroforese teve a mesma composição do tampão utilizado na confecção do gel. O tempo de corrida foi estimado em duas horas e trinta minutos até que a solução corante atingisse a região próxima da borda inferior do gel (Figura 6). Aplicou-se durante a corrida, uma voltagem constante de 80 V.

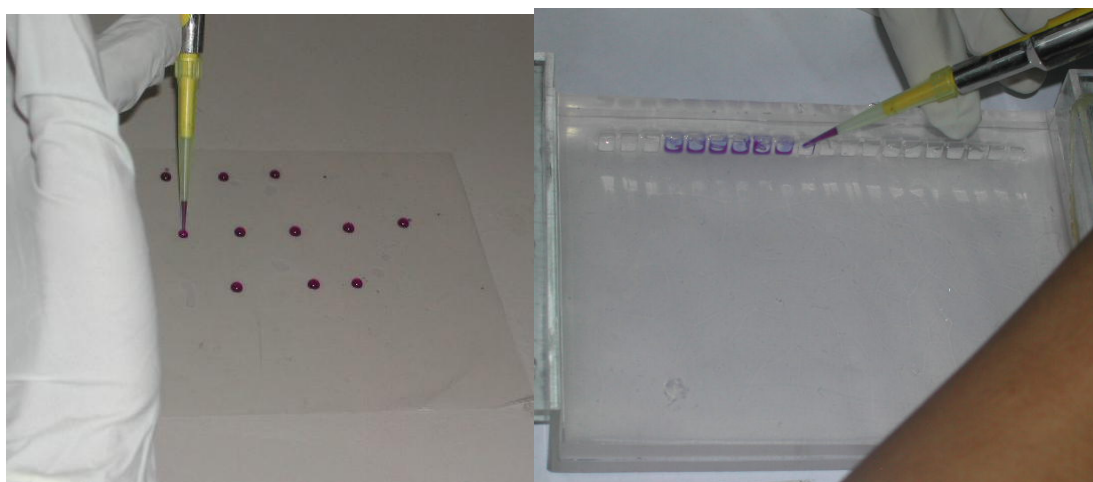


Figura 6: Aplicações das amostras de DNA no gel de agarose. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.

3. 12- Análise dos produtos e Visualização

Para separação dos produtos amplificados foi utilizada a eletroforese horizontal, em gel de agarose a 1,5 %, preparado em TAE 1X, corado com $0,5\mu\text{L}^{-1}$ de brometo de etídio para visualização do DNA sob luz ultravioleta (UV). Onde os produtos de amplificação foram separados sob uma voltagem constante de 80 Volts durante duas horas e trinta minutos. O DNA padrão, com fragmentos de tamanhos conhecidos utilizado foi o *Ladder* 1 kb.

Após a eletroforese, as bandas foram visualizadas, com detecção em luz UV e os resultados foram fotografados por uma câmera acoplada a um sistema computadorizado denominado ALPHA INNOTECH CORPORATION/ALPHA DIGI DOCTM, para posterior análise.

3. 13- Análise computacional dos dados

A análise dos marcadores RAPD polimórficos foi realizada em planilha no programa Microsoft Excel utilizando a relação indivíduo e *primer* com suas respectivas massas moleculares com o intuito de gerar dados para uma matriz de similaridade a qual fornece as informações necessárias para os resultados finais. Os valores da planilha foram dados de acordo com a presença e ausência de bandas.

Quando um marcador está presente em um indivíduo, é fornecido ao mesmo, na planilha, o número 1 (um), caso contrário, ou seja, na ausência da banda, é fornecido o número zero (0) e no caso de dúvidas em relação ao fragmento fornecemos o número 9 (nove). Em seguida, a matriz foi gerada utilizando o programa NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*, versão 2.02), desenvolvido por Rohlf (1994).

A similaridade entre as amostras foi analisada através dos coeficientes de *Jaccard* (Sneath e Sokal, 1973). Representado na seguinte forma:

$$\text{Jaccard: } S_j = \frac{a}{a+b+c}$$

em que:

a = número de casos em que a banda está presente nos dois genótipos, simultaneamente;

b = número de casos em que a banda está presente somente no genótipo i;

c = número de casos em que a banda está presente somente no genótipo j.

A partir da matriz, os *clusters* (dendrograma) foram gerados pelo método UPGMA

(*Unweighted Pair Group Mean Average*), que é um método de média aritmética não ponderada, onde foi expresso na forma de dendrograma.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Crescimento micelial do patógeno

Houve variação na velocidade do crescimento micelial dos 22 isolados de *R. solani*, em função do meio utilizado (BDA) e das próprias características morfológicas.

Os resultados das análises de variância que estão apresentados na Tabela 6, indicam efeitos significativos ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, entre os tratamentos em relação ao crescimento micelial do fungo.

TABELA 6. Resumo da análise de variância para o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, oriundo de diferentes culturas à 25⁰C por 3 dias.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	22	178,6846	7,7689	10,34 *
Resíduo	2	0,1495	0,0747	
Total	71	213,4109	0,7517	
CV (%)	17,11			
Média	5,07			

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

As médias do crescimento micelial permitiu a divisão dos isolados do patógeno em 4 grupos. O grupo 1 estão representados pela letra A, Grupo 2 representados pela letra B, grupo 3 representados pela letra C e grupo 4 representados pela letra D, conforme ilustra a Tabela 7.

Os isolados de *R. solani* das culturas bastão do imperador, brachiaria, citros, melancia e rúcula apresentaram maior crescimento micelial, com diâmetros médios de 7,88 cm; 7,39 cm; 7,35 cm; 7,11 cm e 6,97 cm, respectivamente, à temperatura de 25⁰C durante 3 dias de incubação, os quais não diferiram significativamente entre si, enquanto que os menores crescimentos foram observados nos isolados de chama, café, e soja, cujos diâmetros médios do micélio foram respectivamente de 2,93 cm; 2,49 cm e 2,14 cm. Os isolados das demais culturas estudadas apresentaram crescimento intermediário.

Apesar dos isolados sorriso de maria, pertencente a família Asteraceae e bastão do imperador, da família Zingiberaceae, serem plantas ornamentais, apresentaram crescimento micelial *in vitro* diferentes entre si, onde o isolado sorriso de maria apresentou um crescimento micelial menor com 5,13 cm de diâmetro, que o isolado bastão do imperador com 7,88 cm de diâmetro, fato este que possa ser explicado em função da temperatura (25⁰C) estabelecida e do período de incubação (3 dias).

