

# Inferência filogenética revela a complexa etiologia das manchas areolada e foliar em seringueira e em outras espécies cultivadas na Amazônia

Ana Paula da Silva de Campos Gaino<sup>1</sup>, Marco Antonio Basseto<sup>2</sup>, Luadir Gasparotto<sup>3</sup>, Luiz Sebastião Poltronieri<sup>4</sup> e Paulo Cezar Ceresini<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rua Monção, 226, 15385-000, Ilha Solteira, São Paulo, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, São Paulo, Brasil. <sup>3</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, Brasil. <sup>4</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental, Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brasil. <sup>5</sup>Institute of Integrative Biology, Plant Pathology, ETH Zurich, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland. \*Autor para correspondência. E-mail: paulo.ceresini@bio.feis.unesp.br

**RESUMO.** A mancha areolada de *Thanatephorus* é uma das doenças mais importantes da seringueira (*Hevea brasiliensis*) na Amazônia brasileira. Além da seringueira, o fungo *T. cucumeris* (fase anamórfica *Rhizoctonia solani*) causa doenças foliares em outras espécies nativas ou cultivadas na região. Baseando-se na ausência de informações sobre quais os grupos de anastomose (AG) de *R. solani* estão associados à seringueira e a outros hospedeiros na Amazônia, testou-se a hipótese de que estes isolados pertencem a AG distintos. Também não há informação sobre a patogenicidade cruzada, à seringueira, de isolados provenientes de outros hospedeiros. A determinação do AG foi efetuada com base em análise filogenética da região ITS do rDNA. Concluiu-se que um novo subgrupo de *R. solani* (o AG-2-2 Hb) é o principal agente causal da mancha areolada em seringueira. Entretanto, isolados de outros AGs (AG-1 IB e ID, AG-4 HGI) e de *Ceratobasidium* sp. (*Rhizoctonia* sp. binucleada AG-R), oriundos de hospedeiros distintos, também infectam seringueira. Isto implica diversidade de fonte de inóculo para a sobrevivência e disseminação dos patógenos. De maneira inédita se relata a ocorrência de um novo AG de *R. solani* infectando citros no Acre, Brasil, distinto dos demais relatados no mundo (provavelmente AG-14).

**Palavras-chave:** *Rhizoctonia solani*, agrupamento de anastomose, patogenicidade cruzada, seringueira, citrus.

**ABSTRACT.** Phylogenetic inference reveals the complex etiology of the target and leaf spot diseases on rubber tree and other species cultivated in the Amazon.

*Thanatephorus* target spot is one of the most important diseases of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) in the Amazon region of Brazil. In addition to rubber tree, the fungus *Thanatephorus cucumeris* (anamorphase = *Rhizoctonia solani*) causes several foliar diseases on other agricultural crops or native species in the region. Based on the lack of information on which anastomosis groups (AG) of *R. solani* are associated with rubber tree and other hosts in the Amazon, we tested the hypothesis that these isolates belong to distinct AGs. There is no information about the cross pathogenicity (to rubber tree) of isolates from other hosts. The AG was determined based on phylogenetic analyses of the ITS region of the rDNA. We concluded that a new subgroup of *R. solani* (the AG-2-2 Hb) is the main pathogen causing the rubber tree leaf spot. However, isolates from other AGs (AG-1 IB and ID, AG-4 HGI) and from *Ceratobasidium* sp. (binucleate *Rhizoctonia* sp. AG-R) from distinct hosts can also infect the rubber tree. This implicates in diversity of inoculum sources for the survival and spread of the leaf spot pathogens. For the very first time, we report the occurrence of a new AG of *R. solani* infecting citrus in Acre, Brazil, which is distinct from all the others already described worldwide (probably AG-14).

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

## Introdução

Em condições naturais, o fungo Basidiomiceto *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk causa várias doenças foliares em culturas de importância agrícola e

em espécies nativas na região da Amazônia brasileira (GASPAROTTO et al., 2001; LOURD et al., 1984; POLTRONIERI et al., 1999; TRINDADE; FURTADO, 1997; TRINDADE et al., 1997). Entre as

doenças relatadas na Amazônia, a mancha areolada da seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg. (1865)] é considerada uma das mais importantes (DESLANDES, 1944). O patógeno *T. cucumeris* tem como fase anamórfica *Rhizoctonia solani* Kühn, uma espécie complexa composta por vários grupos de anastomose (AGs) (CARLING, 1996). A espécie multinucleada *R. solani* é conhecida como patógeno de diversas plantas cultivadas (OGOSHI, 1987).

A mancha areolada da seringueira foi relatada pela primeira vez no Brasil, em 1943, no Pará (DESLANDES, 1944). Hoje é considerada a segunda enfermidade de maior impacto econômico para a seringueira, provocando lesões foliares que progridem para intensa desfolha em condições de viveiros, jardins clonais e plantas adultas (GASPAROTTO et al., 1997). Prejuízos em torno de 30% na produção de látex em seringais brasileiros foram relatados, nos anos de 1970, em função da incidência da mancha areolada (GASPAROTTO et al., 1997). A maioria dos clones brasileiros de seringueira é suscetível a essa enfermidade. (GASPAROTTO et al., 1982). Entretanto, na Costa Rica, há relato de resistência em *H. brasiliensis* (clones FB 54 e FB 3363), *H. benthamiana* (clones F 4515, F 4327 e F 4542), *H. pauciflora* e *H. rigidifolia* (CARPENTER, 1951).

Outro gênero (filogeneticamente próximo à *Thanatephorus*), considerado importante patógeno de uma série de plantas na Amazônia, é o *Ceratobasidium* spp. (BENCHIMOL et al., 2001; TRINDADE; FURTADO, 1997). Este patógeno causa a doença denominada mal-do-fio, que é peculiarmente distinta da mancha areolada (GASPAROTTO et al., 1997). *Ceratobasidium* tem como fase anamórfica espécies binucleadas de *Rhizoctonia* (SNEH et al., 1996). Muitas das espécies de *Rhizoctonia* binucleadas, entretanto, estão frequentemente associadas com controle biológico (BASSETO et al., 2008; CERESINI; SOUZA, 1997; SNEH et al., 1996).

O principal objetivo deste estudo foi elucidar aspectos importantes sobre a etiologia da mancha areolada em seringueira e em diversas outras espécies cultivadas ou nativas na região amazônica. O único relato clássico da literatura que trata da etiologia da mancha areolada data da década de 1980. (BOLKAN; RIBEIRO, 1985) determinaram que o AG-2 estava consistentemente associado à mancha areolada da seringueira. Naquela época, entretanto, apenas cinco AGs de *R. solani* haviam sido descritos mundialmente. Desde então, o AG-2 foi reclassificado em vários outros subgrupos de anastomose (AG-2-1, AG-2-2 IIIB, AG-2-2 IV, AG-2-2 LP, AG-2-3 e AG-2-4) e atualmente é considerado um grupo complexo e polifilético

(CARLING et al., 2001). A real etiologia das manchas foliares em diversas outras espécies da Amazônia é desconhecida.

