Original Article

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, GENÉTICA E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Rhizoctonia solani* PROVENIENTES DE ALGODOEIROS NO BRASIL

MORPHOLOGICAL, GENETIC CHARACTERIZATION AND PATHOGENICITY OF Rhizoctonia solani *ISOLATES FROM COTTON IN BRAZIL*

Amanda Cabral Corrêa OLIVEIRA[1]; Paulo Estevão de SOUZA[2]; Edson Ampélio POZZA[2]; Antônia dos Reis FIGUEIRA[2]; Gabriel Dornelas AVELAR[3]; Eliane Aparecida GOMES[4]; Fernando Pereira MONTEIRO[3]

1. Universidade Federal de Lavras - UFLA, Departamento de Fitopatologia, Lavras, MG, Brasil. amandacco@hotmail.com; 2. Professor(a), Doutor(a), Universidade Federal de Lavras, UFLA, Departamento de Fitopatologia, Lavras, MG, Brasil; 3. Doutorando, Departamento de Fitopatologia - UFLA, Lavras, MG, Brasil; 4. Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brasil.

RESUMO: A espécie *Rhizoctonia solani* é um patógeno importante na cultura do algodão associada a doenças conhecidas como tombamento e mela. A variabilidade entre os isolados são extremamente importantes, porque existem diferenças entre os grupos de anastomose, tomadas como aqueles isolados capazes de trocar informações genéticas entre si. A caracterização morfológica, quando confirmada pela a caracterização genética fornece informações concretas sobre a distribuição do isolados quando agem como um agente patogênico. O objetivo foi identificar e caracterizar os grupos de anastomose no Brasil e confirmá-los pela caracterização genética. Foram consideradas 51 isolados de *Rhizoctonia solani* com o objetivo de caracterizar os grupos de anastomose e determinar a patogenicidade. A caracterização morfológica foi realizada observando-se o número de núcleos, morfologia da colônia e identificação de grupos de anastomose (AG). Na caracterização genética foram sequenciados e analisados os fragmentos genômicos contendo as regiões 5.8 S, ITS1 e ITS2, comparando-se os isolados listados no GenBank. A patogenicidade foi avaliada utilizando a escala de infecção com graus que variam de 1 a 4. Considerando-se o AG foram identificados 36 de 51 isolados como AG-4 e dois isolados como AG-7, 13 isolados não tiveram classificação. Em análises moleculares foram confirmados os 36 isolados identificados pela caracterização morfológica e mais 10 isolados como AG-4. Todos os isolados AG-7 foram confirmados e encontrado mais um nas análises moleculares. Para a patogenicidade verificou-se que cinco isolados não diferem do controle. A virulência intermediária e alta virulência foram observadas em 16 e 24 isolados, respectivamente, com médias 2,52-3,3 e 3,4-3,9.

PALAVRAS-CHAVE: Algodão (*Gossypium hirsutum* L.). Necrotrófico. Tombamento. Biologia molecular. Virulência

INTRODUÇÃO

Rhizoctonia solani Kühn é a fase assexuada de *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk, um basidiomiceto da família Ceratobasidiaceae (SNEH et al., 1991). O conhecimento de características morfológicas, culturais, grupos de anastomose (AG) e de patogenicidade das populações de *R. solani* pode elucidar importantes aspectos ligados à sua etiologia e epidemiologia, fornecendo subsídios para o estabelecimento de medidas de controle mais eficientes no campo (OGOSHI, 1987). Os AGs podem ser caracterizados pela manifestação de compatibilidade somática entre os indivíduos, através da anastomose de hifas (fusão). Há isolados representando diferentes AGs em função da incompatibilidade desta reação entre alguns grupos (ANDERSON, 1982). Existem reconhecidos quatorze grupos de anastomose de hifas em *R. solani* e numerosos subgrupos (SNEH et al., 1991; CARLING et al., 1999).

Em algodoeiro, o grupo de anastomose AG-4 é identificado frequentemente como o agente etiológico do tombamento em pré e pós-emergência (SINCLAIR, 1965; MOUSTAFA-MAHMOUD et al., 1993; GOULART, 2001; SANTOS et al., 2005), bem como na recente doença conhecida por "mela do algodoeiro", em que os sintomas iniciais caracterizam-se por lesões nas bordas dos cotilédones, as quais evoluem para o encharcamento, seguida de destruição total dos cotilédones e morte da plântulas. Goulart et al. (2011) comprovaram a ocorrência de mela por *R. solani* AG4-HGI em plântulas de algodoeiro no Brasil, sendo que em casos mais severos tem levado a ressemeadura. Isolados de AG-7 foram registrados na Geórgia e no Mississippi, EUA, também causando tombamento em algodoeiro (BAIRD, 1997; BAIRD et al., 2000). Os isolados de *R. solani* AG-4 e AG-7 têm hospedeiros, morfologia e produzem sintomas similares; consequentemente, isolados AG-7 nos Estados Unidos podem ter sido equivocadamente identificados como AG-4 (BAIRD

Received: 20/09/12
Accepted: 20/02/14

et al., 2000). O último grupo de anastomose a ser identificado, foi o AG-13; os isolados foram obtidos de raízes doentes de algodoeiro em campos da Geórgia (CARLING et al., 2002).

No Brasil, o principal agente causal do tombamento de plântulas é *R. solani* AG-4, devido à frequência com que ocorre (mais de 95% dos casos) e pelos danos causados nas plântulas durante a fase de estabelecimento da lavoura (GOULART, 2007). Rosa et al. (2005) relataram também a associação não patogênica do AG-7 à batata em áreas de cultivo de Ponta Grossa, PR. Entretanto, não foram encontrados relatos de *R. solani* AG-11 e AG-13 associado ao algodoeiro no país.

Para inferir relações taxonômicas entre os diferentes AGs de *R. solani* por métodos moleculares, utiliza-se extensivamente o operon, que codifica o RNA ribossomal (rRNA) (WHITE et al., 1990; GONZALES et al., 2001), além da sequência de nucleotídeos das regiões espaçadoras internas do rDNA (ITS1 e ITS2), os quais podem embasar a proposição de uma nova classificação (OGOSHI, 1987; SNEH et al., 1991; LIU; SINCLAIR, 1993). Meinhardt et al. (2002), produziram um padrão de bandas específico para o grupo de anastomose AG-4 e seus subgrupos, que permitiu identificar onze genótipos entre os dezoito isolados de *R. solani*, obtidos de feijão. Oliveira (2008) avaliando isolados padrão e de campo, por árvore filogenética observou a aproximação entre os grupos de anastomose AG-4 e AG-7, com 93% de similaridade, enquanto entre isolados AG-4, a similaridade foi de 100%.

