



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Rizoctoniose do feijoeiro: Caracterização
molecular do patógeno e controle biológico
com leveduras**

Dyana de Albuquerque Tenório

Recife – PE

2015

DYANA DE ALBUQUERQUE TENÓRIO

**Rizoctoniose do feijoeiro: Caracterização molecular do
patógeno e controle biológico com leveduras**

**RECIFE-PE
FEVEREIRO – 2015**

DYANA DE ALBUQUERQUE TENÓRIO

Rizoctoniose do feijoeiro: Caracterização molecular do patógeno e controle biológico com leveduras

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador(a): Prof.^o Dr.^o Delson Laranjeira (UFRPE)

Co-Orientador(a): Prof.^o Dr.^o Cristiano Souza Lima (UFC)

**RECIFE-PE
FEVEREIRO - 2015**

Ficha catalográfica

T312r Tenório, Dyana de Albuquerque
Rizoctoniose do feijoeiro: Caracterização molecular do patógeno e controle biológico com leveduras / Dyana de Albuquerque Tenório. – Recife, 2015.
82 f. : il.

Orientador(a): Delson Laranjeira.
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2015.
Referências.

1. ITS rDNA 2. Filogenia 3. SSR 4. Biocontrole
5. Indução de resistência I. Laranjeira, Delson, orientador
II. Título

CDD 632

**RIZOCTONIOSE DO FEIJOEIRO: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO
PATÓGENO E CONTROLE BIOLÓGICO COM LEVEDURAS**

DYANA DE ALBUQUERQUE TENÓRIO

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 25/02/2015

ORIENTADOR:

Prof^o. Dr^o. Delson Laranjeira (UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof^o. Dr^o. Cristiano Souza Lima (UFC)

Prof^a. Dr^a. Rejane Pereira Neves (UFPE)

Prof^o. Dr^o. Ueder Pedro Lopes (UFRPE/UAG)

Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Alves de Oliveira (UFRPE)

**RECIFE-PE
FEVEREIRO – 2015**

Á Deus pela oportunidade de mais uma conquista e por todas as bênçãos, me dando força e coragem para seguir adiante.

OFEREÇO

Aos meus pais e irmão que sempre me incentivaram mesmo nos momentos mais difíceis, com atenção e carinho.

Ao meu esposo por todo o amor dedicado.

Ao meu tio José Soares pelo carinho e força

DEDICO

A todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela constante presença em minha vida pelo amparo, para trilhar o caminho desta conquista.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco - **UFRPE** e ao **Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia** pelo apoio institucional e a **CAPES/CNPq** pela concessão da bolsa de estudo. À Unidade Acadêmica de Garanhuns e **CENLAG**, pela disposição de suas instalações e recursos para a realização deste trabalho.

Aos meus orientadores **Prof. Dr^o. Delson Laranjeira** e **Prof. Dr^o. Cristiano Souza Lima** pela orientação, ensinamentos e confiança em mim depositada, na execução deste trabalho.

Um agradecimento especial a **Prof. Dr^o. Erika Valente** que colaborou nos trabalhos e ao **Dr^o. Antônio Félix da Costa** (IPA) pela contribuição com material vegetal utilizado nos experimentos.

Aos meus pais **Evandro e Maria Quitéria** pelos ensinamentos, amor, incentivo e apoio em momentos tão importantes em minha vida. Ao meu irmão **Davy** e **familiares** pelo carinho e torcida.

Ao meu esposo, **João Henrique** pela demonstração de companheirismo, carinho e amor dedicando-se a realização de um sonho. Também á seus pais e familiares pelos momentos de apoio de demonstração de cuidado.

Aos meus amigos fitopatologistas **Cristiane, Leilson e Aricléia** pela convivência, carinho, ajuda e amizade e aos meus **colegas** de doutorado com quem convivi e compartilhei os meus anseios.

Aos companheiros do Laboratório CENLAG **Jamilly Barros, Jéssica Moraes, Wendson Silva e Aldo Texeira** pelo convívio e pela inestimável ajuda na realização dos experimentos.

Aos meus **amigos** alagoanos, que sempre estiveram ao meu lado me dando apoio e força para seguir adiante.

SUMÁRIO

	Pág
RESUMO GERAL.....	viii
GENERAL ABSTRACT.....	ix
CAPÍTULO I – Introdução Geral.....	1
1. Importância do feijoeiro.....	2
2. Doenças radiculares da cultura.....	3
3. O patógeno – <i>Rhizoctonia solani</i>	4
4. Classificação do patógeno <i>Rhizoctonia solani</i>	5
5. Identificação molecular do patógeno.....	6
6. Controle da doença.....	7
7. Aspectos gerais do controle biológico.....	8
8. Controle biológico com leveduras.....	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
CAPÍTULO II - Caracterização molecular de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> provenientes de feijoeiro no agreste meridional de Pernambuco.....	23
Resumo.....	24
Introdução.....	25
Material e Métodos.....	27
Resultados.....	30
Discussão.....	31
Agradecimentos.....	33
Referências Bibliográficas.....	34
CAPÍTULO III - Potencial de leveduras no controle da rizoctoniose do feijoeiro caupi.....	44
Resumo.....	45
Introdução.....	46
Material e Métodos.....	47
Resultados.....	51
Discussão.....	53
Agradecimentos.....	57
Referências Bibliográficas.....	58
CONCLUSÕES GERAIS.....	72

RESUMO GERAL

A rizoctoniose, causada pelo fungo de solo *Rhizoctonia solani*, é considerada uma das doenças mais importantes do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris*) e do feijoeiro-caupi (*Vigna unguiculata*), sendo um dos fatores responsáveis pela baixa produtividade da cultura. O presente trabalho teve como objetivos: caracterizar isolados do agente causal da rizoctoniose do feijoeiro na região do agreste de Pernambuco, utilizando marcadores microssatélites e análise filogenética; e avaliar o uso de leveduras no controle do agente causal da rizoctoniose do feijoeiro. Em áreas de cultivo do feijoeiro da região do agreste meridional de Pernambuco, realizaram-se coletas de plantas com sintomas da rizoctoniose. Sendo obtidos 34 isolados fúngicos identificados como *Rhizoctonia*. Na análise filogenética, as sequências gênicas da região ITS do rDNA destes isolados foram similares a pelo menos três grupos de anastomose (AG4 HG-I, AG3-PT e AG4 HG-III). Na análise de microssatélites, cinco conjuntos de iniciadores (TC_AG3_1, TC01, TC06, TC_AG3_09 e TC11) amplificaram um total de 13 bandas, observando-se variação genética. Setenta isolados de *R. solani* foram avaliados quanto a agressividade, sendo selecionado o isolado CMM-3643 para o ensaio de controle biológico. Foram obtidos 70 isolados de leveduras de plantas de feijoeiro aparentemente assintomáticas, destes foram escolhidos os que proporcionaram índice de severidade da doença $\leq 25\%$. Ensaio experimentais demonstraram que os três isolados de leveduras (C6A, FVF10 (R1), FVC10) selecionados foram promissores como agentes de biocontrole da rizoctoniose do feijoeiro-caupi (cv. IPA-207), apresentando eficiência no controle da doença causada pelo isolado CMM-3643. Aumentos nos níveis das enzimas POX e CAT pelo tratamento das sementes com a levedura FVF10 (R1), assim como a ausência de mecanismos de antibiose, sugere que o mecanismo de biocontrole em questão é a indução de resistência da planta. Com base nas avaliações realizadas concluiu-se que o AG4 HG-I é o principal grupo de anastomose da rizoctoniose do feijoeiro no município de São João. Além disso, este é o primeiro relato da redução dos sintomas da rizoctoniose em plântulas de feijoeiro-caupi pela ação antagônica de leveduras sobre *R. solani*.

Palavras-chaves: ITS rDNA, Filogenia, SSR, biocontrole, indução de resistência.

GENERAL ABSTRACT

The damping-off and stem rot caused by the soil pathogen *Rhizoctonia solani*, is considered one of the most important diseases of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and cowpea (*Vigna unguiculata*), being one of the factors that contribute to the low productivity of these crops. This study aimed to characterize isolates of the causal agent of damping-off and stem rot of beans in the rural area of Pernambuco State, using microsatellite markers and phylogenetic analysis; and evaluate the use of yeasts in the control of the causal agent of damping-off and stem rot of beans. In bean growing areas of the southern region of Pernambuco, there were collections of plants with symptoms of damping-off and stem rot. Thirty-four fungal isolates were identified as *Rhizoctonia*. In the phylogenetic analysis, the sequences of ITS rDNA region of isolates were similar to at least three anastomosis groups (AG4 HG-I, AG3-PT and AG4 HG-III). In microsatellite analysis, five sets of primers (TC_AG3_1, TC01, TC06, TC11 and TC_AG3_09) amplified a total of 13 bands, showing genetic variation. Seventy *R. solani* were evaluated for aggressiveness, being the isolate CMM-3643 selected to the biological control trials. Seventy yeast isolates were obtained from apparently asymptomatic bean plants. From these, were chosen only isolates where the disease severity index was $\leq 25\%$. Experimental tests showed that the three yeast isolates (C6A, FVF10 (R1), FVC10) were selected as promising biocontrol agents of damping-off and stem rot of cowpea (cv. IPA-207), being efficient in controlling the disease caused by isolated CMM -3643. Increases in the levels of POX and CAT enzymes by treating the seeds with FVF10 yeast (R1), as well as, the absence of antibiosis mechanisms suggests that the biocontrol mechanism in question is the induction of disease resistance. In view of the results it is concluded that the AG4 HG-I is the primary anastomosis group causing damping-off and stem rot of beans in the São João municipality, Pernambuco State. In addition, this is the first report of damping-off and stem rot symptoms reduction in cowpea seedlings due to the antagonistic action of yeasts against *R. solani*.

Keywords: ITS rDNA, phylogeny, SSR, biocontrol, resistance induction

CAPÍTULO I

Introdução Geral

Rizoctoniose do feijoeiro: Caracterização molecular do patógeno e controle biológico com leveduras

INTRODUÇÃO GERAL

1. Importância do feijoeiro

Entre as várias leguminosas cultivadas no mundo, a Fabaceae destaca-se como a principal e maior família, tradicionalmente dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (LEWIS et al., 2005; LIMA, 2000). Esta última subfamília ocupa o primeiro lugar tanto em número de espécies quanto em fins econômicos, sendo a soja (*Glycine max* (L.) Merr.), o grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), o amendoim (*Arachis hypogaea* L.), a ervilha (*Pisum sativum* L.) e o feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* (L.)) as culturas mais exploradas pelo homem para a produção de grãos (LEWIS et al., 2005).

As três espécies mais produzidas e consumidas de feijão no mundo, são *Phaseolus vulgaris* (feijoeiro-comum), *Phaseolus lunatus* Billb. (feijoeiro-fava) e *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (feijoeiro-caupi) as quais pertencem a esta subfamília. A preferência do consumidor é diferenciada por região, principalmente quanto à cor e ao tipo de grão (FAO, 2010). Consideradas como uma das principais alternativas econômicas e sociais para geração de emprego e consumo de proteína e ferro, o feijoeiro-comum, fava e caupi se adaptam as mais adversas condições edafoclimáticas (BONETT et al., 2006; IBGE, 2012).

No Brasil as safras são cultivadas com várias espécies de feijoeiro, logo, para efeito de regulamento técnico, as espécies *Phaseolus vulgaris* (feijoeiro-comum) e *Vigna unguiculata* (feijoeiro-caupi) são consideradas como feijão pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2008). De acordo com os dados da Conab (2013) a produtividade média no Brasil na safra 2012/2013 foi de 913 Kg ha⁻¹, sendo considerada baixa. Agricultores brasileiros que utilizam tecnologia na produção de feijão conseguem em média 3000 Kg ha⁻¹. Entretanto, a maior parte do feijão brasileiro é produzida por pequenos agricultores com pouca tecnologia, adubação e controle de doenças/pragas (BRASIL, 2008; PAULA JÚNIOR et al., 2007).

Dentre as causas da baixa produtividade e perdas da qualidade do feijoeiro no Brasil, destacam-se as doenças. Dependendo das condições climáticas alguns patógenos tem a capacidade de reduzir consideravelmente ou até inviabilizar a produção do grão. A utilização de inovações tecnológicas como o plantio direto e a irrigação trás novos desafios ao seu

cultivo, principalmente a respeito de doenças causadas por patógenos de solo (NECHET; HALDFELD-VIEIRA, 2006; PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIM, 2006).

2. Doenças radiculares da cultura

No Brasil, as doenças que incidem sobre o sistema radicular são relatadas em praticamente todas as zonas produtoras de feijoeiro, contribuindo para o baixo rendimento da cultura, variando em função do inóculo presente na área, suscetibilidade da cultivar, condições climáticas e de práticas de manejo do solo (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005; BUENO; FISCHER, 2006; ZAMBOLIM; COSTA; VALE, 1997).

Os patógenos habitantes do solo são considerados de difícil controle devido às estruturas de resistência especializadas, que garantem a sobrevivência em condições adversas, por apresentarem ampla gama de hospedeiros, e também por causa da complexidade do ambiente em que são encontrados (BEDENDO, 2011; REIS et al., 2004). Além do fato de algumas estruturas de resistência sobreviverem no solo por vários anos na ausência de planta hospedeira como clamidósporos, escleródios e microescleródios (AMORIN, 1995; NECHET; HALDFELD-VIEIRA, 2006).

O controle químico das doenças radiculares é economicamente viável e apresenta uma série de restrições do ponto de vista ambiental e para a saúde dos aplicadores (LIMA; ASSUNÇÃO; VALLE, 2005). Para o controle é necessário adotar medidas que consistam da ação preventiva de proteção às plantas, na restauração da comunidade microbiana e da estrutura do solo debilitada pela agricultura intensiva (LOBO JUNIOR et al., 2009).

Entre os patógenos radiculares destacam-se os fungos *Fusarium solani* (Mart.) Appel & Wollenv. f.sp. *phaseoli* (Burk.) Snyder. & Hans, *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., *Pythium palmivora* (Butler), *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) e *Rhizoctonia solani* Kuhn (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005; BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005; MICHEREFF; ANDRADE; MENEZES, 2005).

Destes, *R. solani* é considerado o de maior frequência e intensidade na cultura, principalmente para região do Nordeste brasileiro (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005; SARTORATO; NECHET; HALDFELD-VIEIRA, 2006). É capaz de atacar uma ampla gama de hospedeiros e ocasionar podridões de sementes, raízes e frutos, cancro no caule, tombamento de plântulas e doenças foliares (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2000; CUBETA; VILGALYS, 1997).

3. O Patógeno - *Rhizoctonia solani*

O fungo *R. solani* (teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) é um basidiomiceto habitante do solo, que ocorre no Brasil, África, Índia e em algumas regiões subtropicais dos Estados Unidos, causando doenças em uma grande variedade de plantas cultivadas (CASTRO et al, 2009; GONZÁLEZ GARCÍA; PORTAL; RUBIO, 2006; SNEH et al., 1996). Incluem espécies economicamente importantes das famílias Solanaceae, Fabaceae, Asteraceae, Poaceae e Brassicaceaeas bem como plantas ornamentais (GONZÁLEZ GARCÍA; PORTAL; RUBIO, 2006; SNEH et al., 1996).

Descrito por Julius Kühn em 1858, *R. solani* é considerado um patógeno cosmopolita que possui uma grande capacidade de competição saprofítica no solo. Devido à ausência da produção de conídios na fase anamórfica, se reproduz de forma assexuada por micélio vegetativo (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005; POLTRONIERI et al., 2006). Tanto o micélio quanto os microescleródios no solo ou em plantas podem produzir hifas vegetativas que atacam diversos tipos de plantações (GONZÁLEZ et al., 2011).

A identificação deste patógeno é realizada com base na presença do micélio inicialmente hialino, tornando-se marrom na maturidade, apresentando septação e ramificação típicas deste fungo. Os microescleródios são irregulares, brancos tornando-se marrom-escuro quando mais velhos, atuando como estruturas de resistência em condições adversas (PIEROBOM; PONTE, 2009). O sistema de classificação baseia-se na fusão de hifas, grupos de anastomose (AGs), cada um dos quais correlacionados com a gama de hospedeiros (SHARON et al., 2006).

A disseminação ocorre por material propagativo e sementes infectadas, podendo também se espalhar através de chuva, irrigação e ferramentas ou qualquer outra forma que leva o solo contaminado (AGRIOS, 2005). O patógeno *R. solani* pode infectar a planta em qualquer estágio fenológico e em qualquer órgão, frequentemente associado a regiões com temperaturas médias elevadas, de chuvas frequentes e com alta umidade, favorecendo o aparecimento de doenças em diversas culturas (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005; CASTRO, 2007).

Na cultura do feijoeiro é causador da rhizoctoniose, os sintomas dessa doença incluem tombamento, cancro do talo, podridão de raízes e colo, podridão de vagens, atraso na emergência e no desenvolvimento da planta no campo (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005; TOLÊDO-SOUZA et al., 2009). Além de reduzir o rendimento e a qualidade da semente da cultura (GODOY-LUTZ et al., 1996).

4. Classificação do patógeno *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani é um complexo de espécies composta por diversos grupos de anastomose (AGs), ou seja, “unidades taxonômicas” correspondentes a espécies filogenéticas sendo cada grupo frequentemente associado a um determinado hospedeiro ou a um grupo restrito de hospedeiros (CARLING, 1996; GONZÁLEZ; CUBETA; VILGALYS, 2006; SNEH et al., 1996). A reação de anastomose é o pareamento entre hifas de diferentes isolados pertencentes ao mesmo AG, ocorrendo à fusão das hifas (CARLING, 1996). A classificação de agrupamento está baseada em diferenças na morfologia da colônia, gama de hospedeiros, virulência, técnicas bioquímicas e métodos moleculares (CARLING et al., 1994; SHARON et al., 2006).

A metodologia para agrupamento-AG é realizada com base em interações somáticas microscópicas, porém essa técnica apresenta dificuldades (LEES et al., 2002). Pois, é difícil atribuir com exatidão um isolado ao grupo AG, pois nem sempre ocorre anastomose com o representante AG conhecido ou podem perder a capacidade de anastomose ou ainda apresentarem fusão com mais de um grupo de anastomose (SHARON et al., 2006). Com o avanço das técnicas moleculares, as análises de sequências de regiões do DNA ribossomal (rDNA) estão sendo usadas como uma metodologia simples e confiável para a sistemática molecular precisa de espécies de *Rhizoctonia* e do seus grupos de anastomose (SHARON et al., 2006; SHARON et al., 2008).

Atualmente são descritos 14 grupos de anastomose, AG1 a AG13 e AG-B1 para *R. solani* (CARLING; KUNINAGA; BRAINARD, 2002). Dentre os AGs, são relatados 23 ISG (grupos intraespecíficos) fundamentado em evidências de reação de anastomose, patogenicidade e morfologia. Essa classificação sugere que os AGs são geneticamente distintos e os ISG grupos evolutivos independentes dentro do grupo *R. solani* (CARLING; KUNINAGA; BRAINARD, 2002; CUBETA; VILGALYS, 1997).

Dentre os grupos de anastomoses (multinucleados) desta espécie fúngica causando doença no feijoeiro, são descritos AG1, AG-2 e AG4 (ÇEBI; ÖZKOÇ, 2010; GONZÁLEZ GARCÍA; PORTAL; RUBIO, 2006). O grupo AG-1 tem distribuição mundial e é subdividido com base na morfologia da colônia e patogenicidade (SNEH et al., 1996). O AG-2 é subdividido de acordo com requerimento de vitamina, análise de sequências do rDNA e patogenicidade (CARLING; SUMNER, 1992). O AG-4 é um dos grupos mais reconhecidos, causando tombamento e podridão de raiz em várias culturas (HARATIAN et al., 2013). Sendo, subdividido com base na homologia das sequências do rDNA (BOYSEN et al., 1996).

A determinação dos AGs dentro do complexo *R. solani* é de grande importância, pois representam populações geneticamente isoladas e não intercruzáveis (CARLING, 1996; SOUZA et al., 2009). A identificação desses AGs e seus ISG trouxeram avanços para o estudo da resistência genética de plantas, estudos epidemiológicos e ecológicos de várias doenças (NAKATANI, 2006).

5. Identificação molecular do patógeno

Estudos realizados principalmente em outros países têm demonstrado que este fungo apresenta grande diversidade genética (CIAMPI et al., 2008; TEWOLDEMEDHIN et al., 2006). Esta diversidade tem sido confirmada pela análise das sequências da região ITS do rDNA, podendo ser utilizado para diferenciar os grupos de anastomose (GONZÁLEZ; CUBETA; VILGALYS, 2006). Frequentemente, a incompatibilidade somática e os marcadores moleculares são utilizados como critérios independentes para inferência sobre os sistemas de cruzamento e estrutura das populações de *R. solani* (CERESINI et al., 2002).