Neste estudo, foi testada a hipótese de que os isolados de *T. cucumeris*, provenientes da região amazônica e oriundos de seringueira e de outras espécies cultivadas ou nativas da região, pertencem a AGs distintos. Para isso, isolados de *T. cucumeris*, foram caracterizados filogeneticamente (baseando-se em sequências de bases da região ITS-5.8S do rDNA). Da mesma forma, não há informação sobre a patogenicidade cruzada de isolados provenientes de outras espécies cultivadas ou nativas da Amazônia para a seringueira. Assim, por meio de teste de patogenicidade cruzada, foi testada uma segunda hipótese de que isolados de *T. cucumeris* de hospedeiros distintos são patogênicos também à seringueira.

Acredita-se que a informação gerada por esta pesquisa oferece importante contribuição para o conhecimento da biologia de *Thanatephorus* sp. na região amazônica, com implicações importantes para o manejo da doença. Por exemplo, se comprovada a hipótese de que a seringueira é hospedeira de um complexo de patógenos do gênero *Rhizoctonia*, envolvidos com a mancha areolada, faz-se necessário selecionar clones resistentes a mais de um AG.

## Material e métodos

**Isolados.** O material constituído de folhas infectadas naturalmente por *T. cucumeris* e/ou *Ceratobasidium* spp. foi coletado em Manaus (Estado do Amazonas). Esta primeira amostragem resultou em seis isolados de seringueira e um de *Mimosa pigra* L. Uma segunda amostra de *T. cucumeris*, causadora de mancha foliar em uma série de hospedeiros nativos ou cultivados, foi coletada em Belém, Estado do Pará. e em Rio Branco, Estado do Acre, em cooperação com pesquisadores da Embrapa - Amazônia Ocidental (Estado do Amazonas), Amazônia Oriental (Estado do Pará) e Acre. Esta amostra totalizou 15 isolados (Tabela 1). Por se tratar de amostras tão diversas, em termos de hospedeiros de origem, e provavelmente também quanto aos AGs dos isolados, optou-se pelo sequenciamento da região ITS-5,8S do DNA ribossomal nuclear (rDNA) como estratégia para determinação dos AGs, baseando-se em análise filogenética em relação à maioria dos AGs de *R. solani* e de *Rhizoctonia* spp. binucleados já descritos.

**Isolamento do patógeno a partir de tecidos foliares infectados.** Fragmentos de lesões foliares desinfestados superficialmente foram transferidos para meio de cultura ágar-água (AA) alcalino

(pH 8,5) e incubados a 25°C, na ausência de luz, por 24h. Os crescimentos miceliais característicos de *Rhizoctonia* spp. obtidos foram purificados em AA alcalino e, posteriormente, em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) (TUIITE, 1969). Os isolados purificados foram preservados em grãos de arroz parboilizado, segundo metodologia adaptada de (SNEH; ADAMS, 1996) e estocados à temperatura de -20°C.

**Determinação do AG, baseando-se em análise filogenética da região ITS-5,8S do rDNA.** Para a caracterização filogenética, os isolados foram cultivados no meio de cultura de BDA + estreptomomicina (0,050 g L<sup>-1</sup>) por dois dias, a 25°C. A extração de DNA genômico do micélio dos isolados de *R. solani* seguiu o protocolo de Kuramae-Izioka (1997). Procedeu-se amplificação da região ITS-5,8S do rDNA por meio de reações da polimerase em cadeia (PCR), utilizando-se condições descritas

anteriormente (CIAMPI et al., 2005; GONZALEZ et al., 2001). Amplificações iniciais foram efetuadas, usando-se o conjunto de iniciadores (*primers*) ITS4/ITS5. Cada produto de PCR foi purificado, utilizando-se colunas MicroSpin S-400 HR (Amersham Pharmacia), de acordo com instruções do fabricante.

Para o sequenciamento da região ITS do rDNA amplificada, foi utilizado kit pré-misturado para ciclo de sequenciamento, baseado em química de corante terminador (*dye terminator cycle sequencing premix kit*) (Amershan Life Science). Cerca de 75 ng de DNA amplificado foram utilizados por reação e 1 µM de cada um dos iniciadores ITS4 ou ITS5 em reações independentes. Os produtos de sequenciamento foram separados em polímero de poliácridamida a 6%, utilizando-se sequenciador automático PE Applied Biosystems ABI-377.

**Tabela 1.** Grupos de anastomose de isolados de *Rhizoctonia solani* (fase teleomórfica *Thanatephorus cucumeris*) e de *Rhizoctonia* spp. binucleadas (fase teleomórfica *Ceratobasidium*) associados a manchas foliares em espécies cultivadas ou nativas da Amazônia e patogenicidade cruzada ao clone de seringueira RRIM 600.

Isolados	Hospedeiro de origem	Família vegetal	Procedência	Ano de obtenção	Grupo de anastomose baseando-se em análise filogenética <sup>a</sup>	Patogenicidade à seringueira
					<i>R. solani</i> (espécies multinucleadas)	
BEL56	Gênero <i>Thanatephorus</i> : Café ( <i>Coffea arabica</i> L.)	fase anamórfica = Rubiaceae	Altamira, Pará	2004	AG-1 IB	ND
BEL68	Repolho ( <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> )	Brassicaceae	Belém, Pará	2004	AG-1 IB	+
BEL59	Maracujá ( <i>Passiflora edulis</i> L.)	Passifloraceae	Belém, Pará	2004	AG-1 ID	ND
BEL60	Feijão ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Fabaceae	Tracuateua, Pará	2004	AG-1 ID	+
BEL61	Vindicá ( <i>Alpinia nutans</i> L.)	Zingiberaceae	Belém, Pará	2005	AG-1 ID	+
BEL71	Pimenta-do-reino ( <i>Piper nigrum</i> L.)	Piperaceae	Belém, Pará	2004	AG-1 ID	+
BEL88.1	Maracujá ( <i>P. edulis</i> )	Passifloraceae		2005	Próximo a AG-2-2 IV, porém em ramo distinto	+
BEL88.2			Benevides Pará		(proposta de novo AG: AG 2-2 Hb)	+
SER01	Seringueira ( <i>Hevea brasiliensis</i> (Willd. Ex A. Juss) Müll.Arg.)	Euphorbiaceae	Manaus, Amazonas	2003	AG2-2 Hb	+
SER02					AG2-2 Hb	+
SER03					AG2-2 Hb	+
SER06					AG2-2 Hb	+
SER07					AG2-2 Hb	+
SER09					AG2-2 Hb	+
BEL54	Capim <i>Brachiaria</i>	Poaceae	Paragominas, Pará	2004	AG-4 HGI	+
BEL62	Abóbora ( <i>Cucurbita pepo</i> L.)	Cucurbitaceae	Belém, Pará	2004	AG-4 HGI	+
BEL64	Urucum ( <i>Bixa orellana</i> L.)	Bixaceae	Belém, Pará	2003	AG-4 HGI	+
BEL66	Jambú ( <i>Spilanthes oleraceae</i> (L.) Jacq.)	Asteraceae	Santa Isabel, Pará	2004	AG-4 HGI	+
H38	Laranjeira ( <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck)	Rutaceae	Rio Branco, Acre	2005	Ramo distinto de todos os demais AGs na árvore filogenética de <i>R. solani</i>	+
H48					(proposta de novo AG: nomenclatura a determinar)	+
H52						+
					<i>Rhizoctonia</i> spp. binucleada	
MIM1	Gênero <i>Ceratobasidium</i> : Unha-de-gato ( <i>Mimosa pigra</i> L.)	fase anamórfica = Fabaceae	Manaus, Amazonas	2003	AG-R	+