Assim, objetivou-se neste estudo, identificar os isolados de *Rhizoctonia solani* obtidos em áreas produtoras de algodão, nos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, classificá-los quanto ao grupo de anastomose, por análises morfológicas e genéticas, bem como confirmar sua patogenicidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Epidemiologia e Fitovirologia Molecular do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

Caracterização morfológica dos isolados de *Rhizoctonia solani*

Para a obtenção dos 51 isolados foram selecionadas regiões produtoras de algodão nos estados da Bahia (6 isolados), Goiás (2 isolados), Mato Grosso (7 isolados), Mato Grosso do Sul (2 isolados) e Minas Gerais (34 isolados), cujas lavouras tinham histórico de doenças causadas por *R. solani*. Em cada lavoura foram coletadas plantas em reboleiras com sintoma de tombamento e/ou mela. Realizou-se o isolamento direto, a partir de fragmentos das plantas coletadas, utilizando-se placas de Petri preenchidas com 12 mL de meio de cultura Ágar-Água (AA). Após 24 e 48 horas, as colônias com hifas características de *Rhizoctonia* sp. foram repicadas para placas de Petri com 12 mL de meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e monitoradas por 15 dias, observando-se hifas septadas, não formação de esporos e características típicas de colônia de *Rhizoctonia* sp. Em ambas as etapas, as placas foram incubadas em câmara de germinação (BOD), à temperatura de 20ºC.

Para contagem de núcleos, as hifas de culturas ativas foram transferidas para lâminas e coradas com Safranim-O (BANDONI, 1979).

A identificação dos grupos de anastomose foi realizada pelo método de Parmeter modificado (CARLING et al., 1987). Em lâminas flambadas contendo meio ágar-água 2% foram pareados os discos de micélio do isolado-teste (AG-4 e AG-7) e do isolado de campo, em extremidades opostas. As lâminas foram acondicionadas em câmara úmida e incubadas em BOD, a 20ºC por 24-48 horas, monitoradas em microscópio de luz até a observação da sobreposição. Em seguida, as lâminas foram coradas com azul de tripan 0,05% em lactofenol e reexaminadas ao microscópio estereoscópico com câmara digital, quanto à anastomose da hifa. Para a certificação da anastomose, a fusão da parede celular e plasmalema acompanhada da morte de células adjacentes (reação K), foram visualizadas em, pelo menos, dez sítios de fusão para cada leitura de anastomose positiva. Obtendo-se 51 isolados de campo.

Caracterização molecular dos isolados de *Rhizoctonia solani*

Para a extração de DNA, os 51 isolados de *R. solani* foram cultivados em 50 mL de meio líquido de extrato de malte e incubados em agitador (80rpm) à temperatura ambiente por três dias. O micélio produzido foi filtrado em filtro de porcelana com o auxílio da bomba de vácuo e, em seguida, macerado em nitrogênio líquido na presença de polivinil pirrolidona (PVP). A extração do DNA genômico total foi obtido pelo o método descrito por Moller et al. (1992). O DNA obtido foi analisado por eletroforese em gel de agarose (0,7%). Procedeu-se a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) nos isolados de *R. solani*, utilizando-se um par de *primers* para as regiões do rDNA, denominados ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') e ITS

5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'). A reação foi composta por 2µL do DNA, 5µL do tampão 10X (0,5M Tris-HCl, 0,7M KCl, 0,1M $MgCl_2$ pH 8,0), 1,5µL de $MgCl_2$ (50mM), 1µL de dNTP (2mM), 2µL de cada *primer* na concentração de 10ρmol/µL, 1µL de Taq DNA polimerase (5un/µL), 35,5µL de água ultrapura.

A amplificação foi realizada no termociclador PCT-100 (MJ Research, Inc. USA), empregando-se 35 ciclos de 40 segundos, a 94ºC, 1 hora a 55ºC, 2 minutos a 72ºC, seguido de um ciclo final de 5 minutos a 72ºC. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose (0,7%). A purificação do DNA foi feita direto do produto de PCR e os isolados que não apresentaram bom resultado ou que apresentaram mais de uma banda foram repetidos, utilizando-se a purificação a partir do gel de agarose, ambos, utilizando-se o kit Wizard®(Promega), seguindo-se as recomendações do fabricante.

O sequenciamento foi realizado no Laboratório NBA, do Núcleo de Biologia Aplicada, Embrapa, Sete Lagoas, MG. A reação foi composta por 2µL do Mix Big Dye® (Applied Bioystems), 1µL do *primer* ITS4 ou ITS5, 2µL do tampão 5X (*buffer dilution*), 3,5µL de água ultrapura e 1,5µL de DNA. A amplificação foi realizada no termociclador, utilizando-se o programa ABI. Em seguida, realizou-se a purificação da reação, de acordo com as instruções do fabricante. E o produto foi injetado no sequenciador ABI3100. Após a correção, com o auxílio dos cromatogramas, as sequências foram analisadas, fazendo-se a comparação das mesmas entre si e com outros 15 isolados de *R. solani* disponíveis no Gene Bank (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2009), (Tabela 1). Para o alinhamento múltiplo, foi utilizado o programa Clustalw (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY, 2009) e, para a análise filogenética, foi utilizado o programa Mega 4.1 (MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS ANALYSIS, 2009). Foram construídas árvores filogenéticas, com bootstrap de 2.000 repetições, considerando-se somente os valores superiores a 50%.

TABELA 1. Origem dos isolados publicados no banco internacional de dado de *Rhizoctonia solani* e *Rhizoctonia* binucleada.