Os resultados de diversos estudos sobre a diversidade genética de *R. solani* tem colaborado para: (1) determinar o grau de semelhança entre os isolados que afetam culturas semelhantes em regiões geograficamente distantes; (b) a identificação de clones entre áreas distantes; (c) detectar o grau de semelhança genética entre os isolados do mesmo AG ou pela comparação de AGs diferentes; (d) determinar a especificidade baseada no hospedeiro para isolados que estão correlacionados com a formação de subgrupos dentro dos AGs; e) detectar a variabilidade entre os isolados provenientes de propagação vegetativa em relação aos que resultam da reprodução sexual (SHARMA; GUPTA; SHARMA, 2005; TODA et al., 2004).

O emprego de marcadores moleculares no processo de caracterização genética esta sendo amplamente utilizado devido a diversos atributos desejáveis, dentre os quais destacam-se: alta taxa de polimorfismo detectada, ausência de influência ambiental, são herdáveis, apresentam baixo custo por informação gerada, estão espalhados por todo genoma e suas análises podem ser automatizadas (FERREIRA; MORETZSOHN; BUSO, 2007). Existe atualmente uma infinidade de marcadores moleculares, divididos em dois grupos baseados em restrição e hibridação e os que empregam o uso da PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Dentre os tipos de marcadores moleculares empregados em estudos populacionais e ecológicos, destacam-se os marcadores microssatélites ou sequencias simples repetidas (SSR) por serem bastante polimórficos, compreendendo sequências de nucleotídeos curtas (1 a 6 pares de bases). A variação genética dos microssatélites é caracterizada pela elevada

heterozigossidade e pela presença de múltiplos alelos. Os microssatélites são considerados marcadores moleculares neutros. Portanto, sua frequência e distribuição devem refletir os processos mutacionais que ocorrem na população, livres de efeito de seleção, quando se encontram localizados em regiões não-codificantes do genoma (ELLEGRÉN, 2004).

É crescente a notoriedade dos SSR, em relação ao número de artigos publicados sobre o isolamento de locos microssatélites em vários organismos (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002) inclusive de fitopatógenos. A identificação de vários locos microssatélites em *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. (GUERIN et al., 2004; TENZER; GESSLER, 1999); *Mycosphaerella musicola* Leach ex Mulder (MOLINA et al., 2001), *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr. (SOUBABERE et al., 2001); *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (SIRJUSINGH; KOHN, 2001); *Botrytis cinerea* Pers. (FOURNIER et al., 2003); *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc. (GIRAUD et al., 2002) entre outros.

O conhecimento sobre a diversidade genética intra e inter populações são úteis na verificação de padrões de migração e recombinação enigmática. Desta forma, contribuindo no esclarecimento do potencial evolutivo das populações, na previsão sobre os riscos relativos apresentados pelo patógeno em termos de aplicações de fungicidas e discriminação de genes de resistência (MCDONALD; LINDE, 2002).

6. Controle da doença

Segundo Reis et al. (2004), as podridões radiculares são consideradas as doenças de controle mais difícil e, considerando-se os danos que causam, têm recebido pouca atenção por parte de pesquisadores. Em relação a *R. solani* a dificuldade do controle está relacionada à não homogeneidade da espécie, ampla gama de hospedeiros, alta habilidade de competição saprofítica e por apresentarem estruturas de resistência o que dificulta seu controle pela rotação de culturas, por permanecerem viáveis por longos períodos (REIS; CASA; HOFFMANN, 2005; ZAMBOLIM; CASA; REIS, 2000).

Atualmente, a principal dificuldade em controlar este patógeno, deve-se ao fato de não ser detectado antes da ocorrência das perdas. Desta forma, é necessário adotar medidas que visem diminuir a densidade do inóculo do patógeno (sementes sadias, tratamento do solo e rotação de culturas), promover o rápido desenvolvimento da plântula (sementes de alto vigor, profundidade de plantio e aplicação adequada de nitrogênio) e evitar a ocorrência de determinadas condições ambientais que favoreçam a atuação do patógeno. O emprego destas

medidas é importante, pois inexitem variedades resistentes para esta doença em alguns hospedeiros (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005).

O tratamento de sementes é o método de controle mais importante, pois visa proteger as plântulas no início de desenvolvimento (MACHADO, 2000), porém o uso contínuo de fungicidas químicos, principalmente contendo o ingrediente ativo pentacloronitrobenzeno (PCNB), com estreito espectro de ação pode estimular a resistência dos patógenos aos mesmos. Além disso, existe uma busca crescente por práticas de produção favorável á conservação do meio ambiente (CAMPANHOLA; BETTIOL, 2003; KINTSCHEV; GOULART; MERCANT, 2014).

Estão em evidência medidas de controle alternativas, sobretudo pela utilização de agentes de controle biológico, destacando-se o uso de indutores ou eliciadores que promovam a resistência das plantas aos patógenos (SILVA, 2007). Esses agentes podem ainda apresentar amplo espectro de ação, sendo utilizados no tratamento de sementes com a mesma eficiência que fungicidas químicos, evitando assim o aparecimento de populações resistentes de patógenos (FERRO et al., 2010).

7. Aspectos gerais do controle biológico

Os resultados do uso de agroquímicos tem conduzido pesquisadores e indústrias a se empenharem na busca de métodos alternativos de controle. Deste modo, práticas culturais podem beneficiar o controle, a exemplo, pela aplicação de organismos eficientes como biocontrolador ou favorecendo os antagonistas nativos (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Os mecanimos de antagonismos que atuam sobre os fitopatógenos são parasitismo, competição, predação, estímulo a germinação seguida de exaustão e lise de propágulos, diminuição das reservas energéticas e antibiose em fitopatógenos (BETTIOL; GHINI, 2005; WHIPPS, 2001). O antagonista pode agir através de um ou mais mecanismos, o que constitui uma característica desejável, aumentando às chances de sucesso do biocontrole. A importância desses mecanismos pode variar de acordo com as condições ambientais e o estado de desenvolvimento do agente biocontrolador e do patógeno (MICHEREFF, 1998).

A identificação das espécies antagonicas a determinadas patógenos e sua aplicação em estudos *in vitro* e *in vivo* contribuem no entendimento dos processos pelo qual o biocontrole se aplica. Apesar disto, o controle biológico nem sempre pode ser atribuído a ação de um simples fator, pois compreende múltiplos mecanismos. Ao contrario do controle químico o biocontrole não erradica completamente o patógeno de forma imediata, e a sua otimização

está direcionada a métodos preventivos aliados a outros fatores ligados ao manejo integrado de doenças (BERNARDES, 2006).

O tratamento de sementes através da microbiolização, apresenta benefícios a diversas culturas favorecendo o equilíbrio da microbiota do solo de cultivo. É um sistema ideal de introdução de micro-organismos vivos para o controle de doenças das sementes, formando a primeira barreira de defesa das plantas contra o ataque de micro-organismos fitopatogênicos, além de promover o crescimento de plantas (MELO, 1996).

Nos processos vitais de fitopatogenos de solo, alguns micro-organismos apresentam bom potencial biocontrolador, cuja atuação está relacionada em processos que destroem as unidades propagativas, reduz o vigor e a virulência do patógeno e/ou promove o desenvolvimento das plantas hospedeiras (HOMECHIN, 1991; MORANDI et al., 2009). Além disso, o biocontrolador deve ser de rápido crescimento, predominância e colonização, a exemplo de *Pseudomonas* spp. e várias espécies de leveduras (MICHEREFF, 1998).

8. Controle biológico com leveduras

É crescente o interesse pelo uso de leveduras no controle biológico, devido ao rápido crescimento se multiplicando em várias fontes de carbono. Colonizando o ambiente e excluindo o crescimento de outros micro-organismos por meio de competição por espaço e nutrientes (VALDEBENITO SANHUEZA, 2000). Entretanto, apresentam outros mecanismos como a produção de compostos voláteis e enzimas que degradam a parede celular; antibiose pela produção de metabolitos antifúngicos; indução de resistência através da atividade de substâncias nos tecidos vegetais, incluindo as enzimas peroxidase (POD), polifenol oxidase (PPO), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), entre outras (BETTIOL; MORANDI, 2009; EL TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; SHALABY; EL-NADY, 2008, ZHAO et al., 2008).

Diversas propriedades importantes das leveduras tornam-nas promissoras como agentes de biocontrole, como por exemplo, não produzem esporos alergênicos como os fungos filamentosos, ou metabólitos antibióticos como os produzidos por bactérias antagonistas (GOUVEIA, 2007). Promovem o crescimento de plantas e são tolerantes aos fungicidas (MENDÉZ; MONDINO, 1999; SPADARO; GUILLINO, 2004). Podendo sintetizar carotenóides intracelularmente, e outras substâncias ativas exocelularmente, a estes compostos tem sido atribuído um importante papel na diminuição do risco de várias doenças degenerativas (SILVA, 2004).

As leveduras são organismos predominantemente unicelulares, vastamente distribuídos na natureza, pertencentes ao reino Fungi. São caracteristicamente esféricas ou ovais, com parede celular e reprodução assexuada por brotamento ou fissão (PELCZAR et al., 1997). Apresenta nutrição heterotrófica através da absorção de nutrientes, com crescimento aeróbico ou anaeróbico facultativo, tornando-os capazes de sobreviver em diferentes condições ambientais (AIDOO; ROB; SARKAR, 2006). Pertencem às subdivisões de fungos Ascomycota e Basidiomycota (SCHISLER et al., 2011).

Existem vários relatos da utilização de leveduras no controle de fungos fitopatogênicos que causam doenças foliares e de pós-colheita, porém a aplicação no controle de fungos habitantes do solo ainda são incipientes (EL TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; MORANDI et al., 2009; SCHISLER et al., 2011). Em estudo recente sobre as interações entre leveduras e outros micro-organismos fitopatogênicos, foi demonstrado que as mesmas podem desempenhar papel importante na supressão de fitopatógenos habitante do solo, incluindo uma grande diversidade de fungos (BOTHA, 2011).

As espécies de leveduras antagônicas estudadas no controle biológico de fungos fitopatogênicos habitantes do solo, incluem *Candida glabrata* (Anderson) Meyer & Yarrow; *Candida maltosa* Komag, Nakase & Katsuya; *Candida slooffia* Uden & Souza; *Rhodotorula rubra* (Schimon) Harrison; *Trichosporom cutancom* (Beurm, Gourgerot & Vaucher) Ota; *Saccharomyces unispora* (Hansen) Meyer; *Candida steatolytica* Yarrow; *Candida valida* Leberle; *Rhodotorula steatolytica* Harrison; *Trichosporon asahii* Akagi; *Epicoccum purpurascens* Ehrenberg; *Epicoccum nigrum* Link.; *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner; *Pichia anomala* Hansen; *Candida sake* Saito & Ota; *Pichia anomala* Hansen; *Saccharomyces cerevisiae* (Meyer) Hansen; *Hansenula arabitolgenes* Fang, entre outras do grupo (ABO-ELYOUSR; MOHAMED, 2009; EL MEHALAWY et al., 2004; EL MEHALAWY et al., 2007; EL TARABILY, 2004; MORANDI et al., 2009; SHALABY; EL NADY, 2008).

Em estudos conduzidos por El Tarabily (2004), foi comprovada a eficiência de *C. valida*, *T. asahii* e *Rhodotorula glutinis* (Fresen.) Harrison no controle de doenças causadas por *R. solani*, reduzindo a severidade da podridão de raízes e a incidência do tombamento em plântulas de beterraba (*Beta vulgaris* L.). Em experimentos realizados por El Mehalawy et al. (2007), as espécies *Candida incommunis* Ohara, *C. steatolytica* Yarrow e *H. arabitolgenes* reduziram a incidência do tombamento de plântulas de algodoeiro (*Gossypium* L.). Mohammed et al. (2008) ao avaliaram o uso de leveduras no controle de *R. solani* em batateira (*Solanum tuberosum* L.), observaram redução considerável na severidade da doença concluindo que leveduras são micro-organismos promissores para o controle da rizoctoniose na cultura.

Porém, relatos de trabalhos utilizando leveduras no controle de *R. solani* na cultura do feijoeiro, são poucos divulgados ou inexistentes.

Em virtude da importância da cultura do feijoeiro para a região do agreste meridional de Pernambuco, bem como dos danos decorrentes da rizoctoniose causada por *R. solani*, pretendeu-se neste trabalho fornecer maiores informações sobre a população de *R. solani* e o potencial biocontrolador de leveduras associadas a plantas de feijoeiro-caupi. Neste sentido, a pesquisa teve como objetivo:

- Determinar as relações filogenéticas para os AGs de *R. solani* do feijoeiro-caupi e feijoeiro-comum do agreste meridional de Pernambuco;
- Avaliar o uso de leveduras no controle da rizoctoniose do feijoeiro-caupi e feijoeiro-comum.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO-ELSYOUSR, K. A. M.; MOHAMED, H. M. Biological control of *Fusarium* wilt in tomato by plant growth promoting yeasts and rhizobacteria. **The Plant Pathology Journal**, Seul, v. 25, n. 2, p. 199-204, 2009.
- AGRIOS, G. N. (Ed.). **Plant pathology**. 5. ed. New York: Elsevier Academic Press, 2005. p. 594-598.
- AIDOO, K. E., ROB, N. M. J.; SARKAR, P. K. "Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods". **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 6, p. 30-39, 2006.
- AMORIN, L. Sobrevivência do inóculo. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 246-267.
- ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. Doenças do feijão caupi. In: CARDOSO, M. J. (Org.). **A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2000. 264 p.
- ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. Doenças fúngicas e bacterianas. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 461-484.
- BEDENDO, Í. P. Podridões de raiz e de colo. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2011. v. 1, p. 443- 448.
- BERNARDES, F. S. **Rizobactéria na indução de resistência sistêmica em cultivos hidropônicos**. 2006. 58 f. Dissertação (Mestrado Agricultura tropical e subtropical) - Instituto agronômico, Campinas, 2006.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Solos Supressivos. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.) **Ecologia e Manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. p. 125-143.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.) Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. 1. ed. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 7-14.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro... In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 333-349.

BONETT, L. P.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; SCHUELTER, A. R.; VIDIGAL FILHO, P. S.; GONELA, A.; LACANALLO, G. F. **Divergência genética em germoplasma de feijoeiro comum coletado no estado do Paraná, Brasil**. Semina: Ciências Agrárias, v. 27, p. 547-560, 2006.

BOTHA, A. The importance and ecology of yeasts in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 1-8, 2011.

BOYSEN, M.; BORJA, M.; DEL MORAL, C.; SALAZAR, O.; RUBIO, V. (1996). Identification at strain level of *Rhizoctonia solani* AG4 strains by direct sequence of asymmetric PCR products of the ITS regions. **Current Genetics**, Germany, v. 29, p. 174–181, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 12 de 28 mar. 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília**, DF, 2008. Seção 1, p. 11-14.

BUENO, C. J.; FISCHER, L. H. **Manejo de fungos fitopatogenicos habitantes do solo, LOCAL:INSTITUTO**, 2006. Disponível em: <http://www.aptaaregional.sp.gov.br/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=445&Itemid=284>. Acesso em : 10 nov. 2014.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: _____ (ed.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. v. 1, p. 13-51.

CARLING, D. E. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In: SNEH, B. JABAJIHARE S.; NEATE, S.; DIJST, G. (eds.). **Rhizoctonia Species: Taxonomy**,

molecular biology, ecology, pathology and disease control. 1. ed. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, 1996, p. 37-47.

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**, Brasília, v. 92, n. 1, p. 43-50, 2002.

CARLING, D. E.; ROTHROCK, C. S.; MACNISHI, G. C.; SWEETINGHAM, M. W.; BRAINARD, K. A.; WINTERS, S. W. Characterization of anastomosis group 11 (AG-11) of *Rhizoctonia solani*. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, v. 84, p. 1387-1393, 1994.

CARLING, D. E.; SUMNER D. R. *Rhizoctonia*. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (eds.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. 1. ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1992. p. 157-65.

CASTRO, C. V. B. **Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Rhizoctonia solani* Kuhn**. 2007, 67 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007.

CASTRO, C. V. B.; MIRANDA, V. S.; BRIOSO, P. S. T.; POLTRONIERI, L. S.; REIS, I. N. R. S. Variabilidade genética de isolados de *Rhizoctonia solani*, de parte aérea, analisadas por meio de marcadores RAPD. **Revista Ciências Agrárias**, Belém, n. 52, p.179-187, 2009.

ÇEBİ, K. M.; ÖZKOÇ, İ. Molecular characterization of *Rhizoctonia solani* AG4 using PCR-RFLP of the rDNA-ITS region. **Turkish Journal of Biology**, Turkey, v. 34, p.261–269, 2010.

CERESINI, P.C.; SHEW, H.D.; VILGALYS, R.; CUBETA, M.A. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco in North Carolina. **Mycologia**, Lawrence, v. 94, n. 3, p.448 - 460, 2002.

CIAMPI, M. B.; MEYER, M. C.; COSTA, M. J. N.; ZALA, M.; MCDONALD, B. A.; CERESINI, P. C. Genetic structure of populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA from soybean in Brazil. **Phytopathology**, Brasília, v. 98, p. 932-941, 2008.

CONAB-ACOMPANHAMENTO da safra brasileira de grãos 2013/2014. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), 2013. Disponível em:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_12_10_16_06_56_boletim_portugues_dezembro_2013.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2014.

CUBETA, M. A.; VILGAYS, R. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, p. 480-484, 1997.

CÚNDOM, M. A.; MAZZA, S. M; GUTIÉRREZ, S. A. Selection of *Trichoderma* spp. Isolates against *Rhizoctonia solani*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 1, n. 4, p. 79-81, 2003.

EL MEHALAWY, A. A.; HASSANEIM, N. M.; KATHER, H. M.; EL DIN, E. A. K.; YOUSSEF, Y. Influence of maize root colonization by the rhizosphere actinomycetes and yeast fungi on plant growth promoter on the biological control of late wilt disease, **International Journal of Agriculture and biology**, Pakistan, v. 6, n. 4, p. 599-604, 2004.

EL MEHALAWY, A. A.; HASSANIM, S. M.; HASSANIM, N. M; ZAKIS, S. A. Induction of resistance and biocontrol of *Rhizoctonia* in cotton against damping-off disease by rhizosphere microorganisms. **New Egypt Journal Microbiology**, Cairo, v. 17, p. 148-168, 2007.

EL TARABILY E.; SIVASITHAMPARAM, K. Potential of yeast as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and plant growth promoters, **Mycoscience**, Tokyo, v. 47, p. 25-35, 2006.

EL TARABILY, K. A. Suppression of *Rhizoctonia solani* disease of sugar beet by antagonists and plant growth-promoting yeasts. **Journal Applied Microbiology**, Hoboken, v. 96, p. 69-75, 2004.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews**, England, v. 5, p. 435-445, 2004.

FAO - Food balance sheets. New York: FAO, 2010. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/368/DesktopDefault.aspx?PageID=368#ancor>>. Acesso em: 23 jan. 2014.

FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 377-420.

FERRO, H. M.; NETO, H. S.; ZANOTO, E.; MEDEIROS, F. H. V.; POMELLA, A. W. V. Eficiência de *Trichoderma Asperellum* controle do tombamento no controle do tombamento causado por *Rhizoctonia solani* em algodoeiro. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 19, 2010. Lavras. **Resumos...** Lavras: SBPCNET, 2010. p. 2271.

FOURNIER, E.; LEVIS, C.; FORTINI, D.; LEROUX, P.; GIRAUD, T.; BRYGOO, Y. Characterization of Bc-hch, the Botrytis cinerea homolog of the *Neurospora crassa* het-c vegetative incompatibility locus, and its use as a population marker. **Mycologia**, Lawrence, v. 95, p. 251–261, 2003.

GODOY-LUTZ, G.; J. ARIAS, J. R. STEADMAN; K. M. ESKRIDGE. Role of natural seed infection by the web blight pathogen in common bean seed damage, seedling emergence, and early disease development. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, p. 887-890, 1996.

GONZÁLEZ GARCÍA, V.; PORTAL, O. M. A.; RUBIO, S. V. Review: Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 4, p. 55–79, 2006.

GONZÁLEZ, D.; CUBETA, M. A.; VILGALYS, R. Phylogenetic utility of indels within ribosomal DNA and [beta]-tubulin sequences from fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, USA, v. 40, p. 459-470, 2006.