No trabalho de Mafia et al. (2005), observou-se tendência de maior crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, a 28⁰C, evidenciado pelo maior diâmetro médio das colônias e pelas maiores taxas de crescimento médio. Nessa temperatura, a colônia teve, em média, 8,4 cm de diâmetro após 72 horas de incubação e, portanto, taxa de crescimento equivalente a 2,8 cm.dia⁻¹.

TABELA 7. Crescimento micelial em diâmetro de *Rhizoctonia solani* oriundo de diferentes culturas à 25⁰C por 3 dias, representados com seus respectivos grupos.

Tratamentos	Diâmetro do micélio (cm)	
Bastão do Imperador	7,88 A	} Grupo 1
Brachiaria	7,39 A	
Cítricos	7,35 A	
Melancia	7,11 A	
Rúcula	6,97 A	
Teca	6,40 B	} Grupo 2
Puerária	6,17 B	
Milho	5,85 B	
Caupi	5,78 B	
Urucum	5,77 B	
Acácia	5,26 B	} Grupo 3
Sorriso de Maria	5,13 B	
Nim	4,55 C	
Pimenta do reino	4,31 C	
AG4	4,31 C	
Cupuaçu	4,27 C	} Grupo 4
Jambu	4,09 C	
Pepino	4,05 C	
AG7	3,85 C	
Repolho	3,84 C	
Maracujá	3,73 C	} Grupo 4
Chama	2,93 D	
Café	2,49 D	
Soja	2,14 D	

Médias seguidas por letras distintas entre si diferenciam os tratamentos, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Scott-Knott.

No estudo de Nechet e Halfeld-Vieira (2006) com *Rhizoctonia solani* em feijão-caupi, verificou-se que a taxa de crescimento micelial variou de 2,1 – 5,3 cm.dia⁻¹ para os isolados de mata são de 2,7 – 5,8 cm.dia⁻¹ para os isolados de cerrado.

Com relação à coloração das colônias (Figura 7A, 7B e 7C), observou-se que os isolados de chama, rúcula, AG7, AG4, puerária, citros, soja, braquiária, feijão - caupi, pepino, acácia, repolho e jambu, apresentaram colônias de coloração marrom claro (Figura 7 A), enquanto que a colônia do isolado bastão do imperador apresentou coloração marrom-alaranjado (Figura 7 B).

Por sua vez, foi observado nos isolados cupuaçu, melancia, nim, urucum, *alternária* sp., milho, teca e café, apresentaram colônias de coloração marrom escuro e anéis concêntricos bem visíveis conforme ilustra a Figura 7 C.

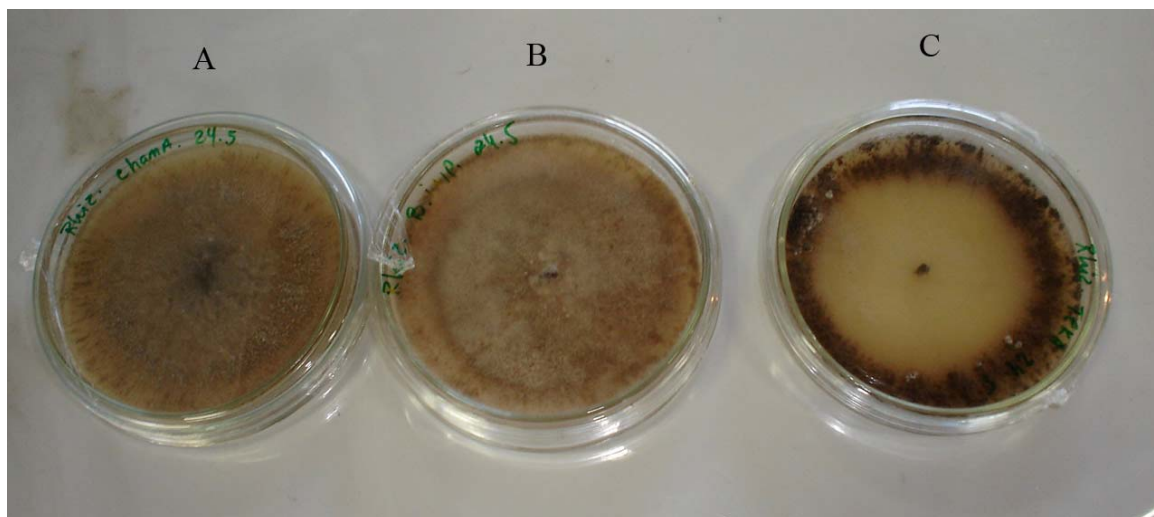


Figura 7. Crescimento micelial e coloração das colônias de *R. solani* oriundas de diferentes culturas à 25⁰C durante 10 dias. A: isolado chama (*Cayaponia espelina* (Manso) Cogn), B: isolado bastão do imperador (*Etlingera Elatior* (Jach) R. M. Sim) e C: isolado teca (*Tectona grandis* L. F). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.

A formação de microescleródios somente foi observada no período de 3 a 4 dias, numa temperatura em torno de 25⁰C, nos isolados brasileiros: isolado de melancia, nim, soja, repolho, jambu e teca, conforme ilustra a Figura 8. Fato não encontrado nos isolados referentes aos isolados do Japão (AG4) e Estados Unidos (AG7) com relação à mesma temperatura.



Figura 8. Formação de microscleródios de *Rhizoctonia solani* obtidos em meio de cultura BDA. Temperatura de 25⁰C e umidade relativa em torno de 80%, durante 3 a 4 dias. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.

Resultado similar foi obtido por Silveira et al. (2000) os quais observaram que nenhum dos isolados microsclerodiais brasileiros, foi morfológicamente idênticos aos representantes japoneses de *Rhizoctonia solani* do grupo de anastomose AG1-IB, e ausentes de microscleródios.

Por outro lado, no estudo realizado por Nechet e Halfeld-Vieira (2006), foi verificada a formação de microscleródios em isolados de *Rhizoctonia solani* em feijão-caupi, fato que não foi observado neste trabalho com a respectiva cultura.

4.2 - Teste de patogenicidade

Os 22 isolados de *Rhizoctonia solani* obtidos a partir da parte aérea de plantas de acácia, bastão do imperador, brachiaria, café, caupi, citrus, cupuaçu, chama, jambu, maracujá, melancia, milho, nim, pepino, puerária, repolho, rúcula, soja, sorriso de maria, teca, urucum e pimenta do reino mostraram patogênicos devido à presença de sintomas (queima foliar) observados num período que variaram entre 3 a 4 dias após a inoculação do fungo em folhas com ferimentos artificiais.

