

**METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO, VARIABILIDADE  
E CONTROLE DE *Rhizoctonia solani* NA CULTURA DA  
CENOURA**

**AMANDA CABRAL CORRÊA DE OLIVEIRA**

**2006**

AMANDA CABRAL CORRÊA DE OLIVEIRA

METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO, VARIABILIDADE E CONTROLE DE  
*Rhizoctonia solani* NA CULTURA DA CENOURA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. Paulo Estevão de Souza

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Oliveira, Amanda Cabral Corrêa de

Metodologia de inoculação, variabilidade e controle de *Rhizoctonia solani* na cultura da cenoura / Amanda Cabral Corrêa de Oliveira. -- Lavras : UFLA, 2006.  
63 p. : il.

Orientador: Paulo Estevão de Souza.  
Dissertação (Mestrado) – UFLA.  
Bibliografia.

1. *Rhizoctonia solani*. 2. Cenoura. 3. Inoculação. 4. Variabilidade  
5. Tratamento químico. 6. Patogenicidade. 7. Grupos de anastomose. 8. Hortaliça.  
I. Universidade Federal de Lavras. I. Título.

CDD-635.1394

**AMANDA CABRAL CORRÊA DE OLIVEIRA**

**METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO, VARIABILIDADE E  
CONTROLE DE *Rhizoctonia solani* NA CULTURA DA CENOURA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 09 de fevereiro de 2006

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza

DFP/UFLA

Prof. Dr. Rovilson José de Souza

DAG/UFLA

Prof. Dr. Paulo Estevão de Souza  
Departamento de Fitopatologia/UFLA  
(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

## **Leão do Norte**

Sou o coração do folclore nordestino  
Eu sou Mateus e Bastião do Boi Bumbá  
Sou o boneco do Mestre Vitalino  
Dançando uma ciranda em Itamaracá  
Eu sou um verso de Carlos Pena Filho  
Num frevo de Capiba  
Ao som da orquestra armorial  
Sou Capibaribe  
Num livro de João Cabral  
Sou mamulengo de São Bento do Una  
Vindo no baque solto de Maracatu  
Eu sou um alto de Ariano Suassuna  
No meio da Feira de Caruaru  
Sou Frei Caneca do Pastoril do Faceta  
Levando a flor da lira  
Pra nova Jerusalém  
Sou Luis Gonzaga  
E eu sou mangue também  
Eu sou mameluco, sou de Casa Forte  
Sou de Pernambuco, sou o Leão do Norte  
Sou Macambira de Joaquim Cardoso  
Banda de Pifó no meio do Carnaval  
Na noite dos tambores silenciosos  
Sou a calunga revelando o Carnaval  
Sou a folia que desce lá de Olinda  
O homem da meia-noite puxando esse cordão  
Sou jangadeiro na festa de Jaboatão  
Eu sou mameluco, sou de Casa Forte  
Sou de Pernambuco, sou o Leão do Norte

(Lenine e Paulo César Pinheiro)

Ao meu estado, Pernambuco, onde a saudade sempre me trará pelos braços e o  
qual me ensinou a ter “Orgulho de Ser Nordestina”.

**DEDICO**

Aos meus pais, Ervin e Guadalupe, pelo amor incondicional e pela educação  
Ao meu irmão, Erwinho, ao apoio e incentivo à pós-graduação e, claro, por ter  
nos dado o melhor presente, meu sobrinho Pedro Henrique  
Aos meus tios Conceição, Bernardo, Elsa, Romeu, Ceça e Celso,  
colaboradores na minha formação  
A Dr. Rildo, meu primeiro orientador na Fitopatologia, a quem serei sempre  
grata.

**OFEREÇO.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por cada amanhecer, permitindo-me seguir meu caminho.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Dr. Paulo Estevão de Souza, pela orientação, profissionalismo, amizade e confiança.

Ao Departamento de Fitopatologia, em especial aos professores, pelos ensinamentos adquiridos durante o curso e pela disponibilidade em colaborar para a realização do trabalho, em especial à professora Antônia dos Reis Figueira.

Ao Departamento de Agricultura, colaborador no desenvolvimento dos trabalhos.

À amizade, única palavra que pode descrever a minha turma de mestrado que, sem dúvida, ficará para sempre marcada em minha memória. Aqui fomos uma família, com almoço aos domingos, estudos em grupo, lágrimas compartilhadas de saudades ou um simples telefonema oferecendo ajuda.

À nossa “equipe de trabalho”, que nunca diferenciou para quem era o experimento e sempre trabalhou em conjunto: Florisvalda (Val), Julio, Felipe, Eldes, Luis Henrique e os demais estagiários, assim como aos funcionários da Clínica Fitossanitária, Eliane, Vladimir e Rute.

À empresa Minas Safra, nosso ponto de apoio no município de São Gotardo, que colaborou com informações, sementes e fungicidas para o desenvolvimento dos experimentos.

Aos meus pais, que são os responsáveis por todas as conquistas de minha vida, mas que, humildemente sentam na arquibancada como se fossem platéia, assim como meus familiares.

À cidade de Lavras que me acolheu e onde pude compartilhar de momentos maravilhosos da cultura e da família mineira. Em especial a Luiza, que foi uma mãezona. Além de parte de meu coração que nunca sairá daqui, pois encontrou sua outra metade.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Patógeno - Aspectos de variabilidade populacional de <i>R. solani</i> .....	03
2.2 Ecologia e epidemiologia do tombamento por <i>R. solani</i> .....	06
2.2.1 Controle químico do tombamento por <i>R. solani</i> .....	09
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Estudo da população de <i>R. solani</i> em solos cultivados com cenoura.....	13
3.1.1 Coleta.....	13
3.1.2 Isolamento fúngico .....	13
3.1.2.1 Isolamento de <i>R. solani</i> nas amostras de solo.....	13
3.1.2.2 Isolamento de <i>R. solani</i> nas amostras de raízes.....	14
3.1.3 Identificação dos isolados, quanto ao grupo de anastomose ..	14
3.1.3.1 Número de núcleos .....	14
3.1.3.2 Grupo de anastomose.....	14
3.1.3.3 Determinação da patogenicidade.....	15
3.1.3.4 Caracterização molecular de regiões do DNA ribossomal de <i>R. solani</i> .....	16
3.1.3.4.1 Extração de DNA .....	17
3.1.3.4.2 Amplificação dos fragmentos ITS 1, 5.8 S e ITS 2 .....	18
3.1.3.4.3 Purificação e seqüenciamento do DNA amplificado.....	18
3.1.3.4.4 Análises das seqüências .....	18



3.2 Avaliação de métodos de inoculação de <i>R. solani</i> para solos cultivados com cenoura.....	19
3.2.1 Análise das sementes e substrato utilizado, determinação da umidade do substrato e produção do inóculo.....	19
3.2.1.1 Perfil das sementes .....	19
3.2.1.2 Perfil do solo.....	19
3.2.1.3 Determinação da capacidade de retenção de umidade nos vasos.....	20
3.2.1.4 Produção do inóculo em grãos de arroz.....	20
3.2.2. Avaliação de métodos de inoculação.....	20
3.3 Eficiência de fungicidas no controle de <i>R. solani</i> em cenoura ..	23
3.4 Patogenicidade de isolados-campo e isolados-testes para a cultura da cenoura.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 Estudo da população de <i>R. solani</i> em solos cultivados com cenoura.....	26
4.1.2 Identificação dos isolados, quanto ao grupo de anastomose ..	28
3.1.3.4 Caracterização molecular de regiões do DNA ribossomal de <i>R. solani</i> .....	30
4.2 Avaliação de métodos de inoculação para <i>R. solani</i> em solos cultivados com cenoura.....	36
4.3 Eficiência de fungicidas no controle de <i>R. solani</i> em cenoura ..	40
4.4 Patogenicidade de isolados-campo e isolados-testes para a cultura da cenoura.....	46
5 CONCLUSÕES.....	49
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	50
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
ANEXOS.....	57

## RESUMO

OLIVEIRA, Amanda Cabral Corrêa de. **Metodologia de inoculação, variabilidade e controle de *Rhizoctonia solani* na cultura da cenoura**. 2006. 63p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

*Rhizoctonia solani* é um patógeno complexo, formado por grupo relacionado, mas geneticamente isolado de espécies, agrupando-se com base na anastomose de hifas. Pode causar tombamento de plântulas em cenoura, ocasionando redução no estande inicial do plantio; como habitante do solo, é capaz de sobreviver como saprófita ou por estruturas de resistência (escleródios), sendo dificilmente detectado antes de causar perdas. Apesar da importância desse patógeno, são poucas as informações sobre a sua epidemiologia e controle para o cultivo de cenoura. Dessa forma, os objetivos, neste trabalho, foram caracterizar isolados de *R. solani*, ajustar a metodologia de inoculação e avaliar a eficiência de fungicidas no controle de tombamento de plântulas. Foram obtidos três isolados-campo de *R. solani*, dos quais um pertence ao AG4 e dois não foram compatíveis com nenhum dos isolados-testes por anastomose de hifas. A melhor forma de inoculação foi a 10% do solo na camada de 0 a 2 cm de profundidade, utilizando uma densidade de 72 mg de inóculo por quilo de solo. Os fungicidas mais eficazes foram pencycuron, no tratamento de sulco e semente, reduzindo o número de plântulas tombadas e azoxistrobim, possibilitando maior emergência de plântulas. O isolado-campo e o isolado-teste, pertencentes ao AG4, foram os mais agressivos na cultura da cenoura, à temperatura de 20°C. São necessários estudos mais específicos para cada princípio ativo testado, objetivando doses mais específicas para o tratamento de semente e de sulco na cultura da cenoura, assim como testar a patogenicidade dos isolados de *R. solani* a outras temperaturas que possam causar infecção no plantio de cenoura pelo patógeno.

---

\*Comitê Orientador: Paulo Estevão de Souza - UFLA (Orientador) e Edson Ampélio Pozza – UFLA (Co-orientador)

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Amanda Cabral Corrêa de. **Inoculation methodology, variability and control of *Rhizoctonia solani* in carrot.** 2006. 63p. Dissertation (Master in Agronomy/Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.\*

*Rhizoctonia solani* is a complex pathogen, formed by a group of related but genetically isolated species, grouping on the basis of hyphal anastomosis. They can cause damping-off of carrot seedlings resulting in a stand reduction of the initial seedling development, and, as a soil inhabitant it is able to survive as a saprophyte or as survival structures (sclerotia), being difficult to detect before causing damage. Despite the importance of this pathogen in carrot fields, few is the information about the disease epidemiology and control. Hence, the objectives of this work, were to characterize isolates of *R. solani*, adjust an inoculation methodology and evaluate the efficacy of fungicides in the control of seedling damping-off. Three isolates of *R. solani* were obtained from an infected field, where one belonged to AG4 and two isolates were not compatible by anastomosis with any other anastomosis group. The best form to inoculate was done at 10% of the soil in the top 0-2 cm layer, using a density of 72 mg of inoculum per kilo of soil. The most efficient fungicides were penicuron in the treatment of row and seed, reducing the number of damped-off seedlings and azoxistrobin enhanced seedling emergence. The field-isolate and the tester belonging to AG4, were the more aggressive in the carrot crop at temperature of 20°C. It is necessary more specific studies for each active ingredient tested, aiming more specific doses to seed and row treatment in carrot fields, as well as, to test pathogenicity of strains of *R. solani* in other temperatures that can cause infection of the studied crop by this pathogen.

---

\*Advising Committee: Paulo Estevão de Souza - UFLA (Adviser) and Edson Ampélio Pozza – UFLA (Co-adviser)

## 1 INTRODUÇÃO

A cenoura encontra-se entre as dez hortaliças mais consumidas no Brasil. A popularidade e o valor econômico da cultura da cenoura são mais evidentes no Sul e Sudeste do país, em razão da influência da colonização européia nessas regiões (Kimati et al., 1997). Somente na companhia de entrepostos e armazéns gerais de abastecimento de São Paulo (CEAGESP) foi comercializado, no primeiro semestre de 2005, um volume de 43.047 toneladas de raízes (Agriannual, 2006). Minas Gerais é o segundo maior produtor de cenoura, mesmo registrando, no ano de 2004, queda de 38% na área plantada em relação a 2003. O resultado negativo só não foi pior devido à alta produtividade da cenoura mineira, de 45,5 toneladas por hectare, 53,2% superior à média nacional, de 29,7 toneladas por hectare (Horticultura, 2006). No estado, o cultivo de cenoura tem importância, principalmente em agricultura irrigada, com destaque para a região de São Gotardo, onde é possível obter até três safras/ano (Juliatti, 2001).

A hortaliça cenoura é considerada suscetível à infecção por *Rhizoctonia solani*, entretanto, não existem registros quantitativos das perdas. Também não se conhecem cultivares resistentes ao tombamento de plântulas, em razão, principalmente, do complexo de patógenos envolvidos na ocorrência da doença (Henz et al., 2000). A planta continua suscetível, durante todo o ciclo da cultura, causando, além do tombamento, podridão da coroa e cancro da raiz.

*R. solani* divide-se em grupos de anastomose (AG) (Ogoshi, 1987), sendo necessário identificar o grupo a qual pertence, pois podem ocorrer redução ou aumento na virulência do patógeno, em função das condições edafoclimáticas e da variabilidade populacional (Carling & Leiner, 1990). Além das características morfológicas, fisiológicas e patogênicas, as características

genéticas dos isolados têm sido amplamente empregadas para a identificação dos AGs (Ogoshi, 1987; Sneh et al., 1991).

No Brasil, são escassos os trabalhos sobre o patossistema *R. solani* e cenoura. Tendo-se como referência a maioria dos trabalhos realizados com outras culturas ou em outros países, sob condições edafo-climáticas diferentes das predominantes nesse estudo, isso implica em desconhecimento da biologia e ecologia do patógeno, aspecto importante no estabelecimento de manejo (Michereff Filho et al., 1996). Outro problema está na gama de metodologias empregadas na produção do inóculo do patógeno e na infestação do solo para o desenvolvimento de estudos científicos.

Como o patógeno causa tombamento apenas na fase inicial de desenvolvimento da planta, medidas de manejo devem reduzir a quantidade de inóculo no início do plantio. O tratamento de sementes com produtos fúngicidas é uma medida eficiente no controle da *R. solani* (Machado, 1988). Entretanto, para o tratamento de sementes, as doses de fungicidas são reduzidas, podendo mascarar o resultado de um fungicida eficiente no controle de tombamento de plântulas, devido a subdosagens.

Assim os objetivos neste estudo foram caracterizar os isolados de *R. solani* quanto ao grupo de anastomose, avaliar metodologias para quantificação e incorporação do inóculo no substrato e verificar a eficácia do tratamento de sementes e de sulco por produtos químicos no controle da Rhizoctoniose na cultura da cenoura.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Patógeno - Aspectos de variabilidade populacional de *Rhizoctonia solani*

*Rhizoctonia solani* Kühn é a fase assexuada de *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk, Basidiomycetes da família Ceratobasidiaceae (Sneh et al., 1991). É comumente associado à podridão de pré-emergência e ao tombamento em pós-emergência, também conhecido, mundialmente, como *damping-off*. Sua ocorrência depende de vários fatores, principalmente da alta umidade e de alto potencial de inóculo no solo. A doença é mundialmente distribuída, causando redução de estandes e de produtividade em praticamente todas as hortaliças (Vale et al., 2001). Silva et al. (1996) ressaltam, ainda que, estando presente no solo ou nas sementes, este patógeno pode, além de causar perdas significativas na fase de plântulas, agir como fonte de inóculo para culturas subseqüentes.