GONZALEZ, M.; PUJOL, M.; METRAUX, J.; GONZALEZ-GARCIA, V.; BOLTON, M. D.; BORRÁS-HIDALGO, O. Tobacco leaf spot and root rot caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. **Molecular Plant Pathology**, Germany, v. 12, p. 209-216, 2011.

GOUVEIA, A. **Controle em campo de pós-colheita de doenças e metabolismo do morangueiro após tratamento com *Saccharomyces cerevisiae***. 2007. 85 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GIRAUD, T.; FOURNIER, E.; VAUTRIN, D.; SOLIGNAC, M.; VERCKEN, E.; BAKAN, B.; BRYGOO, Y. Isolation of eight polymorphic microsatellite loci, using an enrichment

protocol, in the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum*. **Molecular Ecology Notes**, United Kingdom, v. 2, p. 121-123, 2002.

GUÉRIN, F.; FRANCK, P.; LOISEAU, A.; DEVAUX, M.; LE CAM, B. Isolation of 21 new polymorphic microsatellite loci in the phytopathogenic fungus *Venturia inaequalis*. **Molecular Ecology Notes**, United Kingdom, v. 4, p. 268-270, 2004.

HARATIAN, M.; SAFAIE, N.; SHARIFNABI, B.; MAHMUDI, S. B.; ARIANA, A. Genetic structure of populations of *Rhizoctonia solani* AG-4 from five provinces in Iran. **Plant Pathology**, Oxford, v. 62, p. 649-656, 2013.

HOMECHIN, M. Controle biológico de patógenos do solo. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. 1. ed. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1991. p. 7-23.

IBGE. LSPA. Levantamento sistemático da produção agrícola. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro: IBGE, 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201210.pdf> Acesso em: 09 nov. 2014.

KINTSCHEV, M. R.; GOULART, A. C. P.; MERCANTE, F. M. Compatibilidade entre a inoculação de rizóbios e fungicidas aplicados em sementes de feijoeiro- comum. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.40, n.4, p.338-346, 2014.

LEES, A. K.; CULLEN, D. W.; SULLIVAN, L.; NICOLSON, M. J. Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 potato and soil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 3, p. 293-302, 2002.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACHINDER, B.; LOCK, M. (Eds.). **Legumes of the world**. 1. ed. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005. 577 p.

LIMA, H.C. **Leguminosas da Mata Atlântica: uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro**. 2000. 141 f. Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

- LIMA, G. S. A.; ASSUNÇÃO, I. P.; VALLE, L. A. C. Controle Genético de Doenças Radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.) **Ecologia e Manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. cap.10, p. 247-278.
- LOBO JUNIOR, M.; BRANDÃO, R. S.; CORRÊA, C. A.; GÖRGEN, C. A.; CIVARDI, E. A.; OLIVEIRA, P. de. **Uso de braquiárias para o manejo de doenças causadas por patógenos habitantes do solo**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2009. 8 p. (Comunicado técnico, 183).
- MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138 p.
- MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 349-379, 2002.
- MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão anual de patógenos de plantas**, Passo. Fundo, v. 4, p. 261-295, 1996.
- MENDÉZ, S.; MONDINO, P. Control Biológico Postcosecha en Uruguay. **Horticultura Internacional**, España, v. 7, p. 29-36, 1999.
- MICHEREFF, S. J. **Apostila de fitopatologia**. Controle biológico de doenças de plantas. Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, 1998. p. 123-126.
- MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.) **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. 1. ed. Recife: UFRPE – Imprensa Universitaria, 2005. v. 1, 398 p.
- MOHAMMED, A. S.; EL HASSAN, S. M.; EL BALLA, M. M. A.; EL SHEIK, E. A. E. The role *Trichoderma*, VA Mycorrhiza and dry yeasts in the control of *Rhizoctonia* disease of potato (*Solanum tuberosum* L.). **University of Khartoum Agriculture Science**, Shambat, v. 16, n.2, p. 285-301, 2008.
- MOLINA, C.; KAEMMER, D.; APONTE, S.; WEISING, K.; KAHL, G. Microsatellite markers for the fungal banana pathogen *Mycosphaerella musicola*. **Molecular Ecology Notes**, United Kingdom, v. 1, p. 137-139, 2001.

MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BETTIOL, W.; TEXEIRA, H. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 251, p. 73-82, 2009.

NAKATANI, A. K. **Diversidade genética de *Rhizoctonia* spp. e análise de sequências multilocos**. 2006, 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

NECHET, K. L.; HALDFELD-VIEIRA, B. A. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp., associados à mela do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), coletados em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 505-508, 2006.

PAULA JÚNIOR, T. J.; VIEIRA, R. F.; CHAGAS, J. M.; CARNEIRO, J. E. S.; ARAUJO, G. A. A.; VENZON, M.; PATTO RAMALHO, M. A.; ABREU, A. F. B.; ANDRADE, M. J. B. Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). In: PAULA JUNIOR, T. J.; VENZON, M. (Eds.). **101 Culturas: manual de tecnologias agrícolas**. 1. ed. Belo Horizonte: EPAMIG, 2007. v. 1, p. 331-342.

PAULA JÚNIOR, T. J. de; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; BORÉM, A. (Org.). **Feijão**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. v. 1, p. 359-414.

PELCZAR, J. R.; MICHAEL, J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. (Eds.). **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1997. v. 1, 556 p.

PIEROBOM, C. R.; PONTE, E. del. (Ed.). **Manual de Sanidade de Sementes**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2009. Disponível em:<<http://faem.ufpel.edu.br/dfs/patologiasementes/cgi-bin/sementes/procura.cgi>>. Acesso em: 25 jan. 2014.

POLTRONIERI, M. C.; BOTELHO, S. M.; LEMOS, O. F. de; ALBUQUERQUE, A. S.; SILVA JÚNIOR, A. C. da; PALHARES, T. C. **Tratos culturais em pimenta de cheiro (*Capsicum chinense* Jacquin)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. 4p. (Comunicado, 167).

REIS ALMEIDA, F. B.; CERQUEIRA, F. M.; NASCIMENTO SILVA, R.; ULHOA, C. J.; LIMA, A. L. 2007. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against

Rhizoctonia solani: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnol Lett**, USA, v. 29, p. 1189-1193.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; HOFFMANN, L. L. Controle cultural de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.) **Ecologia e Manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. cap.11, p. 279- 301.

REIS, E.M.; BEZERRA, R.; SCHEER, O.; MORAES, N.L.M.; CARDOSO, C.A. Manejo das podridões radiculares. In: REIS, E.M. **Doenças na cultura da Soja**. Passo Fundo: Aldeia Norte Editora, 2004. 128 p.

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

SCHISLER, D. A.; JANISIEWICZ, W. J.; BOECKHOUT, T.; KURTZMAN, C. P. Agriculturally important yeast: Biological control of field and postharvest disease using yeast antagonists, and yeasts pathogens of plants. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOECKHOUT, T. **The yeasts: a taxonomic study**. 5. ed. London: Elsevier, 2011, cap. 4, p. 45-58.

SHALABY, M. E. S.; EL NADY, M. F. Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocontrol agent against *Fusarium* infection of sugar beet plants. **Acta Biologica szegediensis**, Szeged, v. 52, n. 2, p. 271-275, 2008.

SHARMA, M., S. K. GUPTA; T. R. SHARMA. Characterization of variability in *Rhizoctonia solani* by using morphological and molecular markers. **Phytopathology**, Brasília, v. 153, p. 449-456, 2005.

SHARON, M.; KUNINAGA, S.; HYAKUMACHI, M.; NAITO, S.; SNEH, B. Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. **Mycoscience**, Tokyo, v. 49, p. 93–114, 2008.

SHARON, M.; KUNINAGA, S.; HYAKUMACHI, M.; SNEH, B. The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp. using molecular and biotechnological

methods compared with the classical anastomosis grouping. **Mycoscience**, Tokyo, v. 47, p. 299-316, 2006.

SILVA, M. C. **Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras induzidas por agentes químicos**. 2004, 105 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

SILVA, R.F. **Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murcha (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)**. 2007, 109 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

SIRJUSINGH, C.; KOHN, L. M. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Molecular Ecology Notes**, United Kingdom, v. 1, p. 267-269, 2001.

SOUZA, E. C.; BASSETO, M. A.; BOLIANI, A. C.; TAKADA, H. M.; CERESINI, P.C. Patogenicidade cruzada de *Ceratobasidium* spp. do caquizeiro (*Diospyros kaki*) e do chá (*Camellia sinensis*) e reação de cultivares de caqui ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 1, p. 09-14, 2009.

SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (eds.). ***Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control**. 1. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1996. 578 p.

SOUBABERE, O.; JORGE, V.; NOTTERGHEM, J. L.; LEBRUM, M. H.; THARREAU, D.; Sequence characterized amplified region markers for the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Molecular Ecology Notes**, United Kingdom, v. 1, p. 19-21. 2001.

SPADARO, D.; GUILLINO, M. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 1, p. 185-194, 2004.

TENZER, I.; GESSLER, C. Genetic diversity of *Venturia inaequalis* across Europe. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, p. 54–552, 1999.

- TEWOLDEMEDHIN, Y. T.; LAMPRECHT, S. C.; MCLEOD, A.; MAZZOLA, M. Characterization of *Rhizoctonia* spp. recovered from crop plants used in rotational cropping systems in the Western Cape province of South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, p. 1399-1406, 2006.
- TODA, T.; MGHALU, J. M.; PRIYATOMOJO, A.; HYAKUMACHI, M. Comparison of sequences for the internal transcribed spacer region in *Rhizoctonia solani* AG 1-ID and other subgroups of AG 1. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 70, p. 270-272, 2004.
- TOLEDO-SOUZA, E. D.; LOBO, J. R.; SILVEIRA, P. M.; CAFÉ FILHO, A. C. Interações entre *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* e *Rhizoctonia solani* na severidade da podridão radicular do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás, v. 39, p. 13-17, 2009.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.) *Controle Biológico*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 1991. v. 2, p. 41-56, 2000.
- WHIPPS, J. M. Roots and their environment: microbial interactions and biocontrole in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 487-511, 2001.
- ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; VALE, F. X. R. Feijão comum: podridão, tombamento e murcha causados por fungos do solo. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.) **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: UFV, 1997. v. 1, p. 375-402.
- ZAMBOLIM, L.; CASA, R. T.; REIS, E. M. Sistema plantio direto e doenças em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 585-595, 2000.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, New Jersey, v. 11, p. 1-16, 2002.
- ZHAO, Y.; TU, K.; SHAO, X.; JING, W.; SU, Z. Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 49, 113–120, 2008.

CAPÍTULO II

**Caracterização molecular de isolados de *Rhizoctonia solani* provenientes de feijoeiro no
agreste meridional de Pernambuco**

Artigo submetido à revista Tropical Plant Pathology

1 **Caracterização molecular de isolados de *Rhizoctonia solani* provenientes de feijoeiro no**
2 **agreste meridional de Pernambuco**

3

4 Dyana de Albuquerque Tenório¹, Erika Valente de Medeiros², Delson Laranjeira¹, Sami Jorge
5 Michereff¹, Kleber Regis Santoro², Cristiano Souza Lima³

6

7 ¹Departamento de Agronomia/Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco-
8 UFRPE, 52171-270, Recife-PE, Brasil, e-mail: dayagro@hotmail.com; sami@depa.ufrpe.br;

9 delson@depa.ufrpe.br. ²Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE, 55296-270, Garanhuns-

10 PE, Brasil, e-mail: evmbio@gmail.com, krsantoro@yahoo.com.br. ³Departamento de

11 Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará-UFC, 60356-001, Fortaleza-CE, Brasil, e-mail:

12 csl@ufc.br.

13

14 Autor para correspondência: Cristiano Lima, e-mail: csl@ufc.br

15

16 **RESUMO**

17 A rizoctoniose causada pelo patógeno de solo *Rhizoctonia solani* (fase anamórfica de

18 *Thanatephorus cucumeris*), é uma das doenças mais importantes do feijoeiro-comum e

19 feijoeiro-caupi. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar isolados do agente causal

20 da rizoctoniose do feijoeiro na região do agreste de Pernambuco, utilizando marcadores

21 microssatélites e análise filogenética. Foram obtidas sequencias de DNA da região ITS do

22 rDNA, de 33 isolados os quais foram utilizadas para gerar uma árvore filogenética de

23 neighbor-joining. As sequências gênicas dos isolados de *R. solani* foram similares as

24 sequências de pelo menos quatro grupo de anastomose, sendo predominante o AG4 HG-I.

25 Nas análises de microssatélites, os cinco conjuntos de iniciadores (TC_AG3_1, TC01, TC06,

26 TC_AG3_09 e TC11) amplificaram um total de 13 bandas, destas apenas duas bandas não

27 foram polimórficas. Nesse estudo observou-se diversidade genética de alta a moderada nas
28 populações e forte evidência de reprodução sexuada no campo. Esses dados são cruciais para
29 o entendimento da genética desse patógeno e planejamento de estratégias de manejo mais
30 eficientes para a rizoctoniose do feijoeiro. Estudos mais amplos utilizando microssatélites
31 necessitam ser realizados para o entendimento da estrutura populacional de *R. solani* AG4
32 HG-I do feijoeiro no Nordeste do Brasil.

33 **Palavras-chave:** *Rhizoctonia solani*, Caracterização Molecular, Filogenia, ITS rDNA,
34 Neighbor Joining, SSR.

35

36 **INTRODUÇÃO**

37 O fungo *Rhizoctonia solani* Kühn (fase anamórfica de *Thanatephorus cucumeris*
38 (Frank) Donk), é considerado um dos patógenos radiculares altamente destrutivo e
39 geneticamente diverso, causando doença em várias culturas de interesse econômico. No
40 Nordeste brasileiro, este fitopatógeno causa a doença denominada de rizoctoniose,
41 contribuindo para a baixa produtividade do feijoeiro-comum e feijoeiro-caupi, sobretudo na
42 fase de germinação e emergência (Athayde Sobrinho et al., 2005). Trata-se de um patógeno de
43 difícil controle, por apresentar uma ampla gama de hospedeiros, uma alta capacidade
44 saprofítica e uma alta virulência, além de produzir microescleródios (Poltronieri et al., 2006;
45 Silva-Barreto et al., 2010).

46 Para a identificação deste patógeno são usados critérios morfológicos, fisiológicos,
47 genéticos e patológicos (Sneh et al., 1996). Sua classificação é de acordo com grupos de
48 anastomose (AGs), sendo estes divididos em 14 AGs: AG-1 a 13 e AG-BI (Carling et al.,
49 2002; Sharon et al., 2006). Além dos grupos de anastomose, são reconhecidos 23 grupos
50 intraespecíficos (ISG) baseado em evidências de reação de anastomose, patogenicidade,
51 morfologia, virulência, gama de hospedeiro e requisitos nutricionais (Carling et al., 2002).

52 Estudos realizados principalmente em outros países têm mostrado que este fungo
53 apresenta grande diversidade genética (Tewoldemedhin et al., 2006; Ciampi et al., 2008).
54 Esta diversidade tem sido evidenciada pela comparação de sequências da região ITS do rDNA
55 e da subunidade 28S do DNA ribossômico, apresentando correlação com os grupos de
56 anastomose (Sharon et al., 2006). O conhecimento dos mecanismos evolutivos que conduzem
57 as mudanças genéticas e a estrutura genética das populações tem implicações importantes
58 para o manejo da doença (McDonald; Linde, 2002). Uma das técnicas mais indicadas para
59 estudos populacionais e ecológicos é a utilização de marcadores do tipo microssatélites (SSR),
60 que consiste em sequências de nucleotídeos curtas (1 a 6 pares de bases) que se repetem
61 inúmeras vezes no genoma, utilizada para detectar variações em locos de sequências
62 repetitivas (Yu et al., 2000).

63 O emprego de marcadores moleculares apropriados pode contribuir significativamente
64 para a elucidação da biologia populacional do complexo *Rhizoctonia* (Cubeta; Vilgalys, 1997),
65 permitindo detectar diferenças entre isolados que não podem ser detectadas por outras
66 técnicas. Atualmente são relativamente poucas as informações sobre a diversidade
67 filogenética e variabilidade genética em *R. solani* no Brasil. Entretanto, são encontrados na
68 literatura estudos realizados em outros países, referentes a alguns grupos de anastomose (AG).
69 Pouco se sabe sobre quais grupos de anastomose de *R. solani* estão associados ao feijoeiro.
70 Relatos na literatura citam o AG1-1A associado a rizoctoniose do feijoeiro-caupi (Nechet;
71 Halfeld-Vieira, 2006); o AG-1 IB à murcha de teia micélica do feijoeiro-caupi e a mancha
72 foliar do eucalipto (Fenille et al., 2002; Nechet; Halfeld-Vieira, 2006); o AG2-2 IIIB ao
73 feijoeiro-caupi, soja e eucalipto (Fenille et al., 2002; Tenório, 2011); e o AG4 HG-I ao
74 cafeeiro, soja, batateira e feijoeiro (Sussel et al., 2001; Fenille et al., 2002; Rosa et al., 2005;
75 Tenório, 2011). Desta forma, o objetivo desse estudo foi caracterizar isolados do agente
76 causal da rizoctoniose do feijoeiro-comum e feijoeiro-caupi na região do agreste de
77 Pernambuco, utilizando marcadores microssatélites e análise filogenética.

78 **Material e métodos**

79 Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios da Cenlag e em casa de vegetação
80 da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG)/Universidade Federal Rural de Pernambuco
81 (UFRPE).

82

83 **Isolados de *Rhizoctonia solani***

84 Nos experimentos foram utilizados isolados de *R. solani*, obtidos da Coleção de
85 Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Profa. Maria Menezes” (UFRPE), e de coletas
86 realizadas nas áreas de plantio de feijoeiro-caupi e feijoeiro-comum do Agreste Meridional de
87 Pernambuco (Tabela 1).

88 As plantas coletadas com sintomas de rizoctoniose foram lavadas em água corrente e o
89 tecido da região de transição da lesão submetido à desinfestação em álcool 70% durante 30s,
90 em hipoclorito de sódio a 1% por 1 min, lavados por duas vezes consecutivas em água
91 destilada esterilizada (ADE) e postos para secar sobre papel-filtro esterilizado. Em seguida os
92 fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar
93 (BDA). Os isolados foram incubados durante aproximadamente três dias em temperatura
94 ambiente (temperatura de $25\pm 1,5$ °C e a umidade relativa de $76\pm 2,5\%$). E as colônias de *R.*
95 *solani* geradas repicadas para uma nova placa de Petri contendo meio BDA e incubadas nas
96 condições descritas anteriormente. Todos os isolados obtidos foram preservados pelo método
97 Castellani.

98

99 **Análise Filogenética**

100 **Extração do DNA genômico**

101 A massa micelial de cada isolado de *R. solani* foi obtida pelo cultivo em meio BDA a
102 25°C, com fotoperíodo de 12h por cinco dias. Posteriormente, o micélio foi retirado do papel
103 celofone, utilizando uma espátula, e usados para a extração do DNA, conforme protocolo

104 descrito por Ferreira & Grattapaglia (1996), adaptado de Murray & Thompson (1980). Após a
105 extração, as amostras de DNA foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% em
106 tampão TBE 1X a 5V/cm, e corado com SYBR Safe® (Invitrogen, Brasil), sendo visualizadas
107 em transiluminador de UV e analisadas quanto a qualidade e quantidade do DNA extraído.
108 Todas as amostras de DNA obtidas foram mantidas a -20°C até a realização das reações de
109 PCR (Polymerase Chain Reaction).

110

111 **Amplificação dos produtos de PCR**

112 As reações de PCR foram realizadas pela amplificação da região ITS rDNA, utilizando
113 os iniciadores ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-
114 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White et al., 1990). As amplificações (50 µL)
115 foram efetuadas utilizando-se 100 ng de DNA genômico, MgCl₂ a 1,5 mM, 2 U de Taq
116 polymerase (Gibco Life Technologies), 0,2 mM de cada um dos dNTPs, KCl a 50 mM, Tris-
117 HCl a 10 mM, e 0,2 µM de cada iniciador. Os ciclos de amplificação consistiram dos
118 seguintes passos: desnaturação inicial de 95 °C por 2 min; 35 ciclos [cada ciclo com 1 min a
119 95 °C (desnaturação), 1 min a 60 °C (anelamento dos oligonucleotídeos), 1 min e 30s a 72 °C
120 (extensão inicial)]; e um ciclo final a 72 °C por 10 min, para a completa extensão dos
121 produtos amplificados. Os produtos da amplificação da região ITS do rDNA foram separados
122 em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE e colorados com SYBR Safe®, sendo visualizados
123 em transiluminador de UV (Sambrook et al., 1989).

