

# Caracterização de Isolados de *Rhizoctonia* spp. e Identificação de Novos Grupos de Anastomose em Jardim Clonal de Eucalipto

Eugenio Sanfuentes<sup>1</sup>, Acelino C. Alfenas<sup>2</sup>, Luiz A. Maffia<sup>2</sup> & Reginaldo G. Mafia<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Victoria 631, Concepción, Chile; <sup>2</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil, e-mail: aalfenas@ufv.br;

<sup>3</sup>Aracruz Celulose S.A. Centro de Pesquisa e Tecnologia, CEP 29197-900, Aracruz, ES, Brasil

Autor para correspondência: Acelino C. Alfenas

---

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

## RESUMO

Espécies de *Rhizoctonia* causam queima foliar em brotações de jardim clonal e podridão de estacas durante o enraizamento, que podem limitar a clonagem do eucalipto, por estaquia. Diante da importância do patógeno para a cultura e da falta de estudos sobre a diversidade de isolados, esse trabalho objetivou caracterizar isolados e relatar novos grupos de anastomose de *Rhizoctonia* spp. em jardim clonal de eucalipto. Os isolados obtidos nas diferentes fases de propagação por estaquia foram caracterizados quanto ao número de núcleos nas células vegetativas, agrupados segundo as características morfológicas das colônias e identificados quanto aos grupos de anastomose, incluindo auxotrofia por tiamina. Avaliou-se, também, a virulência ao eucalipto e o efeito da temperatura no crescimento micelial dos isolados. Não se detectou correlação entre os agrupamentos morfológicos e reações de anastomose. Constatou-se, também, que a população de *Rhizoctonia* spp., nos solos de jardins clonais, é constituída por ampla gama de isolados, predominantemente binucleados, com diferentes graus de virulência a eucalipto. Os isolados binucleados e os multinucleados, tiveram a mesma tendência de crescimento em relação à temperatura, com ótimo para a taxa de crescimento entre 25-30 °C. Observou-se, pela primeira vez, isolados de *R. solani* AG2-2 IIIB e os binucleados de *Rhizoctonia* spp., AG-P e AG-O, como agentes etiológicos da podridão de estacas em casa de vegetação, e os isolados binucleados AG-A e AG-L em solo de jardim clonal de eucalipto.

**Palavras-chave adicionais:** *Rhizoctonia solani*, *Eucalyptus*, etiologia, queima foliar.

## ABSTRACT

**Characterization of isolates of *Rhizoctonia* spp. and identification of new anastomosis groups in eucalyptus clonal nurseries**

*Rhizoctonia* spp. cause shoot and leaf blight of eucalyptus in clonal hedges as well as cuttings. Despite the importance of *Rhizoctonia* spp. to eucalyptus, little is known about their diversity. Thus, we characterized isolates and report new anastomosis groups in a eucalyptus clonal hedge. Isolates obtained at different stages of cutting propagation were characterized according to the number of nuclei in vegetative cells, grouped by morphological characteristics of the colony, anastomosis group, and thiamine auxotrophism. The isolates were also evaluated for virulence on eucalyptus and effect of temperature on their mycelial growth. No correlation between morphological grouping and anastomosis reaction was detected. A wide range of isolates, predominantly binucleate, forms the population of *Rhizoctonia* spp. present in the soil of clonal hedges, which differed in virulence to eucalyptus. Binucleate and multinucleate isolates had similar growth features at different temperatures, with an optimum growth rate between 25-30 °C. Isolates of *R. solani* AG2-2 IIIB and binucleate isolates of *Rhizoctonia* spp., AG-P and AG-O, as agents of cutting rot, and binucleate isolates AG-A and AG-L in the soil of eucalyptus clonal hedge are reported for the first time.

**Additional keywords:** *Rhizoctonia solani*, *Eucalyptus*, etiology, leaf blight.

---

## INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção de mudas de eucalipto é realizada, quase que exclusivamente, por propagação vegetativa. Todavia, a queima foliar de brotações em jardim clonal e em banco clonal e a podridão de estacas durante o enraizamento podem ser limitantes à clonagem, por estaquia, de eucalipto. Nos primeiros relatos, essas doenças foram associadas a isolados de *Rhizoctonia solani* J.G.

Kühn e *Rhizoctonia* spp. (Alfenas *et al.*, 2004).

Com base no número de núcleos das células vegetativas, as espécies de *Rhizoctonia* podem ser divididas em três grupos: uni, bi e multinucleadas (Carling *et al.*, 2002). Isolados de *R. solani* são identificados, segundo a fusão de hifas com isolados-teste, em grupos de anastomose (AG1 a AG13 e AG-BI) (Sneh *et al.*, 1991; Ogoshi, 1996; Carling *et al.*, 2002). Tais grupos podem ser associados a diferentes características culturais, tipo de hospedeiros, dentre outras. Há, contudo, ampla variabilidade dentro de cada grupo. Os grupos de anastomose são ainda subdivididos em subgrupos, segundo a gama de hospedeiros, a morfologia, os requerimentos para tiamina e

---

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG. 2000.

a homologia de DNA. A identificação de *Rhizoctonia* spp., em nível de grupo ou subgrupo de anastomose, além do objetivo taxonômico, é importante sob o ponto de vista ecológico, epidemiológico (Ogoshi, 1996) e de controle (Kataria & Gissi, 1996). Os isolados binucleados de *Rhizoctonia* spp., assim como os multinucleados, também são diferenciados em grupos de anastomose (AG-A a AG-S) (Sneh *et al.*, 1991) ou CAG-1 a CAG-7 (Burpee *et al.*, 1980).