Isolados	AG*	Procedência
AB286941	AG-P	Japão
AY684924	AG-4	Taiwan
DQ102449	AG-4	Israel
EF429313	AG-A	China
AF354100	AG-7	México
EF203246	AG-4	Vietnan
EF203248	AG-4	Vietnan
EF203251	AG-4	Vietnan
EU244842	AG-4	Suíça
FJ440198	AG-4	China
FJ746914	AG-4	Estados Unidos
FJ746938	AG-4	Estados Unidos
FJ746974	AG-4	Estados Unidos
AY270002	AG-4	GO, Brasil
FJ746939	AG-4	Estados Unidos

* AG = grupo de anastomose

Determinação da patogenicidade dos isolados de *Rhizoctonia solani*

A patogenicidade dos 51 isolados foi determinada utilizando-se o método *in vitro* desenvolvido por Eken e Demirci (2004) e modificado por Oliveira et al. (2008). De acordo com este método, sementes de algodão da cultivar Delta Opal foram desinfestadas superficialmente ao imergir as semente em NaOCl (1%), por cinco minutos, seguida da tríplice lavagem das mesmas em água corrente, sendo transferidas para a câmara de fluxo laminar para o processo de secagem. Quando secas, foram distribuídas 10 sementes de algodão de forma circular em placas de Petri (15 cm de diâmetro), preenchidas com 20 mL de meio AA. No centro de cada placa foi disposto um disco de 9 mm, provindo de colônias do patógeno com três dias de idades, desenvolvidas no escuro, a 20ºC. Na

testemunha foi adicionado o disco de meio de meio de cultura contendo o inóculo. As placas foram incubadas em câmaras de crescimento, à temperatura de 20°C, mantidas por quatro dias no escuro e por mais seis dias, em fotoperíodo de 12 horas.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições, sendo a unidade experimental uma placa de Petri com 10 sementes. A severidade da doença foi medida adaptando-se escala com notas de 1 a 4, em que: 1 – sem sintomas, plântula sadia; 2 – radícula infectada e hipocótilo sadio; 3 – radícula e hipocótilo infectados e 4 – necrose completa da plântula ou completamente podre ou, ainda, semente não germinada. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar® (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização morfológica dos isolados de *Rhizoctonia solani*

Os 51 isolados foram identificados como *R. solani*, pois apresentaram hifas septadas, bem definidas e foram observados mais de dois núcleos dentro de cada célula vegetativa da hifa, sendo então, classificada como multinucleada. As colônias apresentaram coloração de bege a marrom e todas produziram escleródios, obedecendo aos critérios de classificação baseados na citomorfologia da hifa e morfologia da colônia, sugeridos por Sneh et al. (1991).

Quanto ao grupo de anastomose, dos 51 isolados testados, 36 (70,59%) se comportaram como AG-4, sendo 14 da região norte de Minas, 11 do Triângulo Mineiro, 4 da Bahia, 1 de Goiás, 5 do Mato Grosso e 1 do Mato Grosso do Sul. O grupo de anastomose AG-4 no algodoeiro, é frequentemente encontrado causando tombamento de pré e pós-emergência (SINCLAIR, 1965; MOUSTAFA-MAHMOUD et al., 1993; GOULART, 2007). Pertencentes a AG-7, apenas 2 isolados (3,92%), ambos do norte de Minas. Entretanto, o grupo de anastomose AG7 também é relatado causando tombamento em plântulas de algodão, por Baird (1997), Baird et al. (2000). Neste trabalho, faz-se o primeiro relato do AG-7 causando tombamento no Brasil. Entretanto, os grupos de anastomose AG-4 e AG-7 apresentam grande semelhança na gama de hospedeiros, na morfologia da colônia e nos sintomas, consequentemente, dificulta a classificação correta dos isolados (BAIRD et al., 2000), (Tabela 2).

TABELA 2. Identificação, grupos de anastomose e procedência dos isolados de *Rhizoctonia solani*, obtidos de plântulas de algodão

Código dos isolados	Grupo de anastomose	Procedência
Testemunha		
MG 1 – I11	AG-7	Buriatizeiro – MG
MG 1 – I20	AG-4	Buriatizeiro – MG
MT 2 – I01	AG-4	Nova Mutum - MT
MG 1 – I22	AG-7	Buriatizeiro – MG
MT 2 – I03	AG-4	Nova Mutum – MT
MG 1 – I02	AG-7*	Buriatizeiro – MG
MG 1 – I04	AG-4	Buriatizeiro – MG
BA 2 – I02	AG–A*	Luiz Eduardo – BA
MG 1 – I21	AG-4	Buriatizeiro – MG
BA 3 – I01	AG-4	Luiz Eduardo – BA
MT 2 – I02	AG-4*	Nova Mutum – MT
MS 2 – I03	AG-4*	Dourados – MS
MG 1 – I17	AG-4	Buriatizeiro – MG
MG 1 – I07	AG-P*	Buriatizeiro – MG
MG 1 – I09	AG-4	Buriatizeiro – MG
MG 1 – I25	AG-4	Buriatizeiro – MG
MG 2 – I01	AG-4	Presidente Olegário – MG
MG 2 – I06	AG-4	Presidente Olegário – MG
MG 1 – I01	AG-4	Buriatizeiro – MG
MG 1 – I26	AG-4	Buriatizeiro – MG
MT 2 – I05	AG-4*	Nova Mutum – MT
MG 3 – I05	AG-4	Varjão de Minas – MG
MG 1 – I19	AG-4	Buriatizeiro – MG

MT 3 – I02	AG-4	Rondonópolis
MT 1 – I01	AG-4	Nova Mutum – MT
MT 2 – I04	AG-4	Nova Mutum – MT
BA 1 – I05	AG-4	Roda Velha – BA
MG 3 – I01	AG-4*	Varjão de Minas – MG
MG 1 – I05	AG-4	Buriatizeiro – MG
MG 1 – I15	AG-4	Buriatizeiro – MG
MG 1 – I03	AG-4	Buriatizeiro – MG
MG 1 – I14	AG-4*	Buriatizeiro – MG
MG 4 – I04	AG-4	Patos de Minas – MG
BA 1 – I03	AG-4	Roda Velha – BA
GO 1 – I02	AG-4*	Posse – GO
MG 4 – I02	AG-4*	Patos de Minas – MG
MG 1 – I28	AG-4	Buriatizeiro – MG
MS 1 – I01	AG-4	Dourados – MS
MG 7 – I01	AG-4	Uberlândia – MG
MG 5 – I01	AG-4	Uberlândia – MG
MG 4 – I03	AG-4	Patos de Minas – MG
GO 1 – I01	AG-4	Posse – GO
BA 1 – I06	AG-4*	Roda Velha – BA
MG 6 – I01	AG-4*	Patos de Minas - MG
MG 2 – I05	AG-4	Presidente Olegário – MG
BA 2 – I01	AG-4	Luiz Eduardo – BA
MG 4 – I01	AG-4	Patos de Minas – MG
MG 1 – I08	AG-4	Buriatizeiro – MG
MG 3 – I02	AG-4	Varjão de Minas – MG
MG 1 – I24	AG-4*	Buriatizeiro – MG
MG 2 – I03	AG-4	Presidente Olegário – MG

* Isolados não caracterizados nos estudos morfológico, mas por estudos moleculares; [1] Médias seguidas da mesma letra, minúscula, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott (P≤0,05).