<sup>a</sup>Determinado pela análise filogenética de sequências da região ITS-5,8S do rDNA (Figura 1 e 2). Os símbolos indicam: (+) = patogênico; (-) = não-patogênico e ND = não-determinada a patogenicidade. As parcelas experimentais foram repetidas cinco vezes e os experimentos, duas vezes.

**Clonagem dos produtos de PCR.** Dada à condição predominante de heterocáριο no ciclo de vida de *T. cucumeris*, é comum observar heterogeneidade nas sequências de DNA em produtos de PCR não-clonados (CIAMPI et al., 2005). Para se separar diferentes alelos no *operon* ITS1-5.8S-ITS2, dentro de uma reação heterogênea de PCR, os amplicons/produtos da amplificação foram clonados dentro de um vetor PCR2.1-TOPO® (Invitrogen, San Diego). Plasmídeos selecionados de *Escherichia coli* One Shot® DH5a™ - T1R recombinantes (Invitrogen, San Diego) foram extraídos de cada amostra e purificados por QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN®). Foram usados *primers* iniciadores universal *forward* e *reverse*, para um dos múltiplos sítios de clonagem do vetor, visando re-amplificar e sequenciar os clones obtidos.

**Análise de dados de sequências da região ITS-5.8S do rDNA.** As sequências obtidas foram analisadas pelo programa phred/phrap/consed para determinação de qualidade (GORDON et al., 1998), alinhadas pelo programa computacional *ClustalX* (THOMPSON et al., 1997) e comparadas com sequências da região ITS do rDNA de todos os AGs de *R. solani* e *Rhizoctonia* spp. binucleadas, depositadas no banco de dados do GenBank® (NCBI). A busca por sequências similares foi efetuada por BLASTN (nucleotídeo-nucleotídeo), versão 2.2.6 de 9/4/2003, disponível no site <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST> (ALTSCHUL et al., 1997).

**Análise filogenética.** As relações filogenéticas entre haplótipos da região ITS-5.8S do rDNA dos isolados de *T. cucumeris* da seringueira e de outras plantas hospedeiras cultivadas ou nativas da Amazônia foram determinadas por meio de análise Bayesiana, usando-se o método de Monte Carlo - Cadeia de Markov, conjugado ao algoritmo de Metrópolis (MCMCMC), por meio do programa MrBayes v 2.01 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001). Para a análise de MCMCMC, Modeltest 3.7 (POSADA; CRANDALL, 1998), implementado no programa PAUP4\* (SWOFFORD, 2002), foi utilizado para se determinar o modelo de substituição de bases de DNA que mais se ajustou aos dados. Um teste hierárquico da razão da verossimilhança, implementado no Modeltest, selecionou o modelo HKY + G como modelo de substituição de bases da região ITS-5.8S do rDNA dentro do complexo *Thanatephorus/Rhizoctonia* (proporção de sítios invariáveis = 0; frequência de bases A = 0,2713, C = 0,2228; G = 0,1336 e T = 0,3724; parâmetro da distribuição gama = 0,3138; razão T de transições/transversões = 1,9654). Sob este modelo evolutivo, o valor da máxima verossimilhança (ML) da árvore mais provável foi de

-ln L 1972,64. Já para o complexo *Rhizoctonia* spp. binucleadas (*Ceratobasidium* spp.), o modelo de substituição de bases, selecionado pelo Modeltest, foi o K80 + G (proporção de sítios invariáveis = 0; frequência de bases = semelhante; parâmetro da distribuição gama = 3,3271; razão T de transições/transversões = 2,1843). Sob este modelo evolutivo, o valor de ML da árvore mais provável foi de -ln L 1621,18.

**Patogenicidade de isolados à seringueira.** A patogenicidade dos isolados de *T. cucumeris* e/ou *Ceratobasidium* spp. de seringueira e de diversos outros hospedeiros foi determinada no clone de seringueira RRIM 600. O inóculo foi preparado por meio do método de colonização de palitos de madeira com micélio de *Rhizoctonia* spp. Palitos de madeira esterilizados foram transferidos para culturas de isolados de *Rhizoctonia* spp. em meio de BDA e incubados por cinco dias a 25°C, em ausência de luz. Palitos colonizados pelo micélio do fungo foram transferidos sobre folíolos jovens destacados de seringueira, próximos a ferimentos efetuados com alfinete esterilizado. Folíolos inoculados foram incubados em estufa biológica, por cinco dias, a 25°C, sob fotoperíodo de 12h. Condição de câmara úmida foi obtida pela manutenção de algodão umedecido na base do folíolo e pelo envolvimento das placas em filme plástico. Observou-se a incidência de sintomas nos folíolos inoculados. O re-isolamento dos patógenos foi efetuado em uma das repetições de cada tratamento para confirmação de sua atuação como agentes casuais da doença. O experimento foi repetido duas vezes.

## Resultados e discussão

Neste estudo, a determinação dos AGs dos isolados de *Thanatephorus* sp. e/ou *Ceratobasidium* spp., procedentes da seringueira e de uma série de outros hospedeiros, foi efetuada com base em análises filogenéticas. A inferência filogenética da região ITS-5,8S do rDNA de *Thanatephorus* sp. e de *Ceratobasidium* spp. é considerada uma ferramenta confiável na discriminação entre AGs (GONZALEZ et al., 2001).

No estudo das relações filogenéticas foram incluídas sequências de bases da região ITS-5,8S do rDNA da maioria dos AGs de *R. solani* (*Thanatephorus* sp.) e de *Rhizoctonia* spp. binucleadas (*Ceratobasidium* spp.) já descritos e depositados no banco de dados do NCBI/GenBank®. Os haplótipos mundiais de *Thanatephorus* sp. determinados com base em sítios polimórficos, detectados ao longo da região ITS-5,8S do rDNA, estão apresentados na Tabela 2.

Já os haplótipos mundiais de *Ceratobasidium* spp. são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 2.** Haplótipos de *Thanatephorus cucumeris* (AGs de *Rhizoctonia solani* multinucleadas) determinados com base em polimorfismos em sequências da região ITS-5,8S do rDNA\*.