Na cultura da cenoura, dependendo do estágio de crescimento da planta, no qual ocorre a infecção, podem-se ter diferentes tipos de doenças, como tombamento de plântulas, podridão da coroa e cancro da raiz, que continuam suscetíveis ao patógeno durante todo o ciclo da cultura. No tombamento de plântulas, o fungo ocorre em plântulas na linha do solo, causando lesões marrom-escuras no caule e na haste; com o progresso, ocorre completo estrangulamento do colo da planta, levando à morte. Para a podridão de coroa originam-se plantas mal formadas e encurtamento das raízes, e o cancro da raiz causa lesões necróticas transversais nas raízes tuberosas, diminuindo o valor comercial da cultura (Henz et al., 2000; Mildenhall & Williams, 1973).

A identificação de *R. solani* é feita por hifas multinucleadas, formando ângulos de noventa graus em suas ramificações. Não ocorre esporulação na fase

de anamorfo, sendo a variabilidade genética obtida a partir da fusão de hifas de isolados distintos e a sobrevivência do mesmo em condições desfavoráveis, a colonização, por escleródios (Sneh et al., 1991).

*R. solani* é um patógeno complexo, formado por grupos de indivíduos relacionados, mas geneticamente isolados, os quais são agrupados com base na anastomose de hifas, sendo essa uma reação de compatibilidade ou incompatibilidade somática entre os indivíduos (Anderson, 1982; Carling et al., 1987). Pode-se observar a fusão de hifas de isolados representando o mesmo grupo de anastomose (ou AG, do inglês *Anastomose Group*), enquanto não se observa essa reação com isolados de diferentes AGs. São reconhecidos 12 grupos de anastomose de hifas em *R. solani*, denominados AG-1 até AG-11 e AG-BI (grupo *bridging isolate*), conforme Sneh et al. (1991).

A caracterização de grupos de anastomose e de grupos intraespecíficos (ou ISG do inglês *Intraspecific Group*), baseada na morfologia, fisiologia, genética e patologia representa resultados mais consistentes na tentativa de se obter padrões de variação genética existente em espécies de *Rhizoctonia*. Várias outras características podem ser empregadas para agrupar isolados de *R. solani* em AGs e ISGs, dentre estas o requerimento de vitaminas, a taxa de crescimento micelial, a temperatura ótima para o crescimento, o tipo de escleródio produzido e os estudos de similaridade de seqüência de bases do DNA (Ogoshi, 1987; Sneh et al., 1991).

Trabalhos anteriores à década de 1970 registram correlação positiva entre diferentes AGs de *R. solani* e morfologia da colônia, assim como fisiologia e patogenicidade dos isolados (Richter & Schneider, 1953; Sherwood, 1969, citado por O'Sullivan & Kavenagh, 1991). Porém, essa correlação entre características culturais e de patogenicidade nem sempre pode ser observada para alguns AGs (Flentje & Saskena, 1957 e Houston, 1945 citados por O'Sullivan & Kavenagh, 1991).

Apesar de não terem hospedeiros específicos, os diferentes AGs possuem certa tendência para essa característica. Dentre eles, o AG-4 apresenta distribuição mais ampla, em termos de plantas hospedeiras e de sintomas. Com relação à descrição de AGs em hortaliças, observa-se que os isolados dos grupos AG-9 e AG-3 estão associados ao cultivo de batata, no Alasca e USA, respectivamente (Carling et al., 1987; Escande & Echandi, 1991). Isolados pertencentes aos grupos AG-2, AG-4 e AG-5 são registrados em campos de beterraba na Irlanda (O'Sullivan & Kavanagh, 1991). Bolkan & Ribeiro (1985) identificaram os AGs de 130 isolados de *R. solani* obtidos de 31 espécies de plantas provenientes de onze estados do Brasil; desses isolados, aqueles pertencentes ao AG-4 foram encontrados em plantios de cenoura e beterraba do Distrito Federal, enquanto isolados pertencentes ao AG-3 foram encontrados em batatais nos estados de Goiás e São Paulo. Relatos mais recentes mencionam AG-1 em alface e AG-4 em tomate, melão, brócolis e espinafre (Kuramae et al., 2003).

Fungos morfologicamente similares a *R. solani*, porém, com hifas bi ou multinucleadas, foram isolados de partes aéreas e subterrâneas de plantas e agrupados no grupo taxonômico “Binucleated *Rhizoctonia* spp.” (BnR). Nesse grupo, isolados não patogênicos conseguiram suprimir a Rhizoctoniose em algumas culturas, constituindo potencial antagonista a *R. solani* (Burpee & Goult, 1984; Escande & Echandi, 1991).

Em fungos, o operon que codifica o RNA ribossomal (rDNA) foi extensivamente usado para estudos de sistemática molecular e filogenética (White et al., 1990), inclusive para inferir relações taxonômicas entre os diferentes AGs de *R. solani* (González et al., 2001). A sequência de nucleotídeos das regiões espaçadoras internas do rDNA (ITS1 e ITS2) também tem sido igualmente utilizada, podendo, inclusive, servir como subsídio para embasar a proposição de uma nova classificação (Ogoshi, 1987; Sneh et al., 1991). Liu &



Sinclair (1993) diferenciaram AG-1 em seis intra-específicos (AG-1-IA, 1-IB, 1-IC, 1-ID, 1-IE, e 1-SE) baseados em RFLP de rDNA e composições de isoenzimas. Os dados de seqüências de DNA, devido à quantidade e à reprodutibilidade das informações que encerram, são também utilizados para estudos de genética de populações de fungos, em que a variação no rDNA é sempre menor dentro de uma única espécie fúngica que entre espécies distintas (Carbone & Kohn, 2004).

Por meio de métodos filogenéticos, a análise da variação na seqüência de DNA possibilitou examinar padrões ancestrais da diversidade genética atual encontrada (Carbone & Kohn, 2004) e inferir sobre a história dos alelos ou haplótipos. Conhecendo a história filogenética dos alelos em loco é possível separar entre um grupo de populações, eventos demográficos do passado, dos eventos do presente (Templeton, 1998).

## **2.2 Ecologia e epidemiologia do tombamento por *R. solani***

*R. solani* é frequentemente isolado de plantas doentes e do solo. Os isolados diferem quanto às suas características morfológicas, culturais e de patogenicidade. Essas diferenças são freqüentemente associadas a variações na virulência de isolados (Ogoshi, 1987).

Por ser um fungo habitante natural do solo, sobrevive como saprófita, colonizando matéria orgânica ou na forma de escleródios (Ogoshi, 1987). Estudos de ecologia e epidemiologia de *R. solani* requerem quantificação do inóculo. Isso também é necessário para estabelecer relações de incidência e de severidade da doença com a flutuação populacional do patógeno no solo.

Para estimar a densidade populacional do patógeno no solo, pode-se incorporar amostras deste em meio de cultura, permitindo o crescimento da colônia a partir de cada partícula do solo. O uso de iscas possibilita estimar o

número de propágulos no solo e sua capacidade para colonizar substratos, com maiores implicações epidemiológicas e não somente de densidade de inóculo (Campbell & Madden, 1990).

A mera existência de propágulos de *R. solani*, detectados a partir do seu isolamento do solo, não implica, necessariamente, em condição suficiente para causarem infecções. Iscas vegetais permitem determinar a capacidade saprofítica e competitiva do patógeno, além de estimarem seu potencial de inóculo e sua sobrevivência no solo e no substrato (Papavizas & Davey, 1962; Papavizas et al., 1975). Sementes ou segmentos de caule, de tubérculos e de raízes são utilizados como iscas, com sucesso, em estudos epidemiológicos com *Rhizoctonia* spp. (Carling et al., 1987; Michereff Filho et al., 1996; Weinhold, 1977). No entanto, o método de iscas precisa ser testado quanto à sua eficiência com relação ao patossistema envolvido, em função de variações na colonização das mesmas, atribuídas ao tamanho e à condição nutricional do inóculo, entre outros fatores. Essa eficiência pode ser consequência do grau de especificidade dos isolados de *R. solani*, em vista da pressão de seleção exercida no cultivo agrícola (Sanfuentes Von Stowasser, 2000).

Sob determinadas condições, *R. solani* pode produzir estruturas de sobrevivência, formando tufo de células largas e curtas semelhantes a clamidósporos ou escleródios, comuns em tubérculos de batata. Depois de estabelecido na área, o fungo pode associar-se a vários hospedeiros e sobreviver em restos culturais. Pode ser disseminado pela água da chuva ou de irrigação, por implementos agrícolas ou outros meios carregando solo contaminado, inclusive material propagativo (Agrios, 2004).

A temperatura influencia tanto a patogenicidade quanto a virulência de *R. solani*. Mildenhall & Williams (1973) relatam *R. solani* AG-2 causando severas podridões e pontuações necróticas em raízes de cenoura nas temperaturas controladas de 20°C, 24°C e 28°C, enquanto que a 16°C, houve

baixa severidade. Em beterraba, a severidade do *damping-off* de pré-emergência é maior entre 10°C a 15°C, mas, existe diferença na patogenicidade dos isolados AG-4 afetando a germinação e a formação das radículas antes dos cotilédones emergirem e o isolado AG-2 causando lesões necróticas no hipocótilo (O'Sullivan & Kavanagh, 1991). Em batata, isolados pertencentes ao AG-3 são mais virulentos a 10°C, danificando brotações, enquanto isolados do AG-5 causam maiores danos aos 15°C e 21,9°C (Carling & Leiner, 1990). Conforme Zambolim et al. (2000), em regiões produtoras de batata-semente, como o sul de Minas Gerais, temperaturas entre 12°C e 18°C e alta umidade são favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, observando-se lesões nas hastes, formação de tubérculos aéreos e escleródios nos tubérculos. A temperatura também tem influência na velocidade do crescimento micelial; como foi observado por Mildenhall & Williams (1973), são necessários, no mínimo, oito dias de temperatura constante para se alcançar o máximo de desenvolvimento.

O micélio de *R. solani* não resiste a períodos prolongados de seca (Cook & Papandick, 1972), assim como observado por Michereff Filho et al. (1996), quando registraram redução na população do patógeno em lavoura de feijão, nos períodos de baixa precipitação pluvial. Observações semelhantes foram feitas em jardim clonal de mudas de eucalipto (Sanfuentes Von Stowasser, 2000). Bruggen et al. (1986) observaram aumento na severidade da Rhizoctoniose em plântulas de feijão com aumento na umidade do solo. Esse aumento pode, ainda, estar relacionado a fatores químicos, físicos e biológicos do solo como um todo (Fenille & Souza, 1999). A irrigação, prática comum em hortaliças, tem influência no desenvolvimento de doenças radiculares, por favorecer a umidade no solo, ideal para a germinação de escleródios e crescimento de hifas. Reduções na irrigação em lavouras de beterraba diminuíram a incidência de múltiplas doenças de raízes causadas por um complexo fúngico, incluindo *R. solani* (Harverson & Rush, 2002).

Várias metodologias são empregadas na tentativa de multiplicar o patógeno artificialmente. A produção do inóculo é diferenciada em função do substrato utilizado, como arroz (Michereff et al., 1996), aveia (Goulart, 2002) e outros, que têm os seus tempos de colonização, secagem, armazenagem e viabilidade do inóculo, diferenciados em função do substrato utilizado. Os estudos também apresentaram modificações na forma de inoculação no solo, diferindo nas densidades de inóculo e na distância do inóculo à semente (Michereff filho et al., 1996). Esses autores observaram que concentrações de inóculo entre 50 a 300 mg·kg<sup>-1</sup> de solo favoreciam o aumento da incidência do tombamento de plântulas de feijão, principalmente com o aumento da concentração do inóculo, assim como a proximidade do inóculo das sementes aumentava a severidade da doença. Por sua vez, Santos et al. (2006), utilizando a mesma metodologia para a produção do inóculo em grãos de arroz, em estudos para feijoeiro e algodoeiro, encontraram as melhores doses de 72 e 144 mg·kg<sup>-1</sup> de substrato. Entretanto, o autor utilizou substrato autoclavado.

### **2.3 Controle químico do tombamento por *R. solani***

A principal dificuldade em controlar doenças causadas por patógenos de solo, como a Rhizoctoniose, deve-se ao fato de, geralmente, elas não serem detectadas antes da ocorrência de perdas. Dessa forma, as medidas a serem adotadas no manejo da doença devem ser capazes de reduzir o inóculo inicial ou preveni-lo.

Dentre o conjunto de práticas recomendadas para o controle do tombamento, o tratamento das sementes com fungicidas eficientes tem sido, até o momento, a principal medida adotada e a opção mais econômica para minimizar os efeitos negativos dessa doença (Goulart, 2002).

O tratamento de sementes tem importante papel no manejo da Rhizoctoniose, entretanto, a recomendação dessa prática requer cautela e estudos, pois o patógeno possui ampla gama de hospedeiros. Para o uso de fungicidas no tratamento de sementes, devem-se ter certos cuidados. O produto deve ser tóxico ao patógeno e não à semente, mesmo no dobro da dose; deve ser atóxico ao homem e animais, não acumulável no solo e também capaz de ser armazenado sem deteriorização (Machado, 2000). Entre os fungicidas protetores para o tratamento de sementes contra espécies de *Rhizoctonia*, podem ser citados: Thiram (ditiocarbomato), Captan (dicarboximida) e Quintozene (nitrobenzeno). Este último tem atuação destacada no controle de fungos de solo que produzem escleródios, como *Rhizoctonia* e *Sclerotium*. Nos produtos sistêmicos, o Carboxin é seletivo para o controle de fungos pertencentes ao filo Basidiomycetes, como *Thanatephorus* (*Rhizoctonia*) e aos causadores de carvão (Machado, 1988).

O tratamento de sementes com fungicidas vem sendo desenvolvido recentemente, como alternativa no manejo das infecções de semente e plântulas por *R. solani* em culturas como a soja e o algodão (Dorrance, 2003; Goulart, 2002). O efeito da especificidade dos fungicidas contra *R. solani* é baseado na variabilidade e depende dos grupos de anastomose, segundo estudos *in vitro*, em que isolados de quatro diferentes grupos de anastomose foram variáveis na sensibilidade a Carboxin, Quintozene e triadimefon; ao mesmo tempo, muitos isolados são sensíveis a iprodione (Martin et al., 1984). Kataria et al. (1991), confirmam o descrito e dividem esta sensibilidade de *Rhizoctonia* spp. em vários grupos de fungicidas, dentre os quais incluem-se os hidrocarbonatos aromáticos (quintozene, chloroneb e o fosforado methyl-tolclophos), benzimidazóis (benomyl, carbendazim, tiofanato-metílico e thiabendazol), carboximidas (carboxin), dicarboximidas (iprodione, vinclozolin e diclozolin), triazóis e

(triadimenol, propiconazole, cyproconazole), morfolinas (fenpropimorph) e feniluréia (pencycuron).

O fungicida pencycuron, do grupo químico das feniluréia, tem registro para o controle de *R. solani* em diversas culturas, inclusive para cenoura, no Brasil. Há décadas sua eficiência vem sendo avaliada nos diferentes grupos de anastomose de *R. solani*, assim como para isolados de *Rhizoctonia* sp. binucleada (Kataria et al, 1991; Sumner, 1987). As feniluréia pertence ao grupo dos fungicidas não-específicos, também podendo ser considerado como “inibidores de sítios múltiplos”, ou seja, esses compostos podem agir sobre mais de um metabolismo de ação no organismo do fungo, conectando-se a várias enzimas e compostos biologicamente significativos. Outra característica dos fungicidas de modo de ação não-específicos é reduzir pouco ou nenhum risco de resistência, sendo utilizado como estratégia relevante na prevenção de surgimento de resistência (Delen & Tosun, 2003).