Permaneceram sem agrupamento 13 isolados (25,49%), o que pode ter acontecido porque a técnica utilizada para agrupar isolados de *R. solani* baseia-se numa manifestação de compatibilidade somática entre os indivíduos, sendo positiva quando há fusão de hifas, mas nem sempre é possível visualizar o ponto de fusão (ANDERSON, 1982; SNEH et al., 1991; CARLING et al., 1999).

Caracterização molecular dos isolados de *Rhizoctonia solani* obtidos de áreas produtoras de algodão no Brasil

Os *primers* ITS 4 e ITS 5 permitiram a amplificação de fragmentos com aproximadamente 700 pares de bases (pb), obtendo-se as regiões ITS 1, 5,8S rDNA e ITS 2 completas, para 98% dos isolados de *R. solani* do algodoeiro estudados. As sequências apresentaram entre 203 a 240pb na região ITS1, 155 a 163pb no gene 5,8S e 261 a 282pb na região ITS2.

Analisando-se as árvores filogenéticas baseadas na sequência de nucleotídeos das regiões ITS1 e ITS2 (Figuras 1 e 2), observa-se que os isolados AG-7 ficaram num mesmo grupo, juntamente com o isolado AF3354100, do México, também classificado dentro desse grupo.

Quanto aos demais isolados, houve tendência de aparecer um grupo com um maior número de isolados dentre os classificados como AG-4, sendo 27 do Brasil e 5 do GenBank, na árvore referente ao ITS1 (Figura 1) e 23 do Brasil e 4 do GenBank na referente ao ITS2 (Figura 2)

Na árvore construída com base nos nucleotídeos da região 5,8S os isolados do tipo AG-7 se agruparam com os AG-4 sem um padrão distinto entre eles (Figura 3). Entretanto, os grupamentos observados não se deram por região geográfica nem apresentaram um padrão específico de comportamento, confirmando a proximidade entre isolados AG-4 e AG-7, observada por Oliveira (OLIVEIRA et al., 2008), quando estudou a árvore filogenética obtida com base na sequência de nucleotídeos para isolados de cenoura obtidos em campo de grupos de anastomose padrão.

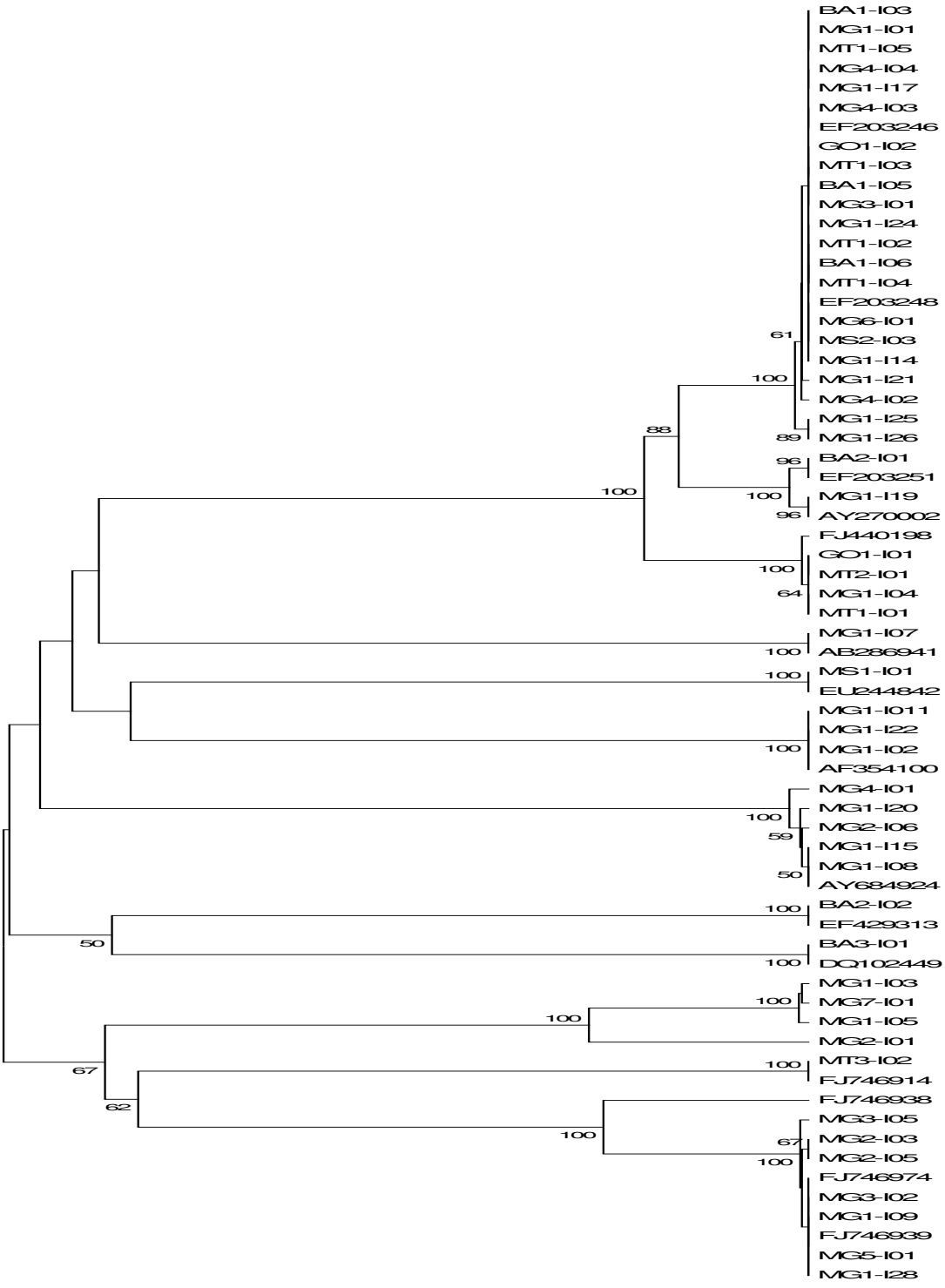


Figura 1. Árvore filogenética obtida com base nas sequências de nucleotídeos da região ITS 1 do rDNA de isolados de *Rhizoctonia solani*, sendo 51 sequenciados e estudados neste trabalho e os demais obtidos no *Gene Bank*. Os valores de *bootstrap* (UPGMA) foram obtidos por meio do programa MEGA versão 4.1, com 1.000 repetições, sendo mostrados os valores acima de 50%