Haplótipos mundiais (filogenia de <i>Thanatephorus</i> )	Frequência	Grupo de anastomose	Código da sequência	Isolados	Hospedeiro	Local de origem	Fonte**
H1	1	AG-8	AB000011	A68	-	Japão	S Kuninaga
H2	1	AG-9	-	-	-	-	-
H3	2	AG-12	AF153803	CH1	-	Australia, Sydney	EJ Pope
		AG-12	AF153807	WDa	-	Australia, Sydney	EJ Pope
H4	14	AG-1 IA	AB000010	1A A-10	-	Japão	S Kuninaga
		AG-1 IA	DQ173048	AG-1 IArJ	Arroz	Japão, Tohoku	MB Ciampi
		AG-1 IA	AJ000199	IMI 360366	-	Reino Unido	A Johanson
		AG-1 IA	AJ000200	IMI 360021	-	Reino Unido	A Johanson
		AG-1 IA	AJ000197	IMI 358761	-	Reino Unido	A Johanson
		AG-1 IA	AF308631	Cuba2	Feijao	EUA, Lincoln	G Godoy-Lutz
		AG-1 IA	DQ173047	AG-1 IAmJ	Milho	Japão, Tohoku	MB Ciampi
		AG-1 IA	DQ173063	SJ047	Soja	Brasil	MB Ciampi
		AG-1 IA	AY270011	SJ067	Soja	Brasil, Goiania	RC Fenille
		AG-1 IA	DQ173064	SJ048	Soja	Brasil	MB Ciampi
		AG-1 IA	DQ301757	SJ057	-	Holanda	AK Nakatani
		AG-1 IA	AB000016	1A Cs-Gi	-	Japão	S Kuninaga
		AG-1 IA	AB000017	1A Cs-Ka	-	Japão	S Kuninaga
		AG-1 IA	AF354097	2Rs	Arroz	EUA	D Gonzalez
H5	1	AG-1 IC	AF354058	3Rs	<i>Pinus</i>	Canada	D Gonzalez
H6	1	AG-1 IA	AF354060	1Rs	Soja	EUA	D Gonzalez
H7	1	AG-7	AF354100	91ST8057-2A RSA	Solo	EUA	D Gonzalez
H8	3	Desconhecido	H38, H48, H52	H38, H48, H52	<i>Citrus</i> sp.	Brasil, Rio Branco	PC Ceresini
H9	1	AG-2-3	-	-	-	-	-
H10	1	AG-5	-	-	-	-	-
H11	1	AG-2-2 IIIB	-	-	-	-	-
H12	8	Desconhecido	SER1_a, SER2_a, SER2_b, SER3_a, SER3_b, SER6, SER7, SER9	SER1, SER2, SER3, SER6, SER7, SER9	Seringueira	Brasil, Manaus	APSC Gaino
H13	2	Desconhecido	BEL88.1, BEL88.2	BEL88.1, BEL88.2	Maracujazeiro	Brasil, Belém	LS Poltronieri
H14	1	Desconhecido	SER1_b	SER1	Seringueira	Brasil, Manaus	APSC Gaino
H15	1	AG-2-2 IIIB	AB054858	65-L-2	-	Japão	S Kuninaga
H16	2	AG-2-2 IV	AB000014	IV BC-10	-	Japão	S Kuninaga
			AF354117	16Rs	Beterraba	Japão	D Gonzalez
H17	1	AG-2-2 IV	-	-	-	-	-
H18	1	AG-2-2 IIIB	AF354116	15Rs	Junco	Japão	D Gonzalez
H19	1	AG-2-2 LP	AB054866	48R	-	Japão	S Kuninaga
H20	1	AG-5	AF354112	19Rs	Soja	Japão	D Gonzalez
H21	1	AG-11	-	-	-	-	-
H22	1	AG-11	AB019027	ROTH25	-	Japão	S Kuninaga
H23	2	AG-4 HGII	AB000045	HG-II UHBC	-	Japão	S Kuninaga
			AF354074	7Rs	Alfalfa	EUA	D Gonzalez
H24	1	AG-4 HGII	-	-	-	-	-
H25	1	AG-4 KHGII	-	-	-	-	-
H26	1	AG-2-3	AB019025	237258	-	Japão	S Kuninaga
H27	2	AG-4 HGIII	AF354075	44Rs	Beterraba	EUA	D Gonzalez
			AF354076	45Rs	Beterraba	EUA	D Gonzalez
H28	1	AG-2	AB054879	758C	-	Japão	S Kuninaga
H29	1	AG-6 HGI	AF354102	70Rs	Solo	Japão	D Gonzalez
H30	1	AG-9 TX	-	-	-	-	-
H31	1	AG-3 PT	-	-	-	-	-
H32	2	AG-3 TB	AB000005	1614	-	Japão	S Kuninaga
		AG-3 TB	AF153774	1600NC	Tabaco	EUA, Carolina do Norte	EJ Pope
H33	1	AG-2-1 (2-t)	AB054852	R144	-	Japão	S Kuninaga
H34	1	AG-10	-	-	-	-	-
H35	1	AG-9 TP	AB000046	TP V12M	-	Japão	S Kuninaga
H36	1	AG-9	AF354109	65Rs	Batata	EUA	D Gonzalez
H37	1	AG-9 TX	AB000037	TX S4R1	-	Japão	S Kuninaga
H38	1	AG-10	AB019026	76107	-	Japão	S Kuninaga
H39	1	AG-6 HGI	-	-	-	-	-
H40	1	AG-4 HGI	AB000018	HG-1 GM-3	-	Japão	S Kuninaga
H41	3	Desconhecido	BEL54, BEL64b, BEL66	BEL54, BEL64, Capim Brachiaria, urucum, e BEL66	jambú	Brasil, Belém	LS Poltronieri
H42	3	Desconhecido	BEL62a, BEL62b, BEL64a,	BEL62, BEL64	Abóbora e urucum	Brasil, Belém	LS Poltronieri

Continua ...

...continuação.