As dicarboximidas incluem o iprodione, vinclozolin, procimidone e clozolinato, todos comercializados atualmente. Este grupo possui ação efetiva contra vários gêneros e o fungicida iprodione também possui alta atividade contra *R. solani* (Datnoff et al., 1997). Os componentes cíclicos de amido presentes nos dicarboximidas são as oxazolidinediones (vinclozolin e clozolinato), succinimide (procimidona) ou hidantoinos (iprodione). Estas diferenças estruturais são fatores que condicionam o espectro de ação dos fungicidas (Pommer & Lorenz, 1995, citados por Dellen & Tosun, 2004). Embora o modo de ação das dicarboximidas ainda não esteja completamente esclarecido, sabe-se que elas inibem a germinação de esporos e o crescimento micelial, além de ocasionar rachaduras nas pontas das hifas e ramificações anormais (Dellen & Tosun, 2004).

Os fenilpirroles são compostos por dois fungicidas comerciais: fenpiclonil e fludioxonil. O grupo fenilpirroles possui amplo espectro de

atividade contra Ascomycetes, Basidiomycetes e Anamorfos (Koller, 1998). Fenpiclonil e fludioxonil são estáveis contra a hidrólise e a decomposição no solo. Esta estabilidade ambiental os torna úteis no controle de doenças em sementes. O modo de ação do fenilpirrole envolve a inibição do açúcar e da absorção de aminoácidos em fungos. Detalhes da ação do inibidor permanecem desconhecidos. Entretanto, ocorrem problemas de resistência cruzada entre o fludioxonil e as dicarboximidas, indicando que ambos apresentam o mesmo modo de ação, caracterizados como sistêmicos (Dellen & Tosun, 2004).

As estrobilurinas são também conhecidas como fungicidas metoxiacrilates (MOA) ou QoI (quinol inibidor externo). O desenvolvimento desse grupo é baseado em inibidores naturais antifúngicos, como a estrobilurina A, oudemansina A e mixotiazol A. As estrobilurinas controlam um amplo espectro de doenças incluindo aquelas causadas por Oomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes e seus anamorfos (Dellen & Tosun, 2004). Além da atividade de contato, eles possuem propriedades translaminares sistêmicas e como resultado de difusão da fase de vapor, até quasistêmicas (mesosystemic) (Gold et al., 1996). As estrobilurinas utilizam um novo sítio alvo em fungos, inibindo a transferência de elétrons no complexo  $bc_1$  (ubihidroquinonas: citocromo c oxidoreductase) na mitocôndria, tendo como resultado a inibição do crescimento micelial do fungo e não germinação de esporos (Dellen & Tosun, 2004). Portanto, esses fungicidas possuem propriedades erradicantes e protetoras (Gold et al., 1996).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### **3.1 Estudo da população de *R. solani* em solos cultivados com cenoura, no estado de Minas Gerais**

##### **3.1.1 Coleta**

Foram selecionadas duas regiões produtoras de cenoura, em sistema de cultivo irrigado em Minas Gerais, nos municípios de Lavras e de São Gotardo, cujas lavouras tinham histórico de *R. solani*. Em cada lavoura foram coletadas amostras de solo, até a profundidade de 15 cm, para se obter isolados, amostrando-se dez diferentes pontos (Papavizas et al., 1975; Sanfuentes Von Stowasser, 2000). As amostras (500 gramas) foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas à temperatura ambiente por, no máximo, cinco dias, até sua utilização. Também foram coletadas as raízes tuberosas de cenoura, com sintomas de cancro de raiz, presentes na área de produção e comercialização.

##### **3.1.2 Isolamento fúngico**

###### **3.1.2.1 Isolamento de *R. solani* nas amostras de solo**

De cada amostra de solo coletada e identificada quanto à sua origem, foi retirada uma amostragem para isolamento de *R. solani*, utilizando-se o método de iscas (Huang & Kulhman, 1989 modificado). Raízes de cenoura saudáveis foram lavadas com água e sabão, flambadas duas vezes após imersão em álcool 95°GL e, em seguida, cortadas em cilindros de 0,5 cm x 1,5 cm. Colocaram-se 20 iscas por caixas plásticas tipo Gerbox (13 x 13 x 4 cm). Adicionaram-se 200 gramas da amostra de solo, coletadas no campo, sobre as iscas. Ajustou-se a umidade do solo para a capacidade de retenção de água (70%) e incubou-se por quatro dias, a 20°C. Após esse período, os fragmentos foram cuidadosamente retirados do solo, lavando-se em água de torneira por três



minutos. Em seguida, foram desinfestados com hipoclorito de sódio a 1% por três minutos, sendo enxaguados duas vezes em água autoclavada e semeados em placas de Petri de 9 cm contendo meio ágar-água 2% (10 – 12 mL), distribuindo-se cinco iscas por placa. Após 48 horas de incubação a 20°C, avaliou-se, sob microscópio estereoscópico, a presença de *R. solani* crescido na superfície das iscas.

#### **3.1.2.2 Isolamento de *R. solani* nas amostras de raízes**

Plantas de cenoura com sintomas de cancro de raiz foram desinfestadas superficialmente e, pelo procedimento de rotina de laboratório, foi feito o plaqueamento direto da parte interna da lesão, em meio malte e ágar-água, adicionando-se 350 ppm de oxitetraciclina. As colônias com hifas, características de *R. solani*, foram repicadas para placas de Petri e tubos de ensaio com meio batata-dextrose-ágar (BDA) e armazenadas em temperatura ambiente para posterior estudo de caracterização dos isolados.

### **3.1.3 Identificação dos isolados, quanto ao grupo de anastomose**

#### **3.1.3.1 Número de núcleos**

As hifas de culturas ativas dos isolados mantidas em BDA foram transferidas para lâminas coradas com “Safranim – O” (Bandoni, 1971, citado por Carling et al., 1987) ou, ainda, os micélios crescidos por dois dias, em meio líquido de batata-dextrose (BD), foram corados pelo método HCL-Giemsa (Herr, 1979), sendo, em seguida, transferidos para lâminas com tampão fosfato e observadas ao microscópio de luz (x 400). Foram feitas, pelo menos, 50 observações por isolado para sua caracterização (Carling et al., 1987).

#### **3.1.3.2 Grupo de anastomose**

A identificação dos grupos de anastomose foi feita de acordo com o

método de Parmeter modificado (Carling et al., 1987). Em lâminas contendo o meio ágar-água 2%, foram pareados os discos de micélio do isolado-teste e isolado-campo em extremidades opostas. As lâminas foram postas em câmara úmida e incubadas na BOD a 20°C por 24 a 48 horas, onde foram monitoradas em microscópio de luz, até a observação da sobreposição. Em seguida, as lâminas foram coradas com azul de tripan 0,05% em lactofenol e reavaliadas ao microscópio de luz (x 400) quanto à anastomose das hifas. Para a certificação da anastomose, a fusão da parede celular e plasmalema acompanhada da morte de células adjacentes (reação K) foram visualizadas, em pelo menos, dez sítios de fusão para cada leitura de anastomose positiva. Os isolados-testes foram obtidos da micoteca da Universidade de Federal de Viçosa e da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Tabela 1).

### **3.1.3.3 Determinação da patogenicidade**

A patogenicidade dos isolados foi determinada em teste preliminares com plântulas de cenoura cultivadas sob condições controladas de 20°C e fotoperíodo de 12 horas. As sementes foram semeadas em vasos de 3 litros contendo substrato Plantmax<sup>®</sup> autoclavado (120°C, 180 min, 1 atm, em 3 etapas). O inóculo referente a cada isolado a ser testado foi obtido utilizando-se o método descrito por Michereff Filho et al. (1996) com algumas modificações. O substrato foi infestado com inóculo equivalente a 72 mg·kg<sup>-1</sup> de substrato. As avaliações foram realizadas diariamente, do oitavo ao trigésimo dia após a semeadura(DAS), observando-se o número de plântulas emergidas e tombadas.

Os isolados selecionados foram utilizados nas outras etapas deste trabalho. Três isolados-campo e onze isolados-teste, obtidos neste estudo, foram depositados na Coleção Micológica de Lavras (CML), na Universidade Federal de Lavras.

TABELA 1. Origem dos isolados-testes de grupos de anastomose de *Rhizoctonia solani*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Código da cultura	Grupo de anastomose de hifas	Hospedeiro ou substrato de origem	Procedência	Cedido por:
CSIW	AG1-IA	<i>Oriza sativa</i>	China, Japão	<sup>1</sup> Z.L. LIU**
PS4	AG2-1	<i>Pisum sativum</i> L.	China, Japão	<sup>2</sup> A. OGOSHI*
C96	AG2-IIIB	<i>Juncus</i> sp.	Japão/1972	A. OGOSHI**
65L.2	AG2-2 2B	<i>Glicines max</i> M.	Estados Unidos	Z.L. LIU*
RI64	AG2-2IV	<i>Beta vulgaris</i>	Japão/1960	A. OGOSHI*
ST9	AG3	<i>Solanum</i> sp.	Japão	Z.L. LIU*
140	AG4	<i>Medicago sativa</i> L.	Estados Unidos	Z.L. LIU*
CU8904	AG5	<i>Cucurbita pepo</i> L.	China	Z.L. LIU*
OHT-1-1	AG6	Solo	Japão/1977	A. OGOSHI*
HO-1556	AG7	Solo	Japão/1979	A. OGOSHI*
TS-2-4	AG - BI	Solo	Japão/1977	A. OGOSHI**

<sup>1</sup>Dr. Akira Ogoshi, Plant Pathology, Faculty of Agriculture – Hokkaido University, Kita 9, Nita-Ku, Sapporo 060, Japan.

<sup>2</sup>Dr. Zoglin L. Liu and Dr. J. B. Sinclair, Plant Patology, University of Illinos at Urbana-Champaign, College of Agriculture, 1102 South Goodwin Avenue, Urbana, IL 61801, USA.

\*Dr. Acelino Couto Alfenas  
Universidade Federal de Viçosa, MG

\*\*Dr. Silvaldo Felipe da Silveira  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ

### 3.1.3.4 Caracterização molecular de regiões do DNA ribossomal de *R. solani*

Foram analisados dois isolados de campo, provenientes de raízes de cenoura e 10 isolados-teste (Tabela 1), exceto o de código C96. Os isolados do banco de dados estão descritos na Tabela 7A.

#### 3.1.3.4.1 Extração de DNA (Moller et al., 1992)

Os isolados de *R. solani* foram cultivados em 50 mL de meio líquido de extrato de malte e incubados em agitador (80rpm) à temperatura ambiente por três dias. Para extrair o DNA genômico total, o micélio foi inicialmente filtrado em filtro de porcelana, com o auxílio da bomba de vácuo e, em seguida, macerado em nitrogênio líquido na presença de PVP (polivinil pirrolidona). Para cada 150 mg de micélio, foram adicionados 750µL de tampão de extração (CTAB 3%; 100mM Tris-HCl pH 8,0; 20mM EDTA; 1,4M NaCl; PVP 2%; 2-mercaptaetanol 0,5%) e o material foi incubado a 65°C, durante 60 minutos, homogeneizando-se a cada 10 minutos. Depois, foram adicionados 600µL de clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção 24:1, agitando-se gentilmente e as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante (cerca de 550µL) foi transferido para tubos eppendorf, acrescentando-se, em seguida, 143µL de NaCl 5N e 65µL de CTAB 10%. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 65°C por 10 minutos. Após esse período, foram adicionados 600µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e as amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante (550µL) foi transferido para outros tubos, que foram incubados em gelo durante 30, após a adição de 225µL de NH<sub>4</sub>Ac 5M e homogeneização. Em seguida, centrifugou-se a amostra a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C; o sobrenadante foi transferido para novo tubo e o DNA foi precipitado por adição de 600µL de isopropanol absoluto gelado, incubação a -20°C durante 30 minutos e centrifugação 14.000 rpm por 10 minutos. Os *pellets* foram lavados com 600µL de etanol a 70%, gelado, secados a vácuo e ressuspensos em 60µL de tampão TE (10mM de Tris-HCl pH 8,0 e 1mM de EDTA). O DNA obtido foi analisado por eletroforese em gel de agarose (0,7%).

#### **3.1.3.4.2 Amplificação dos fragmentos ITS 1, 5.8 S e ITS 2**

Os fragmentos de DNA foram amplificados por PCR (*polymerase chain reaction*), utilizando-se um par de *primers* para as regiões do rDNA, denominadas ITS 4 (5'GCGGGTAGTCCTACCTGATTGA3') e ITS 5 (5'GTAGGTGACCTGCGGAGGATC'). A reação foi composta por 2µL do DNA, 5µL do tampão 10X (0,5M Tris-HCl; 0,7M KCl; 0,1M MgCl<sub>2</sub> pH 8,0), 1,5µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1µL de dNTP (2mM), 2µL de cada *primer* na concentração de 10µmol/µL, 1µL de Taq DNA polimerase (5un/µL), 35,5µL de água ultrapura. A amplificação foi realizada no termociclador PCT-100 (MJ Research, Inc. USA), empregando-se 35 ciclos de 40 segundos a 94°C, 1 hora a 55°C, 2 minutos a 72°C, seguido de um ciclo final de 5 minutos a 72°C. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose (0,7%).

#### **3.1.3.4.3 Purificação e seqüenciamento do DNA amplificado**

Após a verificação do tamanho correto da banda, o DNA foi purificado a partir do gel de agarose utilizando-se o Kit QiAquick® (Quiagen DNA), seguindo-se as recomendações do fabricante. A qualidade e a concentração do DNA foram estimadas também por eletroforese em gel de agarose (0,7%). O seqüenciamento foi realizado no Laboratório NBA, do Núcleo de Biologia Aplicada, EMBRAPA, Sete Lagoas, MG.

#### **3.1.3.4.4 Análises das seqüências**

Após a correção das seqüências, com o auxílio dos cromatogramas, as seqüências foram analisadas, fazendo-se a comparação das mesmas entre si e com outros 32 isolados de *R.solani* disponíveis no *Gene Bank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para o alinhamento múltiplo foi utilizado o programa Clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) e para a análise filogenética, foi utilizado o programa Mega 3.1 (*Molecular Evolutionary*

*Genetics Analysis*), disponível em: (<http://www.megasoftware.net/>). Foram construídas árvores filogenéticas, com *bootstrap* de 2.000 repetições, considerando-se somente os valores superiores a 25%.

### **3.2 Avaliação de métodos de inoculação de *R. solani* para solos cultivados com cenoura**

#### **3.2.1 Análise das sementes e substrato utilizado, determinação da umidade do substrato e produção do inóculo**

##### **3.2.1.1 Perfil das sementes**

Sementes de cenoura, cultivar Juliana, foram analisadas quanto à qualidade sanitária e fisiológica (teste de emergência), conforme recomendações das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Estas análises foram realizadas na Clínica Fitossanitária (DFP) e no Laboratório de Análise de Sementes (DAG), respectivamente na Universidade Federal de Lavras.

##### **3.2.1.2 Perfil do solo**

Foi utilizado solo (Latosolo Vermelho distroférico), horizonte B, não esterilizado, na proporção de 3:1, solo e areia. Análise de rotina para sanidade do solo foi realizada da mistura previamente peneirada, retirou-se amostra de 20g, que foi lavada em água destilada por cinco vezes e uma sexta vez por água destilada autoclavada, seca em placa de Petri de 15 cm de diâmetro com dupla camada de papel de filtro. Após 16 horas, foi feito o plaqueamento de fragmentos do solo em placas de Petri de 9 cm de diâmetro com meio de cultura ágar água e malte. As placas foram incubadas a 20<sup>0</sup>C, fotoperíodo de 12 horas e avaliadas com 24 e 48 horas, identificando os patógenos desenvolvidos. Colônias com suspeita de *R. solani* foram replaqueadas para diagnose mais precisa.