Inicialmente observaram-se lesões amareladas que evoluíram para manchas de coloração marrom clara seguido de marrom escuro, conforme ilustra a Figura 9. E conseqüentemente houve uma redução da área fotossintética com a evolução dos sintomas nas folhas.



Figura 9. Sintomas típicos de queima foliar induzida por *R. solani*, observados em folhas de citrus (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), após 3 a 4 dias de inoculação. Temperatura de 24^oC e umidade relativa em torno de 80%. Embrapa Amazônia Oriental, Belém- PA, 2007.

Após 8 dias de inoculação, à uma temperatura de 24^oC e umidade relativa em torno de 80%, observaram-se a formação de microescleródios na superfície das folhas com ferimentos artificiais, inoculadas com discos micelial. No entanto, em folhas destacadas na ausência de ferimento apresentaram os sintomas típicos da doença somente após 10 e 11 dias de inoculação conforme ilustra a Figura 10.

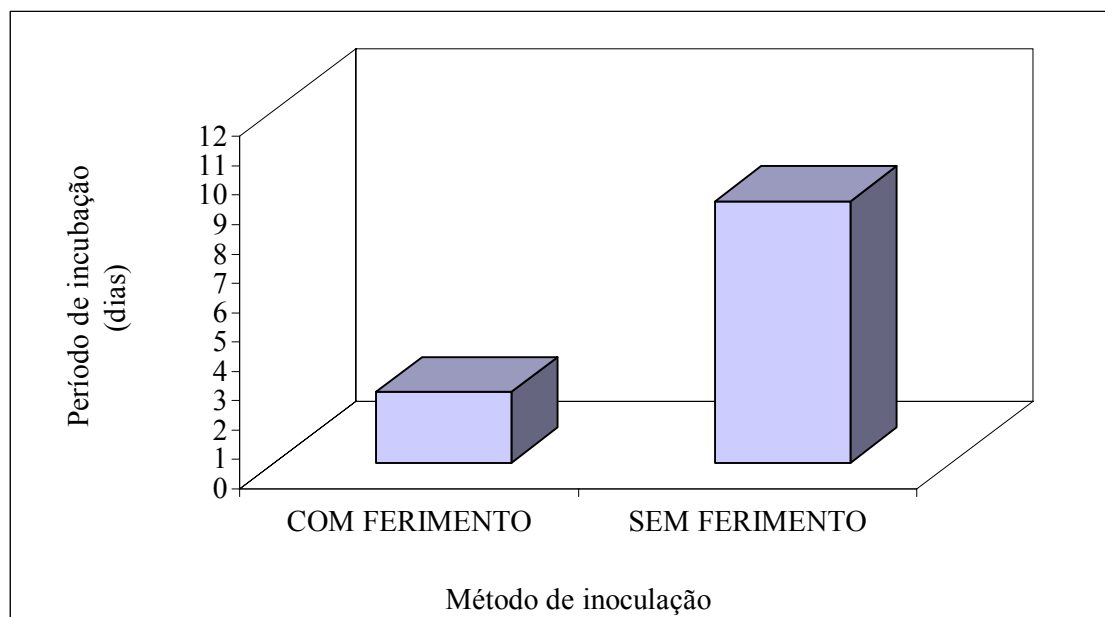


Figura 10: Período de incubação (dias) nas plantas, até o aparecimento dos sintomas em folhas destacadas, com ferimentos e sem ferimentos, inoculadas com *Rhizoctonia solani* em condições laboratoriais. Temperatura de 24^oC e umidade relativa em torno de 80%.

Relatos semelhantes foram obtidos também por Ogoshi (1987); Pascual et al., (2000), onde *R. solani* associada a doenças com sintoma de queima foliar em diversas culturas, como feijão, milho, sorgo, algodão, soja e arroz, podem pertencer ao grupo de anastomose AGI-IA ou AGI-IB, após 7 dias de inoculação do patógeno.

No Brasil, isolados de *Rhizoctonia* spp. binucleados já haviam sido relatados associados a podridão do hipocótilo na soja descrito por Fenille et al., (2002), necrose em eucalipto estudado por Silveira et al., (2002) e podridão do colo e/ou radicular no feijoeiro conforme estudos feito por Ceresini e Souza, (1997). Resultado similar também foi obtido por Silveira et al., (2000), onde eles citaram que o isolado de *Rhizoctonia solani* (RH-21), é o causador da mela do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), obtido de Linhares-ES, classificado no grupo brasileiro de *R. solani* "AG1-IB similar".

Segundo Mafia et al. (2005), estudando a queima foliar e tombamento de mudas em plantas medicinais da família Labiatae, causadas por *Rhizoctonia solani* AG1- 1B confirmou-se que com a reprodução dos sintomas da doença por inoculação artificial nas mudas e o reisolamento indireto, em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), do mesmo fungo a partir de tecidos doentes confirmou-se *Rhizoctonia solani*, como agente etiológico da doença, conforme é observado no presente trabalho.

4.3 - Variabilidade Genética

O procedimento seguido na execução deste trabalho permitiu detectar que as extrações de DNA genômico possibilitaram a obtenção de DNA em concentrações que variaram de 10 ng/ μ L a 50 ng/ μ L.

Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 11 (RAPD). Obteve-se um total de 17 fragmentos RAPD, com tamanhos variando de 800 a 1800 pb (pares de bases nucleotídicas), amplificados pelos 2 primers utilizados (OPA2 e OPA3) da *Operon*, gerando 100% de polimorfismo dos 14 isolados, sendo que o OPA2 amplificou nove (9) bandas e o OPA3, oito (8) bandas polimórficas.