Haplótipos mundiais (filogenia de <i>Thanatephorus</i> )	Frequência	Grupo de anastomose	Código da sequência	Isolados	Hospedeiro	Local de origem	Fonte**
H43	2	AG-1 IB	AB000025	1B 001-7	-	Japão	S Kuninaga
			AB000038	1B SFBV-1	-	Japão	S Kuninaga
H44	12	AG-1 ID	AB122125	RCP1	Café	Japão	M Hyakumachi
		AG-1 ID	AB122131	RCP15	Café	Japão	M Hyakumachi
		AG-1 ID	AB122127	RCP4	Café	Japão	M Hyakumachi
		AG-1 ID	AB122130	RCP13	Café	Japão	M Hyakumachi
		AG-1 ID	AB122132	RCP21	Café	Japão	M Hyakumachi
		AG-1 ID	AB122126	RCP3	Café	Japão	M Hyakumachi
		AG-1 ID	AB122129	RCP11	Café	Japão	M Hyakumachi
H44		AG-1 ID	AG-11D e os desconhecidos BEL59, BEL60, BEL61, BEL71	BEL59, BEL60, BEL61, BEL71	Maracujazeiro, feijão, vindicá, e pimenta-do-reino	Brasil, Belém	L SPoltronieri
H45	1	AG-1 ID	AB122128	RCP7	Café	Japão	M Hyakumachi
H46	2	Desconhecido	BEL56a, BEL68	BEL56, BEL68	Café, repolho	Brasil, Belém	L S Poltronieri
H47	1	Desconhecido	BEL56b	BEL56	Café	Brasil, Belém	L SPoltronieri
H48	1	AG-1 IB	AB000039	1B SHIBA-1	-	Japão	S Kuninaga
H49	1	AG-4 HGI	AB000007	HG-I 78-23R-3	-	Japão	S Kuninaga
H50	1	AG-6 GV	-	-	-	-	-
H51	1	AG-6 GV	AF354104	75Rs	Solo	Japão	D Gonzalez
H52	2	AG-3	AB000023	OKA-6	-	Japão	S Kuninaga
		AG-3	AB000024	PKA-9	-	Japão	S Kuninaga
H53	1	AGBI	AB054873	TE2-4	-	Japão	S Kuninaga
H54	1	AG-8	AF354069	(ZG1-4)88351	Cevada	Austrália	D Gonzalez
H55	1	AG-8	AF153795	93444.3	Solo	Austrália	EJ Pope
H56	1	AG-8	AF153799	93462	Solo	Austrália	EJ Pope
H57	3	AG-3 PT	AF354106	42Rs	Batata	EUA	D Gonzalez
		AG-3 PT	AF354107	5Rs	Batata	EUA	D Gonzalez
		AG-3 PT	AB019007	30983	-	Japão	S Kuninaga
H58	1	AG-3 PT	AB019019	Scl-24	-	Japão	S Kuninaga
H59	4	AG-8	AF354067	(ZG1-2)SA50	Aveia	Austrália	D Gonzalez
		AG-8	AF153798	95399	Solo	Austrália	EJ Pope
		AG-8	AF153797	92638	Solo	Austrália	EJ Pope
		AG-8	AF153796	93444.4	Solo	Austrália	EJ Pope

\*Baseando-se num total de 114 sítios polimórficos, após exclusão de inserções/deleções presentes ao longo da sequência. Haplótipos desconhecidos identificados neste estudo são indicados em cinza. \*\* Fonte de isolados ou depositário das sequências da região ITS do rDNA no GenBank® (NCBI): A Johanson, Natural Resources Institute, Central Avenue, Chatham Maritime, Chatham, Kent, ME4 4TB, Reino Unido; AK, Nakatani, CBS - Centraalbureau voor Schimmecultures, Uppsalalaan 8, Utrecht 3584CT, Holanda; APSC Gaino, Unesp, Campus de Ilha Solteira, 15385-000 Ilha Solteira, SP, Brasil; DE González, Instituto de Ecología, A. C., Km 2.5 Antigua Carretera a Coatepec, Xalapa, Veracruz 91000, México; EJ Pope, Department of Microbiology (G08), The University of Sydney, Sydney, New South Wales 2006, Austrália; G Godoy-Lutz, Plant Pathology, University of Nebraska-Lincoln, 406 Plant Sciences Hall, Lincoln, NE 68583-0722, EUA; LS Poltronieri, Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brasil; MB Ciampi, Unesp Campus de Jaboticabal, Depto. Tecnologia, Jaboticabal, SP, Brasil; M Hyakumachi, Gifu University, Faculty of Agriculture; Yanagido 1-1, Gifu, Gifu, 501-1193, Japão; PC Ceresini, Unesp, Campus de Ilha Solteira, 15385-000 Ilha Solteira, SP, Brasil; ETH Zurich - Swiss Federal Institute of Technology, Plant Pathology, LFW B28, 8092 Zurich, Switzerland; RC Fenille, Ministério da Agricultura, Goiânia, Goiás, Brasil; S Kuninaga, Health Sciences University of Hokkaido; Tohbetu, 1757, Ishikari-gun, Hokkaido 061-0293, Japão.

**Tabela 3.** Haplótipos de *Ceratobasidium* spp. (*Rhizoctonia* spp. binucleadas) determinados com base em polimorfismos em sequências da região ITS-5,8S do rDNA\*.

Haplótipos mundiais (filogenia de <i>Ceratobasidium</i> )	Frequência	Grupo de anastomose	Código da sequência	Isolados	Hospedeiro
H1	2	AGA	AF354092	C-662	-
		AGBo	AF354091	SIR-2	Batata doce
H2	2	AG-L	DQ279047	-	-
		AG-L	AF354093	FK02-1	Solo
H3	2	Desconhecido	MIM1a	MIM1	Mimosa
		Desconhecido	MIM1b	-	-
H4	2	S	-	-	-
		CAG-7	AF354084	BN22	<i>Pitiosporium</i>
H5	1	AGR	AJ427407	-	<i>Cucumis</i> sp.
H6	1	E	-	-	-
H7	1	CAG-6	AF354083	BN74	<i>Erigeron</i>
H8	1	AG-E	DQ279013	-	-
H9	1	AG-C	DQ279046	-	-
H10	1	C	-	-	-
H11	1	CAG-4	AF354081	BN38	Soja
H12	3	<i>R. solani</i> (AG desconhecido)	H038, H048, H052	H038, H048, H052	<i>Citrus</i> sp.
H13	1	<i>R. solani</i> AG-2-2 Hb	SER1_a	SER1	Seringueira

Continua...

...continuação.

Haplótipos mundiais (filogenia de <i>Ceratobasidium</i> )	Frequência	Grupo de anastomose	Código da sequência	Isolados	Hospedeiro
H14	1	AGD	AF354090	C-610	-
H15	1	Q	-	-	-
H16	1	AG-Q	DQ279061	-	-
H17	1	CAG-1	AF354086	BN1	Gramado
H18	1	AG-D	DQ279060	-	-
H19	1	I	-	-	-
H20	3	AGU	AB196666	MWR-22	<i>Rosa hybrida</i>
		AGU	AB196664	MWR-20	<i>R. hybrida</i>
		AGU	AB196665	MWR-24	<i>R. hybrida</i>
H21	1	P	-	-	-
H22	1	AG-P	DQ279015	-	-
H23	1	CAG-3	AF354080	BN31	Amendoim
H24	1	F	-	-	-
H25	1	CAG-5	AF354082	BN37	Pepino
H26	1	AG-F	DQ279014	-	-
H27	1	AG-I	DQ279064	-	-
H28	1	AG-Bb	AJ000193	IMI 375130	-
H29	1	AG-Bb	DQ279058	-	-
H30	1	AG-Ba	DQ279059	-	-
H31	1	AG-S	AJ427400	-	<i>Pittosporum</i> SP.
H32	1	G	-	-	-
H33	1	AG-G	DQ279049	-	-
H34	1	AGBa	AF354088	C-460	Arroz
H35	1	AG-K	DQ279056	-	-
H36	1	AGQ	AF354095	C-620	Solo
H37	1	AGO	AF354094	FK06-2	Solo
H38	1	AG-O	DQ279045	-	-
H39	1	AGBo	DQ279057	-	-
H40	1	AGH	AF354089	STC-9	Solo
H41	1	AGH	DQ279065	-	-
H42	3	AGT	AB196662	3Iba-1000	<i>R. odorata</i>
		AGT	AB196661	4Oit-800	<i>R. odorata</i>
		AGT	AB196663	1Fuk-600	<i>R. odorata</i>
	1	AGA	DQ279052	-	-