Para culturas florestais, é crescente a importância de isolados binucleados de *Rhizoctonia* (Huang & Kuhlman, 1991; Hietala & Sen, 1996; Comporota & Perrim, 1998). No Brasil, Silveira *et al.* (2000) realizaram o primeiro estudo de identificação de isolados de *Rhizoctonia* obtidos de eucalipto em viveiros, onde havia incidência de podridão de estacas ou queima de brotações. Estes autores identificaram isolados de *R. solani* pertencentes ao grupo AG1 e caracterizaram alguns isolados binucleados. Entretanto, pouco se conhece sobre a diversidade de *Rhizoctonia* spp. em jardim clonal. Sendo assim, o presente trabalho objetivou caracterizar isolados e relatar novos grupos de anastomose de *Rhizoctonia* spp. em jardim clonal de eucalipto.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamento de *Rhizoctonia* spp. do solo de jardim clonal e de substrato de enraizamento

Os isolamentos foram realizados a partir de solo obtido em dois jardins clonais (JC) de eucalipto, localizados em Aracruz ES (JC 1) e em Belo Oriente MG (JC 2). As amostras de solo foram coletadas, mensalmente, durante 12 meses (fevereiro de 1998 a janeiro de 1999) e 11 meses (maio de 1998 a março de 1999), nos JC 1 e JC 2, respectivamente. O isolamento foi realizado de forma indireta, por meio de iscas de eucalipto, conforme Sanfuentes *et al.* (2002): segmentos cilíndricos (20 x 5 mm) de haste de eucalipto, previamente desinfestadas superficialmente com NaClO, a 1000 ppm de Cl<sub>2</sub> ativo, por 5 min, e lavadas com água destilada esterilizada, foram inseridos no solo contido em caixas plásticas do tipo gerbox (11 x 11 x 3 cm). Após incubação a 27 °C, no escuro, por 48 h, as iscas foram retiradas do solo, lavadas em água de torneira por 3 min, desinfestadas com NaClO, a 1000 ppm de Cl<sub>2</sub> ativo, por 3 min, enxaguadas duas vezes com água destilada esterilizada e semeadas em meio de ágar-água (2 %) acidificado (pH = 5,0). Após 24-48 h de incubação a 27 °C, transferiram-se as colônias para meio batata-dextrose-ágar (BDA) inclinado em tubos de ensaio. Para cada amostra de solo, empregaram-se três repetições, cada qual constituída de um gerbox com 200 g de solo e 30 iscas de eucalipto. Efetuou-se o isolamento a partir do substrato de enraizamento, conforme empregado para o solo.

### Isolamento de *Rhizoctonia* spp. de estacas

A partir de estacas, efetuou-se o isolamento de forma direta: as estacas com sintomas de mela foram lavadas em água de torneira, por 2 a 3 min, desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio, a 1000 ppm de Cl<sub>2</sub> ativo, por três min, e o excesso de cloro retirado por duas passagens em água destilada esterilizada. Em seguida, as estacas foram semeadas em ágar-água (2 %) acidificado (pH = 5,0). Após 48 h de incubação, a

27 °C, transferiram-se as colônias para BDA inclinado em tubos de ensaio.

### Determinação do número de núcleos e agrupamento por morfologia das colônias

Para determinar o número de núcleos, empregou-se o método HCl-Giemsa (Herr, 1979). Subseqüentemente, agruparam-se as colônias conforme a morfologia dos isolados caracterizados como binucleados ou multinucleados. Para tal, repicaram-se os isolados para meio BDA em placas de Petri (9 cm), incubando-se a 27 °C, no escuro. Após 15 dias, anotou-se a aparência das colônias, formação de anéis concêntricos no micélio, pigmentação e presença de escleródios. As colônias morfologicamente similares foram agrupadas e para cada agrupamento, elegeu-se um isolado-tipo.

### Identificação do grupo de anastomose

Para identificar os grupos de anastomose, os isolados caracterizados como binucleados ou multinucleados foram pareados diante dos isolados-teste *Rhizoctonia* spp. binucleada e de *R. solani*, empregando-se o método de Parmeter *et al.* (1969). Para determinar as reações de anastomose, o micélio foi corado com lactofenol, contendo 0,5 % azul-de-anilina, e a seguir visualizado ao microscópio de luz (x400).

Isolados que não tiveram reações de anastomose com os isolados-teste foram confrontados a outros isolados, dentro e entre os agrupamentos estabelecidos com base na morfologia, bem como com isolados caracterizados por Silveira *et al.* (2000) como binucleados RH-5, RH-10 e RH-24 e multinucleados RH-18 e RH-26 (AG1). Os isolados-teste utilizados nos pareamentos foram os multinucleados (*R. solani*): AG1-1A (CSKA, CSIW), AG1-1B (B19), AG1-1C (BV7), AG2-1 (F56, PS4), AG2-2 IIIB (C96, C330), AG2-2 IV (RI64), AG2-2 (65L.2), AG3 (ST9, ST-11-6), AG4-HG1 (AH1), AG4 (140), AG5 (CU 8904), AG6-HG1 (OHT-1-1), AG7 (H0-1556) e AG-BI (TS-2-4) e binucleados (*Rhizoctonia* spp.): AG-A (C-517), AG-C (OR-706), AG-D (W-12), AG-E (F-18), AG-F (AH-6), AG-G (AH-9), AG-I (AV-2), AG-K (AC-1), AG-L (Fko-2-26), AG-O (FROG-2), AG-P (C-578) e AG-Q (C-620) (Sneh *et al.*, 1991).