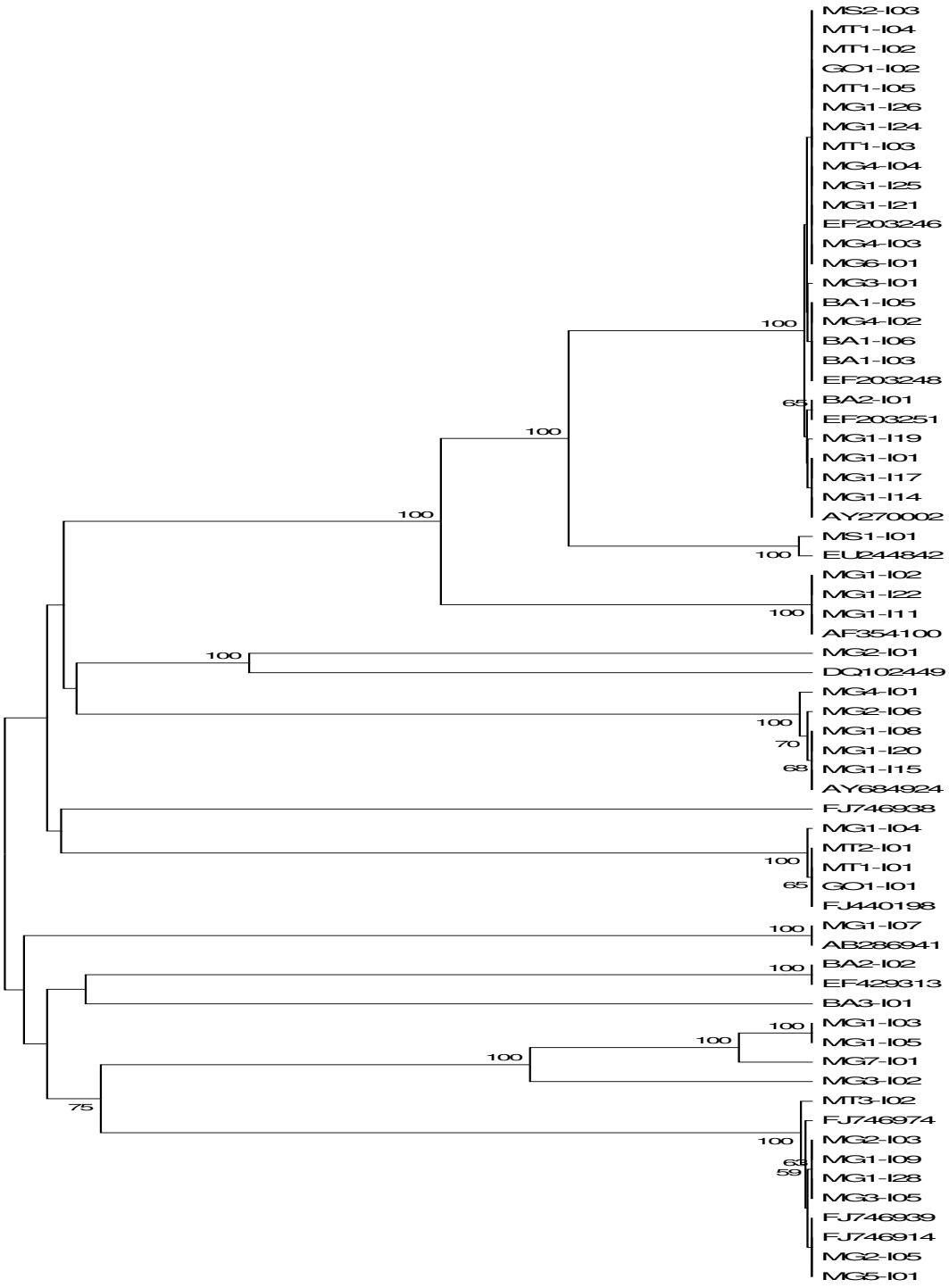


Figura 2. Árvore filogenética obtida com base nas sequências de nucleotídeos da região ITS 2 do rDNA de isolados de *Rhizoctonia solani*, sendo 51 sequenciados e estudados neste trabalho e os demais obtidos no *Gene Bank*. Os valores de *bootstrap* (UPGMA) foram obtidos por meio do programa MEGA versão 4.1, com 1.000 repetições, sendo mostrados os valores acima de 50%