\*Haplótipos desconhecidos identificados neste estudo são indicados em cinza. \*\*Fonte de isolados ou depositário das seqüências da região ITS do rDNA no GenBank® (NCBI): A Johanson, Natural Resources Institute, Central Avenue, Chatham Maritime, Chatham, Kent, ME4 4TB, Reino Unido; AK Nakatani, CBS - Centraalbureau voor Schimmecultures, Uppsalalaan 8, Utrecht 3584CT, Holanda; APSC Gaimo, Unesp Campus de Ilha Solteira, 15385-000 Ilha Solteira, São Paulo, Brasil; DE González, Instituto de Ecología, A. C., Km 2.5 Antigua Carretera a Coatepec, Xalapa, Veracruz 91000, México; M Hyakumachi, Gifu University, Faculty of Agriculture, Yanagido 1-1, Gifu, Gifu, 501-1193, Japão; PC Ceresini, Unesp Campus de Ilha Solteira, 15385-000 Ilha Solteira, São Paulo, Brasil; ETH Zurich - Swiss Federal Institute of Technology, Plant Pathology, LFW B28, 8092 Zurich, Switzerland.

As relações filogenéticas, baseadas em análise Bayesiana (Figura 1e 2), entre haplótipos da região ITS-5,8S do rDNA, obtidos da amostra de distintos hospedeiros na Amazônia, indicaram que pelo menos cinco AGs de *R. solani* estão associados com manchas foliares nos seguintes hospedeiros: o AG 2-2 em seringueira (SER1 a SER9) e maracujazeiro (BEL88.1 e 2); o AG-1 IB em cafeeiro e repolho; o AG ID em maracujazeiro (isolado BEL59), feijão, vindicá e pimenta-do-reino; e o AG-4 HGI em capim *Brachiaria*, abóbora, urucum e jambu (Tabela 1; Figura 1).

Em citros, no Estado do Acre, detectou-se, pela primeira vez, a ocorrência de um provável novo AG de *R. solani*. Sintomas da infecção foliar, natural de plantas de *Citrus* sp. pelo patógeno, podem ser observados na Figura 3. Em citros, os primeiros relatos de epidemias causadas pela mancha areolada surgiram com a expansão de áreas de cultivo no Estado do Pará nos últimos anos (TRINDADE

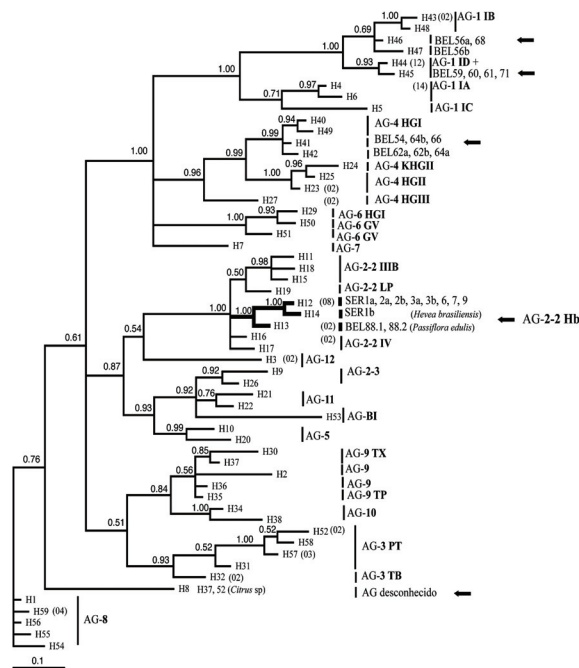
et al., 1997). Nesta cultura, o fungo afeta especificamente as espécies de laranjeira doce, não sendo observado ataque em limoeiros e tangerinas (TRINDADE et al., 1997). Muito pouco é relatado sobre esta doença em condições brasileiras e o potencial de expansão para outras regiões do Brasil é desconhecido.

A análise filogenética indicou posicionamento distinto dos haplótipos da região ITS-rDNA dos isolados de citros em relação aos demais AGs já descritos no mundo (Figura 1). O haplótipo associado aos isolados de *Citrus* sp. não apresentou relação filogenética com quaisquer dos AGs de *Rhizoctonia* spp. binucleadas (Figura 2). Deve-se considerar a possibilidade de se conferir uma denominação particular a este novo AG de *R. solani* (provavelmente AG-14), uma vez que os últimos grupos descritos foram o AG-12 e o AG-13 (CARLING et al., 2002; CARLING et al., 1999). Para tanto, é necessária a introdução destes dois

isolados padrões em nosso laboratório no Brasil para então se determinar, por meio de interações microscópicas, que os isolados de *Citrus* não apresentam anastomose com nenhum dos grupos descritos mundialmente.

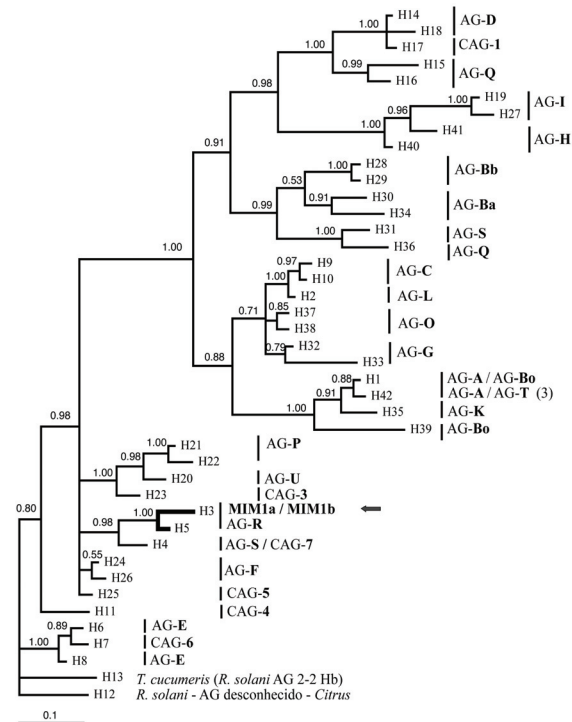
É a primeira vez que se descreve, no Brasil, a ocorrência do grupo de anastomose AG-1 ID em diversos hospedeiros. O AG-1 ID já havia sido relatado como patógeno do café em Mindanao, nas Filipinas, em 1996 (PRIYATMOJO et al., 2001). Confirmou-se, também, pela análise filogenética (Figura 1), que os isolados de seringueira pertencem ao AG 2-2, como relatado por (BOLKAN; RIBEIRO, 1985). Entretanto, estes ocuparam um ramo distinto aos dos AG-2-2 IV, AG-2-2 LP e AG-2-2 IIIB. Isto é uma indicação de que, possivelmente, trata-se também de um novo subgrupo de anastomose dentro do complexo AG-2-2. Propomos a denominação deste novo subgrupo como a de AG-2-2 Hb.