124

125 **Análise dos resultados**

126 Os produtos da PCR foram enviados para sequenciamento nos sentidos senso e anti-
127 senso utilizando os iniciadores ITS4 e ITS5, em laboratório especializado (Macrogen e
128 UFPE). Os eletroferogramas e sequencias obtidas foram analisadas utilizando o software
129 BioEdit®, alinhadas no CLUSTALW (Thompson et al., 1994) e comparadas com sequências

130 das região ITS dos isolados de *R. solani* depositadas no banco de dados do NCBI utilizando o
131 software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>). As análises filogenéticas
132 foram realizadas no PAUP 4.0 versão beta 10 (Swofford, 2000). A análise de bootstrap foi
133 realizada pelo critério de distância utilizando neighbor-joining, com 1000 repetições.
134 Sequências de *Ceratobasidium* foram utilizadas para formar outgroup nas análises.

135

136 **Amplificação de microssatélites para isolados de *Rhizoctonia solani***

137 Em um pré-ensaio foram avaliados iniciadores desenhados para amplificar sete locos
138 distintos de *R. solani* AG4 de acordo com Haratian et al. (2013). Destes foram selecionados
139 marcadores co-dominantes do tipo microssatélite (SSR) (Tabela 2), representando cinco locos
140 de polimorfismo conhecido, para genotipagem dos isolados, sendo nove isolados selecionados
141 para gerar o dendrograma devido a limitação de espaço no gel. As reações de polimerase em
142 cadeia (PCR) foram realizadas separadamente para cada loco SSR em volume de 15 µL,
143 contendo 1 µL de DNA genômico (5 a 15 ng), 1,5 µ de tampão 10x, 0,2 mM (cada) de dNTPs,
144 0,3 uM de cada iniciador e 1 unidade de Taq polimerase. As PCRs incluem uma desnaturação
145 inicial de 15 min a 95, seguida por 35 ciclos de desnaturação por 30 seg a 94°C, anelamento
146 60°C por 30 seg, e alongação por 2 min a 72° C, além de uma extensão final de 10 min a
147 72°C. Os produtos de PCR foram separados em gel de poliacrilamida 6% em tampão TBE e
148 colorados com SYBR Safe, sendo visualizados em transiluminador de UV.

149

150 **Análise dos resultados**

151 Para análise dos microssatélites, todas as bandas visíveis, polimórficas e não-
152 polimórficas, foram utilizadas. Da análise manual do gel, resultou uma matriz de 0 e 1, na
153 qual '1' correspondeu à presença do alelo e '0' representou a ausência do alelo.

154 Bandas de mesmo peso molecular, em diferentes isolados, foram consideradas
155 homólogas. O método UPGMA (agrupamento de pares não ponderados com base na média

156 aritmética) foi selecionado para as análises, utilizando o software PAUP (análises
157 filogenéticas utilizando parcimônia) 4.0 versão beta 10 (Swofford, 2000) para a construção de
158 dendrogramas dos nove isolados de *R. solani* do feijoeiro-caupi, feijoeiro-comum e solo,
159 previamente identificados como pertencentes ao AG4 HG-I.

160

161 **Resultados**

162 **Análise filogenética**

163 As sequencias obtidas da região ITS do rDNA dos 33 isolados de *Rhizoctonia*,
164 juntamente com sequencias de referência (Kuninaga et al., 1997; Sharon et al., 2006),
165 depositadas no GenBank, NCBI, foram utilizadas para gerar uma árvore filogenética de
166 neighbor-joining (Figura 1). Analisando a topologia da árvore, percebe-se que a maior parte
167 dos isolados (n = 30) de *Rhizoctonia*, agruparam junto com isolados de referência do AG4
168 HG-I, com 97% de suporte de bootstrap. Porém, quatro isolados tiveram comportamento
169 diferenciado. O isolado CMM 3644 agrupou com isolado de referência do AG3 PT, com
170 suporte de 98%. O isolado CMM 2989 formou um grupo junto com isolados do AG4 HG-III,
171 com suporte de 100%. O isolado A4P19FC não agrupou em nenhum grupo de anastomose.
172 Em buscas no Genbank com esse isolado, utilizando a ferramenta BLAST, não foi encontrada
173 nenhuma sequencia com 100% de identidade com AG identificado no depósito. O isolado
174 A2P3FC também não agrupou com AGs de *R. solani*. Entretanto, nas buscas no Genbank,
175 utilizando BLAST, foram recuperadas duas sequencias de *Ceratobasidium* (EU273525 e
176 FJ515884), que foram inseridas na árvore filogenética. As mesmas formaram um grupo com o
177 isolado A2P3FC.

178 Os isolados que agruparam no AG4 HG-I formaram uma politomia e não puderam ser
179 diferenciados dentro do grupo nessa análise, pois não formam sub-grupos.

180

181 **Análise de microssatélites**

182 Nas análises de microssatélites, os cinco conjuntos de iniciadores referentes a cinco
183 alelos (TC_AG3_1, TC01, TC06, TC_AG3_09 e TC11) amplificaram um total de 13 bandas
184 entre 100 e 3000 pb, aproximadamente (Figura 2). Destas, apenas duas bandas não foram
185 polimórficas. Na análise de UPGMA, das bandas amplificadas, foi possível diferenciar sete
186 isolados. Apenas os isolados CMM 3266 e CMM 3274 apresentaram as mesmas bandas para
187 todos os cinco alelos em que houve amplificação. Na análise de bootstrap, os isolados CMM
188 3266 e CMM 3274 formaram um grupo com 75% de suporte. Estes, por sua vez, juntamente,
189 com os isolados CMM 3255, CMM 3276 e 0122 formaram um grupo maior com 52% de
190 suporte. Já os isolados CMM 2988 e CMM 3270 formaram um grupo com 74 % de suporte
191 (Figura 3).

192

193 **Discussão**

194 Foram encontrados isolados em três grupos de anastomose (AG4 HG-I, AG4 HG-III e
195 AG3 PT) e, possivelmente, um novo grupo de anastomose de *R. solani* associados à
196 rizoctoniose do feijoeiro no agreste pernambucano, além de um isolado de *Ceratobasidium*
197 AG-L, utilizando-se a análise de sequencias da região ITS rDNA dos isolados para a
198 identificação de AGs. A utilização de sequencias da região ITS rDNA para a identificação de
199 AGs de *R. solani* têm sido recomendado na literatura e permite a diferenciação de isolados em
200 todos os AGs (Kuninaga et al., 1997; Sharon et al., 2006).

201 Em estudos anteriores foram relatados vários grupos de anastomose de *R. solani* em
202 feijoeiro incluindo AG-4, AG-1 IA, AG-1 IB, AG-1, AG-1 IF, AG-2 1, e AG-2 2 de lugares
203 como o Brasil, Cuba, Nova York, Costa Rica e Porto Rico (Echavez-Badel et al., 2000;
204 Meinhardt et al., 2002; Godoy-Lutz, 2008; Venegas et al., 2008; Nerey et al., 2010). Na
205 Turquia, foram identificados alguns AGs de *Rhizoctonia* multinucleada como AG-1, AG-2-1,
206 AG-2-2, AG-3, AG-4, AG-5, AG-6, AG-7, AG-9, AG -10, e AG-11 e binucleada (AG-A, B-

207 AG, AG-E, F-AG, AG-G, AG-I, e AG-K) associados a espécies de feijoeiro (Karaca et al.,
208 2002; Eken; Demirci, 2004; Erper et al., 2011).

209 Neste trabalho, o AG4 HG-I parece ser o principal grupo de anastomose presente no
210 município de São João, que reúne um grande número de pequenas propriedades de
211 agricultores familiares no agreste pernambucano. Este resultado reforça o que havia sido
212 observado anteriormente por Tenório (2011), que além desse AG, observou também o AG2-2
213 IIIB. A diversidade genética de *R. solani* como agente causal da rizoctoniose do feijoeiro no
214 agreste de Pernambuco é representada agora por aproximadamente cinco AGs, caso o isolado
215 A4P19FC venha a ser considerado mais um AG. Além disso, foi encontrado também
216 *Ceratobasidium* AG-L associado a plantas com rizoctoniose na região. Com essas novas
217 evidências vêm ganhando força a hipótese de que a rizoctoniose do feijoeiro no município de
218 São João-PE é causada por organismos com ampla diversidade genética, possivelmente de
219 espécies filogenéticas diferentes.

220 Os isolados agrupados no AG4 HG-I não formaram sub-grupos na análise filogenética.
221 Em estudo anterior, o sequenciamento da região ITS rDNA não diferenciou os isolados dentro
222 do AG4 HG-I (Tenório, 2011). Meinhardt et al. (2002) conseguiram diferenciar os isolados do
223 AG4 e seus subgrupos, utilizando a região ribossomal ITS1/5.8S/ITS2. Essa não
224 diferenciação de isolados, demonstrada nesse estudo, pode ser explicada por não ter sido
225 utilizado a região ITS rDNA completa para a análise, predominando a região 5.8S no
226 fragmento analisado. Porém, representantes desses isolados puderam ser diferenciados
227 utilizando-se análise de microssatélites.

228 Os alelos de microssatélites (TC_AG3_1, TC01, TC06, TC_AG3_09 e TC11) foram
229 utilizados pela primeira vez com sucesso na amplificação dessas regiões em isolados do
230 agente causal da rizoctoniose do feijoeiro-caupi no Brasil. Mesmo dentro do AG4 HG-I nessa
231 região restrita de cultivo de feijoeiro, pode-se observar variação genética nos isolados,
232 mostrando que essa população não é clonal, diferente do que se pensava apenas observando o

233 resultado do sequenciamento da região ITS rDNA. Esses alelos, mais dois que não
234 amplificaram (TC_AG3_16 e TC_AG3_29) já haviam sido testados anteriormente com
235 sucesso em isolados desse mesmo AG associados a plantas doentes de pepino, beringela,
236 pimenta, feijão verde, abóbora e beterraba açucareira no Iran (Haratian et al., 2013). Sendo
237 observada uma diversidade genética de alta a moderada nas populações (Haratian et al.,
238 2013).

239 Observações de variação de agressividade no campo durante as coletas de material
240 vegetal doente e também nos testes de patogenicidade em casa de vegetação, aliado a variação
241 genética observada com os marcadores microssatélites para o AG4 HG-I permitiu concluir
242 que essa sub-população do agente causal da rizoctoniose no agreste pernambucano não é
243 estritamente clonal, como se pensava, e que é possível que esteja ocorrendo reprodução sexual
244 dessa população no campo. A ausência de clones compartilhados entre populações pode ser
245 atribuída aos tamanhos relativamente baixos das amostras analisadas, e/ou reprodução sexual
246 frequente em populações de *R. solani* (Haratian et al., 2013; Linde et al., 2005; McDonald;
247 Linde, 2002).

248 Conclui-se que o AG4 HG-I é o principal grupo dentro da espécie *R. solani* causando
249 rizoctoniose do feijoeiro no município de São João, agreste pernambucano, e que a doença é
250 causada por pelo menos quatro AGs, com um possível novo AG de *R. solani*. *Ceratobasidium*
251 AG-L é também agente causal da rizoctoniose do feijoeiro na região. Esses novos dados são
252 cruciais para o entendimento da genética desse patógeno e planejamento de formas de manejo
253 mais eficientes a rizoctoniose do feijoeiro. Estudos mais amplos utilizando microssatélites
254 necessitam ser realizados para o entendimento da estrutura populacional de *R. solani* AG4
255 HG-I no feijoeiro-caupi e feijoeiro-comum no Nordeste do Brasil.

256

257 **Agradecimentos**

258 A CAPES pela concessão de bolsa de doutorado à Dyana de Albuquerque Tenório, e ao
259 CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa a Delson Laranjeira e Cristiano Souza Lima; a
260 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)/Unidade Acadêmica de Garanhuns
261 (UAG), pela formação e disponibilização de estrutura para a realização do trabalho.

262

263 **Referencias Bibliográficas**

264 Athayde Sobrinho C, Viana FMP, Santos AA (2005) Doenças fúngicas e bacterianas. In:
265 Freire Filho FR, Lima JAA, Ribeiro VQ (Eds.) Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília:
266 Embrapa Informação Tecnológica. pp.461-484.

267 Carling DE, Kuninaga S, Brainard KA (2002) Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal
268 transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani*
269 anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. *Phytopathology*, Brasília 92:43-50.

270 Ciampi MB, Meyer MC, Costa MJN, Zala M, McDonald BA, Ceresine PC (2008) Genetic
271 structure of populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA from soybean in
272 Brazil. *Phytopathology*, Brasília 98:932-941.

273 Cubeta MA, Vilgays R (1997) Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex.
274 *Phytopathology*, St. Paul 87:480-484.

275 Echavez-Badel R, Gomez-Galve JE, Alameda-Lozada M (2000) Characterization of
276 *Rhizoctonia* spp. isolates collected from *Phaseolus vulgaris* in Puerto Rico. *Journal of*
277 *Agriculture of The University of Puerto Rico* 84:79–86.

278 Eken C, Demirci E (2004) Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and
279 binucleate *Rhizoctonia* isolates from bean in Erzurum, Turkey. *Journal of Plant Pathology* 86:
280 49–52.

281 Erper I, Ozkoc I, Karaca GH (2011) Identification and pathogenicity of *Rhizoctonia* species
282 isolated from bean and soybean plants in Samsun, Turkey. *Archives Of Phytopathology And*
283 *Plant Protection* 44:78–84.

- 284 Fenille RC, Souza NL, Kuramae EE (2002) Characterization of *Rhizoctonia solani* associated
285 with soybean in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht 10:773-792.
- 286 Ferreira ME, Grattapaglia D (1996) Introdução ao uso de marcadores moleculares 2th Ed.
287 Brasília, EMBRAPA-CENARGEM. pp. 220.
- 288 Godoy-Lutz G, Kuninaga S, Steadman JR, Powers K (2008) Phylogenetic analysis of
289 *Rhizoctonia solani* subgroups associated with web blight symptoms on common bean based
290 on ITS-5.8S rDNA. *Journal of General Plant Pathology* 74:32–40.
- 291 Haratian M, Safaie N, Sharifnabi B, Mahmudi SB, Ariana A (2013) Genetic structure of
292 populations of *Rhizoctonia solani* AG-4 from five provinces in Iran. *Plant Pathology*, Oxford,
293 62:649-656.
- 294 Karaca GH, Ozkoc I, Erper I (2002) Determination of the anastomosis grouping and virulence
295 of *Rhizoctonia solani* Kühn isolates associated with bean plants grown in Samsun/Turkey.
296 *Pakistan Journal of Biological Sciences* 5:434–437.
- 297 Kuninaga S, Natsuaki T, Takeuchi T, Yokosawa R (1997) Sequence variation of the rDNA
298 ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*,
299 Germany 32:237-243.
- 300 Linde CC, Zala M, Paulraj RSD, McDonald BA, Gnanamanickam SS (2005) Population
301 structure of the rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from India. *European*
302 *Journal of Plant Pathology* 112:113-121.
- 303 McDonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential and
304 durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto 40:349-379.
- 305 Meinhardt LW, Wulff NA, Bellato CM, Tsai SM (2002) Genetic analyses of *Rhizoctonia*
306 *solani* from *Phaseolus vulgaris* grown in the Atlantic rainforest region of São Paulo, Brazil.
307 *Fitopatologia Brasileira* 27:259–267.
- 308 Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA.
309 *Nucleic Acids Research*, Oxford 8:4321–4325.

- 310 Nechet KL, Haldfeld-Vieira BA (2006) Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp.,
311 associados à mela do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), coletados em Roraima. Fitopatologia
312 Brasileira, Brasília 31:505-508.
- 313 Nerey Y, Pannecouque J, Hernandez HP, Diaz M, Espinosa R, De Voz S, Van Beneden S,
314 Herrera L, Hofte M (2010) *Rhizoctonia* spp. causing root and hypocotyl rot in *Phaseolus*
315 *vulgaris* in Cuba. Journal Phytopathology 158:236–243.
- 386 Poltronieri MC, Botelho SM, Lemos OF de, Albuquerque AS, Silva Júnior AC da, Palhares
387 TC (2006) Tratos culturais em pimenta de cheiro (*Capsicum chinense* Jacquin). Belém:
388 Embrapa Amazônia Oriental. 4p. (Comunicado, 167).
- 389 Rosa DD, Fenille RC, Souza NL, Kuramae EE (2005) Caracterização citomorfológica,
390 molecular e patogênica de isolados de *Rhizoctonia solani* de batata. Summa
391 Phytopathologica, Jaboticabal 31:133-141.
- 392 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2th Ed.
393 New York: Cold Spring Harbor Laboratory. pp. 215.
- 394 Sharon M, Kuninaga S, Hyakumachi M, Sneh B (2006) The advancing identification and
395 classification of *Rhizoctonia* spp. using molecular and biotechnological methods compared
396 with the classical anastomosis grouping. Mycoscience, Tokyo 47:299-316.
- 397 Silva-Barreto FAZ, Pereira WV, Ciampi MB, Camara MPS, Ceresini PC (2010) Associação
398 de *Rhizoctonia solani* grupo de anastomose 4 (AG-4 HGI e HGIII) à espécies de plantas
399 invasoras de área de cultivo de batata. Summa Phytopathologica, Jaboticabal 36:145-154.
- 400 Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G (1996) *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular
401 Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. 1th Ed. Dordrecht: Kluwer Academic
402 Publishers.
- 403 Sussel AAB, Fenille RC, Kuramae EE, Souza NL (2001) Caracterização de *Rhizoctonia*
404 *solani*, agente etiológico do tombamento de mudas de café. Summa Phytopathology, Botucatu
405 27:348-352.

- 406 Swofford DL (2000) PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods).
407 Version 4.0b10. Sunderland. Massachusetts: Sinauer Associates.
- 408 Tenório DA (2011) Diversidade genética e patogênica de *Rhizoctonia solani* do feijoeiro no
409 agreste meridional de Pernambuco. MSc. dissertation, Universidade Federal Rural de
410 Pernambuco. Recife, Pernambuco.
- 411 Tewoldemedhin YT, Lamprecht SC, Mcleod A, Mazzola M (2006) Characterization of
412 *Rhizoctonia* spp. recovered from crop plants used in rotational cropping systems in the
413 Western Cape province of South Africa. Plant Disease, St. Paul 90:1399-1406.
- 414 Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of
415 progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap
416 penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, Oxford 22:4673-4680.
- 417 Venegas J P, Godoy-Lutz G, Steadman JR, Urrea C, Harveson R (2008) Morphological and
418 molecular characterization of *Rhizoctonia solani* isolates from western Nebraska dry beans.
419 Ann Rpt. Bean Improvement Coop 51:86-87.
- 420 Yu K, Park SJ, Poysa V, Gepts P (2000) Integration of simple sequence repeat (SSR) markers
421 into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The Journal of
422 Heredity, Oxford 91:429-434.
- 423 Zala M, McDonald B, Bernardes de Assis J, Ciampi MB, Storari M, Peyer P, Ceresini PC
424 (2008) Highly polymorphic microsatellite loci in the rice- and maize-infecting fungal
425 pathogen *Rhizoctonia solani* anastomosis group 1IA. Molecular Ecology Resources 8:686–
426 689.
- 427 White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal
428 ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ
429 (Eds.) PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. San Diego, USA. Academic
430 Press. pp. 315-322.