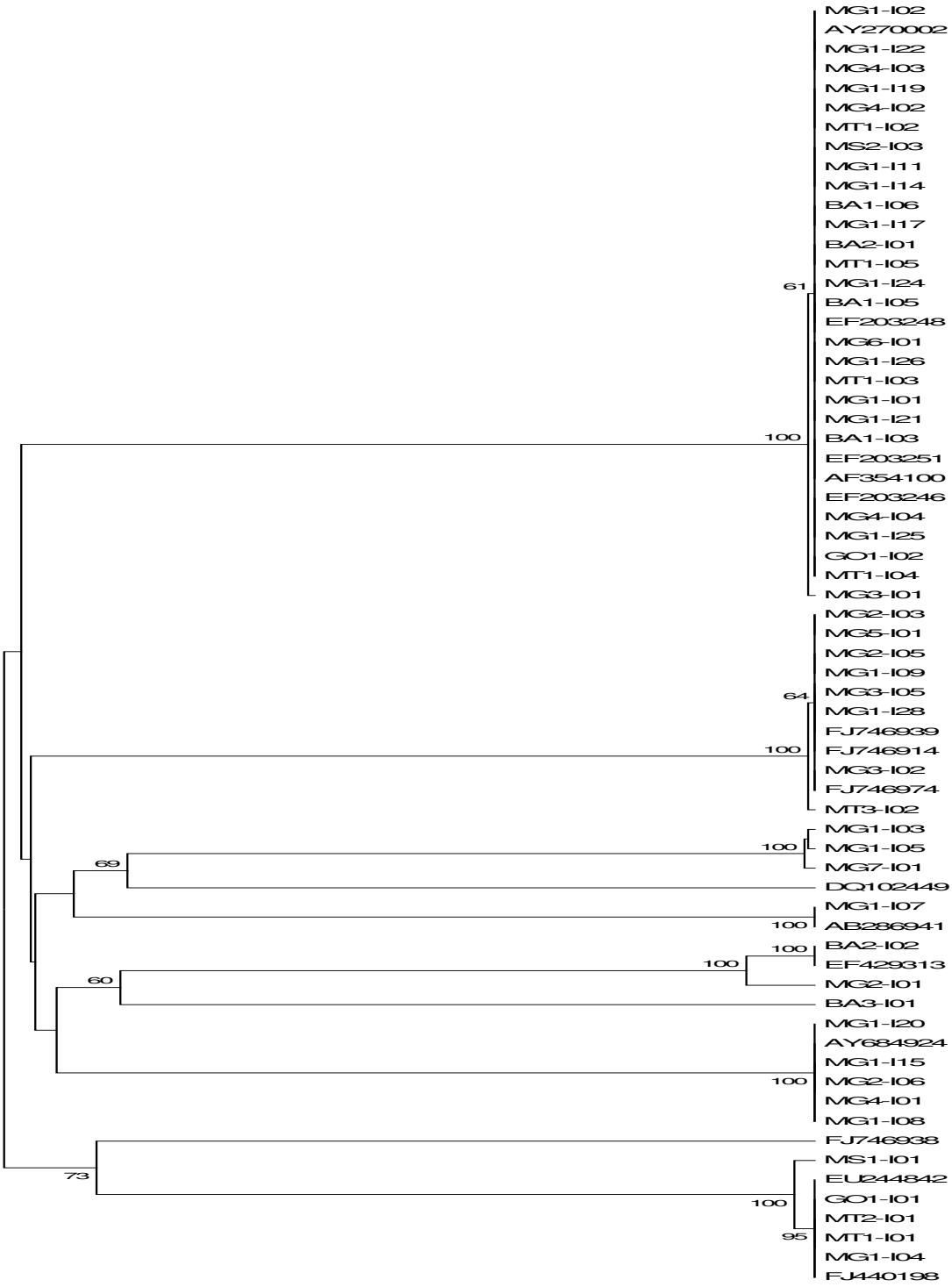


Figura 3. Árvore filogenética obtida com base nas sequências de nucleotídeos do gene 5,8S do rDNA de isolados de *Rhizoctonia solani*, sendo 51 sequenciados e estudados neste trabalho e os demais, obtidos no *Gene Bank*. Os valores de *bootstrap* (UPGMA) foram obtidos por meio do programa MEGA versão 4.1, com 1.000 repetições, sendo mostrados os valores acima de 50%

O isolado BA2-I02 não se agrupou com nenhum outro isolado, nas três árvores filogenéticas, enquanto o BA2-I01 se agrupou com os isolados AG-4, os quais formaram o maior grupamento nas três árvores, confirmando a teoria citada por Carbone & Kohn (2004), de que a variação no rDNA é sempre menor dentro de uma única espécie fúngica se comparado entre espécies distintas. O isolado MG1-I07 também não se agrupou a nenhum outro nas árvores referentes à ITS1 e ITS2, mas ficou junto com o grande grupo dos AG-4 na árvore referente à região 5,8S. Isso pode ter se dado por ser um gene de uma região mais conservada (BOYSEN et al., 1996).

Os resultados apresentados sugerem que a análise genética das regiões ITS 1 e ITS 2 pode constituir um dos critérios para a separação de diferentes AGs, concordando com Rosa et al. (2005), que utilizando a mesma região para o estudo de isolados de *R. solani* provenientes de batata, conseguiram separá-los tanto em grupos como subgrupos de anastomose. Meinhardt et al. (2002) para isolados de feijão, obtiveram padrão de bandas capaz de separar o grupo AG-4 e seus subgrupos, entretanto, a técnica incluía não só PCR como também Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).

Pela análise molecular, que comparou os 51 isolados de algodão a 15 isolados de *Rhizoctonia* do *GenBank*, confirmaram-se os 36 isolados e mais 10 como AG-4; os 2 isolados AG-7 também foram confirmados, além de mais 1, sendo os 3 isolados AG-7 da mesma região, no norte de Minas Gerais e 2 foram caracterizados como *Rhizoctonia* binucleada (espécie de *Rhizoctonia* com apenas dois núcleos), sendo um AG-P, oriundo do norte de Minas e um AG-A, da Bahia (BA). Nas árvores filogenéticas, os dois isolados binucleados permaneceram próximos a isolados multinucleados de *R. solani*. Estudos com *Rhizoctonia* spp. binucleada tem se tornado frequente pelo seu potencial para a indução de resistência (BASSETO et al., 2008).

Nos estudos morfológicos não foi encontrado nenhum isolado binucleado, demonstrando que há divergências entre as técnicas morfológicas e moleculares, sendo necessários estudos mais aprofundados para a confirmação da classificação desses isolados.

Determinação da patogenicidade dos isolados de *Rhizoctonia solani* obtidos das regiões produtoras de algodão no Brasil

Verificou-se estatisticamente, que cinco isolados não diferiram da testemunha, sendo três do norte de Minas Gerais, dos quais pertenciam ao grupo de anastomose AG-7 e um AG-4, assim como mais dois isolados do Mato Grosso do grupo AG-4 (Tabela 3). Seis isolados demonstraram baixa virulência, enquadrando-se entre as médias 1,60 e 1,96. Destes, três são do norte de Minas, sendo um AG-7 e dois AG-4, mais dois isolados da Bahia, sendo um AG-A e outro AG-4 e, ainda, um isolado do Mato Grosso, também pertencente ao grupo AG-4. Com virulência intermediária de 2,52 a 3,30, enquadraram-se 16 isolados, sendo sete do norte de Minas e três do Triângulo Mineiro, quatro do Mato Grosso e, ainda, um da Bahia e outro do Mato Grosso do Sul. Com alta agressividade, 24 isolados se enquadraram com médias entre 3,4 a 3,9, sendo 7 isolados do norte de Minas, 11 do Triângulo Mineiro, 3 da Bahia, 2 de Goiás e 1 do Mato Grosso do Sul, observando-se que todos pertenciam ao grupo AG-4. Logo, 92% dos isolados foram patogênicos e 51% deles apresentaram alta virulência.