### **3.2.1.3 Determinação da capacidade de retenção de umidade nos vasos**

Os cálculos foram feitos conforme as recomendações das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) com modificações. Adicionaram-se 3L de água em 3kg do substrato solo/areia, correspondente ao volume de um vaso. Quantificou-se o volume de água escorrido. Por diferença, determinou-se o volume de água retido. Este valor foi corrigido por um fator de correção específico; determinou-se a quantidade de água por vaso, com o solo seco. Após 48 horas, novos cálculos foram feitos, para a recarga. Os dados foram obtidos dentro da câmara de crescimento a 20°C.

### **3.2.1.4 Produção do inóculo em grãos de arroz**

Utilizou-se a metodologia descrita por Michereff Filho et al. (1996) com modificações. O inóculo foi obtido a partir de culturas com cinco dias de idade, crescidas em meio batata-dextrose-água (BDA), sob regime de luz contínua e temperatura de 20°C. Três discos de micélio com 9 mm de diâmetro foram transferidos, em ambiente asséptico, para sacos plásticos de polietileno de 10x17cm, contendo 60 g de arroz pré-cozido e autoclavado (120°C, 30 min., 1 atm), incubado por 8 dias, em fotoperíodo de 12 horas a 20°C. O arroz colonizado foi acondicionado em saco de papel e seco à sombra, em temperatura ambiente, por 96 horas. Posteriormente, esse inóculo constituído de arroz e *R. solani* foi triturado em multiprocessador, peneirado em malha de 0,180 mm e armazenado em saco plástico fechado. Antes de cada ensaio, o inóculo foi semeado em ágar-água (2%), para avaliar sua viabilidade, analisando-se visualmente o crescimento micelial característico de *R. solani* e posterior confirmação em microscópios de luz.

### **3.2.2 Avaliação de métodos de inoculação**

Sementes de cenoura da cultivar Juliana foram semeadas em sulcos de 2

cm de profundidade em vasos plásticos de 3 litros, contendo o substrato solo/areia (3:1), não esterilizado e inoculado com *R. solani* (AG-4), por quatro diferentes densidades de inóculo, em três formas de infestação. A testemunha consistiu do plantio de sementes em solo não infestado. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento a 20°C, com fotoperíodo de 12 horas.

Os tratamentos testados para a inoculação basearam-se em quatro densidades de inóculo 9, 18, 36 e 72 mg de inóculo por kg de solo, com três formas de infestação artificial do solo, são elas: o inóculo misturado a 100% do solo que preenchia os vasos (semelhante a infecção natural); o inóculo incorporado a 10% de solo, na parte superior do vaso (praticidade para desenvolver trabalhos de campo) e o inóculo adicionado em contato direto com as sementes, antes do plantio (caracterizando sementes infestadas).

O delineamento experimental utilizado no ensaio foi o de blocos ao acaso, com esquema fatorial de 4 x 3 (densidades e formas de aplicação), com 5 repetições, sendo a unidade experimental um vaso com 40 sementes.

Avaliaram-se a emergência e o tombamento de plântulas, por meio de inspeções diárias, a partir do oitavo dia após a semeadura (DAS) até o trigésimo dia após a semeadura. Para análise dos dados, foi calculado o índice de velocidade de emergência (IVE), calculado pela fórmula proposta por Maguire (1962), porcentagem de tombamento pós-emergência (%TPÓS) e, por transformação, a porcentagem de plântulas tombadas pré-emergência (%TPRÉ).

$$\text{IVE} = \sum_{i=1}^n \frac{N_i}{D_i}, \text{ em que:}$$

IVE = índice de velocidade de emergência;

$N_i$  = número de plântulas germinadas na 1ª contagem, 2ª contagem, ... enésima contagem, respectivamente;



$D_i$  = número de dias após semeadura na 1ª contagem, 2ª contagem, ... enésima contagem, respectivamente;

$$\%TPÓS = (100 \times N_t)/X_{et} , \text{ em que:}$$

$\%TPÓS$  = porcentagem média de tombamento pós-emergência

$N_t$  = número de plantas tombadas;

$X_{et}$  = média de plântulas emergidas na testemunha

$$\%TPRÉ = [(40 - N_e) \times (\%X_{et})]/100 , \text{ em que:}$$

$\%TPRÉ$  = porcentagem média de tombamento pré-emergência

40 = constante, correspondente ao número de sementes por vaso;

$N_e$  = número final de plântulas emergidas;

$\%X_{et}$  = porcentagem da média de plântulas emergidas na testemunha.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar<sup>®</sup> (Ferreira, 2000). As variáveis significativas no teste F foram submetidas ao teste de médias ou análise de regressão. O índice de velocidade de emergência e o tombamento médio de pré-emergência foram comparados pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ). Para a porcentagem média de pós-emergência foram analisadas densidades entre formas de aplicação, ajustando-se modelos linear e quadrático.

Para confirmar a identidade do patógeno, plântulas com sintomas de tombamento foram submetidas ao isolamento em meio ágar-água, para posterior análise da sua morfologia.

### **3.3 Eficiência de fungicidas no controle de *R. solani* em cenoura**

As metodologias para as análises das sementes e contaminação do solo, assim como para produção do inóculo, estão descritas no item 3.2.1. Sementes de cenoura da cultivar Juliana, foram semeadas em sulcos de 2 cm de profundidade em vasos plásticos de 3 litros, contendo o substrato solo/areia (3:1), não esterilizado e inoculado com *R. solani* (AG-4). Utilizaram-se 72 mg·kg<sup>-1</sup> de solo, incorporado à superfície na camada de 0-2 cm. A testemunha consistiu do plantio de sementes em solo infestado não tratado. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento a 20<sup>0</sup>C, com fotoperíodo de 12 horas.

Os tratamentos testados foram compostos por cinco fungicidas, em dosagens para tratamento de sulco e tratamento de sementes, conforme Tabela 2. O delineamento experimental utilizado no ensaio foi de blocos ao acaso, com esquema fatorial de 5 x 2 (5 fungicidas e 2 formas de aplicação), com 5 repetições, sendo a unidade experimental um vaso com 40 sementes.

As avaliações foram realizadas diariamente do oitavo ao trigésimo dia após a semeadura, registrando-se a emergência e o tombamento de plântulas. Para analisar os dados, foi calculado o índice de velocidade de emergência (IVE), a porcentagem média de tombamento pós-emergência (%TPÓS) e por transformação a porcentagem média de plântulas tombadas pré-emergência (%TPRÉ). As fórmulas estão descritas no item 3.2.2. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar<sup>®</sup> (Ferreira, 2000) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ).

Para confirmar a identidade do patógeno, plântulas com sintomas de tombamento foram submetidas ao isolamento em meio ágar-água para análise da morfologia.

TABELA 2. Dosagens dos fungicidas utilizados para o controle de Rhizoctoniose, nos ensaios com cenoura, em condições controladas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Fungicida	Tratamento de sulco (kg ou g) de i.a./ha	Tratamento de semente (g) de i.a./100kg de semente
pencicuron	650 g	75 g
fludioxonil	62,5 g	5 g
iprodone	3,75 kg	50 g
procimidone	650 g	50 g
azoxistrobim	250 g	125 g

### 3.4 Patogenicidade de isolados-campo e isolados-testes para a cultura da cenoura

As metodologias para as análises das sementes e contaminação do solo, assim como para produção do inóculo, estão descritas no item (3.2.1). Sementes de cenoura da cultivar Juliana foram semeadas em substrato contendo solo:areia (3:1). Foram utilizados três isolados-campo: isolado A, isolado B, isolado C e dez isolados-testes, correspondente aos grupos de anastomose: AG1-IA, AG 2-1, AG2-2IV, AG2-2IIIB, AG 3, AG 4, AG 5, AG 6, AG 7, AG – BI e testemunha não inoculada. Na inoculação, utilizaram-se 72 mg·kg<sup>-1</sup> de solo dos diferentes isolados já citados, incorporados à superfície na camada de 0 a 2 cm. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento a 20°C, com fotoperíodo de 12 horas. O delineamento experimental utilizado no ensaio foi de blocos ao acaso, com 14 tratamentos e 5 repetições, com 40 plântulas cada.

As avaliações foram realizadas do oitavo ao trigésimo dia após a semeadura. Após esse período, foram avaliados a emergência e o tombamento de plântulas. Para a análise dos dados, foi calculado o índice de velocidade de emergência (IVE), a porcentagem média de tombamento pós-emergência

(%TPÓS) e, por transformação, a porcentagem média de plântulas tombadas pré-emergência (%TPRÉ). As fórmulas estão descritas no item 3.2.2. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar<sup>®</sup> (Ferreira, 2000) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ).

Para confirmar a identidade do patógeno, plântulas com sintomas de tombamento foram submetidas ao isolamento em meio ágar-água para análise da morfologia.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estudo da população de *R. solani* em solos cultivados com cenoura

O isolado A foi obtido em raízes comerciais produzidas no município de Lavras. Os isolados B e C foram obtidos no município de São Gotardo, a partir de raízes com sintomas de cancro-de-raízes no material de descarte dos lavadouros (beneficiadora PADAP e BAC). Foram poucos os isolados obtidos, em relação ao número de visitas feitas mensalmente de janeiro a setembro de 2005, principalmente ao município de São Gotardo, provavelmente devido ao fato de em 2005, ter ocorrido alta oscilação na temperatura ideal para o desenvolvimento do fungo (Figura 1), entre 20°C e 28°C.

Em cenoura há relatos do fungo ocasionando podridões e pontuações necróticas em raízes nas temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C, quando inoculado artificialmente, enquanto que a 16°C ocorre pouca infecção (Mildenhall & Williams, 1973). Os autores ainda relataram que *in vitro*, sob condições controladas de temperatura, houve máximo crescimento micelial do fungo com seis dias, a 28°C e oito dias a 20°C e 24°C.

O grupo de anastomose também tem influência sobre a temperatura ideal para ocorrer infecção. Estudos para isolados de soja apresentaram temperatura ótima para o crescimento micelial aos grupos AG1 e AG4 de 20°C e AG2-2 e AG5 de 25°C (Harikrishnan & Yang, 2004). Contudo, no campo, outros fatores podem influenciar o patógeno além da temperatura e luz. É necessário levar em consideração outros fatores, como umidade, pH do solo, histórico da área para a doença e para outras plantas hospedeiras e, ainda, o nível tecnológico do plantio que, por sua vez, no município de São Gotardo, é alto, o que é comprovado pela sua alta produtividade, 53,2% superior à média nacional (Horticultura, 2006).

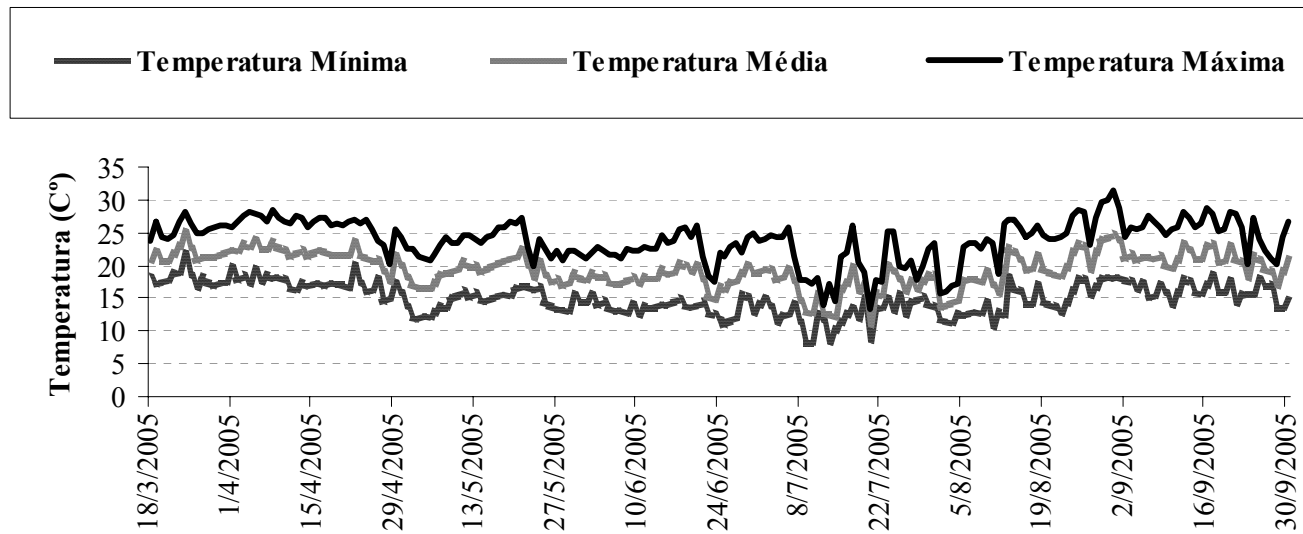


FIGURA 1. Médias quinzenais de temperatura mínima, média e máxima. Dados do município de São Gotardo, de março a setembro de 2005. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Não se obteve êxito na metodologia para isolar *R. solani* a partir de amostras de solo naturalmente infestado. A metodologia utilizada foi desenvolvida para recuperar isolados, a partir de solos esterilizados e infestados artificialmente, não havendo competitividade do patógeno com outros microrganismos (Huang & Kuhlman, 1989). Sanfuentes Von Stowasser (2000), comparando iscas para quantificar *R. solani*, observou a maior eficiência das iscas para solo infestados artificialmente em comparação aos naturais, entretanto, a maior colonização para ambos os solos foi por propágulos de eucalipto, sugerindo especificidade entre o patógeno e o hospedeiro.

Em 90% das amostras coletadas com sintomas característicos de cancro-da-raiz foi identificado o patógeno *Fusarium oxysporum* (Massola Jr. et al., 2005). Esse patógeno é citado como secundário e ou saprófita na cultura da cenoura. Esse diagnóstico retrata dois graves problemas: o primeiro, a perda do valor comercial das raízes de cenoura devido à presença de lesões e, em segundo, o diagnóstico errôneo por técnicos no campo, pois, até o momento, as lesões foram consideradas como típicas de Rhizoctoniose. Esse fato pode induzir o uso inadequado de fungicidas, uma vez que os patógenos são anamorfos, entretanto, de classes fúngicas distintas, sendo *R. solani* um Basidiomycetes, e *F. oxysporum* um Ascomycetes.

#### **4.1.2 Identificação dos isolados, quanto ao grupo de anastomose**

Os isolados A, B e C foram caracterizados como *R. solani* com base no número de núcleos, utilizando-se a técnica de coloração dos núcleos, tanto pelo corante safranina-O quanto pelo método de coloração de núcleos HCL-Giemsa. Foram observados mais de dois núcleos, dentro de cada célula vegetativa da hifa, sendo, então, classificados como multinucleados (Figura 2(A)).

Houve anastomose somente do isolado B com o isolado-teste correspondente ao grupo AG-4 (Figura 2(B)). A associação do AG-4 com o

cultivo de cenoura, já havia sido relatada no Distrito Federal (Bolkan & Ribeiro 1985). Dentre os diferentes grupos de anastomose, o AG-4 é o que apresenta maior distribuição entre plantas hospedeiras e sintomas (Carling et al., 1987; Escande & Echandi, 1991). Esse grupo de anastomose também pode infectar batata e beterraba, cultivadas no município de São Gotardo .