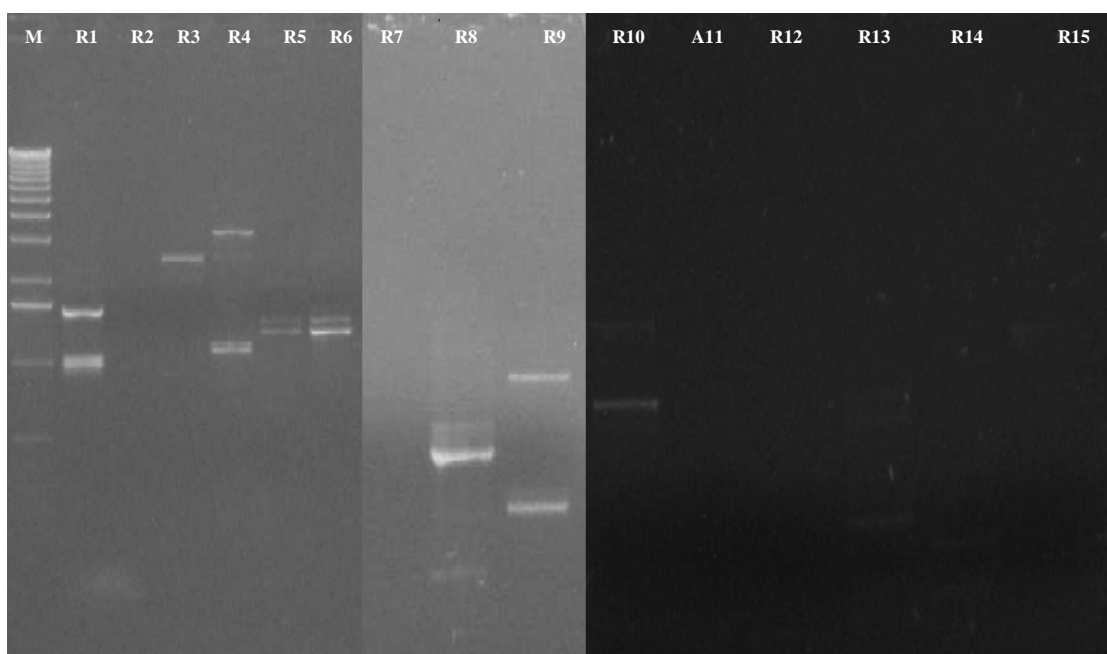


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose, mostrando o polimorfismo de *Rhizoctonia solani*, pela técnica de RAPD com o primers OPA 2. M corresponde ao marcador *Ladder* 1 kb, e os genótipos analisados são: R1 - chama (*Cayaponia espelina* (Manso) Cogn.), R2-rúcula (*Eruca sativa* (L.) Cav.), R3- bastão do imperador (*Etlingera elatior* (Jach) R. M. Sim), R4 - cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.), R5- melancia (*Citrullus vulgaris* Schrad), R6- puerária (*Puerária phaseoloides* (Roxb.) Benth), R7- AG7, R8- AG4, R9- nim (*Azadirachta indica* A. Juss), R10- citrus (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck, A11- alternária spp, R12 milho (*Zea mays* L.), R13- acácia (*Acácia farnesiana* (L.) Willd.), R14- café (*Coffea arabica* L.), R15- controle negativo (sem DNA).

As estimativas de similaridade genéticas, entre os isolados, obtidas a partir do coeficiente de *Jaccard* estão presentes na Figura 12, onde a similaridade genética média encontrada entre os isolados de *R. solani* foi de 21,71%.

A maior similaridade genética foi obtida entre as culturas R7 referente ao isolado de melancia e R8, isolado nim com índice igual a 1,00. A segunda maior similaridade foi de 75%, entre R5 (isolado de *R. solani* do grupo de anastomose AG7) e R6 (isolado do grupo de anastomose AG4).

Grande parte das amostras apresentou pouca ou nenhuma similaridade entre os isolados.

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14
R1	1,00													
R2	0,50	1,00												
R3	0,13	0,20	1,00											
R4	0,13	0,00	0,00	1,00										
R5	0,50	0,50	0,00	0,20	1,00									
R6	0,43	0,40	0,00	0,17	0,75	1,00								
R7	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00							
R8	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00						
R9	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00					
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00				
R11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00			
R12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	1,00		
R13	0,13	0,00	0,00	0,50	0,20	0,40	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00	0,00	1,00	
R14	0,20	0,29	0,29	0,00	0,13	0,25	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,13	1,00

Figura 12: Matriz de similaridade genética estimada pelo índice de *Jaccard*, para todos os isolados analisados de *Rhizoctonia solani*.

Na Figura 13, encontra-se o dendrograma gerado pelo método UPGMA, através do programa NTSYS-pc, 2.02. A partir da média encontrada, a clusterização (Figura 13) provocou a separação dos isolados em sete (7) grupos principais.

A maior similaridade genética encontrada entre os isolados foi R7 (AG7) e R8 (AG4) com 100%. A segunda maior similaridade foi R5, isolado melancia e R6, isolado puerária

com 75% enquanto R11, isolado de *alternária* sp. ficou completamente isolado dos demais isolados com nenhuma de similaridade genética fato explicado por pertencer a um grupo taxonomicamente distintos.

Quatro grupos foram formados por duplas, os isolados R10, isolado citrus e R12, isolado milho com 50% de similaridade, R7 isolado de *R. solani* do grupo de anastomose (AG7) e R8 do grupo (AG4) com 100% de similaridade. O isolado R13, isolado acácia e R4 isolado cupuaçu com 50%. E o isolado de R3 isolado bastão do imperador e R14, isolado café com 29% de similaridade genética, conforme ilustra a Figura 13.

Apenas um grupo apresentou maior número de isolados, sendo constituído por R1 isolado chama, R2 isolado rúcula, R5 isolado melancia e R6 isolado puerária com 46% de similaridade. E dividiu-se em dois subgrupos, R5 isolado melancia e R6 isolado puerária com similaridade genética de 75%, e R1 isolado chama e R2 isolado rúcula com 48% de similaridade genética (Figura 13).