A análise Bayesiana das relações filogenéticas entre haplótipos da região ITS-5.8S de todos os AGs de *Rhizoctonia* spp. binucleadas (*Ceratobasidium* spp.) indicou que o isolado binucleado de *Rhizoctonia* sp. de mimosa (*M. pigra*) pertence ao mesmo ramo do AG-R (Figura 2).



A. *Thanatephorus cucumeris* (fase anamórfica = *Rhizoctonia solani*)

**Figura 1.** Árvore filogenética ilustrando as relações entre haplótipos da região ITS-5.8S dos AGs de *Rhizoctonia solani* (AG-1 a AG-12 e AG-BI) e o grupo de isolados de *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) obtidos de *Hevea brasiliensis* e diversas outras espécies cultivadas ou nativas na Amazônia brasileira\*.



B. *Ceratobasidium* spp. (fase anamórfica = *Rhizoctonia* spp. binucleada)

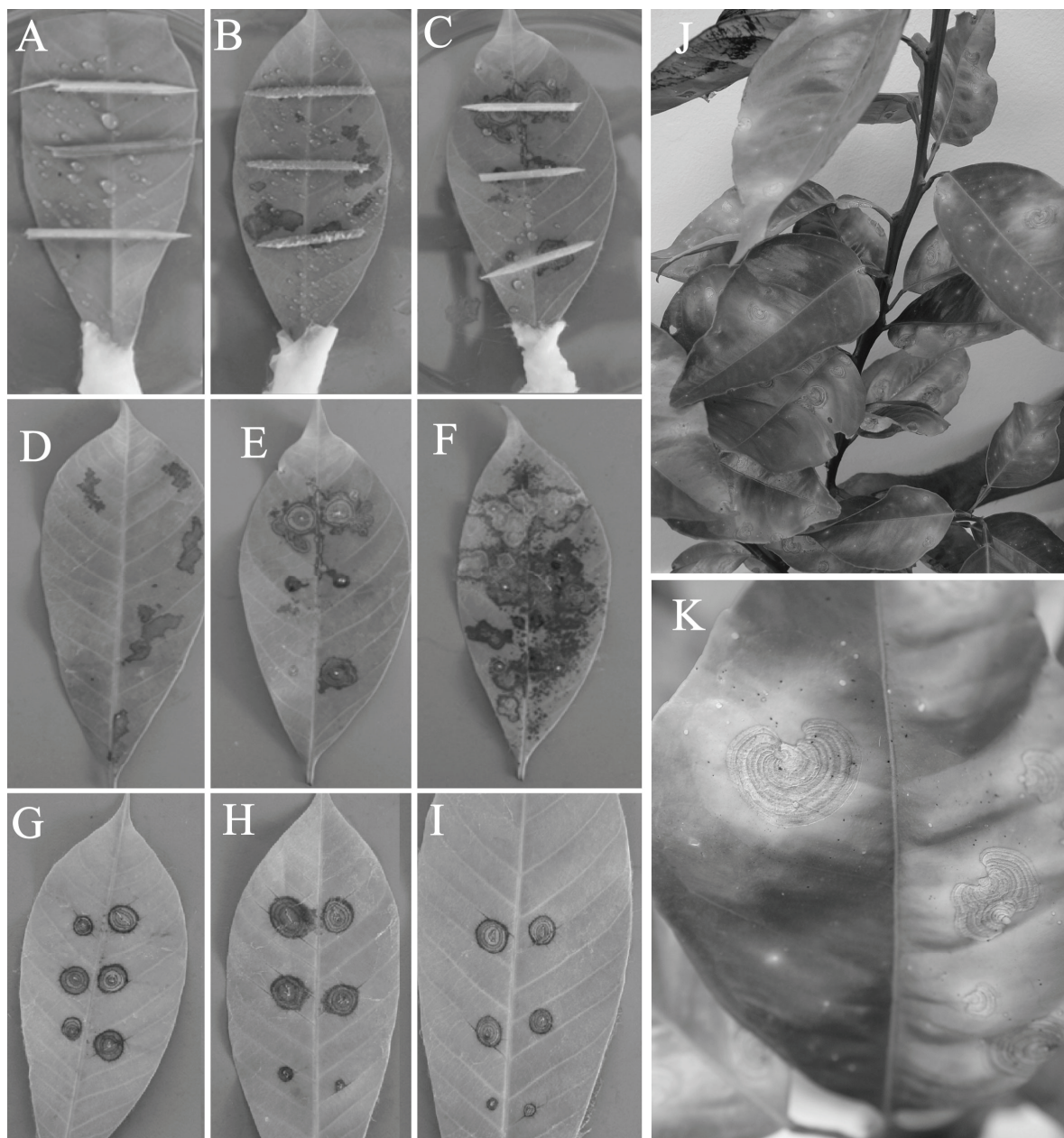
**Figura 2.** Árvore filogenética ilustrando as relações entre haplótipos da região ITS-5.8S dos AGs de *Ceratobasidium* sp. (*Rhizoctonia* sp. binucleadas AG-A a AG-U e CAG-1 a CAG-7) e o grupo de isolados obtido de *Mimosa* sp., espécie nativa da Amazônia brasileira. Esta árvore foi enraizada com a sequência da região ITS-5.8S de *T. cucumeris* (*R. solani* AG-2-2 Hb da seringueira)\*.

\*Os táxons são identificados pelo código do haplótipo mundial de *Thanatephorus* (A) e de *Ceratobasidium* (B) seguido pelo número de amostras e respectivo grupo de anastomose. As sequências da região ITS-5.8S da maioria dos diferentes AGs, utilizadas para se inferir as relações filogenéticas, são oriundas do GenBank® (NCBI). As Tabelas 2 e 3 descrevem os haplótipos das sequências da região ITS-rDNA e os isolados de origem ou grupo de anastomose. As setas em negrito indicam os haplótipos dos isolados que se buscou identificar. Nos ramos principais são apresentados valores de probabilidades posteriores (variando de 0 a 1.0) geradas por análise Bayesiana de MCMCMC. Valores próximos a 1.0 indicam elevada significância estatística para o respectivo ramo, avaliada em 11.542 árvores num total de 3 milhões de árvores artificialmente geradas.

No teste de patogenicidade à seringueira, observou-se que todos os isolados desta planta induziram sintomas característicos de mancha areolada. Os isolados de *R. solani*, oriundos de uma série de hospedeiros distintos e pertencentes ao AG-1 IB e ID, AG-2-2, AG-4 HGI, bem como os isolados de *Citrus* e o isolado de *Rhizoctonia* sp. binucleada AG-R oriundo de mimosa, também foram patogênicos à seringueira RRIM 600 (Tabela 1; Figura 3).