Os três isolados A, B e C foram patogênicos à cenoura na câmara de crescimento a 20°C, em que 100% das sementes não germinaram, caracterizando tombamento em pré-emergência. A testemunha apresentou 80% de emergência. A alta agressividade dos isolados pode ser atribuída ao substrato Plantmax<sup>®</sup>, rico em matéria orgânica, autoclavado. Dessa forma, não apresentava competitividade de agentes de controle aos isolados de *R. solani*. Foi possível observar micélio do fungo crescendo sobre o substrato, confirmado-o por montagem de lâmina com fita adesiva e coradas com azul tripam, diretamente sobre o micélio. Analisando-se as condições de campo, onde sempre ocorrerá competitividade, infere-se aos ensaios subseqüentes montagem em solos não esterilizados, porém, não infestados com *R. solani*.

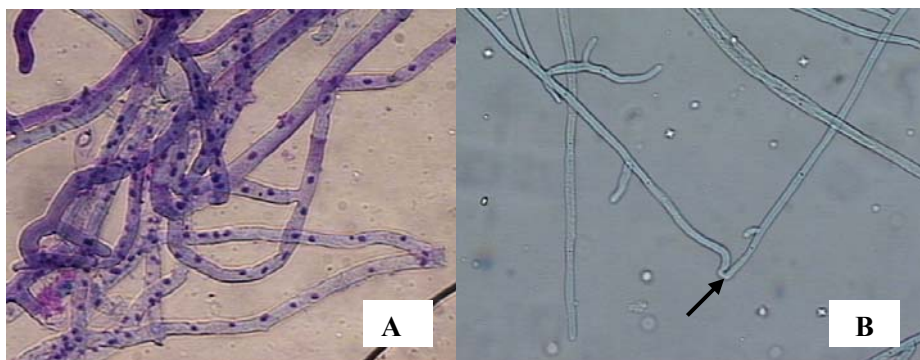


FIGURA 2. Hifas vegetativas de *Rhizoctonia solani*. A) multinucleadas coradas com HCL-Geimsa, B) fusão de hifas do isolado-teste AG4 a com isolado-campo. UFLA, Lavras, MG, 2006.



#### 4.1.3 Caracterização molecular de regiões do DNA ribossomal de *R. solani*

A identidade de nucleotídeos entre os doze isolados que tiveram o segmento do rDNA seqüenciado, referente às regiões ITS1, rRNA e ITS2, variou entre 80% e 99% (Tabela 3). A menor identidade ocorreu entre o isolado C e o Isolado B e a maior entre o AG5 e o AG1-IA-CSW. Comparando-se esses isolados com os 32 extraídos do banco internacional de dados, a menor identidade foi de 76% entre o Isolado C e cinco outros isolados: o AB054861 e o AB000044 do Japão, o AY387528 e o AY387553 da Espanha e o AF354110 do México (Tabela 4). A maior identidade foi de 99%, observada entre o isolado AG2-1 e o AF54063 do México, o AG3 e os isolados AY387528 e AY387553 da Espanha, o AG4 e o AJ245888 também da Espanha e entre o Isolado B e o AY684924 de Taiwan. Essa maior identidade entre os isolados indica que eles devem ter, respectivamente, a mesma origem geográfica.

É interessante notar que, dentre os doze isolados seqüenciados, os dois que apresentaram menor identidade entre si (Isolados B e C) foram provenientes do campo, enquanto que os dez outros foram conseguidos a partir de coleções que vêm sendo mantidas experimentalmente como padrão para estudos diversos. Provavelmente, os isolados oriundos do campo tiveram maior pressão de adaptação, gerada pela constante exposição às diversas condições ambientais e aos diferentes agroquímicos, que normalmente, são aplicados nas lavouras.

O Isolado C foi o que apresentou uma maior diversidade genética, tanto quando comparado com os demais isolados seqüenciados neste trabalho como quando comparado com outros isolados do banco internacional de dados. Seguindo a linha de raciocínio anterior, esse isolado, apesar de ser proveniente do mesmo município que o isolado B, deve ter dado uma maior resposta à pressão de seleção no campo.

A árvore filogenética com *bootstrap* (2000 repetições), para os doze isolados seqüenciados, também mostrou que o isolado C ficou distante, separado

TABELA 3. Porcentagem de identidade de nucleotídeos, entre os isolados estudados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>Isolados</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
1. AG1-IA-CSW	--											
2. AG2-1	93	--										
3. AG2-2B	91	91	--									
4. AG2-2IV	91	90	98	--								
5. AG3	91	94	90	89	--							
6. AG4	90	91	89	88	90	--						
7. AG5	99	93	91	91	91	90	--					
8. AG6	93	93	91	91	92	93	93	--				
9. AG7	90	91	90	90	90	94	90	93	--			
10. AG-BI	91	92	87	87	91	88	91	93	90	--		
11. Isolado B	91	91	89	89		97	91	94	93	89	--	
12. Isolado C	81	81	81	81	80	82	81	81	82	81	80	--

TABELA 4. Porcentagem de identidade de nucleotídeos, entre isolados estudados e os isolados publicados no banco de dados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>Isolado</b>	<b>AG1-IA</b>	<b>AG2-1</b>	<b>AG2-2B</b>	<b>AG2-2IV</b>	<b>AG3</b>	<b>AG4</b>	<b>AG5</b>	<b>AG6</b>	<b>AG7</b>	<b>AG-BI</b>	<b>Isolado B</b>	<b>Isolado C</b>
AF354063	92	99	90	90	93	91	92	90	89	92	91	77
U57744	90	97	84	85	91	88	91	93	90	87	89	80
AB019026	89	92	87	89	93	88	89	88	87	89	88	77
AY154311	83	85	97	97	84	84	85	86	85	83	84	75
AB054861	84	86	95	94	85	84	86	87	86	84	85	76
AF308621	85	90	94	94	86	86	89	90	89	86	87	78
AJ000201	83	88	94	93	86	85	87	89	87	84	86	75
AF308622	85	89	94	94	87	87	89	90	89	86	87	79
AY387528	88	90	87	87	99	88	88	88	86	89	87	76
DQ059576	85	91	83	84	96	86	89	90	88	86	86	77
AY387553	88	90	87	88	99	87	88	88	86	89	87	76
AF153775	87	88	88	88	88	98	87	91	91	87	95	79
AJ24888	88	91	85	84	89	99	89	93	93	85	96	81
AY684924	86	91	85	85	89	96	90	94	93	86	99	80
U57743	92	88	87	87	87	87	91	89	87	86	87	78
U57741	92	89	86	87	87	87	91	89	87	86	87	77
AF354102	92	91	88	90	92	92	91	98	91	91	92	77
AY634121	89	89	82	82	88	88	90	96	90	85	90	80
AF354081	93	92	89	89	92	93	92	94	92	92	93	78
AF354099	89	89	87	89	90	92	88	90	90	88	91	78
DQ102441	90	90	83	83	88	90	91	93	98	85	91	83
AF153793	91	92	90	90	91	93	91	92	94	90	93	78
AY684922	95	92	86	87	90	88	98	93	90	87	89	81
U57893	94	90	84	85	87	86	95	92	89	85	86	79
AF354110	83	87	83	84	86	84	86	88	85	96	85	76
AB000044	84	87	84	85	87	84	86	88	85	95	85	76
AF354105	90	97	89	89	93	89	90	90	87	90	89	77
DQ102448	89	90	85	84	89	96	90	93	93	85	98	81
AF354092	88	88	86	87	86	88	87	87	88	88	88	90
DQ102406	84	83	82	82	84	84	82	83	84	83	83	89
AB000040	84	85	82	82	85	86	83	84	86	84	86	87
AJ427404	85	85	83	83	85	86	85	85	87	86	86	88

dos demais, que se colocaram num segundo grupo, com dois principais subgrupos (Figura 3). O AG2-2B e o AG2-2IV compuseram um dos subgrupos e os demais ficaram no segundo subgrupo, tendo o isolado B ficado mais próximo ao AG4 e AG7. O AG2-1 também é uma subdivisão do AG2, entretanto, ficou separado do primeiro subgrupo, aproximando-se mais do AG3.

Analisando-se a árvore com *bootstrap*, incluindo os isolados estudados e os do banco de dados, observa-se a sua divisão em dois principais grupos: o primeiro se subdivide em dois, com o isolado C sozinho em um dos subgrupos, mostrando novamente sua diversidade e os isolados AJ427404 (Espanha) AF354092 (México), DQ102406 (Israel) e o AB000040 (Japão) no segundo subgrupo (Figura 4). Estes isolados pertencem ao grupo de anastomose AG A, classificação dada para *Rhizoctonia* sp binucleada, devido à maior proximidade com o isolado C. Esse resultado contradiz a caracterização morfológica, em que o isolado C foi identificado como multinucleado.

Os demais isolados estudados neste trabalho se espalharam pelos demais subgrupos do segundo grupo da árvore filogenética, tendo os isolados AG1-IA-CSW e AG5 se agrupado com o isolado AY684922, oriundo do Taiwan e não tendo sido descrito seu grupo de anastomose. Portanto, foi seqüenciado do telemorfo *Thanateforus cucumeris*, mostrando que, independente da fase morfológica do fungo, suas características genéticas são mantidas. O isolado B agrupou-se com 99 *bootstrap* ao isolado AY684924, o qual não se conhece seu grupo de anastomose. Entretanto, quando observado seu agrupamento no nível do terceiro braço, encontra-se o AG4, cujos seis isolados estão agrupados 99 *bootstrap*, comprovando, mais uma vez, a identificação morfológica do isolado B como pertencente ao grupo de anastomose AG4.

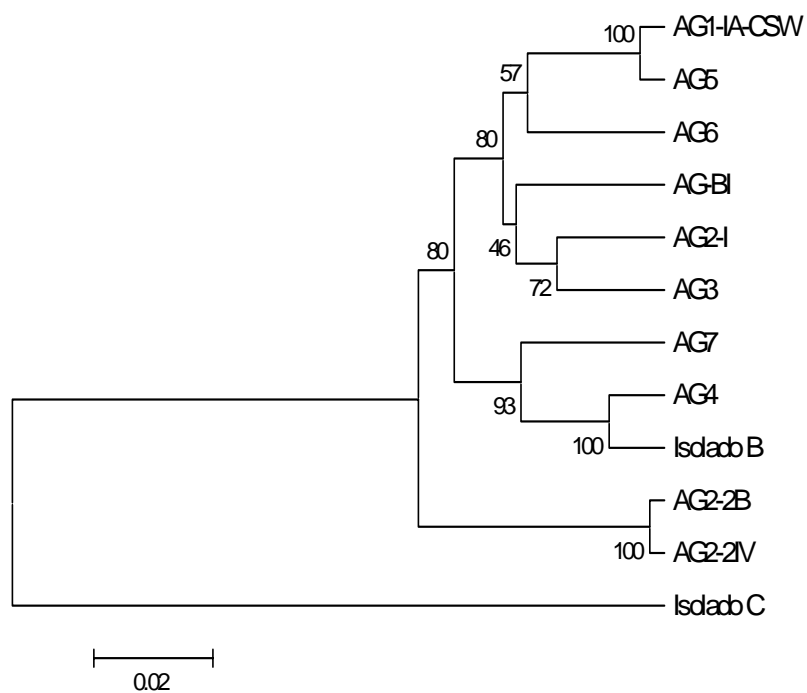


FIGURA 3. Árvore filogenética obtida com base na seqüência de nucleotídeos do rDNA de 12 isolados de *Rhizoctonia solani*. Valores *Bootstrap* obtidos com 2.000 repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.

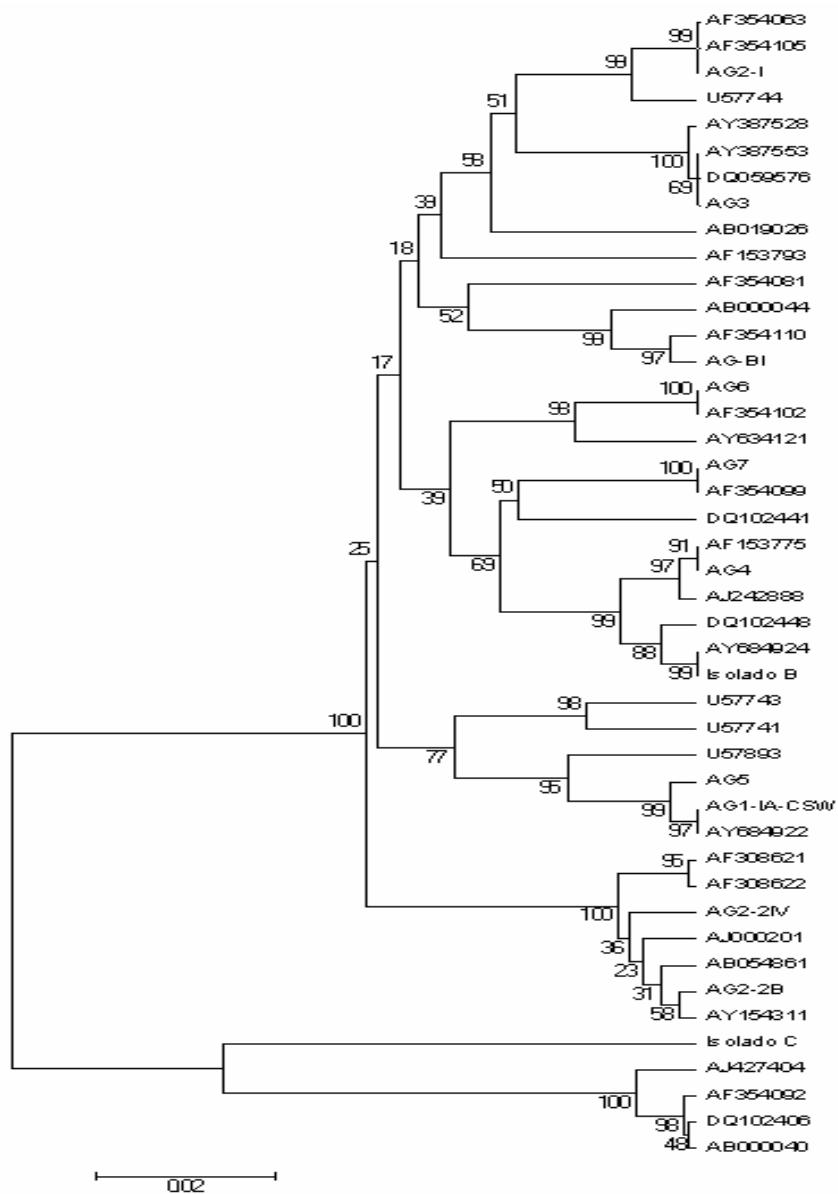


FIGURA 4. Árvore filogenética obtida com base na seqüência de nucleotídeos do rDNA de isolados de *Rhizoctonia solani*, sendo 12 seqüenciados e estudados neste trabalho e os demais obtidos no *Gene Bank*. Valores *bootstrap* obtidos com 2.000 repetições. UFLA, Lavras, MG, 2006.

#### **4.2 Avaliação de métodos de inoculação para *R. solani* em solos cultivados com cenoura**

A análise fisiológica e sanitária do lote de sementes usadas não detectou *R. solani* e registrou 81% de emergência (Tabela 1B). As sementes apresentaram alto vigor, pois 70% dessa emergência ocorreu nos primeiros 7 dias da montagem dos *Blotter test*. Na análise do substrato não foi identificado patógeno associado ao tombamento de plântulas (Tabela 2B). Os vasos, no momento do plantio, foram regados com 695mL de água e recarga de 86mL, a cada 2 dias.