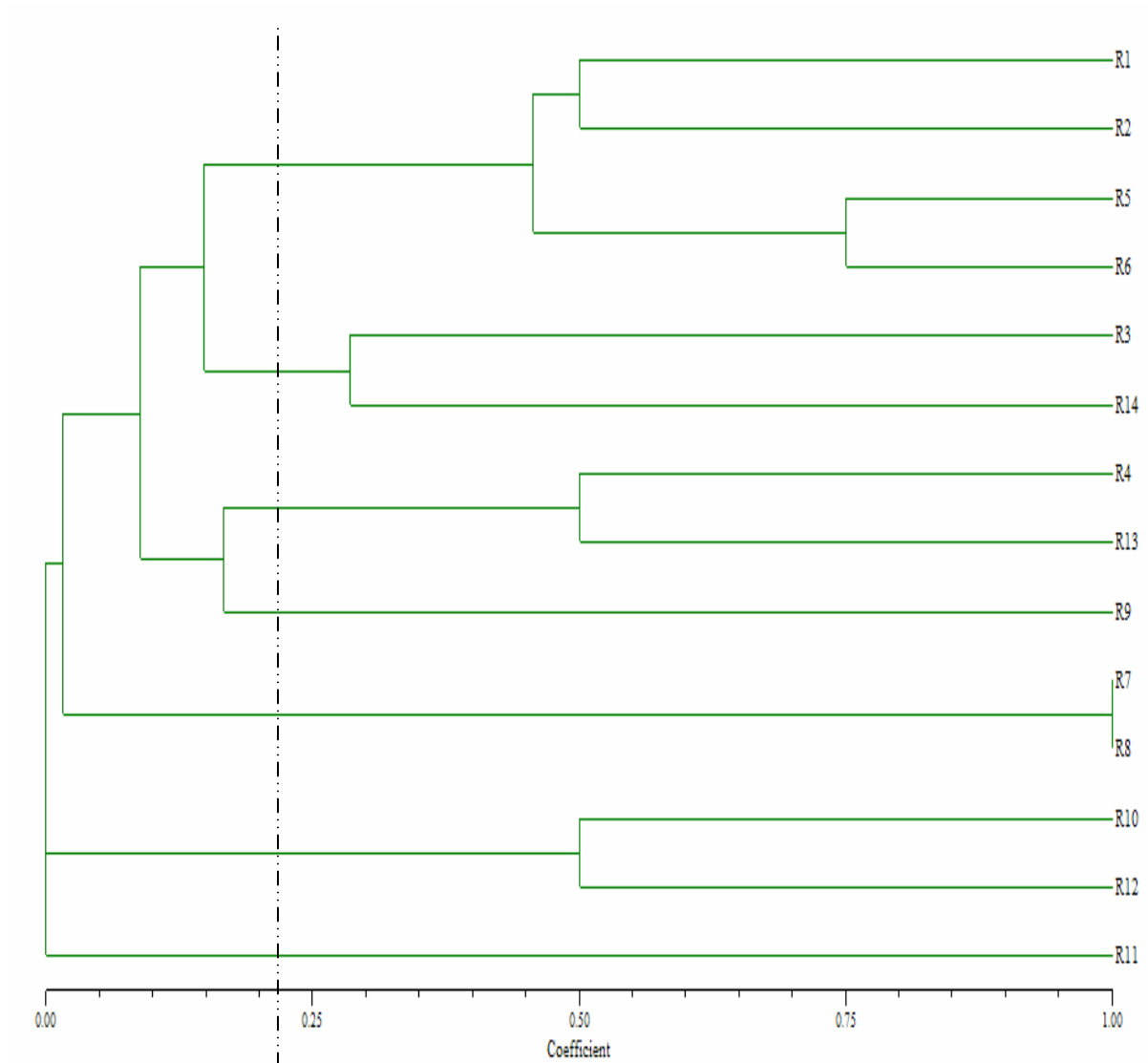


Figura 13: Dendrograma gerado pelo método de análise UPGMA para o coeficiente de *Jaccard*, a partir das 17 bandas polimórficas geradas pelo RAPD, dos 13 isolados de *Rhizoctonia solani* e 1 isolado de *alternária* sp.

Os isolados brasileiros (R1, R2, R3, R4, R5, R6, R9, R10, R11, R12, R13, R14), apresentaram diferença no padrão de polimorfismo comparados com isolado japonês (R8) e isolado procedente aos Estados Unidos (R7), uma explicação para esta diferença seria o fato do isolamento reprodutivo (origem geográfica) ser mais pronunciado entre populações de *R. solani* AG4 e AG7, que é um patógeno estritamente do solo, do que entre populações de *R. solani* brasileiro, patógeno proveniente de parte aérea foliar das culturas.

Sartorato, Nechet e Vieira (2006), estudando 23 isolados de *Rhizoctonia solani* em feijão caupi, nos ecossistemas de mata e cerrado, através do método RAPD, observaram que

os isolados coletados no cerrado são mais divergentes entre si que os isolados coletados no ecossistema de mata.

A existência da divergência genética entre isolados/populações do fungo *Rhizoctonia solani* já foi observada pelos autores LIU e SINCLAIR (1992) e GOMES et al. (2003). Esses autores afirmaram que o fungo é altamente variável, o que explica a divergência encontrada entre os isolados conforme mostra este trabalho. Variações quanto às exigências para crescimento micelial *in vitro* dos isolados, decorrentes do isolamento, entre os isolados brasileiros, japones e dos Estados Unidos, podem explicar as variações obtidas nos padrões de polimorfismo dos isolados. Literatura precedente também confirma haver abundante variabilidade genética na população mundial de *Rhizoctonia solani* do grupo de anastomose AG1 e AG4 (REYNOLDS et al., 1983; VILGALYS, 1988; LIU e SINCLAIR, 1993; VILGALYS e GONZALES, 1990).

Desta forma, estes resultados mostram que o uso de marcadores RAPD, pode ser de grande utilidade para a identificação e diferenciação de importantes fungos fitopatogênicos, como referido nos trabalhos de SREENIVASAPRASAD et al. (1993, 1994); CORREL et al. (1993); CROUS et al. (1993); SHERRIFF et al. (1994); VASCONCELOS et al. (1994); SHERRIFF et al. (1995) e VIEIRA (1996).

5- CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

1. A análise de variância mostrou diferença significativa no crescimento micelial dos 22 isolados estudados.
2. Os isolados de *R. solani* mostraram-se patogênicos as plantas testadas, causando sintomas típicos de queima das folhas nas plantas.
3. O uso da técnica RAPD permite determinar a variabilidade genética entre os 13 isolados de *R. solani* provenientes do Estado do Pará (Brasil), Estados Unidos e Japão.
4. De acordo com o perfil polimórfico dos isolados de *R. solani*, foi observada a formação de sete grupos genotípicos.
5. Os parâmetros utilizados para estudos de variabilidade genética de *R. solani*, como características morfológicas e molecular podem ser utilizados na diferenciação fisiológica do fungo.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G.C. *Thanatephorus cucumeris (Rhizoctonia solani)*, a species complex of wide host range. *Advances in Plant Pathology*, London, v.6, p.535-552, 1988.
- ALBERT, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; TAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 294p. 1997.
- ALFENAS, A.C., FERREIRA, F.A., BARBOSA, M. M. Fungos associados à podridão de estacas de eucalipto para enraizamento. **Fitopatologia Brasileira**, v.13, p.142, 1988.
- ANDERSEN, W. R.; FAIRBANKS, D. J. Molecular markers: Important tools for plant genetic resource characterization. **Diversity**, v. 6, n. 3,40, p. 51-53. 1991.
- ANDERSON, N.A. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, St. Paul, v.20, p.329-344, 1982.
- ARAGÓN, L. E. **Educação, Ciências e Tecnologia: Bases para o desenvolvimento sustentável da Amazônia**. Belém. Associação de Universidades Amazônicas, UNESCO, 1997.
- ATKINS JR., J.G; LEWIS, W.D. *Rhizoctonia* aerial blight of beans in Louisiana. **Phytopatology**, 42: 1, 1952.
- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O.F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. **Heredity**, v.73, p. 117-123, 1994.
- BARRETO, M.; SCALOPPI, E.A.G. **Doenças Do Amendoim (*Arachis hypogaea* L.), 1999 (BOLETIM TÉCNICO)**.
- BECKMANN, J.S. **Genomic Genetics**. Agricultural Research Organization, The Valcani Center, Bet Dagan, Israeli, n ° 2658-E. Series. 15 pages. 1989.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 4^a ed. Viçosa: UFV, 2005. 525 p.