Como critério adicional para identificar os subgrupos de anastomose dos isolados multinucleados AG2, eles foram avaliados quanto ao requerimento para tiamina, conforme Nicoletti *et al.* (1999): discos de cultivo em meio ágar-água foram retirados das margens da colônia e repicados para meio líquido Czapek-Dox (Dhingra & Sinclair, 1995), suplementado ou não com 5 mg/L de tiamina hidrocloreto. Aos 10 dias de incubação, a 27 °C, retirou-se o micélio, removeu-se o excesso de água em papel-filtro, mantido em funil de Büchner, sob vácuo, e pesou-se a massa micelial. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Empregaram-se dois isolados como comparadores: um reconhecidamente auxotrófico (AG-5) e outro prototrófico (AG2-1).

### Avaliação da virulência dos isolados ao eucalipto

Para avaliar a virulência dos isolados de *Rhizoctonia* spp. adaptou-se a metodologia de Silveira *et al.* (2000) pincelou-

se a superfície foliar de ramos de eucalipto (*Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden) com suspensão micelial (2 g micélio/25 mL água) de cada isolado, cultivado em meio líquido semi-sintético (Alfenas *et al.*, 1998). Os ramos foram mantidos com suas bases imersas em água, em câmara de nevoeiro, sob nebulização intermitente, a 25 °C, e fotoperíodo de 12 h. Após 5 dias de incubação, avaliou-se a severidade da doença, mediante escala diagramática com quatro graus: 1- superfície foliar sem sintomas; 2- 1 a 25 %; 3- 26 a 50 %; e 4- 51 % ou mais de superfície foliar com sintoma de mela (Sanfuentes *et al.*, 2002). O grau de severidade de doença incitada correspondeu à média de quatro ramos e 5-6 folhas/ramo.

#### Indução e caracterização dos teleomorfos

Para induzir os teleomorfos de *Rhizoctonia* spp, empregaram-se os mesmos ramos inoculados no item anterior, os quais foram mantidos em câmara de nevoeiro, nas mesmas condições, durante 5 a 10 dias adicionais. Os isolados férteis foram caracterizados quanto às dimensões do metabasídio, dos esterigmas e dos basidiósporos, sob microscópio de luz (x400) (Sneh *et al.*, 1991; Burpee *et al.*, 1980).

#### Efeito da temperatura sobre a taxa de crescimento micelial

Discos de micélio de 7 mm, obtidos das margens

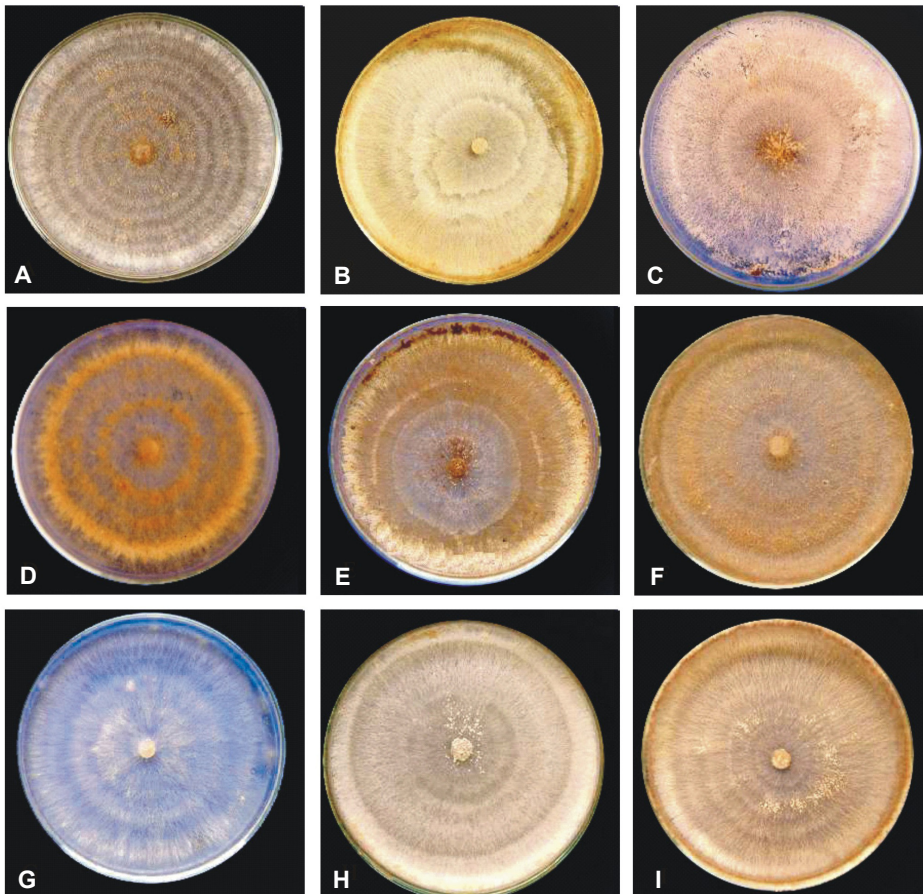
de colônias crescendo ativamente em meio BDA, foram depositados no centro de placas de Petri, contendo 12 ml do mesmo meio de cultivo. As culturas foram incubadas a 15, 20, 25, 30, 35 ou 40 °C. Diariamente, realizou-se a medição do diâmetro das colônias, cujos dados foram utilizados para o cálculo da taxa de crescimento. Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições (uma placa = uma unidade experimental).

