

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E GENÉTICA
DE ISOLADOS DE *Rhizoctonia solani* E
ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS DE
GRUPOS DE ANASTOMOSE (AGs) EM
ALGODÃO**

AMANDA CABRAL CORRÊA DE OLIVEIRA

2009

AMANDA CABRAL CORRÊA DE OLIVEIRA

ANÁLISE MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Rhizoctonia solani* E ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS DE GRUPOS DE ANASTOMOSE (AGs) EM ALGODÃO

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, área de concentração em Controle de Doenças de Plantas, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Paulo Estevão de Souza

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

2009

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

Oliveira, Amanda Cabral Corrêa de.

Análise morfológica e genética de isolados de *Rhizoctonia solani* e estudos epidemiológicos de grupos de anastomose (AGs) em algodão / Amanda Cabral Corrêa de Oliveira. – Lavras : UFLA, 2009.

129 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Paulo Estevão de Souza.

Bibliografia.

1. *Rhizoctonia solani*. 2. Tombamento. 3. Algodão. 4. Epidemiologia. 5. Biologia molecular. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.5194

AMANDA CABRAL CORRÊA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE ISOLADOS DE
Rhizoctonia solani E ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS DE GRUPOS DE
ANASTOMOSE (AGs) EM ALGODÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, área de concentração em Controle de Doenças de Plantas, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 14 de agosto de 2009

Profa. Dra. Luiza Suely Sêmen Martins	UFRPE
Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza	UFLA
Prof. Dr. José da Cruz Machado	UFLA
Prof. Dr. João Almir Oliveira	UFLA

Prof. Dr. Paulo Estevão de Souza
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e a FAPEMIG pelo financiamento do projeto de tese.

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 Dr. Antônia dos Reis Figueira. Assim como, aos funcionários do Departamento e da Clínica Fitossanitária, Eliane, Vladimir e Rute.

À amizade, foram muitos os colegas durante essa caminhada. Primeiro nas disciplinas, alguns se mantiveram e novos surgiram na realização dos experimentos.

À cidade de Lavras que me acolheu e onde pude compartilhar de momentos maravilhosos da cultura e da família mineira.

À minha família que Eu amo muito, meus pais, Ervin e Guadalupe, pelo amor incondicional e educação, que levou-me a todas as conquistas de minha vida. Meu irmão, Erwinho, ao apoio e incentivo à pós-graduação e, claro, por ter nos dado o melhor presente, meus sobrinhos Pedro Henrique e Letícia. E ao meu querido José Alicio, que surgiu em minha vida como um presente de Deus.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	1
1 Introdução Geral.....	2
2 Referencial Teórico.....	5
2.1 Aspectos de variabilidade populacional de <i>Rhizoctonia solani</i>	5
2.2 Aspectos epidemiológicos da doença em algodoeiro	8
2.3 Aspectos gerais do manejo da doença	11
3 Referências Bibliograficas.....	15
CAPÍTULO 2: Análise morfológica, genética e patogenicidade de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> provenientes de regiões produtoras de algodão no Brasil.....	23
Resumo.....	24
Abstract.....	25
1 Introdução.....	26
2 Material e Métodos.....	29
2.1 Ensaio 1: caracterização morfológica dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> , obtidos de áreas produtoras de algodão no Brasil.	29
2.2 Ensaio 2: caracterização molecular dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> , obtidos de áreas produtoras de algodão no Brasil	31

2.3 Ensaio 3: determinação da patogenicidade dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> , obtidos das regiões produtoras de algodão no Brasil	35
3 Resultados e Discussão.....	37
3.1 Ensaio 1: caracterização morfológica dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> , obtidos de áreas produtoras de algodão no Brasil	37
3.2 Ensaio 2: caracterização molecular dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> , obtidos de áreas produtoras de algodão no Brasil	39
3.3 Ensaio 3: determinação da patogenicidade dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> , obtidos das regiões produtoras de algodão no Brasil	49
4 Conclusões.....	53
5 Referências Bibliográficas.....	54
CAPÍTULO 3: Influência da temperatura sobre isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> , obtidos em áreas produtoras de algodão, nos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais.....	59
Resumo.....	60
Abstract.....	61
1 Introdução.....	62
2 Material e Métodos.....	65
2.1 Ensaio 1: efeito da temperatura sobre crescimento micelial e produção de escleródios de <i>Rhizoctonia solani</i> , isolados de algodão	65
2.2 Ensaio 2: efeito da temperatura sobre a patogenicidade de <i>Rhizoctonia solani</i> , isolados de algodão	67
3 Resultados e Discussão.....	68
3.1 Ensaio 1: efeito da temperatura sobre crescimento micelial e produção de escleródios de <i>Rhizoctonia solani</i> , isolados de algodão	68