Na análise de variância para o índice de velocidade de emergência, não houve interação entre a quantidade de inóculo e as formas de aplicação (Tabela 1A). As formas de aplicação tiveram efeito significativo de ( $P = 0,8672$ ), assim como a testemunha adicional diferiu dos tratamentos com ( $P = 0,9619$ ) nessa variável. A quantidade de inóculo não teve influência significativa na emergência das plântulas.

A forma de aplicação do inóculo na semente diferiu significativamente das formas de aplicação do inóculo adicionado a 100% e 10% do solo, na superfície, com velocidade de emergência média de 3,18 (Tabela 5).

Não houve efeito da interação entre densidade de inóculo e forma de aplicação na porcentagem média de tombamento de pré-emergência (Tabela 1A).

As formas de aplicação do inóculo, adicionado a 100% e a 10% do solo, na superfície, foram mais eficientes, diferindo estatisticamente do inóculo adicionado às sementes, que apresentou 48,13% de plântulas tombadas em pré-emergência (Tabela 5).

Para porcentagem média de tombamento de pós-emergência, houve efeito na interação entre densidade de inóculo e forma de aplicação ( $P = 0,9574$ ). A testemunha adicional diferiu dos tratamentos ( $P = 0,2937$ ) nessa variável (Tabela 1A).

TABELA 5. Dados médios de índice de velocidade de emergência (IVE), tombamento médio de pré (%TPRÉ) e pós-emergência (%TPÓS) com três formas de aplicação do inóculo de *Rhizoctonia solani*. UFLA, Lavras – MG, 2006.

Formas Aplicação	IVE	%TPRÉ	%TPÓS
Inóculo adicionado a 100% do solo	11,76 a	15,75 b	28,21 b
Inóculo adicionado a 10% do solo na superfície	12,10 a	20,45 b	44,64 a
Inóculo adicionado às sementes	3,18 b	48,13 a	27,86 ab
Testemunha	7,52*	21,00*	0,0*

Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

\* Significativo ( $P = 0,0463$ )

O tombamento de pós-emergência aumentou de forma crescente com o aumento da concentração de inóculo, até o limite de  $72 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de solo, para 100% e 10% do solo (Figura 5). Não houve ajuste de modelos polinomiais para forma de aplicação do inóculo adicionado às sementes (Tabela 4A) (Figura 5).

A forma de aplicação do inóculo adicionado às sementes diferiu das formas de aplicação do inóculo no solo, tanto no índice de velocidade de emergência como na porcentagem média de tombamento de pré-emergência, devido à maior proximidade do inóculo de *R. solani* ao hospedeiro. O fato das sementes estarem semeadas a 2 cm de profundidade também influenciou na intensidade da doença, impedindo a emergência das mesmas. Relatos da distância e da profundidade do inóculo em relação ao hospedeiro confirmam os resultados encontrados, em que quanto mais próximo, maior a infecção (Dimond & Horsfall, 1965 citado por Michereff Filho et al., 1996; Papavizas et al., 1975). A semente na fase de germinação absorve maior umidade e seus tecidos ficam tenros, liberando nutrientes que ativam os microrganismos da rizosfera. Nesta circunstância, há uma maior probabilidade de penetração e colonização do patógeno, ocasionando a podridão de pré-emergência (Vale et al., 2001).



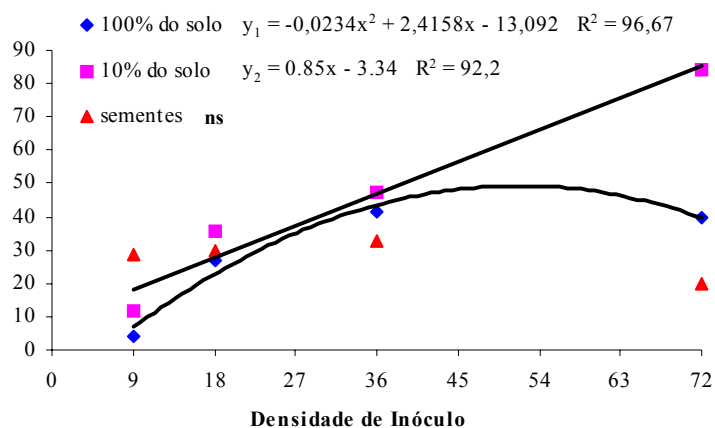


FIGURA 5. Porcentagem média de tombamento pós-emergência de plântulas de cenoura inoculadas com *Rhizoctonia solani*, em quatro densidades de inóculo, por três formas de aplicação. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Em estudos realizados por Michereff Filho et al. (1996), para a cultura do feijão, o aumento da doença foi diretamente proporcional ao incremento na densidade de inóculo, iniciando com 50 mg até 300 mg·kg<sup>-1</sup> de solo. Na dosagem de 300 mg·kg<sup>-1</sup> de solo não houve diferença significativa para os diferentes solos coletados em cidades distintas e não autoclavados. Foi observado uma menor dosagem, de 72 mg, do inóculo para causar tombamento pós-emergência em plântulas de cenoura do que no trabalho citado. Essa baixa densidade de inóculo, capaz de causar tombamento em cenoura, é fator preocupante no campo, quando se associa a condições edafo-climáticas ideais e ou rotação de culturas suscetíveis ao patógeno.

Em outro trabalho desenvolvido com feijão e algodão, por Santos et al. (2006), a densidade de inóculo suficiente para causar sintomas foi de 72 e 144mg·kg<sup>-1</sup> de substrato, respectivamente, sendo semelhantes ao necessário para causar tombamento em cenoura. Entretanto, os autores trabalharam com solo

autoclavado que não apresentava competitividade para o inóculo, dessa forma, apresentando densidades inferiores às citadas por Michereff Filho et al. (1996).

A variável porcentagem média de tombamento de pós-emergência mostrou-se a mais eficiente para avaliar a doença na cultura da cenoura, justificando-se pelo fato das plântulas serem suscetíveis ao patógeno, permitindo apenas avaliações da incidência da doença (figura 6(A), 6(B)). Neste experimento foi impossível avaliar a severidade da doença, como pode ser observado em outros trabalhos, ela é quantificada utilizando-se escala de notas, dependendo do tamanho da lesão formada no hipocótilo das plântulas de feijão e algodão (Michereff Filho et al., 1996; Santos et al, 2006). Outro fator importante na escolha de porcentagem média de tombamento pós-emergência, é que as sementes de cenoura são pequenas, impedindo o seu resgate para avaliação precisa do percentual de tombamento de pré-emergência.

É importante considerar, como metodologia para trabalhos na cultura da cenoura, que o melhor resultado não foi o capaz de infectar o maior número de sementes e sim o que causou maior número de tombamento pós-emergência das plântulas. Isso porque a morte de todas as plântulas não permitiria a comparação visual dos resultados (Figura 6(C; D)).

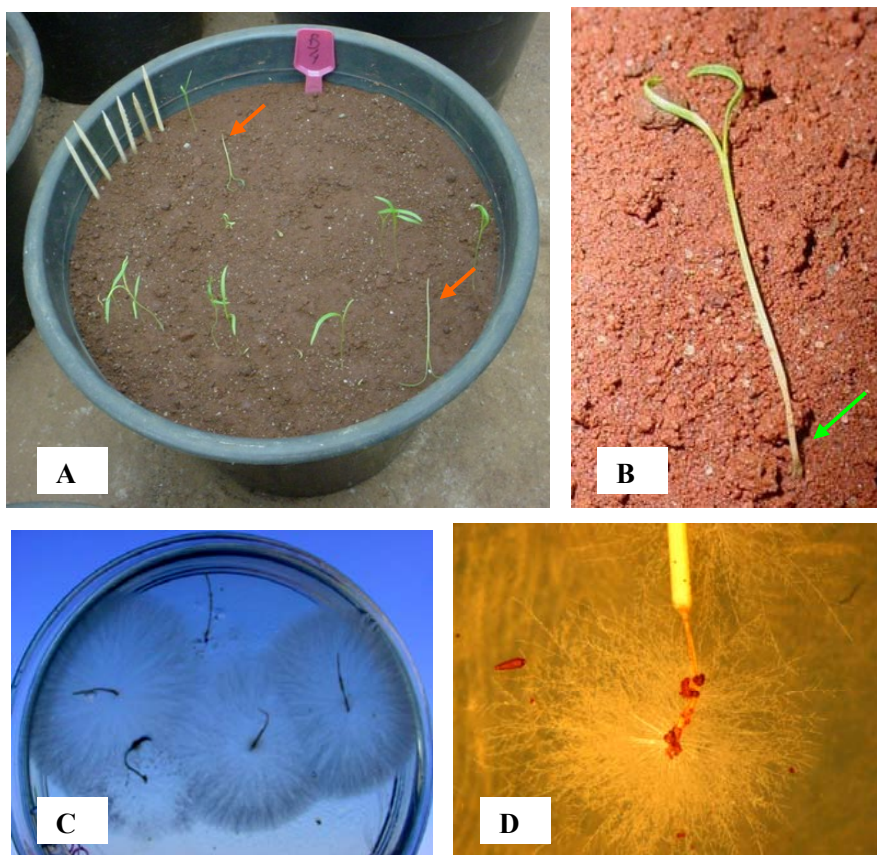


FIGURA 6. Plântulas de cenoura tombadas. A) Estande de plântulas emergidas e tombadas na linha do solo; B) sintoma característico do tombamento, lesões marrom-escuras no caule que progridem até o completo estrangulamento das plântulas; C) e D) plaqueamento das plântulas tombadas para a confirmação do patógeno. UFPA, Lavras, MG, 2006.

#### 4.3 Eficiência de fungicidas no controle de *R. solani* em cenoura

Os resultados preliminares das análises das sementes e contaminação do solo estão descritas no item 4.2.

Não houve efeito da interação entre os fungicidas e formas de aplicação

no índice de velocidade de emergência (Tabela 5A). Os fungicidas diferiram entre si ( $P = 0,0067$ ), assim como a testemunha adicional diferiu dos tratamentos ( $P = 0,0463$ ).

O melhor resultado foi obtido com azoxistrobim, promovendo maior velocidade na emergência de plântulas. Os fungicidas iprodione, pencicuron e procimidone comportaram-se como intermediários. O fludioxonil mostrou-se ineficiente, para a variável testada (Tabela 6).

TABELA 6. Dados médios de índice de velocidade de emergência (IVE) para cinco fungicidas no controle de *Rhizoctonia solani*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Fungicidas	Média
Pencicuron	20,94 ab
fludioxonil	14,35 b
iprodione	18,61 ab
procimidone	16,21 ab
azoxistrobim	24,74 a
Testemunha	12,87 *

Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

\* Significativo ( $P = 0,0463$ )

Houve interação significativa entre os fungicidas e as formas de aplicação para a variável porcentagem média de tombamento pré-emergência ( $P = 0,000$ ). A testemunha adicional também diferiu significativamente dos tratamentos (Tabela 5A).

Apenas o fungicida iprodione diferiu significativamente entre os tratamentos de sulco e semente (Tabela 7). Para o tratamento de sulco, os

fungicidas com menor porcentagem de tombamento em pré-emergência foram azoxistrobim, iprodione e pencicuron, diferindo significativamente do fludioxonil. No tratamento de sementes, apenas os fungicidas pencicuron e azoxistrobim mantiveram maior eficiência.

Na análise de variância para porcentagem média de tombamento pós-emergência (Tabela 5A), houve interação entre os fungicidas e as formas de aplicação ( $P = 0,000$ ). O tratamento adicional diferiu dos demais, com alta significância ( $P = 0,000$ ).

Os fungicidas pencicuron e azoxistrobim não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos de sulco e semente. No entanto, os fungicidas fludioxonil, iprodione e procimidone foram os mais eficazes no tratamento de sulco, que no tratamento de sementes (Tabela 8). Para os fungicidas aplicados no tratamento de sulco, pencicuron apresentou melhor resultado, tombando-se apenas 1,33% das plântulas, enquanto azoxistrobim não foi eficiente para o controle da doença, com 30% de tombamento pós-emergência. No tratamento de semente o fungicida pencicuron manteve sua eficiência com 6% de tombamento, quando comparado aos demais, com no mínimo, 39,33%.

Para melhor visualização dos resultados foi agrupado cada fungicida nos dois tratamentos em relação à testemunha (Figura 7), observando-se o número de plântulas tombadas pós-emergência, diariamente. Observa-se, assim, que a testemunha apresentou maior número de plântulas tombadas, do terceiro ao oitavo dia de avaliação, que teve início oito dias após a semeadura e o pico de tombamento foi no quinto e sexto dias de avaliação, com 12 plântulas tombadas por dia.

O fungicida azoxistrobim ofereceu proteção na fase de germinação das sementes, favorecendo o índice de velocidade de emergência (IVE). Este fungicida pertence as estrobilurinas, constituído por inibidores naturais como estrobilurina A, oudemasina A e miscotiazol, secretados por Basidiomycetes

TABELA 7. Porcentagem média de tombamento pré-emergência em plântulas de cenoura tratadas por cinco fungicidas em duas formas de aplicação, para o controle de *Rhizoctonia solani*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Fungicida	Forma de aplicação	
	Sulco (%T) <sup>1</sup>	Semente (%T)
Pencicuron	19.88 b A	12.00 b A
fludioxonil	36.75 a A	30.50 a A
iprodione	14.25 b B	34.50 a A
procimidone	26.63 ab A	30.38 a A
azoxistrobim	13.88 b A	14.25 b A
Testemunha	41,25 *	

Médias com mesma letra, minúscula, nas colunas, e maiúscula, nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>1</sup> Porcentagem média de tombamento pré-emergência.

\* Significativo ( $P = 0,000$ )

TABELA 8. Porcentagem média de tombamento pós-emergência em plântulas de cenoura tratadas por cinco fungicidas em duas formas de aplicação, para o controle de *Rhizoctonia solani*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Fungicida	Forma de aplicação	
	Sulco (%T) <sup>1</sup>	Semente (%T)
Pencicuron	1,33 c A	6,00 b A
fludioxonil	22,00 ab B	54,67 a A
iprodione	4,67 bc B	58,00 a A
procimidone	10,67 bc B	50,67 a A
azoxistrobim	30,00 a A	39,33 a A
Testemunha	60,00 *	

Médias com mesma letra, minúscula nas colunas, e maiúscula nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>1</sup> Porcentagem média de tombamento pós-emergência.