431 **Tabela 1.** Procedência dos isolados de *Rhizoctonia*

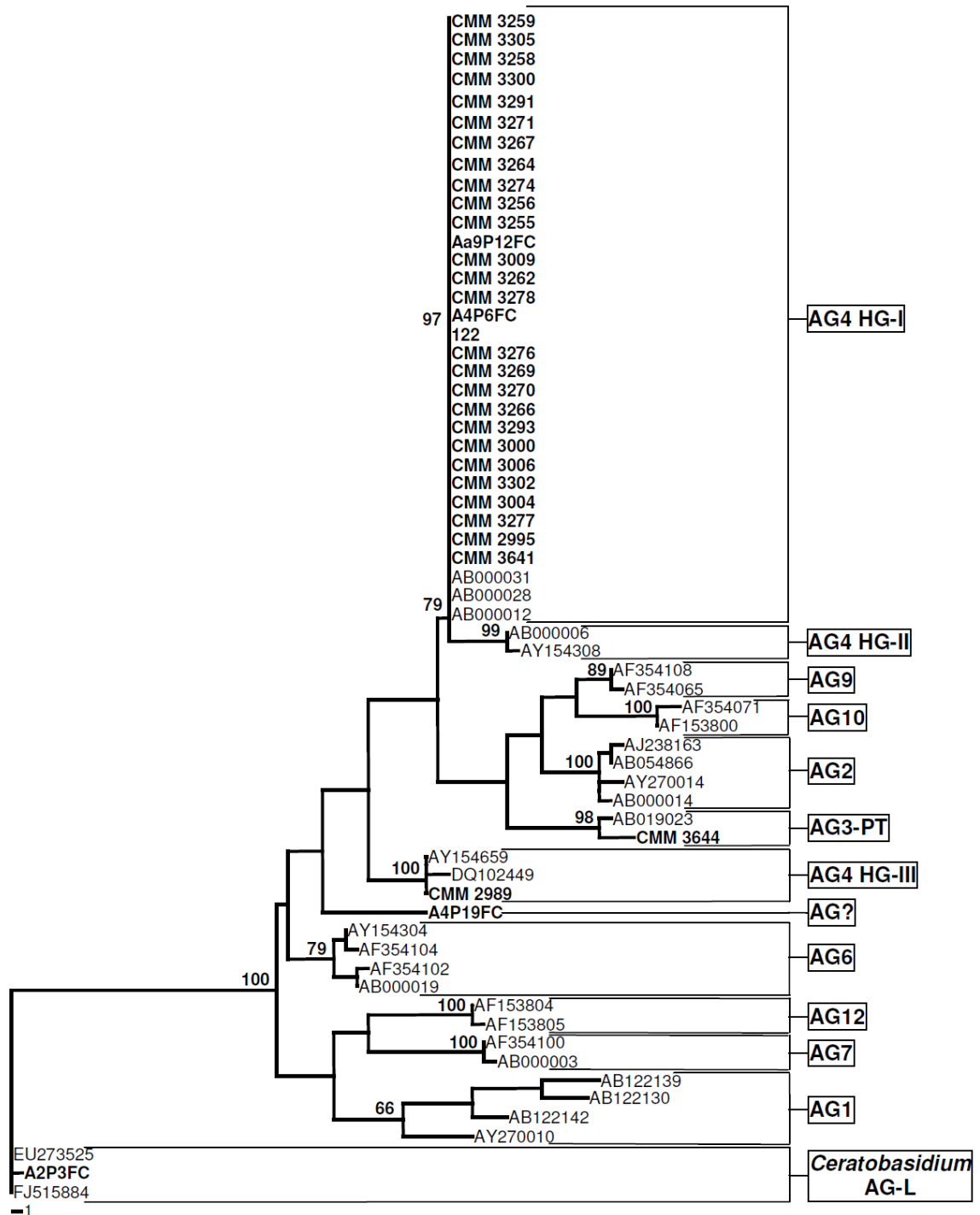
Área*	Código original	Código CMM**	Hospedeiro/ Substrato	Origem	Coordenada (altitude)	Cedido por***
A1	A1P2 A1P8 A1P14 A1P21	3262 3264 3266 3267	Feijão-caupi	São João	S08°51'24,8'' W036°22'47,5'' (724m)	TENÓRIO, D. A.
A2	A2P5	3269	Feijão-caupi	São João	S08°51'20,5'' W036°22'41,7'' (727m)	TENÓRIO, D. A.
A2.1	A2P3FC	-	Feijão-comum	São João	S08°51,0'33,0'' W36°22,0'40'' (717m)	X
A3	A3P8	3270	Feijão-caupi	São João	S08°51'17,3'' W036°22'47,5'' (730m)	TENÓRIO, D. A.
A3.1	3P4R1 3P4R2 3P15R1 3P25R2	3255 3256 3258 3259	Feijão-comum	São João	S08°51'14,5'' W036°22'43,7'' (728m)	TENÓRIO, D. A.
A4	A4P2 A4P9	3271 3274	Feijão-caupi	São João	S08°51'05,2'' W036°22'50,7'' (717m)	TENÓRIO, D. A.
A6	A6P6	3276	Feijão-caupi	São João	S08°51'00,1'' W036°23'05,9'' (711m)	TENÓRIO, D. A.
A10	A10P14 A10P15	3277 3278	Feijão-caupi	São João	S08°51'43,7'' W036°22'38,7'' (719m)	TENÓRIO, D. A.
A13	A13P11 A13P23	3291 3293	Feijão-caupi	São João	S08°50'28,2'' W036°23'02,8'' (695m)	TENÓRIO, D. A.
A14	A14P56 A14P69	3300 3302	Feijão-caupi	São João	S08°51'26,5'' W036°22'19,7'' (710m)	TENÓRIO, D. A.
A16	P3	3305	Feijão-caupi	São João	S08°51'9,3'' W036°22'44'' (714m)	TENÓRIO, D. A.
-	JP2R5 JP4R5 LJ2R3 1 JP4R1	3004 3009 3000 3006	Solo	Jupi	-	MICHEREFF, S. J.
-	SJ3R2 SJ5R3 SJ9R1	2988 2989 2995	Solo	São João	-	MICHEREFF, S. J.
-	- -	3641 3644	-	-	-	MICHEREFF, S. J.

A17	A4P19FC A4P6FC	- -	Feijão-comum	São João	S07°90'23,4'' W090°20'84,9'' (689m)	TENÓRIO, D. A.
A19	Aa9P12FC	-	Feijão-comum	São João	S07°76'54,6'' W090°16'52,7'' (680m)	X
-	0122	-	Feijão-caupi	São João	-	X

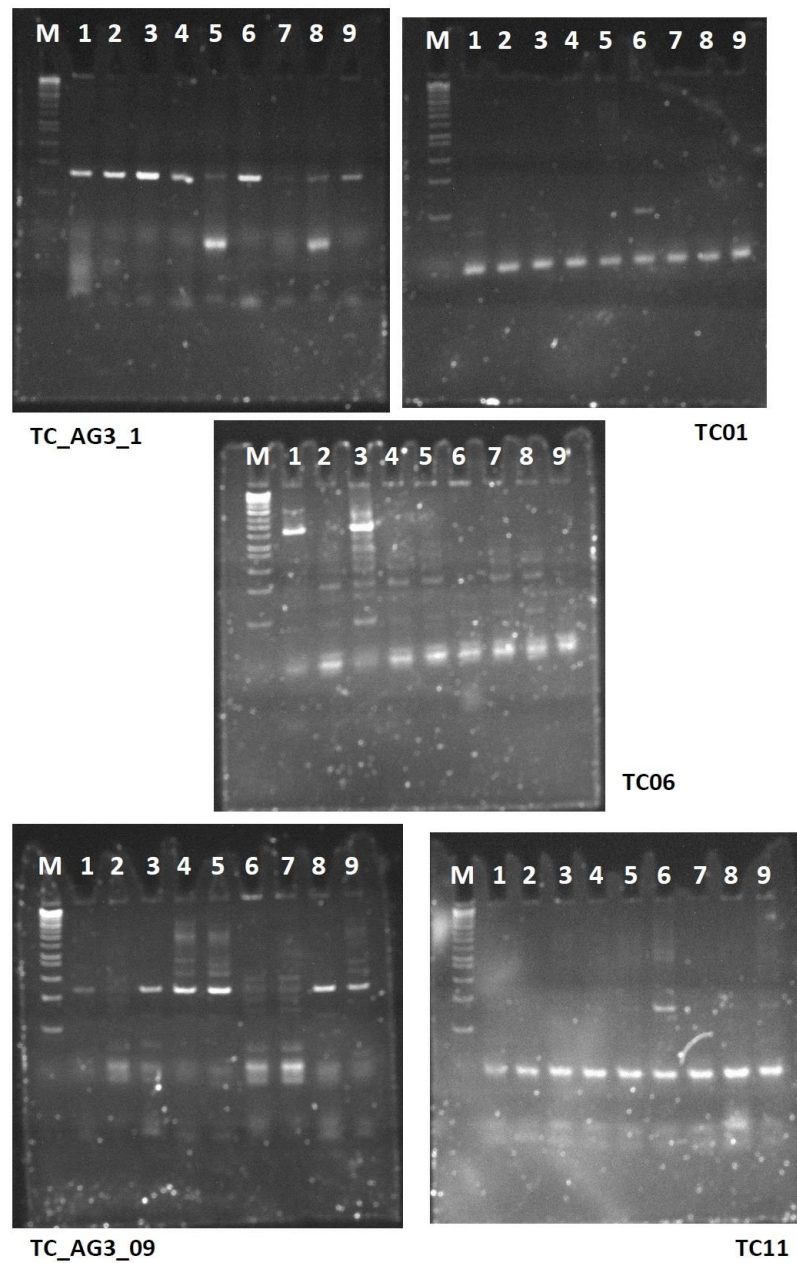
432 *Área de coletas; **CMM=Código da coleção de culturas fitopatogênicos Prof Maria
433 Menezes, setor de Fitossanidade, departamento de agronomia, UFRPE, Recife-PE;
434 ***Isolados cedidos: dissertação (TENÓRIO, 2011), Prof Sami J. Michereff (CMM) e de
435 coletas realizadas nas áreas de cultivo.

436 **Tabela 2.** Descrição dos iniciadores microssatélites usados na caracterização dos isolados de
 437 *Rhizoctonia solani*

ID	Primer's	T (°C)	Produto (bp)	Ref.
TC01	F: CATGCTCATTTGCGACATCT R: AACAAACAGCAAGGGCCATC	60	104–143	Zala et al.(2008)
TC06	F: CAGAGATACGTCCAGCAACG R: ATGCTCATTTGCGACATCTG	60	220-232	Zala et al.(2008)
TC11	F: TGCAGAACCATAGGACTGG R: TGACAGACAGGACAGCTACTGG	60	199-224	Zala et al.(2008)
TC_AG3_1	F: CGACTTGGGATTCGTCTAGTTC R: TCTGATCTACGAAGCAGTCGTC	60	141-171	Ferrucho et al.(2009 apud Haratian et al., 2013)
TC_AG3_09	F: CAGACAGCTCTTCGCCTACTC R: TGACCCTGGACAGAATTAACG	60	220-253	Ferrucho et al.(2009 apud Haratian et al., 2013)



438 **Figura 1.** Árvore filogenética de neighbor-joining da região ITS rDNA de isolados de
 439 *Rhizoctonia* associados à rizoctoniose do feijoeiro-caupi e feijoeiro-comum no agreste
 440 pernambucano. Os números acima dos internódios representam o suporte de bootstrap do
 441 agrupamento para 1.000 repetições. Os isolados em negrito foram obtidos neste estudo. Os
 442 outros códigos representam os depósitos no GenBank, NCBI, dos isolados de referência. Os
 443 grupos de anastomose (AG) aparecem em caixas.



444

445 **Figura 2.** Alelos de microssatélites amplificados para isolados de *Rhizoctonia solani* AG4

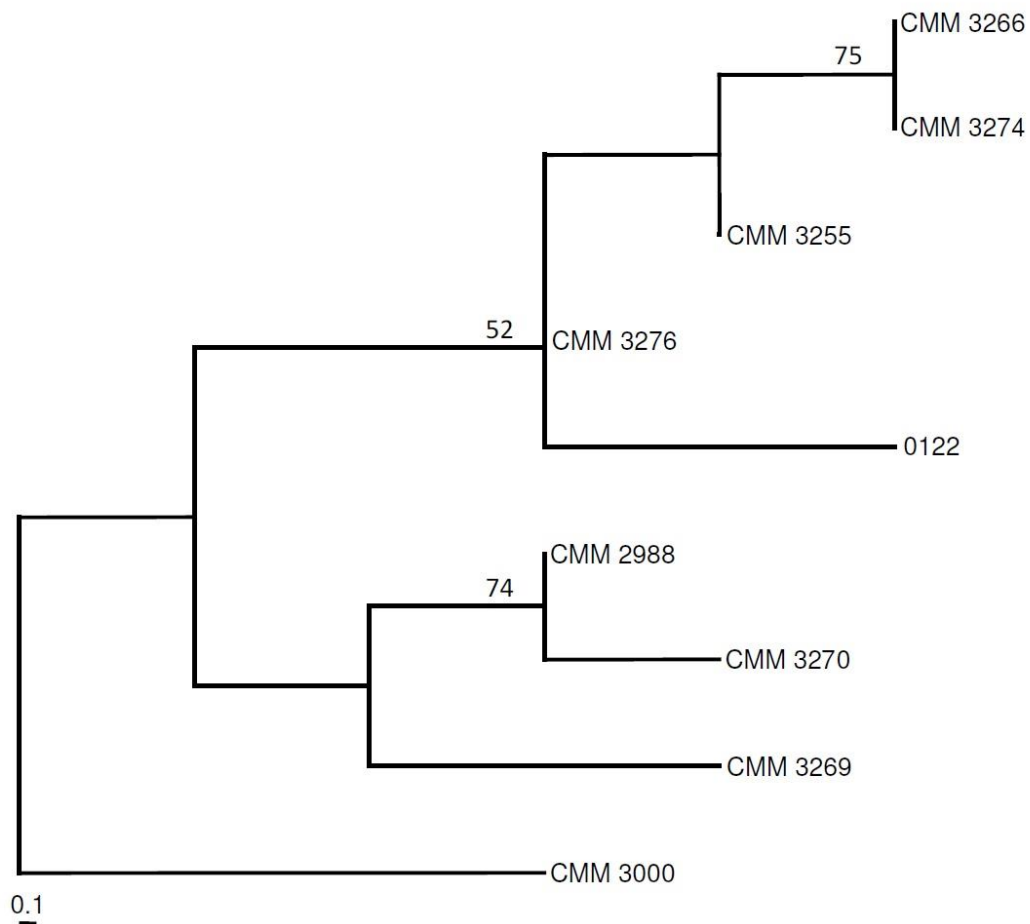
446 HG-I associados à rizoctoniose do feijoeiro-caupi e feijoeiro-comum no agreste

447 Pernambucano. TC_AG3_1, TC01, TC06, TC_AG3_09 e TC11 = alelos de microssatélites.

448 M = Marcador de peso molecular 1Kb ladder; 1 = 0122; 2 = CMM 2988; 3 = CMM 3000; 4 =

449 CMM 3255; 5 = CMM 3266; 6 = CMM 3269; 7 = CMM 3270; 8 = CMM 3274; 9 = CMM

450 3276.



451

452 **Figura 3.** Dendrograma de UPGMA para isolados de *Rhizoctonia solani* AG4 HG-I baseado
 453 em comparações de padrões de microssatélites gerados pela amplificação de cinco locos
 454 (TC_AG3_1, TC01, TC06, TC_AG3_09 e TC11). Os números nos internódios correspondem
 455 a valores de bootstrap para 1.000 repetições. A escala na base da árvore representa o número
 456 de mudanças nas bandas. Treze bandas, representando alelos cada uma foram avaliadas.

CAPÍTULO III

Potencial de leveduras no controle da rizoctoniose do feijoeiro-caupi

Artigo submetido à *PLOS ONE*

Potencial de leveduras no controle da rizoctoniose do feijoeiro-caupi

Dyana de A. Tenório¹, Erika V. de Medeiros², Cristiano S. Lima³, Jéssica M. da Silva²,
Jamilly A. Barros², Rejane P. Neves⁴, Delson Laranjeira^{1*}

¹Departamento de Agronomia/Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, Recife, PE, Brasil; ²Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE, Garanhuns, PE, Brasil; ³Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, CE, Brasil; ⁴Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brasil.

*Autor para correspondência

E-mail: delson@depa.ufrpe.br

RESUMO

A doença rizoctoniose causada por *Rhizoctonia solani* (teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris*), contribui na baixa produtividade da cultura sendo considerado destrutivo em várias regiões do Brasil. O controle desse patógeno é extremamente difícil, e as medidas de manejo viáveis são conhecidamente escassas. O biocontrole utilizando-se leveduras pode representar uma solução eficiente ao manejo da cultura. Objetivou-se selecionar leveduras, obtidas de plantas de feijoeiro, com potencial biocontrolador a rizoctoniose e os possíveis mecanismos de ação. Isolados de *R. solani* foram avaliados quanto a agressividade, sendo selecionado o isolado CMM-3643. Setenta leveduras foram utilizadas na microbiolização de sementes de feijoeiro-caupi visando selecionar isolados com potencial antagonico na redução da severidade da rizoctoniose (CMM-3643) em condições de casa de vegetação, sendo escolhidos os tratamentos que proporcionaram índice de severidade da doença $\leq 25\%$. A estabilidade do controle biológico foi confirmada para todos os isolados de leveduras selecionados (C6A, FVF10 (R1), FVC10), pela redução do índice de severidade da rizoctoniose em relação ao controle. No antagonismo “in vitro”, somente o isolado C6A apresentou efeito inibitório significativo no crescimento micelial do isolado CMM-3643. Aumento nos níveis das enzimas POX e CAT pelo tratamento das sementes com a levedura FVF10 (R1), assim como a ausência de mecanismos de antibiose contra o patógeno CMM-3643, sugere que o mecanismo de biocontrole em questão é a indução de resistência da planta. Este é o primeiro relato da redução dos sintomas da rizoctoniose em plântulas de feijoeiro-caupi pela ação antagonica de leveduras sobre *R. solani*.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, antagonista, biocontrole, indução de resistência.

35 INTRODUÇÃO

36 *Rhizoctonia solani* Kuhn (teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) é um
37 importante patógeno de solo, que ocorre mundialmente causando doenças em uma grande
38 variedade de plantas cultivadas [1]. Inclui espécies economicamente importantes das famílias
39 Solanaceae, Fabaceae, Asteraceae, Poaceae e Brassicaceaeas, e em plantas ornamentais [1, 2].
40 Em feijoeiro-caupi (*Vigna unguiculata*) é o agente causal da rizoctoniose, doença radicular
41 economicamente importante e destrutiva nos campos produtores, sobretudo na fase de
42 germinação e emergência do feijoeiro [3, 4].

43 A infecção deste agente patogênico pode resultar em diferentes sintomas, como
44 tombamento e podridões, e a sua gravidade dependerá não apenas da presença das condições
45 ambientais favoráveis, mas também da interação sinérgica entre outros patógenos presentes
46 no solo. Os principais sintomas induzidos por esse fungo caracterizam-se por tombamento de
47 plântulas, cancro do talo e podridões de sementes e de raízes [1]. Sendo, considerado um
48 patógeno de difícil controle, por produzir hifas vegetativas que atacam diversos tipos de
49 plantações e estruturas de resistência no solo, apresentando ampla capacidade saprofítica e
50 alta agressividade [5].

51 Desta forma, é necessário adotar medidas que visem diminuir a densidade do inóculo do
52 patógeno, promover o rápido desenvolvimento da plântula e evitar a ocorrência de condições
53 ambientais que favoreçam a atuação do patógeno [2]. As medidas de controle da doença se
54 baseia no cultivo em solo com boa drenagem, plantio raso, rotação de culturas, solarização e
55 principalmente o tratamento de sementes ou rega do solo com aplicações de fungicidas
56 contendo o ingrediente ativo pentacloronitrobenzeno (PCNB) [1, 4, 6]. Porém o uso contínuo
57 de fungicidas químicos pode estimular o desenvolvimento de resistência do patógeno, além da
58 poluição criada por esses produtos no meio ambiente [7].

59 Consequentemente, pesquisas têm sido realizadas no desenvolvimento de insumos
60 alternativos aos produtos químicos sintéticos para o controle das doenças de plantas, uma
61 destas alternativas é a utilização de agentes de controle biológicos [8]. Dentre os agentes de
62 biocontrole, tem crescido o interesse pelo uso de leveduras, por apresentarem potencial para
63 suprimir uma ampla gama de fitopatógenos de solo e para promover o crescimento da planta
64 [9, 10].

65 El Tarabily [11] comprovou a eficiência de *Candida valida*, *Trichosporon asahii* e
66 *Rhodotorula glutinis* no controle de doenças causadas pelo fungo habitante do solo *R. solani*
67 em plântulas de beterraba (*Beta vulgaris* L.). Trabalho realizado por El-Mehalawy et al. [12]
68 demonstrou a eficiência das leveduras *Hansenula arabitolgenes*, *Candida incommunis* e

69 *Candida steatolytica* na produção de compostos antifúngicos com elevado efeito inibitório
70 contra *R. solani*, além de apresentarem redução da incidência do damping-off em algodoeiro
71 (*Gossypium* L.). Mohammed et al. [13] e El Mehalawy et al. [14] demonstraram a eficiência
72 do uso de leveduras na redução da severidade da rizoctoniose da batateira (*Solanum*
73 *tuberosum* L.) e algodoeiro, respectivamente.