BOTELHO, S.A.; RAVA, C.A.; LEANDRO, W.M. Supressividade induzida a *Rhizoctonia solani* pela adição de diferentes resíduos vegetais. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 35-42, 2001.

BUTLER, E.E; BOLKAN, H. A medium for heterokaryon formation in *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v.63, p.542-543, 1973.

CARDOSO, J. E. **Avanços na pesquisa sobre a mela do feijoeiro no estado do Acre**. Rio Branco: EMBRAPA - UEPAE Rio Branco, 1981. 29 p. (Boletim de Pesquisa, 1).

CARDOSO, J.E. **Doenças do feijoeiro causadas por patógenos de solo**. Goiânia: Embrapa-CNPAF, 1990. 30p. (Embrapa-CNPAF. Documentos, 30).

CARDOSO, J. E. Podridões radiculares, p.151- 64. In: SARTORATO, A.; RAVA, A. (Eds.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: Embrapa-SPI. 1994, 300p.

CARLING, E.E.; SUMMNER, D.R. *Rhizoctonia*. In: SINGLETON L.L.; MIHAIL, J.D.; RUSH, C.M. (Eds). *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. Minnesota, USA: APS Press, 1992. p.157-165.

CARVALHO, A.O., ALFENAS, A.C., DEMUNER, N.L. Patogenicidade de fungos isolados de estacas de eucalipto para enraizamento. **Fitopatologia Brasileira**, v.14, p.122, 1989.

CARVALHO, A.O., BROMMONSCHENKEL, S.H., ALFENAS, A.C., FERREIRA, F.A. Identificação de culturas de *Rhizoctonia* isoladas de eucalipto e leucena. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.121, 1987.

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*) no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**; v. 23, p. 14-24, 1997.

COOPERACION internacional através de lãs pruebas internacionales de arroz. Cali: CIAT, 1978. (Noti- CIAT. Serie AS- 6).

COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul. APS Press, 1983.

CORREL, J. C., RHOADS, D. D; GUEBER, J. C. Examination of mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism, DNA fingerprints and Randomly Amplified Polymorphic DNA of *Colletotrichum orbiculare*. **Phitopathology**, v. 83, p. 1199 – 1204, 1993.

CROUS, P. W.; ALFENAS, A. C.; WINGFIELD, M. J. *Calonectria scoporia* end *Calonectria morginii* sp. Nov., and variation among isolantes of their *Cylindrocladium anamorphs*. **Micology Research**, v. 6, p. 701- 708, 1993.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2003. v.2.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, J. A.; CARNEIRO, P. C. S. Divergência genética. In: CRUZ, C. D.; REGAZZI, J. A.; CARNEIRO, P. C. S. (ed.). **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2004A. v. 1, Cap. 8, p. 377-413.

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. GQMOL. **Aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos**. Versão 2004. Viçosa, MG: UFV, 2004.

CHET, I.; BAKER, R. Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology**, v.70, p. 994 - 998, 1980.

DANIELS, Saprophytic and parasitic activities of some isolates of *Corticium solani*. **Trans. Brit. Mycol, Soc.**, v. 46, n. 4, p. 385-502, 1963.

DUARTE, M. de L. R.; ALBUQUERQUE, F. C de. **Sistemas de produção da Pimenta-do-Reino**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2005.

FAIRBANKS, D. J.; ANDERSEN, W. R.; MAUGHAM, P. J. **Analyses for biological resource characterization**. A laboratory manual. Provo, Utah: Brigham Young University, 1991, 27 p.

FALK, D.A. Integrated strategies for conserving plant genetic diversity. *Ann. Missouri Bot. Gard*, v. 77, p. 38-47, 1990.

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

FERREIRA, F.A. **Patologia Florestal**: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa, MG, UFV, SIF, 1989. p. 570.

FERREIRA, F.A. Queima foliar do eucalipto por *Rhizoctonia solani* em jardim clonal e plantas no campo na região Amazônica. **Fitopatologia Brasileira**, v. 16, p. 36, 1991.

FERREIRA, F.A., SILVEIRA, S.F. Queima de folhas de eucalipto no estado de SP, causada por *Rhizoctonia* binucleada. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p. 366, 1995.

FERREIRA, M.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

GALINDO, J. J.; ABAWI, G. S.; THURSTON, H. D. & GALVEZ, G. Sources of inoculum and development of bean web-blight in Costa Rica. **Plant Disease**. V. 67, p. 1021, 1983b.

GIBSON, J. P.; SMITH, C. The incorporation of biotechnologies into animal breeding strategies. In: MOO-YOUNG, M.; BABINK, L. A.; PHILIPS, J. P. **Animal biotechnology: comprehensive Biotechnology**. 1989 p. 204-231.

GODOY, L. C.; CARDOZO, R. M.; MORAES, G. V. Avaliação de diversidade genética em subespécies e cruzamento de avestruzes (*Struthio camelus*) com o uso de marcadores RAPD. **Animal Sciences**, v. 27, n. 2, p. 199-206, abr./jun, 2005.

GOMES, M.V.L., BRESEGHELLO, L., SILVA, W.S. & PETROFEZA, S. **Diversidade genética em populações de *Rhizoctonia solani* isolados de feijoeiro em sistema de produção irrigado no cerrado**. Resumos, 49º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia SP. 2003. p. 1149.

HALL, R. Electrophoretic protein profiles as criteria in the taxonomy of fungi and algae. Symposium on the use of electrophoresis in the taxonomy of algae and fungi. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** 100:253-259. 1973.

REZENDE, D.V.; FERREIRA, F.A. Epifitismo de linhagens de *Rhizoctonia solani* na doença queima de folhas do eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, p.204, 1992.

SANTOS, A.B.C., FERNANDES, G.M.L. Ocorrência de rubelose e queima de folhas do eucalipto no estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.393, 1996.