O re-isolamento dos patógenos confirmou a sua atuação como agentes causais de mancha areolada. Baseando-se nos testes de patogenicidade cruzada, aceitou-se a segunda hipótese de que isolados de *T. cucumeris* de hospedeiros distintos são patogênicos também à seringueira.





**Figura 3.** Sintomas de mancha areolada de *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) em folhas destacadas de seringueira, em condições de estufa incubadora. A. testemunha com palitos; B. SER1 (seringueira, AG 2-2 Hb); C e E. BEL71 (pimenta-do-reino, AG 1 ID); D. BEL54 (capim *Brachiaria*, AG 4 HGI); F. BEL88.1 (maracujá, AG 2-2 Hb); G (H38), H (H48) e I. (H52) (*Citrus*, provavelmente um novo AG de *R. solani*); J e K. Sintomas de mancha areolada em citros, em condições naturais; amostras obtidas em Rio Branco, Estado do Acre.

**Conclusão**

Um novo subgrupo de *R. solani* (o AG-2-2 Hb) é o principal agente causal da mancha areolada em seringueira. Entretanto, isolados de outros AGs (AG-1 IB e ID, AG-4 HGI) e de *Ceratobasidium* sp. (AG-R), de hospedeiros distintos, também infectam seringueira. Isto implica diversidade de fonte de inóculo dos patógenos da mancha areolada. De maneira inédita se relata a ocorrência de um novo AG de *R. solani* infectando citros no Estado do Acre, Brasil, distinto dos demais relatados no mundo

(provavelmente AG-14). Dado o complexo de patógenos do gênero *Rhizoctonia* envolvidos com a mancha areolada da seringueira, é necessário selecionar clones resistentes a mais de um AG.

**Agradecimentos**

Agradecemos à Fapesp pelo apoio financeiro, pela concessão de auxílio-pesquisa (a PC Ceresini, processo 04/02127-9) e Bolsa de Iniciação Científica (à APSC Gaino, processo 04/02127-9); à Capes pela concessão de bolsa de Pós-graduação (Mestrado)

para a primeira autora; à Embrapa Amazônia Oriental, Amazônia Ocidental e Acre que nos ofereceram suporte logístico e laboratorial para coleta e isolamento de material e ao ETH Zurich por financiar parcialmente esta pesquisa (processo TH-16/06-1, a PC Ceresini) por meio do Convênio Unesp – ETH.

## Referências

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- BASSETO, M. A.; VALÉRIO FILHO, W. V.; COSTA SOUZA, E.; CERESINI, P. C. O papel de *Rhizoctonia* spp. binucleadas na indução de resistência a mela da soja. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 2, p. 183-189, 2008.
- BENCHIMOL, R. L.; POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R.; ALBUQUERQUE, F. C. White-thread blight: five new hosts in the state of Pará, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 778-778, 2001.
- BOLKAN, H. A.; RIBEIRO, W. R. C. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. **Plant Disease**, v. 69, n. 77, p. 599-601, 1985.
- CARLING, D. E. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (Ed.). **Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1996. p. 37-47.
- CARLING, D. E.; BAIRD, R. E.; GITAITIS, R. D.; BRAINARD, K. A.; KUNINAGA, S. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v. 92, n. 8, p. 893-899, 2002.
- CARLING, D. E.; KUNINAGA, S.; BRAINARD, K. A. Hyphal anastomosis reactions, rDNA-Internal Transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. **Phytopathology**, v. 92, n. 1, p. 43-50, 2001.
- 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**, v. 89, n. 10, p. 942-946, 1999.
- CARPENTER, J. B. **Target leaf spot of the Hevea rubber tree in relation to host development, infection, defoliation and control**. Washington, D.C.: USDA, 1951. (Technical bulletin, 1028).
- CERESINI, P. C.; SOUZA, N. L. Associação de *Rhizoctonia* spp. binucleadas e de *R. solani* Kuhn GA 4 HGI e GA 2-2 III B ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 23, n. 1, p. 14-23, 1997.
- CIAMPI, M. B.; KURAMAE, E. E.; FENILLE, R. C.; MEYER, M. C.; SOUZA, N. L.; CERESINI, P. C. Intraspecific evolution of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA associated with soybean and rice in Brazil based on polymorphisms at the ITS-5.8S rDNA operon. **European Journal of Plant Pathology**, v. 113, n. 2, p. 183-196, 2005.
- DESLANDES, J. A. Observações fitopatológicas na Amazônia. **Boletim Fitossanitário**, v. 1, n. 2-4, p. 223-228, 1944.
- GASPAROTTO, L.; HANADA, R. E.; ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R. Mancha areolada causada por *Thanatephorus cucumeris* em mogno africano. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 660-661, 2001.
- GASPAROTTO, L.; SANTOS, A. F.; PEREIRA, J. C. R.; FERREIRA, F. A. **Doenças da seringueira no Brasil**. Brasília: Embrapa, 1997.
- GASPAROTTO, L.; TRINDADE, D. R.; LIEBEREI, R. Sistema de avaliação da incidência da mancha areolada [*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] em seringueira (*Hevea* spp.). **Fitopatologia Brasileira**, v. 7, n. 3, p. 349-357, 1982.
- GONZALEZ, D.; CARLING, D. E.; KUNINAGA, S.; VILGALYS, R.; CUBETA, M. A. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. **Mycologia**, v. 93, n. 6, p. 1138-1150, 2001.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.
- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MrBayes: bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754-755, 2001.
- KURAMAE-IZIOKA, E. E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista Unimar**, v. 19, n. 3, p. 683-689, 1997.
- LOURD, M.; BRAZ, M. L. A.; GASPAROTTO, L. Ocorrência da mancha areolada em citrus no município de Manaus-AM. **Fitopatologia Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 135, 1984.
- OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, p. 125-143, 1987.
- POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R.; BENCHIMOL, R. Web Blight (*Thanatephorus cucumeris*) in passion fruit in the state of Pará of Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 92, 1999.
- POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.
- PRIYATMOJO, A.; ESCOPALAO, V. E.; TANGONAN, N. G.; PASCUAL, C. B.; SUGA, H.;

KAGEYAMA, K.; HYAKUMACHI, M. Characterization of a new subgroup of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 1 (AG-1-ID), causal agent of a necrotic leaf spot on coffee. **Phytopathology**, v. 91, n. 11, p. 1054-1061, 2001.

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

SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. ***Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control***. Dordrecht: Kluwer Academic, 1996.

SWOFFORD, D. L. **PAUP\* 4.0: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)**, 4.0. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAC, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.

**Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

TRINDADE, D. R.; FURTADO, E. L. Doenças da seringueira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 628-641.

TRINDADE, D. R.; POLTRONIERI, L. S.; ALBUQUERQUE, F. C. Mancha arcolada causada por *Thanatephorus cucumeris* em laranjeiras no estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 115, 1997.

TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess, 1969.

*Received on September 9, 2008.*

*Accepted on November 21, 2008.*

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.