Observa-se que os isolados AG-7 apresentaram de nenhuma a baixa virulência, contradizendo os relatos de Baird et al. (2000), que relataram *R. solani* AG-7 causando lesões marrom-escuras em raízes de algodão e com patogenicidade confirmada a 18° e 24°C. Entretanto, os isolados classificados nesse esse estudo como AG-7 são oriundos do norte de Minas, uma região de temperaturas mais elevadas. Logo, como o teste de patogenicidade foi realizado a 20°C, pode não ter favorecido a virulência do patógeno.

O isolado de algodão BA2-I02 pertence ao AG-A apresentou baixa virulência de 1,89, semelhante aos resultados encontrados por Eken & Demice (2004) para isolados de feijão do grupo AG-A.

Neste estudo, com exceção do isolado MG1-I07 do grupo AG-P, todos os isolados de média e alta virulência foram classificados como AG-4, podendo-se afirmar, que no Brasil este é o principal agente causal do tombamento de plântulas de algodão, e é o mesmo grupo de anastomose utilizado em estudos no Brasil por Goulart (2007) e Santos et al. (2005).

Tabela 3. Dados médios da severidade da doença na patogenicidade de isolados de *Rhizoctonia solani*, em plântulas de algodão

Código dos isolados	Grupo de anastomose	Médias [1]
Testemunha		1,00 a
MG 1 – I11	AG-7	1,22 a
MG 1 – I20	AG-4	1,26 a
MT 2 – I01	AG-4	1,40 a
MG 1 – I22	AG-7	1,42 a
MT 2 – I03	AG-4	1,45 a
MG 1 – I02	AG-7*	1,60 b
MG 1 – I04	AG-4	1,65 b
BA 2 – I02	AG–A*	1,89 b
MG 1 – I21	AG-4	1,94 b
BA 3 – I01	AG-4	1,94 b
MT 2 – I02	AG-4*	1,96 b
MS 2 – I03	AG-4*	2,52 c
MG 1 – I17	AG-4	2,89 c
MG 1 – I07	AG-P*	2,93 c
MG 1 – I09	AG-4	2,96 c
MG 1 – I25	AG-4	2,97 c
MG 2 – I01	AG-4	3,03 c
MG 2 – I06	AG-4	3,03 c
MG 1 – I01	AG-4	3,03 c
MG 1 – I26	AG-4	3,04 c
MT 2 – I05	AG-4*	3,11 c
MG 3 – I05	AG-4	3,14 c
MG 1 – I19	AG-4	3,17 c
MT 3 – I02	AG-4	3,17 c
MT 1 – I01	AG-4	3,23 c
MT 2 – I04	AG-4	3,28 c
BA 1 – I05	AG-4	3,30 c
MG 3 – I01	AG-4*	3,40 d
MG 1 – I05	AG-4	3,42 d
MG 1 – I15	AG-4	3,43 d
MG 1 – I03	AG-4	3,45 d
MG 1 – I14	AG-4*	3,49 d
MG 4 – I04	AG-4	3,51 d
BA 1 – I03	AG-4	3,56 d
GO 1 – I02	AG-4*	3,56 d
MG 4 – I02	AG-4*	3,59 d
MG 1 – I28	AG-4	3,60 d
MS 1 – I01	AG-4	3,60 d
MG 7 – I01	AG-4	3,65 d
MG 5 – I01	AG-4	3,65 d
MG 4 – I03	AG-4	3,67 d
GO 1 – I01	AG-4	3,73 d
BA 1 – I06	AG-4*	3,73 d
MG 6 – I01	AG-4*	3,74 d
MG 2 – I05	AG-4	3,76 d
BA 2 – I01	AG-4	3,76 d
MG 4 – I01	AG-4	3,79 d
MG 1 – I08	AG-4	3,80 d
MG 3 – I02	AG-4	3,85 d
MG 1 – I24	AG-4*	3,86 d
MG 2 – I03	AG-4	3,91 d

Dos 51 isolados estudados, apenas três foram obtidos de plântulas com sintoma de mela MT3-I02, MS1-I01 e MG7-I01. Todos foram patogênicos apresentando média ou alta virulência e classificados como AG-4, não tendo sido possível, neste trabalho, identificar o subgrupo com os testes aplicados. Seria necessária uma nova busca, no banco de dados, apenas de isolados AG-4 com subgrupos definidos e, então, a construção de novas árvores, buscando a similaridades entre os isolados MT3-I02, MS1-I01 e MG7-I01 e os do banco de dados.

CONCLUSÕES

Os grupos de anastomose identificados na caracterização morfológica foram confirmados na caracterização molecular;

Houve divergência entre a caracterização morfológica e molecular para os isolados binucleados;

Os isolados AG-4 foram encontrados em maior número e, na grande maioria, mais virulento.

O grupo de anastomose AG-7 foi identificado como o agente etiológico do tombamento no Brasil.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de realização do doutorado, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e a FAPEMIG pelo apoio financeiro do projeto de tese.

ABSTRACT: The *Rhizoctonia solani* is an important pathogen in cotton crop associated with damping-off disease. The variability among isolates are extremely important, because differences exist between anastomosis groups, taken as those isolates capable of exchanging genetic information with each other. Morphological characterization, when confirmed by genetic characterization provides concrete information about the isolates distribution when it acts like a pathogen. Our study was to identify and characterize the anastomosis groups in Brazil and confirm them by genetic characterization. We considered 51 *Rhizoctonia solani* isolates aiming to characterize the anastomose group and determine their pathogenicity. The morphological characterization was done observing the number of cores, colony morphology and identification of anastomosis groups (AG). In genetic characterization were sequenced and analyzed the genomic fragments containing the 5.8 S, ITS1 and ITS2 regions and compared them to *Rhizoctonia* isolates listed in the GenBank. The pathogenicity was evaluated for the disease severity, using the scale of infection with grades ranging from 1 to 4. Considering the AG we identified 36 of 51 isolates as AG-4 and two isolates as AG-7 and 13 isolates were listed as unrated. In molecular analyses were confirmed those 36 isolates and were identified more 10 isolates as AG-4. All the AG-7 isolates were confirmed and we found one more considering the molecular analyses. For the pathogenicity was found that five strains did not differ from the control. Intermediate virulence and high virulence were observed in 16 and 24 isolates, respectively with averages from 2.52 to 3.3 and from 3.4 to 3.9.