## RESULTADOS

#### Determinação do número de núcleos e agrupamento por morfologia das colônias

Dentre 182 isolados de *Rhizoctonia* spp., obtidos a partir do solo do jardim clonal, 47 (25,8 %) foram multinucleados e 135 (74,2%) binucleados. Dentre os isolados associados à mela de estacas em casa de enraizamento, cinco (35,7 %) eram multinucleados e nove (64,3 %) binucleados. Dois isolados, obtidos a partir de resíduos de substrato em tubetes, eram multinucleados.

Com base na morfologia das colônias, as culturas foram classificadas em cinco grupos de multinucleados: MN1 (Figura 1A), MN2 (Figura 1B), MN3 (Figura 1C), MN4 (Figura 1D) e MN5 (Figura 1E); e quatro grupos binucleados: BN1 (Figura 1F), BN2 (Figura 1G), BN3 (Figura 1H) e BN4 (Figura 1I).



**FIG. 1** – Características morfológicas de colônias de isolados multinucleados e binucleados de *Rhizoctonia* spp.; **A.** Grupo MN1; **B.** Grupo MN2; **C.** Grupo MN3; **D.** Grupo MN4; **E.** Grupo MN5; **F.** Grupo BN1; **G.** Grupo BN2; **H.** Grupo BN3; **I.** Grupo BN4.



(Figura 1H) e BN4 (Figura 1I), conforme as características predominantes (Tabela 1).

### Identificação do grupo de anastomose

Para um mesmo grupo morfológico, encontraram-se isolados pertencentes a diferentes grupos de anastomose para colônias binucleadas e multinucleadas. Os isolados tipos dos grupos MN1 e MN5 não realizaram anastomose com nenhum isolado-teste, enquanto os dos grupos MN2, MN3 e MN4 foram incluídos no grupo de anastomose AG1, AG4 e AG2 – 2 IIIB, respectivamente. O isolado-tipo do grupo MN2 também realizou anastomose com o isolado RH-18 (AG-1), e as características morfológicas de ambos foram semelhantes.

O isolado-tipo do grupo MN4 realizou anastomose, em diferentes graus, com os isolados-teste correspondentes aos subgrupos AG2-2 e com AGI-BI. Todavia, não se detectou anastomose com o grupo AG2-1. Em relação ao requerimento por tiamina, confirmou-se a auxotrofia, com relação de crescimento de biomassa maior que 10 (com/sem tiamina), semelhantes ao isolado auxotrófico testemunha do subgrupo AG2-2.

Apenas o isolado-tipo do grupo BN2 realizou anastomose, sendo identificado como AG-L. Dentro dos grupos morfológicos, identificaram-se isolados (RL-C, C2B2 e C3-21.3) que formaram anastomose com os isolados C-578, FROG-2 e 517, correspondendo aos grupos binucleados AG-P, AG-O e AG-A, respectivamente. Os isolados C3-23.1 (BB4) e C-II-28/p3 (BB3) produziram anastomose com os isolados RH-24 e RH-5.

### Avaliação da virulência dos isolados ao eucalipto

A maioria dos isolados multinucleados foi patogênica a folhas de eucalipto com graus 3-4 de severidade.

Os isolados C3-8.6 e C1-16.5-1, pertencentes ao grupo AG2-2 IIIB, foram de baixa virulência, que coincidiu com sua morfologia anormal.

Os isolados binucleados testados variaram quanto à virulência, sendo os dos grupos BN3 e BN4 altamente virulentos, enquanto os isolados dos grupos BN1 e BN2 variaram de altamente virulentos a não-patogênicos (Tabela 2).

### Indução e caracterização dos teleomorfos

A maioria dos isolados multinucleados, correspondentes a *R. solani*, produziu a fase basidial em ramos e folhas de eucalipto após 8 a 14 dias da inoculação. As características morfológicas corresponderam às descritas previamente para *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk (Sneh *et al.*, 1991). Entretanto, as dimensões do metabasídio e dos basidiósporos foram ligeiramente inferiores às descritas para esta espécie (metabasídio 14-18  $\mu\text{m}$  x 8-10  $\mu\text{m}$ , geralmente com quatro esterigmas 10-17  $\mu\text{m}$ , basidiósporos 8-5  $\mu\text{m}$  x 6-4  $\mu\text{m}$ ). Dentre os isolados binucleados, apenas o C-II-28/p6 produziu a fase perfeita, cujas características morfológicas e tamanho do metabasídio (14 x 10  $\mu\text{m}$ ) e dos basidiósporos (8-5  $\mu\text{m}$  x 6-4  $\mu\text{m}$ ) foram semelhantes aos descritos para *Ceratobasidium* sp. (Sneh *et al.*, 1991).