\* Significativo ( $P = 0,000$ )

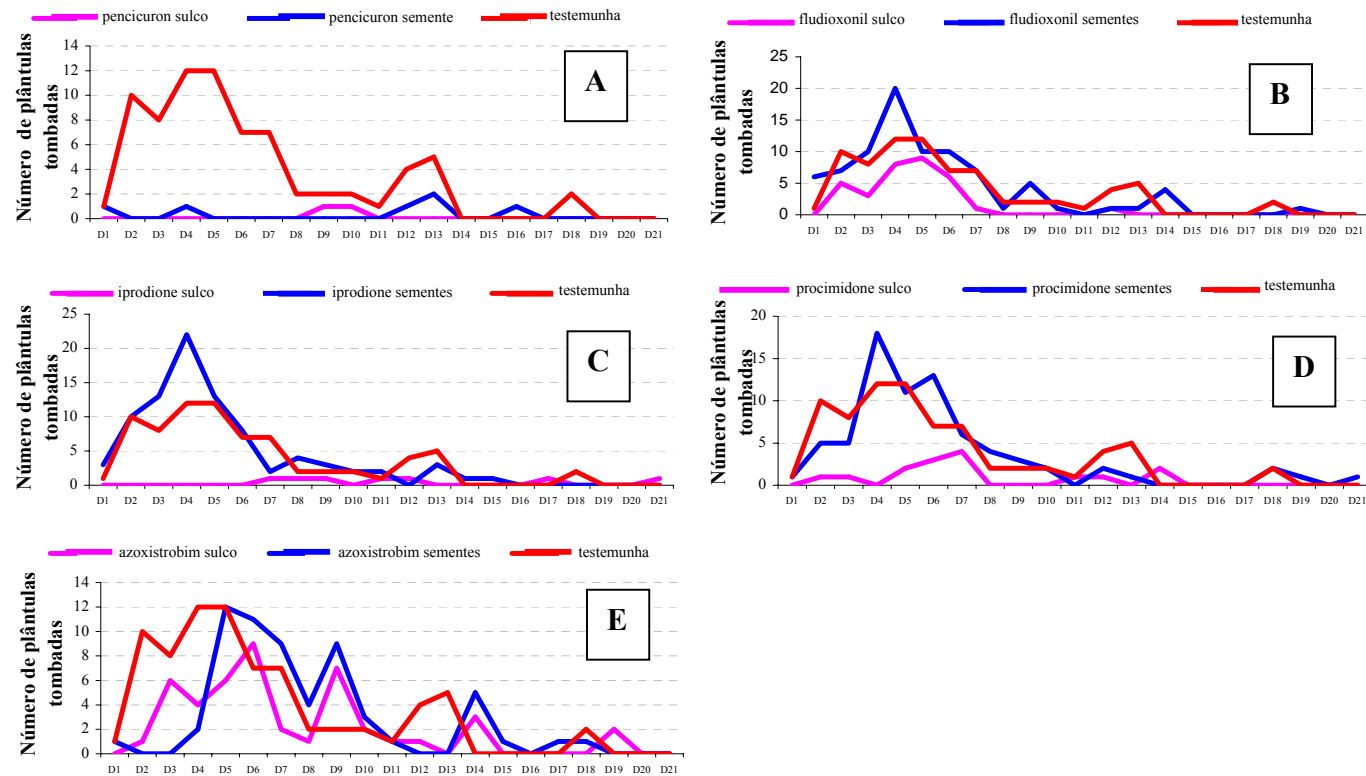


FIGURA 7. Comparação entre os fungicidas nos tratamentos de sulco e de semente em relação à testemunha. Observação diária do número de plântulas tombadas. A) pencicuron, B) fludioxonil, C) iprodione, D) procimidone, E) azoxistrobim. UFLA, Lavras, MG, 2006.

(Mizutani et al., 1995). As estrobilurinas controlam várias doenças fúngicas incluindo as causadas por Basidiomycetes, como o *Uromyces appendiculatus* (Gold et al., 1996). Não se têm relatos da utilização de estrobilurina no controle de Rhizoctonioses, entretanto, sua eficiência foi comprovada no presente trabalho.

Os melhores resultados avaliados pela porcentagem média de tombamento de pré-emergência estão compatíveis com os resultados encontrados para a variável índice de velocidade de emergência, comprovando-se a eficiência dos fungicidas pencicuron e azoxistrobim para os tratamentos de sulco.

Foi observado efeito significativo do tratamento de sulco e de sementes para o fungicida pencicuron, avaliando-se a porcentagem média de tombamento de pós-emergência. O fungicida pencicuron é o único produto comercial com registro no Ministério da Agricultura para o controle de *R. solani* em cenoura. Sua eficiência para o controle do patógeno já foi comprovada para outras culturas, como a do algodão que, utilizado em mistura tríplex com triadimenol e tolylfluanid, apresentaram boa proteção contra o tombamento, não sendo observada plântulas com sintoma (Goulart, 2002). A eficiência de pencicuron também já havia sido comprovada, na cultura do feijão, para isolados dos grupos de anastomose AG2-2, AG4 e de binucleadas, exceto para o AG2-1 em que o patógeno foi capaz de causar sintomas nas raízes e hipocótilo para as duas dosagens testadas (Sumner, 1987).

Ainda na porcentagem média de tombamento de pós-emergência, o fungicida iprodione utilizado no tratamento de sulco apresentou alta eficiência, tombando-se apenas 4,67% das plântulas emergidas. Quando utilizado no tratamento de sementes, apresentou maior porcentagem de tombamento, com 58% das plântulas com sintoma. Isso pode ter ocorrido pela utilização da dosagem recomendada para tratamento de sementes na cultura da cevada, única



cultura registrada para iprodione no tratamento de sementes, observando-se a subdosagem do produto (Agrofit, 2005).

#### **4.4 Patogenicidade de isolados-campo e isolados-testes para a cultura da cenoura**

Os resultados preliminares das análises de sementes e contaminação do solo estão descritos no item 4.2.

Os isolados diferiram significativamente para as variáveis índice de velocidade de emergência ( $P = 0,9930$ ) e porcentagem média de tombamento pós-emergência ( $P = 0,9944$ ) (Tabela 6A).

Em relação ao índice de velocidade de emergência, todos os isolados diferiram estatisticamente da testemunha não inoculada, a qual apresentou maior número de plântulas emergidas. Entretanto, os grupos de anastomose AG3, AG2-2IV, AG2-2IIIB e AG5 apresentaram-se como intermediário, com menor virulência. Para a variável porcentagem média de tombamento de pós-emergência, apenas o isolado B e o AG4 diferiram da testemunha com 50% e 53,98% de plântulas tombadas, respectivamente (Tabela 9).

No que tange ao índice de velocidade de emergência, a confirmação da patogenicidade dos diferentes grupos de anastomose na cultura da cenoura favorece a hipótese de que qualquer AG pode vir a causar perdas por tombamento na cultura, dependendo das condições edafo-climáticas e da agressividade do isolado. Os isolados-testes, provenientes de outras culturas, preservados por mais de dez anos, foram patogênicos à cenoura.

No presente estudo, o AG4 apresentou menor índice de velocidade de emergência, representando maior número de plântulas com tombamento de pré-emergência, em comparação ao AG5. Este teve maior índice de velocidade de emergência, aproximando-se mais da testemunha. O'Sullivan (1991) descreveu

TABELA 9. Dados médios de índice de velocidade de emergência (IVE), porcentual médio de tombamento em pós e pré-emergência na patogenicidade de isolados e grupos de anastomose de *Rhizoctonia solani*, na cultura da cenoura. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Isolados e AGs	IVE	%TPÓS	%TPRÉ
Isolado C	13,37 a	3,03 a	19,40 a
AG 6	13,59 a	16,97 a	15,00 a
AG 4	14,11 a	53,98 b	20,80 a
Isolado B	14,11 a	50,00 b	20,80 a
AG 7	14,13 a	18,18 a	20,40 a
AG 2-1	14,21 a	12,12 a	17,80 a
AG - BI	14,23 a	4,24 a	21,60 a
Isolado A	14,27 a	6,66 a	21,40 a
AG 1-1A	15,03 a	14,54 a	17,00 a
AG 3	15,25 a b	9,70 a	14,80 a
AG 2-2IV	15,34 a b	0,00 a	19,00 a
AG 2-2IIIB	15,40 a b	11,51 a	21,40 a
AG 5	16,01 a b	8,48 a	13,20 a
testemunha*	20,22 b	0,00 a	14,20 a

As médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

IVE= índice de velocidade de emergência; %TPÓS= % de tombamento pós emergência; %TPRÉ= % de tombamento pré emergência.

\*solo não inoculado

resultados semelhantes, observando que os grupos de anastomose AG4, AG5 e um grupo não identificado apresentaram maior agressividade em relação ao grupo AG2. Entretanto, há variação com base na fase em que ocorreu o

tombamento, tendo o AG4 sido mais agressivo em pré-emergência e o AG5 em pós-emergência.

Apesar da pequena variação entre os isolados quanto à agressividade, analisando-se a porcentagem média de tombamento pós-emergência, conclui-se que sua confiabilidade pode ser observada pelo fato de o isolado B, juntamente com o AG4, serem iguais estatisticamente, pois, na identificação do grupo de anastomose desse mesmo isolado, foi identificado como pertencente ao grupo 4 e confirmado pelo seqüenciamento. Associação da virulência de *R. solani* vem sendo estudada por vários autores, tendo maior virulência para o AG4, sido observada por Eken & Demirci (2004) para feijão na Turquia, na temperatura de 25°C. Para beterraba, a maior agressividade do AG4 foi entre as temperaturas de 12°C e 30°C (O'Sullivan, 1991) e, para soja, o grupo AG4 apresentou maior desenvolvimento da colônia a 20°C (Hrikrishnam & Yang, 2004). Portanto, o grupo AG4 está bem adaptado a longas faixas de temperaturas, podendo ocasionar doenças em diversas culturas. Entretanto, este experimento foi conduzido sob uma única temperatura de 20°C, o que pode ter sido desfavorável a outros grupos de anastomose, como o grupo AG2, que foi mais agressivo em beterraba (O'Sullivan, 1991) nas temperaturas entre 8°C e 15°C. Por sua vez, na cultura da cenoura, há relatos do grupo AG2 causando lesões na raiz entre 20°C e 28°C, não havendo dados da fase de tombamento (Mildenhall & Williams, 1973).

O município de São Gotardo, maior produtor de cenoura do estado de Minas Gerais, apresentou, no ano de 2005, alta variação de temperaturas de 12°C e 30°C (Figura 1). Assim, em caso de condições favoráveis para epidemias futuras pelo patógeno, grupos de anastomose que se mostraram pouco agressivos na temperatura de 20°C neste estudo poderão vir a causar danos. Pois, além da temperatura, o município é produtor de outras culturas também suscetíveis a *R. solani* dos mais variados grupos de anastomose.

## 5 CONCLUSÕES

- O isolado B pertence ao grupo de anastomose AG4, caracterizado como multinucleado e identificado como *Rhizoztonia solani*.
- Houve divergência entre a caracterização morfológica e molecular do isolado C.
- A metodologia de inoculação artificial foi eficiente com 72 mg de inóculo, quando aplicada a 10% do substrato do vaso na camada de 0 a 2 cm, causando tombamento de plântulas de cenoura.
- No controle de *R. solani* causando tombamento de pré e pós-emergência, o fungicida pencicuron foi eficiente para o tratamento de semente e de sulco.
- O fungicida azoxistrobim foi eficiente no controle de Rhizoctoniose apenas na fase de emergência das plântulas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Rhizoctonia solani* causa vários tipos de doença em cenoura, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta. Entretanto, é na fase de plântulas que ocorrem as maiores perdas, reduzindo o *stand* inicial do plantio, devido ao *damping-off*. Dessa forma, medidas de manejo devem ser direcionadas para reduzir a quantidade de inóculo no início do plantio. Como não são conhecidas cultivares resistentes ao tombamento de plântulas, o manejo da doença pode ser feito adotando-se os princípios de exclusão a partir de sementes saudáveis e ou proteção, utilizando-se o tratamento de sementes ou de sulco. Contudo, as metodologias empregadas na produção do inóculo para o desenvolvimento de trabalhos científicos ainda não estavam ajustadas para a cultura da cenoura, assim como, no Brasil, apenas um fungicida tem registro do Ministério da Agricultura para o controle de *R. solani* em cenoura.

Neste estudo, atingiu-se o objetivo no ajuste da metodologia para a inoculação artificial de *R. solani* em cenoura, em que a dosagem de 72 mg·kg<sup>-1</sup> de solo adicionado na camada de 0 a 2 cm, proporcionou uma boa formação de estande e, por outro lado, alto nível de tombamento pós-emergência das plântulas.

Na tentativa de adicionar outros princípios ativos ao controle de *R. solani* em cenoura, são necessários estudos mais específicos sobre cada produto químico testado, objetivando-se doses mais específicas para o tratamento de sementes e de sulco na cultura da cenoura.

Os estudos realizados foram desenvolvidos sob a temperatura de 20°C, entretanto, há relatos relacionando uma maior agressividade em outras temperaturas, dependendo do grupo de anastomose, sendo necessário testar a patogenicidade dos isolados de *R. solani* a outras temperaturas que também possam causar infecção do patógeno na cultura da cenoura.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL - Anuário da agricultura brasileira. 10. ed. São Paulo: FNP. Consultoria & Agroinformativos, 2006. 504 p.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. London: Academic Press, 2004. 922 p.
- AGROFIT. Ministério da agricultura e abastecimento. **Relatório de produtos formulados**. Disponível em: <<http://www.agrofit.com.br>>. Acesso em: 25 jul. 2005.
- ANDERSON, N. A. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 20, p. 329-347, 1982.
- BOLKAN, H. A.; RIBEIRO, W. R. C. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 69, n. 7, p. 599-604, July 1985.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.
- BRUGGEN, A. H. C. VAN; WHALEN, C. H.; ARNESON, P. A. Emergence, growth, and development of dry bean seedlings in response to temperature, soil moisture, and *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 76, n. 6, p. 568-572, June 1986.
- BURPEE, L. L.; GOULTY, L. G. Supression of brown patch disease of creeping bentgrass by isolates of nonpathogenic *Rhizoctonia* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, n. 6, p. 692-694, June 1984.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley, 1990. 532 p.
- CARBONE, I.; KOHN, L. M. Inferring process from pattern in fungal population genetics. **Applied Mycology & Biotechnology**, v. 4, fungal genomics. 30p. 2004.
- CARLING, D. E.; LEINER, R. H. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* on potato. **Phytopathology**, St. Paul, v. 80, n. 10, p. 930-934, Oct. 1990.

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

COOK, R. J.; PAPANDICK, R. J. Influence of water potencial of soils and plants on root diseases. **Phytopathology**, St. Paul, v. 10, p. 349-374, 1972.

DATNOFF, L.; LIANG, L.; ELLIOTT, C. In vitro effects of bicarbonates, potassium silicate and iprodione on radial growth of *Alternaria solani* and *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, p. 22, 1997. Supplement.

DELEN, N.; TOSUN, N. Fungicidas: mecanismo de ação e resistência. Parte 1: fungicida com modo de ação específicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, p. 43-69, 2003.

DELEN, N.; TOSUN, N. Fungicidas: mecanismo de ação e resistência. Parte 2: fungicida com modo de ação específicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 12, p. 27-90, 2004.

DORRANCE, A. E.; KLEINHENZ, M. D.; McCLURE, S. A.; TUTTLE, N. T. Temperature, moisture, and seed treatment effects on *Rhizoctonia solani* root rot of soybean. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 5, p. 533-538, 2003.

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

ESCANDE, A. R.; ECHANDI, E. Protection of potato from *Rhizoctonia* canker with binucleate *Rhizoctonia* fungi. **Plant Pathology**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 197-202, June 1991.

FENILLE, R. C; SOUZA, N. L. de. Efeitos de materiais orgânicos e da umidade do solo na patogenicidade de *Rhizoctonia solani* Kühn AG-4 ao feijoeiro. **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 10, p. 1959-1967, out. 1999.

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

GOLD, R. E.; AMMERMANN, E.; KOHLE, H.; LEINHOS, G. M. E.; LORENZ, G.; SPEAKMAN, J. B.; STARK-URNAU, M.; SAUTER, H. The synthetic strobilurin BAS 490F: profile of a modern fungicide. In: LYR, H.; RUSSEL, P. E.; SISLER H. D. (Ed.). **Modern fungicides and antifungal compounds**. Intercept Andoven, 1996. p. 79-92.

GONZALES, D.; CARLING, D. E.; VILGALYS, R.; CUBETA, M. A. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorfos. **Mycologia**, Bronx, v. 93, n. 6, p. 1138-1150, Nov./Dec. 2001.

GOULART, A. C. P. Efeito do tratamento de sementes de algodão com fungicidas no controle do tombamento de plântulas causado por *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 399-402, jul./ago. 2002.