74 Devido à busca por formas alternativas e sustentáveis de manejo da rizoctoniose, aliado
75 a relatos sobre a eficiência de leveduras no controle de patógenos habitantes do solo e a
76 importância econômica e social da cultura do feijoeiro-caupi, os objetivos do trabalho foram
77 (a) selecionar leveduras antagonistas no controle da rizoctoniose, através microbiolização de
78 sementes de feijoeiro-caupi; (b) analisar possíveis mecanismos de ação envolvidos no
79 controle.

80

81 **MATÉRIAS E MÉTODOS**

82 **Agressividade de isolados de *Rizoctonia solani***

83 Para avaliar a severidade da rizoctoniose do feijoeiro-caupi, foram utilizados 69
84 isolados de *R. solani* (Tabela 1). No experimento foi utilizado solo coletado no Instituto
85 Agrônômico de Pernambuco no município de Brejão – PE, o solo foi esterilizado em
86 autoclave (120°C, 1 atm, 60 min, dois dias consecutivos), e após 15 dias da esterilização
87 acondicionado em bandejas plásticas (13x13x4 cm).

88 Antes do plantio, as sementes foram desinfestadas em solução de NaClO 1% por dois
89 minutos, lavadas duas vezes em água destilada esterilizada e colocadas para secar em câmara
90 de segurança biológica CLASSE 2A. Antes do plantio, os isolados do patógeno foram
91 cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Agar) durante
92 três dias a 25±2°C sobre alternância luminosa. Destas placas foram retirados discos de 5 mm
93 diâmetro da cultura do fungo, sendo estes depositado sobre cada semente.

94 As bandejas foram mantidas em casa de vegetação, com temperatura variando de 22-
95 32°C e umidade relativa de aproximadamente 77±2,5%. O tratamento controle consistiu
96 apenas da semente, sem o patógeno. O delineamento experimental foi inteiramente
97 casualizado com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por uma bandeja com
98 nove plantas. A severidade da rizoctoniose foi avaliada aos 15 dias após o plantio, utilizando-
99 se escala de notas [16], onde: 0 = ausência de sintomas, 1 = hipocótilo com pequenas lesões, 2
100 = hipocótilo com grandes lesões, sem constrição, 3 = hipocótilo totalmente constricto,
101 mostrando tombamento e 4 = sementes não germinadas e/ou plântulas não emergidas.
102 Utilizando os dados obtidos com as escalas de notas, foram calculados os índices de

103 severidade da rizoctoniose (SVR) conforme McKinney [17], pela expressão: SVF ou SVR =
104 $[\Sigma(\text{grau da escala} \times \text{frequência}) / (\text{número total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})] \times 100$. Os
105 dados da SVR foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de
106 Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. O isolado mais agressivo será selecionado para
107 os testes de controle com leveduras.

108

109 **Obtenção dos isolados de leveduras**

110 O isolamento das leveduras foi realizado a partir de fragmentos de tecidos de folhas,
111 raiz e caule de plantas de feijoeiro-caupi e feijoeiro-comum aparentemente assintomático.
112 Esses fragmentos foram imersos separadamente em tubos de ensaio (cinco fragmentos por
113 tubo) contendo 10 mL de água esterilizada (AE) adicionada de cloranfenicol (50 mg L^{-1}). Em
114 seguida, os tubos foram submetidos à agitação em banho de ultra-som por 10 minutos e,
115 posteriormente submissão agitação em “vórtex”, em seguida foi efetuada uma diluição (10^{-1}).
116 Desta diluição, alíquotas de 0,1 mL foram distribuídas em placas de petri contendo meio
117 Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) suplementado com extrato de levedura ($1,5 \text{ g L}^{-1}$) e
118 adicionado de cloranfenicol (50 mg L^{-1}), e uniformemente espalhado na superfície do meio
119 com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas por 72 horas à
120 temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{ C}$, após esse período as colônias de leveduras formadas foram
121 repicadas para tubos de ensaio contendo meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA). Os isolados
122 obtidos foram conservados em óleo mineral à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ \text{ C}$).

123

124 **Seleção de leveduras com potencial biocontrolador**

125 Neste estudo foi utilizado um total de 70 isolados de leveduras, extraídas de plantas de
126 feijoeiro-caupi e feijoeiro-comum coletadas de áreas de plantio de feijoeiro na região do
127 agreste de Pernambuco, para o tratamento das sementes de feijoeiro-caupi (cultivar IPA-207).

128 As sementes foram inicialmente desinfestadas em NaClO (1 %) por 10 min e
129 posteriormente lavadas por duas vezes em água destilada esterilizada (ADE). O tratamento foi
130 realizado por imersão em suspensão de leveduras na concentração 10^7 UFC mL^{-1} (unidades
131 formadoras de colônias), sendo adicionadas as suspensões um surfactante Tween 80 a 0,02%,
132 por 10 min, com posterior acondicionamento das sementes em temperatura de 28° C por 12h
133 antes da semeadura.

134 O inóculo de *R. solani* (CMM-3643), foi multiplicado em arroz parbolizado seguindo a
135 metodologia adaptada de Barbosa et al [15]. Esse substrato colonizado foi incorporado ao solo
136 (50 mg de substrato colonizado kg^{-1} de solo), 48h antes do plantio. A semeadura das sementes

137 tratadas foi realizada em bandejas de plásticos mantidas em casa de vegetação, utilizando solo
138 autoclavado com as mesmas características físico-químicas do teste de patogenicidade.

139 O experimento foi conduzido em dois ensaios experimentais, com temperatura variando
140 de 22-31^oC e 15-26^oC e umidade relativa de aproximadamente 80%. O delineamento
141 experimental foi inteiramente casualizado com 71 tratamentos (leveduras + controle) e cinco
142 repetições. O tratamento controle foi representado em solo infestado pelo patógeno e semeado
143 com sementes de feijoeiro-caupi sem tratamento com leveduras. Transcorrido 15 dias após a
144 semeadura, a severidade da rizoctoniose foi avaliada utilizando-se escala de notas (16), sendo
145 o índice de severidade da rizoctoniose (SVR) calculados conforme McKinney [17], e
146 submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott, ao nível
147 de 5% de probabilidade.

148

149 **Teste de controle biológico com isolados mais promissores**

150 Para avaliar a estabilidade do controle biológico foram utilizados os isolados de
151 leveduras que proporcionaram índice de severidade da doença $\leq 25\%$. Para os testes de
152 biocontrole a metodologia de infestação de solo e aplicação das leveduras nas sementes, foi
153 realizada conforme descrito anteriormente na etapa de seleção de leveduras com potencial
154 biocontrolador. O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos
155 (leveduras + controle) e cinco repetições, sendo cada repetição representada por nove
156 unidades amostrais (plantas). O controle constituiu de solo infestado com *R. solani* e de
157 sementes sem tratamento. O teste de controle foi realizado em dois experimentos, com
158 temperatura variando de 14,9-26^oC e 19-30^oC e umidade relativa de aproximadamente 80%.
159 Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias dos
160 tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott (P=5%).

161

162 **Análise de mecanismos envolvidos no controle de *Rhizoctonia solani***

163 **Avaliação do antagonismo *in vitro***

164 Para verificação do antagonismo dos isolados de leveduras selecionadas (C6A, FVF10
165 (R1), FVC10) sobre o isolado patogênico de *R. solani* (CMM 3643) foi utilizado à
166 metodologia de pareamento das colônias. Inicialmente, as leveduras antagonistas foram
167 cultivadas em meio Sabouraud (peptona 10 g, ágar 15 g, dextrose 40 g, água destilada
168 esterilizada 1000 mL⁻¹) suplementado com extrato de levedura (1,5 g L⁻¹) e adicionado de
169 cloranfenicol (50 mg L⁻¹) a 28 °C \pm 2 °C e fotoperíodo de 12h por 48 horas. A partir das
170 colônias formadas, obteve-se a suspensão de células, pela adição da solução salina esterilizada

171 na superfície do meio, ajustando as suas concentrações a 10^7 UFC mL⁻¹. Utilizando-se bordas
172 de funis de vidro (esterilizados) com 7cm de diâmetro, foram realizadas imersões na
173 suspensão da levedura e, em seguida, tocadas sobre no meio de cultura BDA de cada placa de
174 Petri (9cm). No centro dessas placas, foi depositado um disco (5 mm) contendo estruturas de
175 *R. solani* obtidos de colônias com três dias de cultivo a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12h.
176 Como tratamento controle, utilizaram-se placas com meio de cultura BDA contendo disco da
177 estrutura do patógeno, sendo as suspensões da levedura substituídas por solução salina
178 esterilizada. As placas foram mantidas em B.O.D., por cinco dias, a temperatura de 25 ± 2 °C
179 com fotoperíodo de 12h.

180 A avaliação da inibição do crescimento do patógeno foi realizada pela medição do
181 diâmetro das colônias, até o período em que as placas da testemunha apresentaram-se
182 totalmente colonizadas. O experimento foi disposto em delineamento inteiramente
183 casualizado com quatro tratamentos (leveduras + controle) e cinco repetições composta por
184 uma unidade experimental. O experimento foi conduzido duas vezes, e como não tiveram
185 diferenças significativas entre os ensaios, realizou-se análise conjunta dos dados.

186

187 **Indução de resposta de defesa bioquímica**

188 Para análise enzimática das plantas de feijoeiro-caupi, foi conduzido um experimento de
189 acordo com a metodologia descrita anteriormente para o teste de controle biológico, sendo
190 coletadas amostras de folhas 15 dias após a semeadura das sementes tratadas (C6A, FVF10
191 (R1) e FVC10) e sem tratamento (tratamento controle). Para determinar a atividade
192 enzimática, 0,1 g das amostras de folhas foram maceradas em N₂ líquido e em seguida
193 adicionado 4 mL do tampão fosfato de potássio (50 mM pH 7,0) com 0,05g de
194 polivinilpirrolidona (PVP). O extrato foi colocado em eppendorf, centrifugados por 10 min a
195 10.000 g a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi transferido para eppendorf, e armazenados em
196 freezer a -20°C, para serem usadas posteriormente. Para determinar a atividade da catalase
197 (CAT, EC 1.11.1.6) foi utilizada a metodologia descrita por Havir & Mchale [18]. A atividade
198 da ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) foi determinada pela metodologia de
199 Nakano & Asada [19] modificada por Koshiha [20]. A determinação da atividade da
200 peroxidase (POX, EC 1.11.1) foi avaliada de acordo com Urbanek et al. [21] usando guaiacol
201 e H₂O₂ como substrato, e a polifenoloxidase (PFO, EC 1.10.3.1) foi determinada pela
202 oxidação do pirogalol [22]. Todas as atividades enzimáticas foram medidas em U min⁻¹mg⁻¹.

203

204 **Identificação de leveduras selecionadas**

205 Os isolados de leveduras selecionados nos testes de controle biológico foram
206 identificados, através da taxonomia clássica (23) na Universidade Federal de Pernambuco
207 (UFPE) e por taxonomia molecular através das regiões genômicas ITS e 26S do rDNA no
208 Laboratório especial de micologia/Universidade Federal de São Paulo.

209

210 **RESULTADOS**

211 **Agressividade dos isolados de *Rhizoctonia solani***

212 Entre os 69 isolados do patógeno avaliados, observou-se uma alta variabilidade da
213 virulência ao feijoeiro-caupi (cv. IPA 207), sendo estes divididos em oito grupos distintos
214 ($P \leq 0,05$). Esse resultado pode estar relacionado à grande diversidade genética e patogênica
215 existente entre os isolados. O grupo de isolados que apresentaram menor severidade da
216 doença foi representado por seis isolados com ISD (Índice de Severidade da doença) variando
217 de 2,2 e 7,8%, os quais não diferindo estatisticamente do tratamento controle (Tabela 1). Um
218 segundo grupo também exibiu ISD menor, variando de 10,5 e 23,9, porém com diferença
219 estatística entre o tratamento controle. No grupo de maior ISD, composto de vinte isolados,
220 obtiveram-se valores superiores a 80%.

221 Pelos resultados apresentados, foi selecionado o isolado CMM 3643 com ISD de 97,8%.
222 A metodologia de inoculação do patógeno *R. solani* demonstrou ser eficiente nas condições
223 avaliadas em relação da expressão da virulência do patógeno. As plântulas inoculadas
224 apresentaram sintomas típicos da rizoctoniose como cancro, tombamento, enfraquecimento
225 das raízes e redução na germinação das sementes, em decorrência da associação do patógeno
226 com o tecido da radícula.

227

228 **Seleção de leveduras como potencial biocontrolador**

229 No primeiro ensaio experimental o índice de severidade da doença variou 15-65%
230 (Tabela 2), no entanto 62 isolados apresentaram diferença ($P \leq 0,05$) em relação o controle
231 (sem tratamento). Os demais isolados não proporcionaram redução expressiva na severidade
232 da doença, não diferindo do controle. As sementes tratadas com as leveduras FVC14, FVC5
233 (IPA) e SJCF15 aumentaram o ISD embora sem diferir em relação ao controle. Os
234 tratamentos que demonstraram maior controle da doença foram FVC10, PGGN, FVC20' e
235 SJCC2 com ISD de 15% e redução da severidade da doença (RSD) de 72,2%. Um grupo
236 intermediário de isolados apresentou baixo ISD variando de 20-25%, não diferindo dos
237 isolados que proporcionaram maior controle.

238 No ensaio 2 (Tabela 3) foi observado a formação de dois grupos com redução da
239 severidade da doença (RSD=58,3-75%), porém só o primeiro grupo apresentou diferença do
240 tratamento controle (ISD=60%). Deste, o tratamento C6A proporcionou menor ISD (15%),
241 reduzindo em 75% a severidade da doença.

242 Os resultados dos dois ensaios demonstram que apenas três isolados de leveduras
243 (FVC10, C6A e FVF10(R1)) mantiveram os valores de $ISD \leq 25\%$, reduzindo a severidade da
244 doença em 54.4-75%. Sendo promissores como agentes de biocontrole da rizoctoniose do
245 feijoeiro-caupi, apresentando maior eficiência no controle da doença causada pelo isolado
246 CMM-3643. Apenas a levedura FVF10 (R1) repetiu a eficiência no controle da doença, com
247 severidade de 25% em ambos os ensaios. As plântulas, oriundas da inoculação das sementes
248 com leveduras, apresentaram melhor desenvolvimento quando comparadas com as plantas
249 sem tratamento.

250

251 **Teste de controle biológico com isolados mais promissores**

252 O tratamento das sementes de feijoeiro-caupi (cv. IPA-207) com as leveduras C6A,
253 FVC10 e FVF10 (R1) resultou em plântulas com menor severidade dos sintomas da
254 rizoctoniose (Tabela 4). Os valores do ISD nesses tratamentos foram de 18,89-23,89% e
255 13,89-27,78% para os experimentos 1 e 2 respectivamente. No primeiro experimento todos os
256 isolados diferiram da testemunha, com redução de 57,4% (C6A), 48,5% (FVC10) e 66,3%
257 (FVF10(R1)).

258 No segundo experimento, observou-se redução expressiva na severidade da doença pelo
259 tratamento FVF10 (R1), quando comparado com o primeiro experimento. O controle também
260 apresentou redução na severidade, esse fato pode estar relacionado às condições ambientais da
261 época do experimento não serem favoráveis ao desenvolvimento do patógeno. O isolado C6A
262 apresentou um leve aumento do ISD da doença, porém não sendo significativo. Os isolados
263 FVC10 e FVF10 (R1) proporcionaram os maiores níveis de controle da rizoctoniose,
264 diferindo do tratamento C6A que apresentou redução de 30,5%. Todas as leveduras estudadas
265 mantiveram a eficiência no controle de plântulas de feijoeiro-caupi contra a rizoctoniose pelo
266 tratamento das sementes, reduzindo significativamente o ISD em relação o controle.

267

268 **Avaliação do antagonismo por pareamento das colônias**

269 Para avaliar a ação antagônica foram testadas as leveduras selecionadas com potencial
270 biocontrolador. Dentre os isolados (C6A, FVC10 e FVF10(R1)), somente o isolado C6A
271 apresentou efeito inibitório significativo sobre o crescimento micelial do isolado *R. solani*

272 CMM-3643, apresentando DMC de 43,25 mm, e formação de halo de inibição. Para os
273 isolados FVC10 e FVF10 (R1) foram verificados valores de DMC de 78,35 e 75,55 mm
274 respectivamente, não apresentando eficiência na diminuição da inibição do crescimento
275 micelial quando comparados com o controle que apresentou valor de 89,20 mm (Tabela 5).

276

277 **Indução de respostas de defesas bioquímicas**

278 Os tratamentos com leveduras induziram acréscimos e decréscimos significativos nos
279 níveis de POX e CAT (Fig. 1A, 1B). Em relação às enzimas PFO e APX não foram
280 observados níveis significativos para todos os tratamentos em relação ao controle (Fig. 1C,
281 1D). As plantas previamente expostas ao tratamento FVF10 (R1) apresentaram atividades de
282 POX e CAT significativamente superior aos demais tratamentos. O nível de APX foi
283 relativamente baixo em relação com o tratamento controle, não diferindo do C6A. Neste
284 mesmo tratamento não foi observado diferença significativa na atividade PFO (Fig. 1C).

285 Na atividade do APX, o isolado C6A apresentou nível baixíssimo da enzima diferindo
286 significativamente dos tratamentos CONTROLE e FVC10 (Fig. 1D). O tratamento FVC10
287 apresentou nível de POX reduzido em comparação aos demais tratamentos, sendo observados
288 níveis altos nas atividades CAT e PFO diferindo do controle. A atividade APX foi superior
289 entre os tratamentos com levedura, não apresentando diferença com o controle (Fig. 1D).

290

291 **Identificação de leveduras selecionadas**

292 As leveduras selecionadas nos testes de controle biológico foram identificadas como
293 *Candida saopaulonensis* strain JYC1092 (C6A), *Cryptococcus laurentii* (FVC10) e *Bullera*
294 *sinensis* (FVF10 (R1)) (Tabela 7).

295

296 **DISCUSSÃO**

297 Evidências sobre a diversidade genética e patogênica de isolados de *R. solani*, tem sido
298 comprovado em diversos estudos através da comparação de seqüências nucleotídicas da
299 região ITS do rDNA e dos diferentes grupos de anastomose (24, 25, 26, 27, 28).

300 Conforme os resultados obtidos, foi selecionado o isolado de *R. solani* o CMM-3643,
301 apresentando o maior nível de severidade da doença (ISD). Esse nível elevado de severidade
302 em plântulas de feijoeiro-caupi cv. IPA-207, dos isolados obtidos de solo e feijoeiro-comum,
303 indica baixa especificidade ao hospedeiro. Essa capacidade que *R. solani* tem em causar
304 doença em diversos hospedeiros, independente do hospedeiro de origem, e em diferentes
305 níveis de virulência tem sido evidenciada em outros patossistemas [27, 29].

306 Devido ao baixo grau de especificidade do hospedeiro, cepas de *Rhizoctonia* de
307 diferentes AGs podem diminuir o condicionamento físico geral da planta durante a
308 colonização, o que resulta em maior sensibilidade a patógenos adicionais [30]. Além disso, o
309 controle desse agente patogênico é dificultado devido ao seu comportamento ecológico, a sua
310 ampla gama de hospedeiros, e à elevada taxa de sobrevivência dos microescleródios [31].

311 Na avaliação da eficiência dos isolados de leveduras (FVC10, C6A e FVF10(R1))
312 selecionados preliminarmente, perante microbiolização das sementes, notou-se de maneira
313 geral que os tratamentos proporcionaram diminuição na severidade da rizoctoniose. Resultado
314 semelhante foi obtido por El-Tarabily [11], onde utilizaram as espécies de leveduras *Candida*
315 *valida*, *Rhodotorula glutinis* e *Trichosporon asahii* para o tratamento de sementes de
316 beterraba-açucareira (*Beta vulgaris*) no controle de *R. solani*.

317 Relatos da eficiência de leveduras no tratamento de sementes também foram
318 demonstrado em estudos conduzidos por El-Mehalawy et al. [32], na redução na incidência da
319 murcha tardia causado pelo patógeno de solo *Cephalosporium maydis* em milho (*Zea mays*),
320 envolvendo as leveduras *Candida glabrata*, *Candida maltosa*, *Rhodotorula rubra* e
321 *Trichosporon cutaneum*. E em pesquisas realizadas por Abo-Elysours e Mohamed [33], no
322 tratamento das plântulas de tomateiro (*Solanum lycopersicon*) pré-inoculadas com as espécies
323 *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida sake* e *Pichia membranifaciens*, observou redução de
324 66,2% da severidade da murcha-de-fusário em condições de campo.