### Efeito da temperatura sobre a taxa de crescimento micelial

Os isolados binucleados e multinucleados não diferiram quanto ao crescimento micelial, na faixa de 5-40 °C, cuja curva de crescimento ajustou-se ao modelo quadrático ( $p < 0,001$ ) (Figura 2). Verificou-se baixa variabilidade no crescimento micelial, entre os isolados, cuja taxa de crescimento variou de 0,2 a 0,7 mm/dia (15 a 30 °C e 40 °C) e de 0,2 a 1,4 mm/dia (35 °C).

**TABELA 1** - Agrupamento dos isolados binucleados e multinucleados de *Rhizoctonia* spp. por morfologia das colônias e dos escleródios

Grupo morfológico	Morfologia de colônias			Escleródios		
	Cor	Tipo de crescimento micelial	Presença	Cor	Tamanho	Posição na colônia
MN1	Bege-marrom	Rasteiro	Abundante*	Marrom	0,5-5 mm	Superficial
MN2	Creme-amarronzado	Rasteiro	Ausente	-	-	-
MN3	Branco acinzentado	Rasteiro	Escassa**	Marrom	0,5-10 mm	Imerso
MN4	Marrom claro a escuro	Rasteiro e aéreo	Abundante	Marrom	0,3-2 mm	Superficial
MN5	Marrom	Rasteiro	Escassa	Marrom	<2mm-	Superficial
BN1	Marrom claro a escuro	Rasteiro e aéreo	Escassa a abundante	Marrom	0,2-5 mm	Superficial e aéreo
BN2	Bege-marrom claro	Rasteiro	Escassa a abundante	Bege	0,5-5 mm	Superficial
BN3	Creme a bege	Rasteiro	Escassa	Bege	<1 mm	Superficial
BN4	Bege a marrom	Rasteiro e aéreo	Escassa	Bege	< 1 mm	Superficial

\*Escleródios produzidos em toda a colônia. \*\*Escleródios produzidos de forma esparsa na colônia.

**TABELA 2** - Distribuição dos isolados binucleados de *Rhizoctonia* spp. segundo o grau de severidade de sintomas da mela em ramos de eucalipto por agrupamento morfológico

Severidade*	Grupo				Total
	BN1	BN2	BN3	BN4	
1	1 (4,5%)	1 (12,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2
2	13 (59,1%)	6 (75,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	19
3	6 (27,3%)	1 (12,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	7
4	2 (9,1%)	0 (0,0%)	3 (100%)	2 (100%)	7
Total	22	8	3	2	35

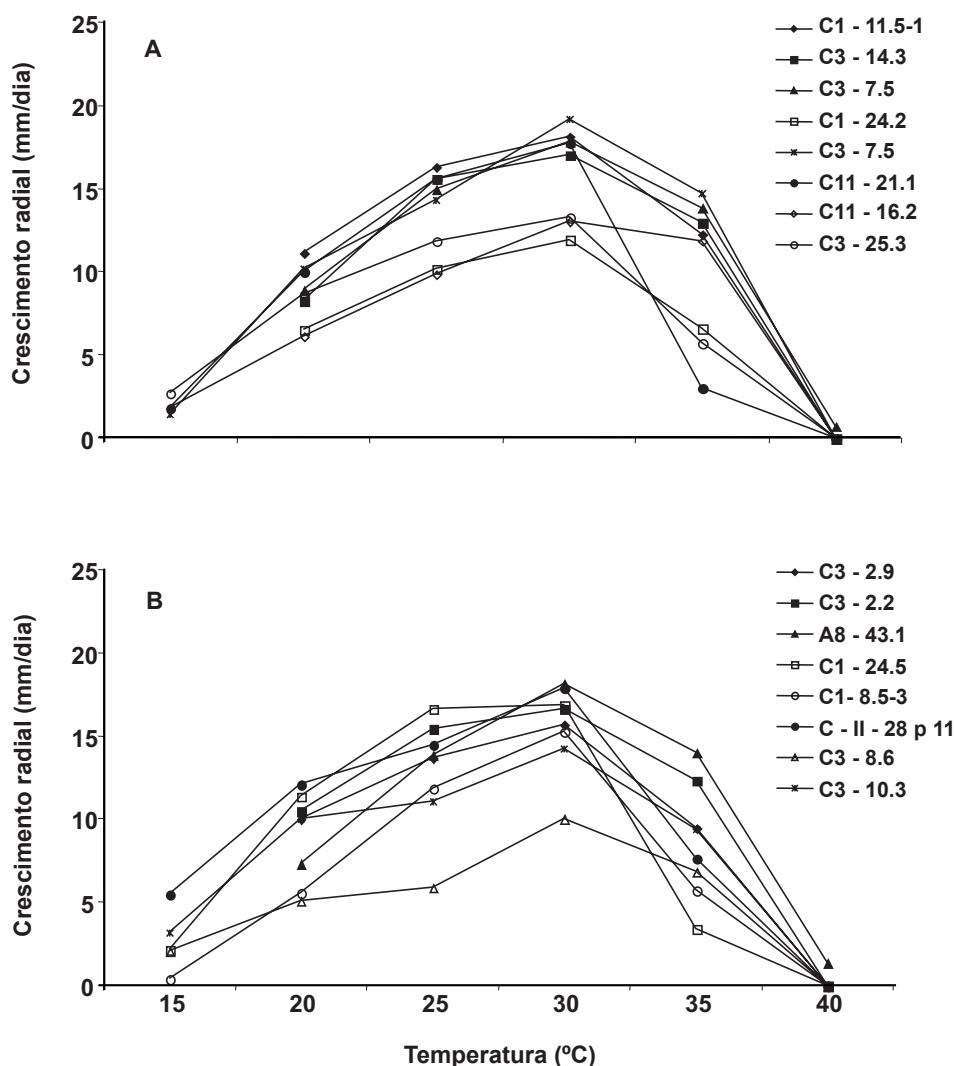
\*Severidade conforme a escala de notas (1: 0%; 2: 1-25%; 3: 26-50%; e 4: >50% de severidade de mela foliar).