HARIKRISHNAN, R.; YANG, B. Recovery of Anastomosis Groups of *Rhizoctonia solani* from different latitudinal positions and influence of temperatures on their growth and survival **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, n. 8, p. 817-823, Aug. 2004.

HARVESON, R. M.; RUSH, C. M. The influence of irrigation frequency and cultivars blends on the severity of multiple root disease in sugar beets. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, n. 8, p. 901-908, Aug. 2002.

HENZ, G. P.; LOPES, C. A. Doenças das Apiáceas. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas – hortaliças**. Viçosa, 2000. v. 2, p. 447-450.

HERR, L. J. Practical nuclear staining procedures for *Rhizoctonia* like fungi. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69, n. 9, p. 958-961, Sept. 1979.

Horticiencias

Cenoura: Área plantada caiu 38% no Estado. Disponível em: <<http://www.abhorticultura.com.br>>. Acesso em: 13 jan. 2006.

HUANG, J. W.; KUHLMAN, E. G. Recovery and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia*-like fungi in forest nursery. **Plant Disease**, St. Paul, v. 73, n. 12, p. 968-972, Dec. 1989.



JULIATTI, F. C. Manejo integrado de fungos fitopatogênicos. In: SILVA, L. H. C. P DA; CAMPOS, J. R.; NOJOSA, G. B. DE A. (Ed.). **Manejo integrado de doenças e pragas em hortaliças**. Lavras, UFLA, 2001. 346 p.

KATARIA, H. R.; VERMA, P. R.; GISI, U. Variability in the sensitivity of *Rhizoctonia solani* anastomose groups to fungicides. **Agriculture Canadian Research Station**, Saskatoon, 1991b.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, 774 p.

KOLLER, W. Chemical approaches to managing plant pathogens. In: RUBERSON, J. R. (Ed.). **Handbook of Intergrated Pest Management**. New York: Dekker, 1998. p. 1-38.

KURAMAE, E. E.; BUZETO, A. L.; CIAMPI, M. B.; SOUZA, N. L. Identification of *Rhizoctonia solani* AG1-1B in lettuce, AG 4 HG-1 in tomato and melon, and AG 4 HG III in broccoli and spinach, in Brazil. **European Journal of Phytopathology**, Dordrecht, v. 109, n. 4, p. 391-395, May 2003.

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

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicação**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 106 p. .

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138 p.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962.

MARTIN, S. B.; LUCAS, L. T.; CAMPBELL, C. L. Compative sensitivity of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia*-life fungi to selected fungicides in vivo. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, n. 7, p. 778-781, July 1984.

MASSOLA Jr., N. S.; MARTINS, M. C.; GIORIA, R.; JESUS Jr., W. C. Doenças da cenoura. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.;

BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, 663 p.

MICHEREFF FILHO, M.; MICHEREFF, S. J.; SILVA, E. B.; ANDRADE, D. E. G. T.; ANTUNES SOBRINHO, S.; NORONHA, M. A.; MARIANO, R. L. R. Influência de tipos de solo do estado de Pernambuco na intensidade da doença induzida por *Rhizoctonia solani* em feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 19-25, mar. 1996.

MILDENHALL, J. P.; WILLIAMS, P. H. Effect of soil temperature and host maturity on infection of carrot by *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 63, n. 2, p. 276-280, Feb. 1973.

MIZUTANI, A.; YUKIOKA, H.; TAMURA, H.; MIKI, N.; MASUKO, M. & TAKEDA, T. Respiratory characteristics in *Pyricularia oryzae* exposed to a novel alkoxyminoacetamide fungicide. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, p. 306-311, 1995.

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

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

O`SULLIVAN, E.; KAVANAGH, J. A. Characteristics and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia* spp. associated with damping-off of sugar beet. **Plant Pathology**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 128-135, Mar. 1991.

PAPAVIZAS, G. C.; ADAMS, P. B.; LUMSDEN, R. D.; LEWIS, J. A.; DOW, R. L.; AYERS, W. A.; KANTZES, J. G. Ecology and epidemiology of *Rhizoctonia solani* in field soil. **Phytopathology**, St. Paul, v. 65, n. 8, p. 871-877, Aug. 1975.

PAPAVIZAS, G. C.; DAVEY, C. B. Isolation and pathogenicity of *Rhizoctonia* saprophytically existing in soil. **Phytopathology**, St. Paul, v. 5, n. 8, p. 834-840, Aug. 1962.

SANFUENTES VON STOWASSER, E. A. **Caracterização de isolados, flutuação populacional e controle biológico de *Rhizoctonia* em jardim clonal**

de *Eucalyptus*. 2000. 106 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SANTOS, F. S.; SOUZA, P. E.; OLIVEIRA, C. A.; MAGALHÃES, F. H. L.; LAURENTI, M. A. Ajuste do inóculo de *Rhizoctonia solani* em substrato para estudos de Rizoctoniose em algodoeiro e feijoeiro. **Summa fitopatológica**, Botucatu, v. 31, n. 4, p. 373-375, 2006.

SILVA, J. B.; MATOS, J. A. R.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Efeito de bacterização de sementes de algodoeiro no controle de *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 342-348, set. 1996

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

SUMNER, D. R. Efficacy of pencycuron Against isolates representing different anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia*-life binucleadas fungi. **Plant Disease**, St. Paul, v. 71, n. 6, p. 515-518, June 1987.

TEMPLETON, A. R. Nested clade analysis of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 381-397, Apr. 1998.

VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C. de; VIDA, J. B. Importância do manejo integrado de doenças. In: SILVA, L. H. C. da; CAMPOS, J. R.; NOJOSA, G. B. de A (ed.). **Manejo integrado de doenças e pragas em hortaliças**. Lavras: UFLA, 2001. p. 39-90.

WEINHOLD, A. R. Population of *Rhizoctonia solani* in agricultural soils determined by a screening procedure. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, n. 4, p. 566-569, Apr. 1977.

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

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: UFV, 2000. v. 2

## ANEXOS

	<b>Página</b>
TABELA 1A - Resumo da análise de variância dos dados referentes ao índice de velocidade de emergência (IVE), porcentagem média de tombamento de pós-emergência (%TPÓS) e porcentagem média de tombamento de pré-emergência (%TPRÉ), provenientes da avaliação de métodos de inoculação para <i>Rhizoctonia solani</i> para solos cultivados com cenoura. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	59
TABELA 2A - Análise de variância dos dados referentes a somas de quadrados seqüenciais das densidades de inóculo dentro da forma de aplicação 1, inóculo adicionado a 100% do solo. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	59
TABELA 3A - Análise de variância dos dados referentes a somas de quadrados seqüenciais das densidades de inóculo dentro da forma de aplicação 2, inóculo adicionado a 10% do solo na superfície. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	60
TABELA 4A - Análise de variância dos dados referentes a somas de quadrados seqüenciais das densidades de inóculo dentro da forma de aplicação 3, inóculo adicionado à semente. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	60
TABELA 5A - Resumo da análise de variância dos dados referentes ao índice de velocidade de emergência (IVE), porcentagem média de tombamento de pós-emergência (%TPÓS) e porcentagem média de tombamento de pré-emergência (%TPRÉ), provenientes da avaliação da eficiência de fungicidas para o controle de <i>R. solani</i> em cenoura. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	61
TABELA 6A - Resumo da análise de variância dos dados referentes ao índice de velocidade de emergência (IVE), porcentagem média de tombamento de pós-emergência (%TPÓS) e porcentagem média de tombamento de pré-emergência (%TPRÉ), provenientes da avaliação da patogenicidade de isolados-campo e isolados-testes para	

a cultura da cenoura. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	61
TABELA 7A. Origem dos isolados publicados no banco de dados de <i>Rhizoctonia solani</i> . UFLA, Lavras, MG, 2006.....	62
TABELA 1B. Qualidade sanitária de sementes de cenoura da cultivar Brasília. Lavras, MG, 2006.....	63
TABELA 2B. Qualidade sanitária do substrato solo/areia (3:1), Latosolo Vermelho distroférico, horizonte B. Lavras, MG, 2006.....	63

## ANEXOS A

TABELA 1A - Resumo da análise de variância dos dados referentes ao índice de velocidade de emergência (IVE), porcentagem média de tombamento de pós-emergência (%TPÓS) e porcentagem média de tombamento de pré-emergência (%TPRE), provenientes da avaliação de métodos de inoculação para *Rhizoctonia solani* para solos cultivados com cenoura. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QMs e significância		
		IVE <sup>1</sup>	%TPÓS	% TPRE <sup>1</sup>
Densidade (D)	3	0,1008 <b>ns</b>	27,9716 *	2,0129 <b>ns</b>
Forma de aplicação (FA)	2	6,8605 *	12,7078 *	54,0996 *
D x FA	6	0,3421 <b>ns</b>	11,9455 *	3,3194 <b>ns</b>
Adicional vs. Fatorial	1	1,5749 *	87,3093 *	2,744 <b>ns</b>
Bloco	4	0,1117 <b>ns</b>	7,2475 <b>ns</b>	2,0041 <b>ns</b>
Erro	48	0,1879	3,0696	1,5033
CV (%)		18,79	34,94	39,33

<sup>1</sup> dados transformados para  $(Y+1)^{1/2}$

\* = teste F significativo ( $F \leq 0,05$ ).

**ns** = teste F não significativo ( $F \leq 0,05$ ).

TABELA 2A - Análise de variância dos dados referentes a somas de quadrados seqüenciais das densidades de inóculo dentro da forma de aplicação 1, inóculo adicionado a 100% do solo. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Causas de variação	GL	SQ	QM	Fc	Prob.<F
b1	1	30,4726	30,4726	9,25	0,004 *
b2	1	27,3770	27,3770	8,31	0,006 *
Desvio	1	1,1622	1,1622	0,35	0,556 <b>ns</b>
resíduo	44	144,9250	3,2937		

b1 : X

b2 : X<sup>2</sup>

\* = significativo ( $P \leq 0,01$ ).

**ns** = não significativo.

TABELA 3A - Análise de variância dos dados referentes a somas de quadrados seqüenciais das densidades de inóculo dentro da forma de aplicação 2, inóculo adicionado a 10% do solo na superfície. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Causas de variação	GL	SQ	QM	Fc	Prob.<F
b1	1	84,8919	84,8919	25,77	0,000 *
b2	1	4,5197	4,5197	1,37	0,248 ns
Desvio	1	2,6562	2,6562	0,80	0,374 ns
resíduo	44	144,9250	3,2937		

b1 : X

b2 : X<sup>2</sup>

\* = significativo (P≤0,05).

ns = não significativo (P≤0,05).

TABELA 4A - Análise de variância dos dados referentes a somas de quadrados seqüenciais das densidades de inóculo dentro da forma de aplicação 3, inóculo adicionado á semente. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Causas de variação	GL	SQ	QM	Fc	Prob.<F
b1	1	2,7727	2,7727	0,84	0,364 ns
b2	1	1,6800	1,6800	0,51	0,479 ns
Desvio	1	0,0603	0,0603	0,02	0,893 ns
resíduo	44	144,9250	3,2937		

b1 : X

b2 : X<sup>2</sup>

\* = significativo (P≤0,05).

ns = não significativo (P≤0,05).

TABELA 5A - Resumo da análise de variância dos dados referentes ao índice de velocidade de emergência (IVE), porcentagem média de tombamento de pós-emergência (%TPÓS) e porcentagem média de tombamento de pré-emergência (%TPRÉ), provenientes da avaliação da eficiência de fungicidas para o controle de *R. solani* em cenoura. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QMs e significância		
		IVE	%TPÓS	% TPRÉ
Fungicida (F)	4	165,6054 *	1902,9360 *	685,8412 *
Forma de aplicação (FA)	1	22,2044 ns	9799,7200 *	52,5312 ns
F x FA	4	64,7469 ns	1062,8789 *	315,2133 *
Adicional vs. Fatorial	1	169,1364 *	2253,6731 *	1464,5243 *
Bloco	4	41,9226 ns	221,8969 ns	56,9208 ns
Erro	40	45,0347	106,4673	63,2279
CV (%)		36,44	34,67	31,89

\* = teste F significativo ( $F \leq 0,05$ ).

ns = teste F não significativo ( $F \leq 0,05$ ).

TABELA 6A - Resumo da análise de variância dos dados referentes ao índice de velocidade de emergência (IVE), porcentagem média de tombamento de pós-emergência (%TPÓS) e porcentagem média de tombamento de pré-emergência (%TPRÉ), provenientes da avaliação da patogenicidade de isolados-campo e isolados-testes para a cultura da cenoura. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QMs e significância		
		IVE	%TPÓS <sup>1</sup>	% TPRÉ
Isolado	13	14,3311 *	8,6279 *	44,8439 ns
Bloco	4	10,0108 ns	1,3977 ns	56,6214 ns
Erro	52	5,2116	1,3627	39,3522
CV (%)		15,27	36,7	34,20

<sup>1</sup> dados transformados para  $(Y + 1)^{1/2}$



\* = teste F significativo ( $F \leq 0,05$ ).

ns = teste F não significativo ( $F \leq 0,05$ ).

TABELA 7A. Origem dos isolados publicados no banco de dados de *Rhizoctonia solani*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Isolado	Referência	Procedencia
AF354063	Mycologia 93 (6), 1138-1150 (2001)	México
U57744	Não publicado	Espanha
AB019026	J. Gen. Plant Pathol. 66, 2-11 (2000)	Japão
AY154311	Não publicado	Brasil
AB054861	Phytopathology 92, 43-50 (2002)	Japão
AF308621	Não publicado	Estados Unidos
AJ000201	FEMS Microbiol. Lett. 162 (2), 289-294 (1998)	Reino Unido
AF308622	Não publicado	Estados Unidos
AY387528	Não publicado	Espanha
DQ059576	Não publicado	Estados Unidos
AY387553	Não publicado	Espanha
AF153775	Mycologia 93 (4), 712-719 (2001)	Austrália
AJ24888	Não publicado	Espanha
AY684924	Não publicado	Taiwan
U57743	Não publicado	Espanha
U57741	Não publicado	espanha
AF354102	Mycologia 93 (6), 1138-1150 (2001)	México
AY634121	Não publicado	Estados Unidos
AF354081	Mycologia 93 (6), 1138-1150 (2001)	México
AF354099	Mycologia 93 (6), 1138-1150 (2001)	méxico
DQ102441	Não publicado	Israel
AF153793	Mycologia 93 (4), 712-719 (2001)	Austrália
AY684922	Não publicado	Taiwan
U57893	Não publicado	Espanha
AF354110	Mycologia 93 (6), 1138-1150 (2001)	México
AB000044	Curr. Genet. 32 (3), 237-243 (1997)	Japão
AF354105	Mycologia 93 (6), 1138-1150 (2001)	México
DQ102448	Não publicado	Israel
AF354092	Mycologia 93 (6), 1138-1150 (2001)	México
DQ102406	Não publicado	Israel
AB000040	Curr. Genet. 32 (3), 237-243 (1997)	Japão
AJ427404	Não publicado	Espanha

## ANEXO B

TABELA 1B. Qualidade sanitária de sementes de cenoura da cultivar Brasília. Lavras, MG, 2006.

Microrganismo	Incidência (%)
<i>Aspergillus</i> sp.	5,0
<i>Alternaria dauci</i>	1,0

TABELA 2B. Qualidade sanitária do substrato solo/areia (3:1), Latosolo Vermelho distroférico, horizonte B. Lavras, MG, 2006.

Microrganismo	Incidência (%)
<i>Rhizopus</i> sp.	4,0
<i>Trichoderma</i> sp.	3,0