SARTORATO, A., NECHET, K.L. & HALFED-VIEIRA, B.A. Diversidade genética de isolados de *Rhizoctonia solani* coletados em feijão-caupi no Estado de Roraima. **Fitopatologia Brasileira** 31:297-301. 2006.

SILVEIRA, S.F. **Etiologia e controle químico da mela de estacas para enraizamento e da queima de folhas do eucalipto, causadas por *Rhizoctonia* spp.** Viçosa, MG: UFV, 1996. 142 p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa, 1996.

HU, J.; QUIROS, C.F. Identification of broccoli and cauliflower cultivar with RAPD markes. **Plant Cell Reports**. v.10, p. 505-511, 1991.

INSTITUTO INTERAMERICANO DE CIÊNCIAS AGRÍCOLAS, São José, Costa Rica. La chasparria Del frijol provocada por *Pellicularia filamentosa*. São José, 1962. p. 30-1 (IICA. Informe técnico).

KOBAYASHI, N.; KO, W.H. Nature of suppression of *Rhizoctonia solani* in Hawaiian soils. **Transactions of the British Mycological Society, London**, v. 84, p. 691-694, 1985.

KRUGNERT.L. Doenças do eucalipto - Eucaliptus spp. In: GALLI, F. **Manual de Fitopatologia**, São Paulo: Agronômica Ceres, 1980, v.2, p. 275-296.

LANDERGREN, U. **Molecular mechanics of nuceic acid sequence amplification**. T.I.G. v.9, n.6, p.199-204, 1993.

LIU, Z.L., NICKRENT, D.L.; SINCLAIR, J.B. Genetic relationships among isolates of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 based on isozyme analysis. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 12, p. 376-382. 1990.

LIU, Z.L.; SINCLAIR, J.B. Genetic Diversity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2. **Phytopathology**, v. 82, p. 778-787, 1992.

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

LIU, Z.L.; SINCLAIR, J.B. Diferentiation of intraespecific groups within anastomosis group 1 of *Rhizoctonia solani* using ribosomal DNA internal transcribed spacer and isozyme comparisons. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 15, p. 272-280, 1993.

LUKE, W. J.; PINCKARD, J.A. & WANG, S. L. Basidiospore infection of cotton bolls by *Thanatephorus cucumeris*. **Phytopathology**, v. 64, p. 107-11, 1974.

MAFIA, R.G., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A., VENTURA, G.M., FERREIRA, E.M., NEVES, I.F., VANETTI, C.A. & SILVA, C. Queima foliar e tombamento de mudas em plantas medicinais causadas por *Rhizoctonia solani* AG1 - 1B. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 302-306, 2005.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. New York: Academic, Press, 1986. p.369-390.

MATZ, J.A. *Rhizoctonia* of the fig. **Phytopatology**, v. 7, p. 110-8, 1917.

MATZ, J. **Uma enfermidade danina de la habichuela**. Porto Rico: 1921. p. 8 (Insular Sta. Circ., 57).

McNEELY, J. A.; MILLER, K. R.; REID, W.; MITTERMEIER, R. A.; WERNER, T. B. **Conserving the world's biological diversity** – Gland, Switzerland, Washington: IUCN/WRI/CI/WWF-US/World Bank, 1990. p. 193.

MILACH, S. C. K.; RINES, H. W.; PHILLIPS, R. L. **Molecular genetic mapping of dwarfing genes in oat**. Theoretical and Applied Genetics, v. 95, p.783 - 790, 1997.

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 17-28.

MÜHLEN, G.S. **Avaliação da diversidade genética de etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com marcadores de DNA: RAPD, AFLP e microssatélites**. Piracicaba, 176 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1999.

MILLS, P.R., SREENIVASAPRASAD, S. & BROWN, A.E. Detection of the antracnose pathogen *Colletotrichum*. In: SCHOTS, A., DEWEY, F.M.; OLVER, R. (eds.) **Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Qualification**. Wallingford: Redwood Press. 1994. p. 183-189.

MORALES, E. A. V.; VALOIS, A. C. C. Recursos Genéticos Vegetais Autóctones e seus usos no desenvolvimento sustentável. Cadernos de Ciências e Tecnologia, Brasília, v. 17, n. 2, p. 11-42, maio/ago. 2000.

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**, v.31, n.5, set./out., 2006.

NEWMAN LUZ, E. D. M. **Principais enfermidades do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) no estado do Acre**. I. Microrregião do Alto Purus. Rio Branco, 1978. 23p. (Comunicado Técnico, 1).

OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intra-specific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, p. 125-143. 1987.

ONESIROSAN, P. T. Seed borne and weedborne inoculum in web-blight of cowpea. **Plant Dis. Repr.**, v. 59, n. 4, p. 338-339, 1975.

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

PARMETER JUNIOR, R.; SHERWOOD, R.T.; PLAT, W.D. Anastomosis growing among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 59, p. 1270-1278, 1969.

PASCUAL, C.B., TODA, T., RAYMONDO, A.D. & HYAKUMACHI, M. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. **Plant Pathology**, v. 49, p. 108-118, 2000.

PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho (*Zea mays* L.). In: KIMATI, H. et. al. **Manual de fitopatologia, doenças das plantas cultivadas**, v.2, p. 538-555, 1997.

POLLASTRE, J. R. R. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2002.

PUNJA, Z.K. Influence of nitrogen and calcium compounds on development of disease due to *Sclerotium rolfsii*. In: ENGELHARD, A.W. (Ed.). **Soilborne plant pathogens: management of diseases with macro and microelements**. St. Paul: The American Phytopathology Society, 1989. p.75-89.

REIF, J. C.; MELCHONGER, A. E.; FRISCH, M. Genetical and mathematical properties of similarity and dissimilarity coefficients applied in plant breeding and seed bank management. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 1, p. 1-7, jan./fev. 2005.

REIS, E.M. Solos supressivos e seu aproveitamento no controle de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1991. p. 181-193.

REYNOLDS, M., WEINHOLD, A.R.; MORRIS, T.J. Comparison of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by acrilamide gel electrophoresis of soluble proteins. **Phytopathology**, v. 73, p. 903-906, 1983.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.80**. New York: Exeter Software, 1991.

ROSATO, Y. B. et al. Diagnóstico molecular de doenças em plantas: detecção de fitopatógenos bacterianos. *In*: SERAFINI, L. A. et al. (ed) **Biotecnologia: avanços na agricultura e agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002, cap. 3, p. 71-100.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.; HIGUCHI, R. H.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ELRICH, H. A. Primer – detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, p.487-491, 1988.