A maioria dos isolados teve o máximo de incremento radial na faixa de 25-30 °C, porém para os isolados multinucleados A8-43.1 e C3-8.6 (AG2-2) e o binucleado C3-7.5, o máximo foi entre 30 e 35 °C. Entre

os isolados binucleados, foi possível distinguir um grupo com crescimento médio de 16 a 18 mm/dia, de outro com taxa de crescimento entre 11 a 13 mm/dia. Entretanto, esses grupos foram heterogêneos, constituídos por vários tipos de isolados. Os isolados multinucleados apresentaram taxas máximas de crescimento entre 14 a 17 mm/dia (excetuando o isolado C3-8.6), ligeiramente inferior à dos isolados binucleados de maior crescimento (Figura 2). Os isolados pertencentes a *R. solani* AG2-2 (C3-8.6, C3-10.3 3 e C-II-28/p11) cresceram a 35 °C, o que segundo esse critério, confirmou a caracterização desses isolados no sub-grupo de anastomose AG2-2 IIIB.

## DISCUSSÃO

Observou-se ampla diversidade entre isolados de *Rhizoctonia* spp. em solo de jardim clonal de eucalipto, com predominância de isolados binucleados (74,2 %) sobre os multinucleados (25,8 %). Ocorreu ainda maior proporção



**FIG. 2** - Crescimento micelial radial (mm/dia), em BDA, sob diferentes temperaturas de incubação de isolados binucleados (A) e isolados multinucleados (B) de *Rhizoctonia* spp.

de isolados binucleados (64,3 %) associados à podridão de estacas em casa de enraizamento. Não se esperava maior frequência de isolados binucleados, pois, no mesmo jardim clonal, identificaram-se anteriormente apenas isolados multinucleados, associados à queima de brotações em cepas de eucalipto (Silveira *et al.*, 2000). Analogamente, aos resultados do presente trabalho, outros autores verificaram frequências de isolados binucleados de *Rhizoctonia* spp. maiores que 50 % (Ploetz *et al.*, 1985; Schisler *et al.*, 1994; Comporota & Perrin, 1998) e até mesmo maiores que 90 % (AG-A, AG-G e AG-I), em raízes de morangueiro (Martin, 1988).

Com base nas reações de anastomose de hifas, caracterizaram-se os isolados binucleados em sete grupos, e, por meio de critérios morfológicos, obtiveram-se apenas quatro grupos. Essa discrepância reforça a necessidade de se empregar a anastomose de hifas como principal critério de classificação, especialmente entre isolados binucleados. O uso de características culturais pode ser útil para identificar grande número de isolados em uma seleção preliminar, apesar do risco de existirem isolados com características morfológicamente similares, mas geneticamente distintos (Ploetz *et al.*, 1985). Isolados do grupo BN1 foram mais frequentes no solo, mas não incitaram doença no campo e em estacas na fase de enraizamento. A predominância de um tipo de isolado de *Rhizoctonia* spp. no solo, em uma cultura, não estará necessariamente relacionada à sua especificidade como patógeno para a cultura principal. Segundo Ploetz *et al.* (1985), a baixa incidência de doença em soja, causada por isolados binucleados de *Rhizoctonia* spp., frequentemente coletados no solo, pode ser atribuída ao fato de esses isolados serem patogênicos somente a plantas daninhas presentes no campo de cultivo, como também por colonizarem o hospedeiro ou outras plantas sem causar doença. De acordo com os mesmos autores, esses isolados podem não causar doença, sob condições controladas, em vista de as condições ambientais serem diferentes daquelas existentes no campo.

A maior frequência de isolamento de um determinado tipo de isolado de *Rhizoctonia* spp. pode estar relacionada à quantidade de inóculo desse isolado no solo e à maior capacidade saprofítica competitiva em relação aos outros isolados. O método de iscas pode ser seletivo para determinados isolados de *Rhizoctonia* spp. que possuem alta capacidade saprofítica competitiva (Papavizas & Davey, 1962). Todavia, até o presente, não se conhecem os aspectos ecológicos de isolados binucleados de *Rhizoctonia* spp. e tampouco suas interações antagônicas a isolados de *R. solani*, comprovadamente patogênicos ao eucalipto. Vários autores já relataram o uso de isolados binucleados hipovirulentos para o biocontrole de isolados patogênicos de *R. solani* (diferentes AGs) em vários patossistemas (Sneh, 1996).