325 Conforme pesquisas, além do antagonismo a fitopatógenos de solo, as leveduras podem
326 apresentar interações mutuamente benéficas a raízes de plantas como promotoras de
327 crescimento e biofertilizantes [10, 13, 34]. Esse trabalho aponta o potencial das leveduras
328 como fertilizantes biológicos, promovendo o crescimento das plântulas. Conforme Sneh et al.
329 [2] promover o rápido desenvolvimento da planta é umas das medidas eficientes de manejo da
330 rizoctoniose.

331 Evidências, acumuladas ao longo dos anos, demonstram que o desempenho das plantas
332 pode ser aumentado como resultado da produção de reguladores de crescimento de leveduras
333 [9]. São identificadas como promotoras de crescimento das plantas os gêneros de leveduras
334 *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon*, *Williopsis* e *Yarrowia*
335 [9, 35, 36, 37]. El-Emery [37] relatou aumento na taxa de germinação de sementes de cevada,
336 milho, ervilha e feijoeiro através do tratamento com levedura, estimulando também o
337 crescimento de plântulas, radículas e alargamento dos cotilédones.

338 A promoção de crescimentos de plantas de feijoeiro-caupi foi investigada por Boby et
339 al. [38], onde foi demonstrado que o tratamento das sementes com *Rhodotorula mucilaginosa*,

340 *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus laurentii*, *Metschnikowia pulcherrima* e
341 *Trichosporon cutaneum* foram capazes de aumentar a biomassa vegetal em relação as plantas
342 não tratadas ou plantas tratadas somente com a incorporação de micorriza no solo. Abd-El-
343 Hafez e Shehata [39] utilizaram *Rhodotorula* sp. como fertilizante biológico para plantas de
344 tomate, relatando ganhos de peso do fruto.

345 No teste in vitro, apenas o isolado C6A apresentou efeito direto no crescimento micelial
346 do isolado *R. solani* CMM-3643 (Tabela 5), com formação de halo de inibição. O efeito
347 inibidor in vitro sugere que compostos, como proteínas, glicoproteínas tóxicas e enzimas
348 degradadoras, produzidos pela levedura atua de forma direta na antibiose sobre *R. solani*.
349 Trabalhos realizados com espécies de leveduras do gênero *Candida*, apresentaram produção
350 de muitos compostos relacionados à antibiose sobre fitopatógenos fúngicos [9]. Testes in vitro
351 realizados por El-Mehalawy [32] evidenciaram que apenas cinco leveduras, de um total de 40
352 isolados obtidos da rizosfera de plantas de milho, foram fortemente antagônicas ao patógeno
353 *Cephalosporium maydis*. Em estudos realizados por Shalaby e El-Nady [40] utilizando o
354 agente de controle biológico *Saccharomyces cerevisiae*, constatou efeito inibidor contra os
355 fungos de solo *R. solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Fusarium oxysporum* F4. Porém, o fungo *F.*
356 *oxysporum* F4 mostrou ser o mais sensível (57,77% de inibição de crescimento), em
357 comparação com *R. solani* e *S. rolfsii*, com inibição do crescimento de 33,33% e 2,22%,
358 respectivamente.

359 As plântulas, provenientes da microbiolização das sementes com a levedura FVF10(R1)
360 apresentou aumento da atividade das enzimas POX e CAT (Fig. 1A, 1B). O nível de PFO foi
361 superior nos tratamentos FVC10 e C6A em relação ao controle. A atividade APX não
362 apresentou acréscimos significativos, demonstrando níveis expressivamente baixos para os
363 tratamentos FVF10(R1) e C6A. Pesquisa realizada por Khalid [41] constatou que a levedura
364 *Saccharomyces cerevisiae* reduziu a incidência da doença causada por *S. rolfsii* em plantas de
365 feijoeiro-comum, resultando em aumento na atividade da peroxidase, polifenol oxidase e
366 quitinase. De acordo com El-Sayed [42], a atuação de *S. cerevisiae* como agente de controle
367 biológico está associada a mecanismos de indução de resistência, comprovados pelo aumento
368 de determinadas enzimas, tais como peroxidase, quitinase e proteína relacionada com
369 patogênese, presentes na planta.

370 El-Tarabily e Sivasithamparam [9] relatam o potencial das leveduras como agente
371 biocontrolador de patógenos de solo promovendo o crescimento das plantas e indução de
372 resistência, por meio da produção das substâncias fenilalanina amônia liase, fitoalexinas,
373 peroxidases e etileno, em tecidos vegetais. A ação de microrganismos promotores de

374 crescimento vegetal na indução de resistência é conhecida, porém há dúvidas sobre os
375 mecanismos e elicitores empenhados para engatilhar o início do processo de defesa na planta
376 [43].

377 Roncatto e Pascholatti [44] avaliaram a ação da levedura *S. cerevisiae* no perfil
378 eletroforético de peroxidase em plantas de milho e sorgo, e observaram que a suspensão de
379 células ou mesmo o filtrado da levedura foi capaz de alterar o padrão de atividade da enzima
380 peroxidase. Relatos sobre a produção de peroxidases por *A. pullulans*, em fermentos no
381 tecido de maçãs, sugere que, indiretamente, isolados de levedura podem reduzir a incidência
382 de doenças atuando como agente indutor de resistência [45]. Tomates inoculados com *Pichia*
383 *guilliermondii* expressaram alterações bioquímicas defensivas a *Rhizopus nigricans*, através
384 de um número de enzimas incluindo peroxidase (POD), polifenol oxidase (PPO), superóxido
385 dismutase (SOD), catalase (CAT), PAL, CHI, e β -1,3-glucanase [46].

386 Conforme Conrath et al. [47], o agente indutor não atua diretamente sobre o patógeno
387 ou é transformado em algum agente antimicrobiano, mas ele sensibiliza a planta a ativar seus
388 mecanismos de defesa em resposta à presença de um patógeno. Esses mecanismos podem
389 envolver enzimas como peroxidase, β -1,3-glucanase, quitinase, fenilalanina amônia-liase e
390 polifenoloxidase [48]. A ativação desses mecanismos estão relacionados à intensificação da
391 formação das espécies reativas em oxigênio (EROs), porém o seu acúmulo nos tecidos
392 vegetais pode resultar na morte da célula. Para evitar esse processo, a enzimas ascorbato
393 peroxidase e catalase atuam na modulação refinada e na remoção do excesso das EROs
394 gerado durante o estresse, respectivamente [49].

395 A constatação do aumento significativo dos níveis de peroxidases em plântulas tratadas
396 com a levedura FVF10 (R1), assim como a ausência de mecanismos de antibiose contra *R.*
397 *solani* CMM-3643, sugere que o mecanismo de biocontrole em questão possa ser indução de
398 resistência da planta. Segundo Hindumathy [50] e Baysal et al. [51], as alterações na atividade
399 da enzima peroxidase pelo tratamento com elicitores podem indicar o envolvimento destes na
400 indução de resistência em plantas.

401 As leveduras identificadas como *Candida saopaulonensis* (C6A), *Cryptococcus*
402 *laurentii* (FVC10), *Bullera sinensis* (FVF10 (R1)) foram eficiente contra *R. solani*, sendo
403 consideradas promissoras no controle deste fitopatógeno em feijoeiro. O presente trabalho é o
404 primeiro relato do isolamento das leveduras *Candida saopaulonensis* e *Bullera sinensis* em
405 feijoeiro, e sua eficiência no controle biológico de *R. solani*, não existindo relatos desta
406 espécie no biocontrole de doenças fitopatogênicas.

407 Estudos realizados por Golubev & Nakase [52], observaram a capacidade de *Bullera*
408 *sinensis* em produzir uma enzima extracelular letal a outras leveduras, secretando um
409 fungicida termolábil. A participação da atividade “killer” presente por alguns isolados de
410 leveduras, nos quais são capazes de produzir toxinas extracelulares (de composição
411 glicolípídica ou glicoproteica) com ação antifúngica ou fungistática sobre outras leveduras
412 e/ou fungos filamentosos [53]. Embora, deste trabalho tenha sido evidenciado ausência de
413 efeito direto da levedura *Bullera sinensis* sobre o *R. solani*, é necessário a realização de testes
414 adicionais para a caracterização quanto a atividade *killer*.

415 Como agente de biocontrole de doenças de origem fúngica, a espécie *Cryptococcus*
416 *laurentii* ((Kuff.) C.E. Skinner) já foi estudada por Bautista-Rosales et al. (54) no
417 antagonismos à *Colletotrichum gloeosporioides* ((Penz.) em manga (*Mangifera indica* L.),
418 considerada umas das principais doenças pós-colheita de frutas tropicais e legumes. Nos
419 resultados obtidos no trabalho mencionado, o isolado da espécie *C. laurentii* apresentou alto
420 potencial antagônico *in vivo*, com redução significativa (75,88%) do desenvolvimento da
421 lesão causada por *C. gloeosporioides*. Sendo associado como potenciais mecanismos de
422 antagonismos à competição por espaço e nutrientes e produção de metabólitos. *Cryptococcus*
423 *Laurentii* têm sido estudada, apresentando elevado potencial antagonico no controle biologico
424 das doenças pós-colheita causadas por *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Penicillium*
425 *digitatum* e *Rhizopus* [55, 56, 57, 58].

426 Os resultados alcançadas nas presentes condições avaliadas, através do tratamento das
427 sementes de feijoeiro-caupi com a levedura *C. Laurentii* selecionado no controle da
428 rhizoctoniose, demonstrou elevado potencial antagonico no controle de *R. solani* com redução
429 da severidade da doença (RSD) de 72,2%, assemelhando-se aos resultados obtidos utilizando
430 está levedura no controle de doenças fúngicas em pós-colheita. Portanto, este é o primeiro
431 relato dessa espécie *C. Laurentii* no controle de doenças radiculares.

432 A compreensão plena do papel das leveduras no controle de patógenos de solo,
433 evidentemente é a chave para futuras práticas agrícolas sustentáveis. Esperamos que, a partir
434 deste estudo, novas pesquisas sejam realizadas utilizando leveduras no controle biológico de
435 *R. solani* em feijoeiro.

436

437 **AGRADECIMENTOS**

438 Agradecemos A CAPES pela concessão de bolsa de doutorado à Dyana de Albuquerque
439 Tenório, e ao CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa a Delson Laranjeira e Cristiano

440 Souza Lima. Ao Dr Antônio Félix da Costa (IPA) pela contribuição com material vegetal
441 utilizado neste trabalho.

442

443 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 444 1. González-García V, Portal OMA, Rubio SV. Review. Biology and Systematics of the
445 form genus *Rhizoctonia*. Span J Agric Res. 2006;4: 55-79.
- 446 2. Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G. *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular
447 Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. 1st. ed. Dordrecht: Kluwer Academic
448 Publishers, 1996.
- 449 3. Sartorato A, Nechet KL, Halfeld-Vieira BA. Diversidade genética de isolados de
450 *Rhizoctonia solani* coletados em feijão-caupi no estado de Roraima. Fitopatol. bras.
451 2006;31: 297-301.
- 452 4. Sikora EJ. *Rhizoctonia* Root Rot on garden beans. Alabama cooperative extension system.
453 2004;1: 1. Available: <http://www.aces.edu/pubs/docs/A/ANR-1006/>
- 454 5. González M, Pujol M, Metraux J, González-García V, Bolton MD, Borrás-Hidalgo O.
455 Tobacco leaf spot and root rot caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. Mol Plant Pathol.
456 2011;12: 209-216.
- 457 6. Kintschev MR, Goulart ACP, Mercant FM Compatibility between rhizobium inoculation
458 and fungicide application in seeds of common beans. Summa phytopathol. 2014;40:338-
459 346.
- 460 7. Rijal IP. Biological management of bush bean wilt (*Rhizoctonia solani* Kuhn.) with
461 *Trichoderma* spp. M.Sc.Thesis, Department of Plant Protection. 2003. Available:
462 <http://www.iaas.edu.np/thesis/plant-protection/bush-bean-wilt.htm>
- 463 8. Pal KK, Gardener BM. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health
464 Instructor. 2006. doi:10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- 465 9. El-Tarabily KA, Sivasithamparam K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne
466 fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Mycoscience. 2006;47: 25-35.
- 467 10. Botha A. The importance and ecology of yeasts in soil. Soil Biol. Biochem. 2011;43: 1-8.
- 468 11. El Tarabily KA, Suppression of *Rhizoctonia solani* disease of sugar beet by antagonists and
469 plant growth-promoting yeasts. J. Appl. Microbiol. 2004;96: 69-75.
- 470 12. El-Mehalawy AA, Hassanein SM, Hassanein NM, Abd-Allah S. Induction of resistance
471 and biocontrol of *Rhizoctonia* in cotton against damping-off disease by rhizosphere yeast
472 and fungi. Appl. Ecol. Environ. Res. 2006 (In press).

- 473 13. Mohammed AS, El Hassan SM, El Balla MMA, El Sheik EAE. The role *Trichoderma*,
474 VA Mycorriza and dry yeasts in the control of *Rhizoctonia* disease of potato (*Solanum*
475 *tuberosum* L.). U.K. J. Agric. Sci. 2008;16: 285-301.
- 476 14. El Mehalawy AA, Hassanim SM, Hassanim NM, Zakis SA. Induction on resistance and
477 biocontrol of *Rhizoctonia* in cotton against damping-off disease by rhizosphere
478 microorganisms. New Egyptian J. Microbiol. 2007;17: 148-168.
- 479 15. Barbosa MAG, Michereff SJ, Mariano RLR, Maranhão E. Biocontrole de *Rhizoctonia*
480 *solani* em caupi pelo tratamento de sementes com *Pseudomonas* spp. *fluorescentes*.
481 Summa Phytopathol. 1995;21: 151-157.
- 482 16. Noronha MA, Michereff SJ, Mariano RLR. Efeito do tratamento de sementes de caupi
483 com *Bacillus subtilis* no controle de *Rhizoctonia solani*. Fitopatol. Bras. 1995;20: 174-
484 178.
- 485 17. Mckinney RH. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings
486 by *Helminthosporium sativum*. Journ. Agric. Res. 1923;6: 195-218.
- 487 18. Havir EA, Mchale NA. Biochemical and development characterization of multiple forms
488 of catalase in tabaco leaves. Plant Physiol. 1987;84: 450-455.
- 489 19. Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase
490 en spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology. 1981;22: 867-880.
- 491 20. Koshiba T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*).
492 Plant Cell Physiol. 1993;34: 713-721.
- 493 21. Urbanek H, Kuzniak-Gebarowska E, Herka K. Elicitation of defense responses in bean
494 leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. Acta Physiol. Plant. 1991;13: 43-50.
- 495 22. Kar M, Mishra D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf
496 senescence. Plant Physiol. 1976; 57: 315-319.
- 497 23. Barnett JA, Paine RW, Yarrow D. 2000. Yeasts: characteristics and identification.
498 Cambriage University Press, Cambriage, UK.
- 499 24. Tewoldemedhin YT, Lamprecht SC, Mcleod A, Mazzola M. Characterization of
500 *Rhizoctonia* spp. recovered from crop plants used in rotational cropping systems in the
501 Western Cape province of South Africa. Plant Dis. 2006;90: 1399-1406.
- 502 25. Ciampi MB, Meyer MC, Costa MJN, Zala M, Mcdonald BA, Ceresine PC. Genetic
503 structure of populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA from soybean in
504 Brazil. Phytopathol. 2008;98: 932-941.

- 505 26. González D, Cubeta MA, Vilgalys R. Phylogenetic utility of indels within ribosomal
506 DNA and [beta]-tubulin sequences from fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex.
507 Mol Phylogenet Evol. 2006;40: 459-470.
- 508 27. Rashad YM, Abdel-Fattah GM, Hafez EE, El-Haddad SA. Diversity among some
509 Egyptian isolates of *Rhizoctonia solani* based on anastomosis grouping, molecular
510 identification and virulence on common bean. Afr. J. Microbiol. Res. 2012; 6: 6661-6667.
- 511 28. Singh V, Singh US, Singh KP, Singh M, Kumar A. Genetic diversity of *Rhizoctonia*
512 *solani* isolated from rice: differentiation by morphological characteristics, pathogenicity,
513 anastomosis behaviour and RAPD fingerprinting. J. Mycol. Plant Pathol. 2002;32: 332-
514 344.
- 515 29. Erlacher A, Cardinale M, Grosch R, Grube M., Berg G. The impact of the pathogen
516 *Rhizoctonia solani* and its beneficial counterpart *Bacillus amyloliquefaciens* on the
517 indigenous lettuce microbiome. Front Microbiol. 2014;5: 175.
- 518 30. Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora RA, Ulrich A, Hallmann J. Endophytic and ectophytic
519 potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function
520 against plant pathogenic fungi. FEMS Microb Ecol. 2005;51: 215-229.
- 521 31. Scherwinski K, Grosch R, Berg G. Effect of bacterial antagonists on lettuce: active
522 biocontrol of *Rhizoctonia solani* and negligible, short-term effect on non-target microbes.
523 FEMS Microb Ecol. 2008;64: 106–116.
- 524 32. El Mehalawy AA, Hassaneim NM, Kather HM, El Din EAK, Youssef Y. Influence of
525 maize root colonization by the rhizosphere actinomycetes and yeast fungi on plant growth
526 promoter on the biological control of late wilt disease. Int. J. Agri. Biol. 2004;6: 599-604.
- 527 33. Abo-Elsyoustr KA, Mohamed HM. Biological control of *Fusarium* wilt in tomato by plant
528 growth promoting yeasts and rhizobacteria. Plant Pathol. J. 2009;25: 199-204.
- 529 34. Eman, Abd El-Monem AA, Saleh MMS, Mostaza EAM. Minimizing the quantity of
530 mineral nitrogen fertilizers on grapevine by using humic acid, organic and biofertilizers.
531 Res. J. Agric. & Biol. Sci. 2008;4: 46-50.
- 532 35. Nassar AH, El Tarabily KA, Sivasithamparam K. Promotion of plant growth by an auxin-
533 producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.)
534 roots. Biol Fertil Soils. 2005;42: 97-108.
- 535 36. Cloete KJ, Valentine AJ, Stander MA, Blomerus LM, Botha A. Evidence of symbiosis
536 between the soil yeast *Cryptococcus laurentii* and a *sclerophyllous* medicinal shrub,
537 *Agathosma betulina* (Berg.) Pillans. Microb Ecol. 2009;57: 624-632.

- 538 37. El-Emery GAE. Effect of growth regulators of yeast autolysate, RNA and adenine on
539 some seeds during germination. Arab Uni J of Agric Sci. 2004;12: 51-67.
- 540 38. Boby VU, Balakrshina AN, Bagyaraj DJ. Interaction between *Glomus musseae* and soil
541 yeasts on growth and nutrition of cowpea. Microbiol Res. 2008;163: 693-700.
- 542 39. Abd-El-Hafez AE, Shehata SF. Field evaluation of yeasts as a bio-fertilizer for some
543 vegetable crops. Arab Uni J of Agric Sci. 2001;9: 169-182.
- 544 40. Shalaby ME, El-Nady MF. Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocontrol agent
545 against *Fusarium* infection of sugar beet plants. Acta Biol. Szegediensis. 2008;52: 271 –
546 275 .
- 547 41. Khalid EE. Biological control of bean damping-off caused by *Sclerotium rolfsii*. Egypt. J.
548 Phytopathology. 2014;42: (in press).
- 549 42. El-Sayed S. Microbial agents as a plant growth promoting and roots protector. 10th ed.
550 Egypt: Microbiology conference; 2000. pp. 12-14.
- 551 43. Punja ZK. Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens – a
552 review of progress and future prospects. Can. J. Plant Pathol. 2001;23: 216-235.
- 553 44. Roncatto MC, Pascholatti SF. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da
554 peroxidase em folhas de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratadas com
555 levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). Sci. agric. 1998;55: 395-402.
- 556 45. Haissam JM. *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research
557 and practical applications. A van Leeuwenhoek. 1996;99: 93–105.
- 558 46. Zhao Y, TU K, Shao X, Jing W, Su Z. Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against
559 *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. Postharvest Biol. Technol. 2008;49: 113–120.
- 560 47. Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B. Priming in plant pathogen interactions. Trends
561 Plant Sci. 2002;7: 210-216..
- 562 48. Cavalcanti LS, Brunelli KR, Stangarlin, JR. Aspectos bioquímicos e moleculares da
563 resistência induzida. In: Cavalcanti LS, Di Piero RM, Cia P, Pascholatti SF, Resende
564 MLV, Romeiro RS, Editors. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos.
565 Piracicaba: FEALQ; 2005. pp. 81-124.
- 566 49. Mittler R. oxidative Stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci. 2002;7:
567 405-410.
- 568 50. Hindumathy CK. The defense activator from yeast for rapid induction of resistance in
569 susceptible pearl millet hybrid against downy mildew disease. Int J Agri Sci. 2012;4: 196-
570 201.