SARTORATO, A.; NECHET, K.L.; HALFELD-VIEIRA, B.A. Diversidade genética de isolados de *Rhizoctonia solani* coletados em feijão-caupi no estado de Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.3, mai./jun., 2006.

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. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, p. 27-36, 2000.

SILVEIRA, S. F.; ALFENAS, ACELINO C. Análise de proteínas e isoenzimas de isolados de *Rhizoctonia spp.* patogênicos a *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**. 2002, v. 27, n. 1, 2002, p. 33-41. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582002000100005&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 20 mar. 2007.

SHERWOOD, R.T. Morphology and physiology in four anastomosis groups in *Thanalephorus cucumeris*. **Phytopathology**, Lancaster, v.59, p. 1924-1929, 1969.

SHERRIFF, C., WHELAN, M. J., ARNOLD, G. M. & BAYLEY, J. A. rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum gramilicola* and *C. sublineolum*. **Mycology Research**, v. 99, p. 475 – 478, 1995.

SHERRIFF, C., WHELAN, M. J., ARNOLD, G. M.; LAFAY, J. F., BRYGOO, Y. & BAYLEY, J. A. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. **Experimental mycology**, v. 18, p. 121 – 138, 1994.

SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. **Identification of Rhizoctonia species**. Minnesota: USA. APS Press, 1991.

SOUTO, E. R.; TESSMAN, D. J.; NUNES, W. M. C. Métodos de PCR aplicados à fitopatologia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, v. 33, p. 27, 2000. Belém: PA.

SREENIVASAPRASAD, S., BROWN, A. E; MILLS, P. R. Coffea berry disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloesporioides*. **Micology Research**, v. 8, p. 995 – 1000, 1993.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E; MILLS, P. R. Nucleotide sequence of the rDNA spacer 1 enables identification of isolates of *Colletotrichum* as *c. acutatum*. **Mycology Research**, v. 98, p. 186 – 188, 1994.

STALPERS, J.A., ANDERSEN, T.F. **A synopsis of the taxonomy of teleomorphs connected with *Rhizoctonia* S. L.** In: Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. & Dijst, G. (eds.) *Rhizoctonia* species: Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht, Netherlands. Kluwer Academic Publishers. 1996. p. 37-47.

UNEP. **Convention on biological diversity**. Rio de Janeiro: United Nations Environment Programme (UNEP), 1992. 24 p. (Na. 92-7807).

VASCONCELOS, M. J. V., MACHADO, M. A., ALMEIDA, A. M. R., HENNING, A. A., BARROS, E. G. & MORREIRA, M. A. Differentiation of *Colletotrichum truncatum* isolates by Randon Amplified Polymorphic DNA. *Fitopatologia brasileira*, v. 19, p. 520 – 523, 1994.

VERZIGNASSI, J.R.; FERNANDES, C. D. Doenças em forrageiras: gado de corte divulga. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. v. 50, p. 3.

VIEIRA, M. G. G. C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro**. 1996. (Tese – Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

VIEIRA, E. H. N.; RAVA, C. A. **Sementes de feijão: produção e tecnologia**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. 270 p.

VILGALYS, R. 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*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p.135-155, 1994.

VILGALYS, R. e GONZALES, D. Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms in *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v. 80, p. 151 - 158, 1990.

VITTI, A.N., KRUGNER, T.L., VIEIRA, J.D. Etiologia da podridão de estacas de *Eucalyptus* spp. em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p. 126, 1989.

WEBER, G. F. Web-blight, a disease of beans caused by *Corticium microsclerotia*. **Phytopathology**, v. 29, p. 559 - 75, 1939.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Genomic fingerprints produced by PCR with consensus tRNA gene primers. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 4, p. 861-866, 1990.

WHIPPS, J.M. Developments in the biological control of soilborne plant pathogens. In: CALLOW, J.A. (ed.). **Advances in botanical research**. Birmingham: Academic, Press, 1997, v. 26, p. 1-84.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J.A. Resistência a doenças induzida pela nutrição mineral das plantas. In: FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (eds.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993. v.1, p. 275-318.

ZAUMEYER, W. J.; THOMAZ, H. R. A monographic study of bean diseases and methods for their control. Washington: USDA, 1957. p. 63-5 (Technical Bulletin, 868).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento do potencial de produtividade da maioria das espécies agronômicas vem ocorrendo de forma consistente desde o século XX. Recentemente, a diversidade de procedimentos científicos utilizados no melhoramento de plantas foi expandida com o desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos, de biologia molecular e celular e da citogenética. Um dos maiores desafios no melhoramento de plantas é a identificação de indivíduos ou progênies que contêm a combinação gênica desejável para as características de interesse.

As genéticas quantitativas e mendeliana forneceram os principais subsídios para o melhoramento de plantas. A genética quantitativa, entretanto, somente fornece informações superficiais sobre a estrutura genômica, ao passo que a molecular complementa as genéticas quantitativas e mendelianas para o entendimento da ação gênica.

Os marcadores moleculares podem ser utilizados para estimar a diversidade genética, facilitar a seleção genotípica, identificar germoplasma, construir mapas genéticos e obter informações sobre a estrutura das características quantitativas. Quando o fenótipo de um ou mais marcadores é conhecido nos dois genitores, é possível determinar a origem de uma progênie pela análise molecular. A paternidade de um indivíduo pode ser testada, se conhecido o padrão dos marcadores moleculares do indivíduo e dos possíveis genitores.

A estratégia de utilização de técnicas biotecnológicas assume importância em programas de seleção e manutenção de germoplasma de *Rhizoctonia solani*, bem como o conhecimento da diversidade morfológica e genética do patógeno pode ser de grande valia em um programa de melhoramento genético, uma vez que pode auxiliar os melhoristas na identificação de novas fontes de resistência.

O objetivo geral deste trabalho foi analisar a diversidade genética do patógeno e ficou constatado que *Rhizoctonia solani*, mesmo sendo a maioria do mesmo local de origem e de hospedeiros distintos, apresentaram diversidade genética entre todos os isolados.

É necessário chamar atenção para o fato de que, a diversidade genética entre os isolados demonstra o potencial de seu aproveitamento em programas de melhoramento genético, uma vez que pode auxiliar os melhoristas na identificação de novas fontes de resistência.

Embora a estratégia de amostragem empregada neste estudo fosse, provavelmente, suficiente para maximizar a detecção de diversidade genética, amostragem adicional em áreas

maiores é necessária para elucidar a magnitude da clonalidade e/ou da recombinação em populações locais do patógeno.