Entre os isolados binucleados, foram identificados os grupos de anastomose AG-L, AG-P, AG-O e AG-A. A maioria deles apresentou de baixa a intermediária virulência ao eucalipto. Esta constitui a primeira constatação destes grupos de anastomose no Brasil. Para os isolados dos

grupos AG-L e AG-O, não existem registros de doença em plantas (Sneh *et al.*, 1991), enquanto para o grupo AG-A, há relatos de isolados patogênicos a amendoim (Brenneman, 1996) e a coníferas (Hietala & Sen, 1996). Isolados AG-P foram descritos como agentes etiológicos da “podridão preta” em folhas de chá (Sneh *et al.*, 1991). Os isolados dos grupos BN3 e BN4 foram altamente virulentos a folhas de eucalipto, analogamente aos resultados obtidos por Silveira *et al.* (2000), com os isolados RH-5 e RH-24. Considerando a importância fitopatológica desses isolados, junto aos do grupo BN1, devem-se continuar os trabalhos de identificação, especialmente com os que podem constituir novos grupos de anastomose.

Dentre as formas multinucleadas de *Rhizoctonia*, identificaram-se isolados dos grupos de anastomose AG2-2 (MN4), AG4 (MN3) e um isolado que realizou anastomose de hifas com RH-18 (AG-1). Todavia, os isolados dos grupos morfológicos MN1 e MN5 não realizaram anastomose com nenhum dos isolados-teste. A maior frequência de isolados AG2-2 no solo pode ser resultado da maior capacidade saprofítica (Hashiba & Kobayashi, 1996). Os isolados AG2-2, identificados conforme os critérios de frequência de anastomose de hifas e auxotrofia para tiamina (Ogoshi, 1996) e crescimento a 35 °C, foram incluídos no subgrupo AG2-2 IIIB (Hyakumachi *et al.*, 1998). Dentre os isolados AG2-2 obtidos do solo, observaram-se diferentes tipos morfológicos, os quais foram distintos daqueles coletados de estacas em casa de vegetação, similares a AG2-2 IIIB. Alguns isolados foram morfológicamente similares aos do subgrupo AG2-3, porém não realizaram anastomose com isolados AG2-1. Uma das características utilizadas na identificação de isolados AG2-3 é sua alta frequência de anastomose com isolados AG2-1, contrariamente aos isolados AG2-2, que possuem baixa frequência de anastomose com isolados desse grupo (Naito & Kanematsu, 1994). Isolados AG2-2 são patogênicos a várias espécies de gramíneas, cultivadas ou daninhas (Burpee & Martin, 1992; Hashiba & Kobayashi, 1996), beterraba açucareira (Herr, 1996). Entretanto, são escassos os trabalhos sobre grupos de anastomose de *R. solani* ou *Rhizoctonia* spp. binucleadas, em espécies florestais. Huang & Kulhman (1991) identificaram *R. solani* AG2-2 em solo de viveiro com incorporação de composto de casca de pinus, mas com baixa virulência em mudas de *Pinus elliottii* Engelm. var *elliotti*. Acredita-se que o presente trabalho seja o primeiro relato de *R. solani* AG2-2 IIIB como agente etiológico da podridão de estacas de eucalipto. Os resultados obtidos, quanto à variabilidade dos isolados de *Rhizoctonia* spp. no solo, confirmam o estabelecido por Papavizas & Davey (1962), para os quais, fungos podem existir no solo como clones distintos, possuindo várias potencialidades, tanto como saprófitas ou como patógenos.

Na fase de agrupamento pelas características morfológicas, observaram-se isolados com características distintas das de *R. solani* e de *Rhizoctonia* binucleada. Esses isolados tiveram características típicas de *Rhizoctonia zea* Voorhess (Ploetz *et al.*, 1985). Dez isolados de *R. zea*

coletados no solo do jardim clonal 1 foram patogênicos a eucalipto (Sanfuentes, 2000). Esta espécie de *Rhizoctonia* causa doenças foliares em pastagens naturais e gramados (Burpee & Martin, 1992), gramíneas cultivadas (Li *et al.*, 1998; Hashiba & Kobayashi, 1996), cereais (Mazzola *et al.*, 1996) e tombamento de mudas em pinus (Sneh *et al.*, 1991).