- 571 51. Baysal O, Soylu EM, Soylu S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the
572 plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused
573 by *Clavibacter michiganensis* ssp. *Michiganensis*. Plant pathol. 2003;52: 747-753.
- 574 52. Golubev WI, Nakase T. Mycocinogeny in the genus Bullera: taxonomic specificity of
575 sensitivity to the mycocin produced by Bullera sinensis. FEMS Microbiol Lett. 1997;146:
576 59-64.
- 577 53. Golubev WI. Antagonist interactions among yeasts. In: Rosa CA, Peter G, Editors. The
578 yeasts handbook: Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Berlin: Springer-Verlog,
579 2006. pp. 197-219.
- 580 54. Bautista-Rosales PU, Calderon-Santoyo M, Servín-Villegas R, Ochoa-Álvarez NA,
581 Vázquez-Juárez R, Ragazzo-Sánchez JA. Biocontrol action mechanisms of *Cryptococcus*
582 *laurentii* on *Colletotrichum gloeosporioides* of mango. Crop Protect. 2014;65: 194-201.
- 583 55. Zhang H, Zheng X, Yu T. Biological control of postharvest diseases of peach with
584 *Cryptococcus laurentii*. Food Control. 2007; 18: 287-291.
- 585 56. Janisiewicz WJ, Saftner RA, Conway WS, Yoder KS. Control of blue mold decay of
586 apple during commercial controlled atmosphere storage with yeast antagonists and sodium
587 bicarbonate. Postharvest Biology and Technol. 2008;49: 374–378.
- 588 57. Mekbib SB, Regnier TJ, Korsten L. Efficacy and mode of action of yeast antagonists for
589 control of *Penicillium digitatum* in oranges. Tropical Plant Pathol. 2011;36: 233-240.
- 590 58. Zhang HY, Zheng XD, Xi YF. Biological control of postharvest blue mould of oranges by
591 *Cryptococcus laurentii* (Kufferath). Skinner Biocontrol. 2005;50: 331–342.

592 **Tabela 1.** Procedência dos isolados de *Rhizoctonia* utilizados no índice de severidade da
 593 doença (ISD)

Área*	Código original	Código CMM**	Hospedeiro/ Substrato	Origem	Coordenada (altitude)	Cedido por***
A1	A1P2 A1P14	3262 3266	Feijão-caupi	São João	S08°51'24,8'' W036°22'47,5'' (724m)	TENÓRIO, D. A.
A2	A2P5	3269	Feijão-caupi	São João	S08°51'20,5'' W036°22'41,7'' (727m)	TENÓRIO, D. A.
A2.1	A2P1FC A2P16F A2P3FC A2P6FC Aa2P6FC	- - - -	Feijão-comum	São João	S08°51,0'33,0'' W36°22,0'40'' (717m)	x
A3	A3P8	3270	Feijão-caupi	São João	S08°51'17,3'' W036°22'47,5'' (730m)	TENÓRIO, D. A.
A3.1	3P4R1 3P4R2	3255 3257	Feijão-comum	São João	S08°51'14,5'' W036°22'43,7'' (728m)	TENÓRIO, D. A.
A4	A4P7	3273 3274	Feijão-caupi	São João	S08°51'05,2'' W036°22'50,7'' (717m)	TENÓRIO, D. A.
A6	A6P6	3276	Feijão-caupi	São João	S08°51'00,1'' W036°23'05,9'' (711m)	TENÓRIO, D. A.
A7	A7P1FC	-	Feijão-comum	São João	S08°51,0'24,5'' W36°22'31,3'' (717m)	x
A10	A10P14 A10P15 A10P16	3277 3278 3279	Feijão-caupi	São João	S08°51'43,7'' W036°22'38,7'' (719m)	TENÓRIO, D. A.
A11	A11P7 A11P19 A11P18 A11P27	3280 3283 3284 3286	Feijão-caupi	São João	S08°50'56,5'' W036°22'47,6'' (708m)	TENÓRIO, D. A.
A12	A12P20	3289	Feijão-caupi	São João	S08°50'41,2'' W036°22'52,6'' (687m)	TENÓRIO, D. A.
A13	A13P10 A13P11 A13P18 A13P23	3290 3291 3292 3293	Feijão-caupi	São João	S08°50'28,2'' W036°23'02,8'' (695m)	TENÓRIO, D. A.
A14	AB14P1 AB14P7 A14P1 A14P40 A14P69	3295 3296 3297 3299 3302	Feijão-caupi	São João	S08°51'26,5'' W036°22'19,7'' (710m)	TENÓRIO, D. A.

A16	P3	3305	Feijão-caupi	São João	S08°51'9,3'' W036°22'44'' (714m)	TENÓRIO, D. A.
-	JP2R5 JP4R5 JP4R3 2 JP3R3 1 JP1R3 LJ2R3 1 JP4R1	3004 3009 3008 3005 3002 3000 3006	Solo	Jupi	-	MICHEREFF, S. J.
-	SJ3R2 SJ7R2 SJ5R3 SJ2R3 SJ9R1	2988 2993 2989 2987 2995	Solo	São João	-	MICHEREFF, S. J.
-	- -	3641 3643	-	-	-	MICHEREFF, S. J.
A17	A4P5FC A4P16FC A4P19FC A4P6FC	- - - -	Feijão-comum	São João	S07°90'23,4'' W090°20'84,9'' (689m)	TENÓRIO, D. A.
A18	A6P8FC	-	Feijão-comum	Lajedo	-	x
A19	Aa9P11FC Aa9P12FC Aa10P1FC Aa12P7FC Aa12P15FC Aa12P17FC Aa12P18FC Aa12P19FC Aa12P20FC	- - - - - - - - -	Feijão-comum	São João	S07°76'54,6'' W090°16'52,7'' (680m)	x
A20	Aa16P4 Aa16P9 Aa16P12 Aa16P13 Aa17P2 Aa17P3	- - - - - -	Feijão-comum	São João	S07°90'85,8'' W090°23'29,1'' (670m)	TENÓRIO, D. A.
A21	Aa21P2	-	Feijão-comum	São João	S07°87'87,1'' W090°20'95,1'' (710m)	x
-	0122	-	Feijão-caupi	São João	-	x

594 *Área de coletas; **CMM=Código da coleção de culturas fitopatogênicos Prof Maria
595 Menezes, setor de Fitossanidade, departamento de agronomia, UFRPE, Recife-PE;
596 ***Isolados cedidos: dissertação (TENÓRIO, 2011), Prof Sami J. Michereff (CMM) e de
597 coletas realizadas nas áreas de cultivo.

598 **Tabela 2.** Dados médios do índice de severidade da doença (ISD) de diferentes isolados de
 599 *Rhizoctonia solani*, em plântulas de feijoeiro-caupi (cv. IPA-207)

Isolado	ISD (%)*	Isolado	ISD (%)*
CMM 3643	97,8 a	CMM 3262	72,2 c
A6P8FC	97,2 a	0122	71,7 c
CMM 3255	96,7 a	CMM 3000	71,7 c
A2P3FC	96,7 a	CMM 3278	70,0 c
CMM 3291	96,1 a	CMM 3295	66,6 c
Aa16P12FC	95,0 a	CMM 3274	63,9 d
CMM 3302	95,0 a	A7P1FC	62,2 d
CMM 3009	95,0 a	CMM 3257	60,0 d
A2P16FC	95,0 a	CMM 3269	58,8 d
Aa9P11FC	93,9 a	CMM 3641	58,3 d
CMM 3290	93,3 a	CMM 3296	57,8 d
Aa17P2FC	91,7 a	CMM 3279	56,1 d
Aa16P9FC	91,7 a	CMM 3266	54,6 d
Aa9P12FC	91,1 a	CMM 2995	52,8 d
CMM 3270	91,1 a	CMM 3280	51,1 d
CMM 2987	90,0 a	CMM 3297	46,6 e
CMM 3008	90,0 a	CMM 2989	45,0 e
CMM 3305	88,9 a	CMM 2993	42,3 e
A4P16FC	88,9 a	A4P6FC	41,1 e
CMM 3273	88,3 a	Aa2P6FC	32,2 f
Aa16P13FC	87,2 b	A4P19FC	31,8 f
CMM 3286	86,7 b	A2P6FC	23,9 g
Aa12P19FC	84,4 b	CMM 3006	19,4 g
CMM 3284	84,4 b	A4P5FC	17,2 g
Aa21P2FC	82,8 b	Aa12P7FC	15,5 g
CMM 3293	82,7 b	Aa12P20FC	12,8 g
CMM 3277	82,2 b	A2P1FC	11,6 g
CMM 3289	81,7 b	CMM 3002	10,5 g
CMM 3004	81,7 b	Aa12P18FC	7,8 h
Aa12P15FC	81,1 b	Aa10P1FC	7,8 h
CMM 3276	78,9 b	CMM 3005	6,1 h
CMM 2988	78,3 b	Aa12P17FC	3,3 h
CMM 3292	76,1 c	Aa17P3FC	3,3 h
CMM 3283	73,9 c	Aa16P4FC	2,2 h
CMM 3299	72,2 c	TESTEMUNHA	0,0 h

CV (%) = 13,34

600 *Média de cinco repetições; Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente
 601 entre si pelo teste de Scott-Knott (P=0,05).

602 **Tabela 3.** Ensaio 1 - Seleção preliminar de leveduras para o biocontrole da rizoctoniose
 603 causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* (CMM-3643), calculada pelo índice de severidade da
 604 doença (ISD), em plântulas de feijoeiro-caupi (cv. IPA-207) oriundas de sementes tratadas
 605 com suspensão de leveduras

Isolado	ISD (%)*	Isolado	ISD (%)*
FVC10	15,0 a	F2B	35,0 a
PGGN	15,0 a	P2 RAIZ	35,0 a
FVC20'	15,0 a	RCSA	35,0 a
SJCC2	15,0 a	FVC8 (IPA)	35,0 a
FVC20	20,0 a	SJCF2B	35,0 a
FVF10 (R1)	25,0 a	FR2B	35,0 a
FVR7 (IPA)	25,0 a	C7	40,0 b
FVF18	25,0 a	F7	40,0 b
C6A	25,0 a	C9	40,0 b
PGGR3	25,0 a	FVR2 (IPA)	40,0 b
HRF2	25,0 a	FVC9 (IPA)	40,0 b
FVF13 (R2)	25,0 a	F3'	40,0 b
C2	30,0 a	FVR8 (IPA)	40,0 b
C207	30,0 a	F5	40,0 b
F.C	30,0 a	HRP3(1)	40,0 b
RFC2	30,0 a	F3A	40,0 b
FVC6 (IPA)	30,0 a	FVC3 (IPA)	40,0 b
F4	30,0 a	P1 ALD.	40,0 b
F2	30,0 a	L-SJAD	40,0 b
FVR1 (IPA)	30,0 a	C5A	40,0 b
FVC7 (IPA)	30,0 a	FVC4 (IPA)	45,0 b
FVR4 (IPA)	30,0 a	FVF12	45,0 b
FVF10	30,0 a	C206	45,0 b
F3B4	30,0 a	SJCF14	45,0 b
C4A	30,0 a	PGGR2''	45,0 b
FVR3 (IPA)	30,0 a	F3B	45,0 b
FR2	30,0 a	F8A	50,0 c
F6	35,0 a	C6	50,0 c
L-N	35,0 a	FVC16	50,0 c
FR3	35,0 a	FVC7	50,0 c
C6B	35,0 a	FVC6	55,0 c
FVC13	35,0 a	CONTROLE	55,0 c
F. NAT	35,0 a	FVC14	60,0 c
FVF9	35,0 a	FVC5 (IPA)	60,0 c
F3	35,0 a	SJCF15	65,0 c
C7B	35,0 a		

CV (%) = 36,50

606 (*) Média de cinco repetições; Médias seguidas da mesma letra não diferem
 607 significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott (P=0,05).

608 **Tabela 4.** Ensaio 2 - Seleção preliminar de leveduras para o biocontrole da rizoctoniose
 609 causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* (CMM-3643), calculada pelo índice de severidade da
 610 doença (ISD), em plântulas de feijão-caupi (cv. IPA-207) oriundas de sementes tratadas com
 611 suspensão de leveduras

Isolado	ISD (%)*	Isolado	ISD (%)*
C6A	15,0 a	F6	50,0 b
FVC6 (IPA)	20,0 a	FR2	50,0 b
FVF10 (R1)	25,0 a	C6B	50,0 b
FVC10	25,0 a	RFC2	50,0 b
FVR8 (IPA)	25,0 a	FVC9 (IPA)	50,0 b
FVR1 (IPA)	25,0 a	FVF18	50,0 b
FR2B	25,0 a	F5	50,0 b
SJCF14	30,0 a	C7B	50,0 b
C9	30,0 a	F3A	50,0 b
FVC13	30,0 a	FVC7	50,0 b
F2B	30,0 a	C5A	50,0 b
C4A	35,0 a	FVF12	55,0 b
FVC20	35,0 a	F7	55,0 b
FVR4 (IPA)	35,0 a	F.C	55,0 b
FVC16	35,0 a	F3'	55,0 b
F. NAT	35,0 a	FVF9	55,0 b
PGGR2''	35,0 a	FVR7 (IPA)	55,0 b
P1 ALD.	35,0 a	F3B	55,0 b
C2	40,0 a	FVF13 (R2)	55,0 b
FR3	40,0 a	FVC14	60,0 b
C7	40,0 a	F2	60,0 b
C207	40,0 a	F8A	60,0 b
FVR2 (IPA)	40,0 a	FVC7 (IPA)	60,0 b
FVC6	40,0 a	FVC20'	60,0 b
PGGN	40,0 a	F3B4	60,0 b
FVF10	40,0 a	PGGR3	60,0 b
FVC5 (IPA)	40,0 a	CONTROLE	60,0 b
FVR3 (IPA)	40,0 a	P2 RAIZ	60,0 b
FVC3 (IPA)	40,0 a	SJCC2	60,0 b
HRF2	40,0 a	SJCF2B	60,0 b
L-N	45,0 a	F4	65,0 b
C206	45,0 a	RCSA	65,0 b
SJCF15	45,0 a	FVC8 (IPA)	65,0 b
C6	45,0 a	L-SJAD	65,0 b
F3	45,0 a	FVC4 (IPA)	75,0 b
HRP3(1)	45,0 a		

CV (%) = 37,57

612 (*) Média de cinco repetições; Médias seguidas da mesma letra não diferem
 613 significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($P=0,05$).

614 **Tabela 5.** Controle biológico da rizoctoniose ocasionada pelo fungo *Rhizoctonia solani*
 615 (CMM 3643) calculado pelo índice de severidade da doença em plântulas de feijoeiro-caupi
 616 (cv. IPA-207) proveniente de sementes tratadas com leveduras

Tratamento	ISD (%)*	
	Experimento 1	Experimento 2
C6A	23,89 b	27,78 b
FVC10	28,90 b	14,45 c
FVF10(R1)	18,89 b	13,89 c
CONTROLE	56,12 a	40,00 a
CV(%)	32,39	19,60

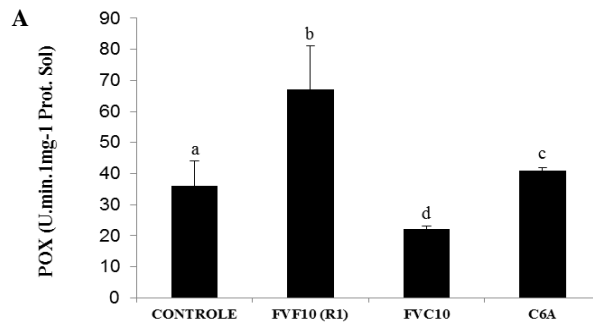
617 (*) Média de cinco repetições; Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem
 618 significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($P=0,05$); ISD calculado de acordo com
 619 Mckinney (1923).

620 **Tabela 6.** Efeito das leveduras na inibição do crescimento micelial do isolado de *Rhizoctonia*
621 *solani* (CMM 3643) calculado pelo diâmetro médio das colônias (DMC)

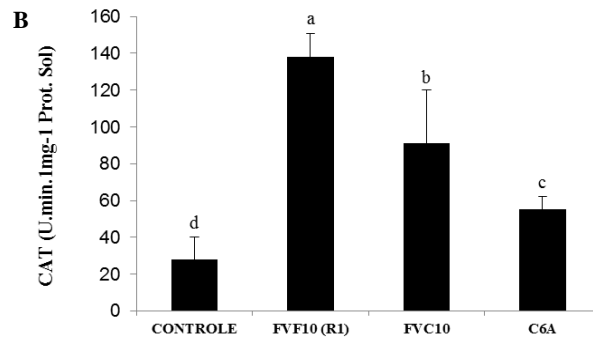
Leveduras	DMC (mm)*
	CMM 3643¹
C6A	43,25 b
FVC10	78,35 a
FVF10(R1)	75,55 a
CONTROLE	89,20 a
CV(%) = 16,83	

622 (*) Média de cinco repetições; Médias seguidas da mesma letra não diferem
623 significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

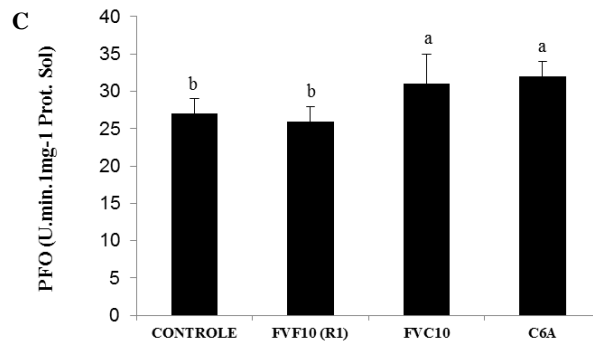
624



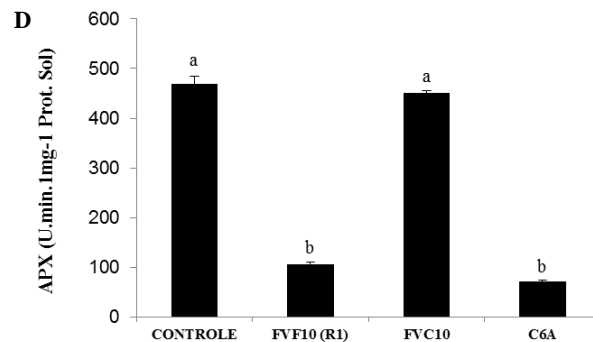
625



626



627



628 Figura 1. Atividade das enzimas Peroxidase - POX (A), Catalase - CAT (B)*,
 629 Polifeniloxidase - PFO (C)* e Ascorbato peroxidase - APX (D)* em folhas de feijoeiro-caupi
 630 (IPA-207), 15 dias após o tratamento ou não (CONTROLE) das sementes tratadas com
 631 leveduras (C6A, FVC10 e FVF10 (R1)). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre
 632 si pelo teste de LSD ($p \leq 0.05$). *As médias foram transformadas em $\sqrt{x+0.5}$.

633 **Tabela 7.** Identificação dos isolados de leveduras selecionados para o controle biológico da
634 rizoctoniose do feijoeiro

Isolado	Espécies	Hospedeiro	Origem (mesorregiões)*
C6A	<i>Candida saopaulonensis</i>	Feijoeiro-comum	Metropolitana
FVC10	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Feijoeiro-caupi	Agreste
FVF10(R1)	<i>Bullera sinensis</i>	Feijoeiro-caupi	Agreste

*Origem das coletas nas mesorregiões do estado de Pernambuco

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- O principal agente causal da rizoctoniose do feijoeiro no município de São João, Pernambuco, pertence ao grupo de anastomose AG4 HG-I. A doença é causada por pelo menos três AGs;
- *Ceratobasidium* AG-L é também agente causal da rizoctoniose do feijoeiro.
- Isolados de AG4 HG-I do feijoeiro no município de São João, apresentam variação genética, indicando que a população não é clonal;
- A microbiolização de sementes reduziu a severidade da rizoctoniose em plântulas de feijão-caupi;
- O agente biocontrolador FVF10 (R1) alterou a atividade de enzimas relacionadas com a defesa, assim como a ausência de mecanismos de antibiose contra *Rhizoctonia solani* CMM-3643, sugere que, indiretamente, essa levedura possa estar reduzindo a incidência da doença atuando como agente indutor de resistência;