KEYWORDS: Cotton (Gossypium hirsutum L.). Necrotrophic. Dumping-off. Molecular biology. Virulence.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, N. A. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 20, n. 1, p. 329-347, Jan./Dec. 1982.

BAIRD, R. E. First report of *Rhizoctonia solani* AG-7 in Georgia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 7, p. 832, July 1997.

BAIRD, R. E.; BATSON, W.; CARLING, D.; SCRUGGS, M. First report of *Rhizoctonia solani* AG-7 on cotton in Mississippi. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 10, p. 1156, Oct. 2000.

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

BASSETO, M. A.; VALÉRIO FILHO, W. V. ; SOUZA, E. C.; CERESINI, P. C. O papel de *Rhizoctonia* spp. binucleadas na indução de resistência da mela da soja. **Acta Scientiraum Agronomy**, Maringá, v. 30, n.2, p. 183-189, 2008.

BOYSEN, M.; BOJA, M.; DEMORAL, C.; RUBIO, V.; SALAZAR, O. Identification at strain level of. *Rhizoctonia solani* AG-4 isolates by direct-sequence of asymmetric PCR products of the ITS regions. **Current Genetics**, Berlin, v. 29, n. 2, p. 174-181, Feb. 1996.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. Inferring process from pattern in fungal population genetics. In: ARORA, D. K.; KHACHATOURIANS, G. G. (Ed.). **Fungal genomics, applied mycology and biotechnology series.** Toronto: Elsevier Science, 2004. p. 29-58.

CARLING, D. E.; LEINER, R. H; KEBLER, K. M. Characterization of a new anastomosis group (AG-9) of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, n. 11, p. 1609-1612, Nov. 1987.

CARLING, D. E.; POPE, E. J.; BRAINARD, K. A.; CARTER, D. A. Characterization of mycorrhizal isolates of *Rhizoctonia solani* from an orchid, including AG-12, a new anastomosis group. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, n. 12, p. 942-946, Dec. 1999.

CARLING, D. E.; BAIRD, R. E., GITAITIS, R. D.; BRAINARD, K. A.; KUNINAGA, S. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology,** Saint Paul, v. 92, n. 8, p. 893-899, Aug. 2002a.

EKEN, C.; DEMIRCI, E. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* isolates from bean in Erzurum, Turkey. **Journal of Plant Pathology,** Pisa, v. 86, n. 1, p. 49-52, Jan. 2004.

EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY. **Clustalw2**. 2009. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. Acesso em: 16 abr. 2009.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

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

GOULART, A. C. P. Suscetibilidade de cultivares de algodoeiro a Rhizoctonia solani e benefícios do tratamento de sementes com fungicidas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 33, n. 3, p. 222-228, jul./set. 2007.

GOULART, A. C. P. Tratamento de sementes do algodoeiro com fungicidas. In: EMBRAPA. **Algodão**: tecnologia de produção. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2001. p. 140-158.

GOULART, A. C. P.; ASSIS, J. B.; CIAMPI, M. B.; CERESINI, P. C. Ocorrência de mela causada por *Rhizoctonia solani* AG4-HGI em plântulas de algodoeiro no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n. 1, p. 68-69, 2011.

LIU, Z. L.; SINCLAIR, J. B. Differentiation of intraspecific groups within anastomosis group 1 of *Rhizoctonia solani* using ribosomal DNA internal transcribed spacer and isozyme comparisons. **Canadian Journal of Plant Pathology,** Ontario, v. 15, n. 4, p. 272-280, Dec. 1993.

MEINHARDT, L. W.; WULFF, N. A.; BELLATO, C. M.; TSAI, S. M. Genetic analyses of *Rhizoctonia solani* isolates from *Phaseolus vulgaris* grown in the Atlantic Rainforest region of São Paulo, Brazil. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 27, n. 3, p. 259-267, set./dez. 2002.

MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS ANALYSIS. **Mega 4.1**. 2009. Disponível em:< http://www.megasoftware.net/>. Acesso em: 16 abr. 2009.

MOLLER, E. M.; BAHNWEG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H. H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research,** Oxford, v. 20, n. 22, p. 6115-6116, Nov. 1992.

MOUSTAFA-MAHMOUD, S. M.; SUMNER, D. R.; RAGAB, M. M.; RAGAB, M. M. Interaction of fungicides, herbicides, and planting date with seedling disease of cotton caused by *Rhizoctonia solani* AG-4. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 7 7, n. 1, p. 79-86, Jan. 1993.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Gene Bank**. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 15 abr. 2009.

OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. **Annual Review of Phytopathology,** Palo Alto, v. 25, n. 1, p. 125-143, Jan./Dec. 1987.

OLIVEIRA, A. C. C.; SOUZA, P. E.; POZZA, E. A.; MANERBA, F. C.; LOPES, M. F. Metodologia de inoculação de *Rhizoctonia solani* na cultura da cenoura**. Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, p. 992-995, 2008.

OLIVEIRA, A. C. C.; SOUZA, P. E.; POZA, E. A.; MANERBA, F. C.; LOPES, M. F. Determinação de patogenicidade e severidade de isolados de rhizoctonia solani em algodão. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 185, 2008. Suplemento.

ROSA, D. D.; FENILLE, R. C.; SOUZA, N. L.; KURAMAE, E. Caracterização citomorfologica, molecular e patogênica de isolados de *Rhizoctonia solani* de batata. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 31, n. 2, p. 133-141, abr./jun. 2005.

SANTOS, F. S.; SOUZA, P. E.; OLIVEIRA, C. A.; MAGALHÃES, F. H. L.; LAURENTI, M. A. Ajuste do inóculo de *R. solani* AG-4 em substrato para estudo de Rhizoctoniose em algodoeiro e feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 31, n. 2, p. 374-376, abr./jun. 2005.

SINCLAIR, J. B. **Cotton seedling diseases and their control.** Baton Rouge: Louisiana State University, 1965. 35 p.

SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. **Identification of *Rhizoctonia solani* species**. Saint Paul: APS, 1991. 134 p.

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