Em vista dos resultados obtidos, conclui-se que a população de *Rhizoctonia* spp., nos solos de jardins clonais, é constituída por ampla gama de isolados, predominantemente binucleados, com diferentes graus de virulência a eucalipto. Os isolados binucleados, assim como os multinucleados, têm a mesma tendência de crescimento em relação à temperatura, com ótimo entre 25-30 °C. Dentre os isolados identificados, relata-se pela primeira vez isolados de *R. solani* AG2-2 IIIB e os binucleados de *Rhizoctonia* spp., AG-P e AG-O, como agentes etiológicos da podridão de estacas em casa de vegetação, e os isolados binucleados AG-A e AG-L em solo de jardim clonal de eucalipto. À medida que se intensificarem os estudos em essências florestais, compreender-se-á melhor a ecologia de *Rhizoctonia* spp. e poder-se-á racionalizar o manejo das espécies e isolados fitopatogênicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C., BRUNE, W., OLIVEIRA, J.R., ALONSO, S.K. & SCORTICHINI, M. Extração de proteínas para eletroforese. In: Alfenas, A.C. (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Viçosa, MG. UFV, Imprensa Universitária. 1998.
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G. & ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa, MG. Editora UFV. 2004.
- BRENNEMAN, T.B. Peanut diseases incited by *Rhizoctonia* species. In: Sneh, B., Jabahi-Hare, S., Neate, S. & Dijst, G. (Eds.) *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. 1996. pp. 315-320.
- BURPEE, L. & MARTIN, B. Biology of *Rhizoctonia* species associated with turfgrasses. *Plant Disease* 76:112-117. 1992.
- BURPEE, L., SANDERS, P.L. & COLE, H.J.R. Anastomosis groups among isolates of *Ceratobasidium cornigerum* and related fungi. *Mycologia* 72:689-701. 1980.
- 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* 92:893-899. 2002.
- COMPOROTA, P. & PERRIN, R. Characterization of *Rhizoctonia* species involved in tree seedling damping-off in French forest nurseries. *Applied Soil Ecology* 10:65-71. 1998.
- DHINGRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. Basic plant pathology methods. 2<sup>nd</sup>. Ed. Boca Raton FL. CRC Press Inc. 1995.
- HASHIBA, T. & KOBAYASHI, T. Rice diseases incited by *Rhizoctonia* species. In: Sneh, B., Jabahi-Hare, S., Neate, S. & Dijst, G. (Eds.) *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. 1996. pp.331-340.
- HERR, L. Practical nuclear staining procedures for *Rhizoctonia*-like fungi. *Phytopathology* 69:958-961. 1979.
- HERR, L.J. Sugar beet diseases incited by *Rhizoctonia* spp. In: Sneh, B., Jabahi-Hare, S., Neate, S. & Dijst, G. (Eds.) *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. 1996. pp. 341-349.
- HIETALA, A.M. & SEN, R. *Rhizoctonia* associated with forest trees. In: Sneh, B., Jabahi-Hare, S., Neate, S. & Dijst, G. (Eds.) *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. 1996. pp.351-358.
- HUANG, J.W. & KUHLMAN, E.G. Formulation of soil amendment to control damping-off of slash pine seedlings. *Phytopathology* 81:163-170. 1991.
- HYAKUMACHI, M., MUSHIKA, T., OGISO, Y., TODA, T., KAGEYAMA, K. & TSUGE, T. Characterization of a new cultural type (LP) of *Rhizoctonia solani* AG2-2 isolated from warm-season turfgrasses, and its genetics differentiation from other cultural types. *Plant Pathology* 47:1-9. 1998.
- KATARIA, H.R. & GISSI, U. Chemical control of *Rhizoctonia* species. In: Sneh, B., Jabahi-Hare, S., Neate, S. & Dijst, G. (Eds.) *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. 1996. pp. 537-547.
- LI, H.R., WU, B.C. & YAN, S.Q. Aetiology of *Rhizoctonia* in sheath blight of maize in Sichuan. *Plant Pathology* 47:16-21. 1998.
- MARTIN, S.B. Identification, isolation frequency, and pathogenicity of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* spp. from strawberry roots. *Phytopathology* 78:379-384. 1988.
- MAZZOLA, M., SMILEY, R.W., ROVIRA, A.D. & COOK, J.R. Characterization of *Rhizoctonia* isolates, diseases occurrence and management in cereals. In: Sneh, B., Jabahi-Hare, S., Neate, S. & Dijst, G. (Eds.) *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. 1996. pp. 259-267.
- NAITO, S. & KANEMATSU, S. Characterization and pathogenicity of a new anastomosis subgroup AG2-3 of *Rhizoctonia solani* Kühn isolated from leaves of soybean. *Annals of the Phytopathogycal Society of Japan* 60:681-690. 1994.
- NICOLETTI, R., LAHOZ, E., KANEMATSU, S., NAITO, S. & CONTILLO, R. Characterization of *Rhizoctonia solani* isolates from tobacco fields related to anastomosis group 2-1 and BI (AG2-1 and AG BI). *Journal of Phytopathology* 147:71-77. 1999.
- OGOSHI, A. Introduction – the genus *Rhizoctonia*. In: Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. & Dijst, G. (Eds.) *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. 1996. pp. 1-9.
- PAPAVIZAS, G.C. & DAVEY, C.B. Isolation and pathogenicity of *Rhizoctonia* saprophytically existing in soil. *Phytopathology* 52:834-840. 1962.
- PARMETER, J.R., SHERWOOD, R.T. & PLATT, W.D. Anastomosing grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 59:1270-1278. 1969.

PLOETZ, R.C., MITCHELL, D.J. & GALLAHER, R.N. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* species from reduced-tillage experiment multicropped to rye and soybean in Florida. *Phytopathology* 75:833-839. 1985.

SANFUENTES, E.A., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A. & SILVEIRA, S.F. Comparison of baits to quantify inoculum density of *Rhizoctonia* spp. in *Eucalyptus* clonal garden soils. *Australasian Plant Pathology* 31:177-183. 2002.

SANFUENTES, E.A. Caracterização de isolados, flutuação populacional e controle biológico de *Rhizoctonia* em jardim clonal de *Eucalyptus*. Tese de Doutorado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2000.

SCHISLER, D.A., NEATE, S.M. & MASUHARA, G. The

occurrence and pathogenicity of *Rhizoctonia* fungi in South Australian plant nurseries. *Mycological Research* 98:77-82. 1994.

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* 106:27-36. 2000.

SNEH, B. Non pathogenic isolates of *Rhizoctonia* spp. (np-R) and their role in biological control. In: Sneh, B., Jabahi-Hare, S., Neate, S. & Dijst, G. (Eds.) *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. 1996. pp. 473-483.

SNEH, B., BURPEE, L. & OGOSHI, A. Identification of *Rhizoctonia* species. St. Paul MN. APS Press. 1991.

---

Recebido 21 Março 2006 - Aceito 23 Abril 2007 - FB 6032