3.2 Ensaio 2: efeito da temperatura sobre a patogenicidade de <i>Rhizoctonia solani</i> , isolados de algodão	76
4 Conclusões.....	81
5 Referência Bibliográfica.....	82
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
ANEXO.....	87

RESUMO

OLIVEIRA, Amanda Cabral Corrêa de. **Análise morfológica e genética de isolados de *Rhizoctonia solani* e estudos epidemiológicos de grupos de anastomose (AGs) em algodão**. 2009. 129 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Conhecer os grupos de anastomose (AG) da população de *Rhizoctonia solani*, que causa tombamento e mela do algodoeiro no Brasil, é de fundamental importância para estudos morfológicos do patógeno e epidemiológicos da doença, podendo fornecer subsídios para o estabelecimento de medidas de controle mais eficientes no campo. Inicialmente, foram obtidos 51 isolados coletados em lavouras de algodão dos estados de Minas Gerais, Bahia, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e submetidos a estudos, com a finalidade de fazer a sua caracterização morfológica e molecular, para a obtenção dos AGs e determinar a sua patogenicidade. Para morfologia, 36 isolados foram identificados como *R. solani* AG-4 e dois como *R. solani* AG-7. Os 13 restantes não puderam ser classificados. Na análise molecular, confirmaram-se os 36 isolados e mais 10 como AG-4. Os dois isolados AG-7 também foram confirmados, além de mais um. Dois isolados foram caracterizados como *Rhizoctonia* spp. binucleada sendo um isolado AG-P e um isolado AG-A. Quanto à patogenicidade, observou-se que 92% dos isolados foram patogênicos e 51% (18MG; 3BA; 1MS e 2GO) apresentaram alta agressividade, enquadrando-se entre as médias 3,4 a 3,9, na escala de notas. Com base nos resultados obtidos, foram selecionados 18 isolados, a serem testados nas temperaturas de 15°, 18°, 21°, 24°, 27° e 30°C. Avaliando-se o índice crescimento micelial (ICM), a produção de escleródios e a determinação de patogenicidade, constatou-se interação significativa entre isolados e temperaturas, nas três variáveis estudadas. Para ICM, observou-se relação com o modelo quadrático a 21°, 24° e 27°C, assim como melhor ajuste ao modelo linear de ICM a 30°C. O maior número de escleródios foi observado às temperaturas de 15° e 18°C, para todos os isolados, com exceção do isolado MS, que foi a 27°C. Verificou-se que 14 isolados (6 de MG; 2 da BA; 2 de GO; 3 de MT e 1 de MS) apresentaram maior severidade entre 24° e 27°C, ajustando-se ao modelo quadrático, enquanto três isolados (2 de MG e 1 de MT) não diferiram significativamente para as temperaturas avaliadas e apenas um isolado (BA 2 – I01) ajustou-se melhor ao modelo linear. Logo, maior severidade foi a 30°C.

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

ABSTRACT

OLIVEIRA, Amanda Cabral Corrêa de. **Morphological and genetic analysis of *Rhizoctonia solani* isolates and epidemiological studies of anastomosis groups (AGs) in cotton.** 2009. 129 p. Thesis (Doctorate in Phytopathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

The knowledge anastomosis groups (AG) of *Rhizoctonia solani* populations, which cause cotton damping-off and sudden death in Brazil, the pathogen morphological features and disease epidemiology foster the establishment of more efficient disease management strategies in the field. Initially, 51 isolates were obtained from cotton seedlings originated from crop fields in Minas Gerais (MG), Bahia (BA), Goiás (GO), Mato Grosso (MT) and Mato Grosso do Sul (MS). They were studied for their morphological and molecular features to determine the assigned AGs and pathogenicity. For morphology, 36 isolates were identified as *R. solani* AG - 4 and two as *R. solani* AG - 7. The remaining 13 strains could not be grouped to any AG. In the molecular analysis, the 36 AG4-match and 10 of the AG unmatched were all grouped as AG4. Both isolates previously assigned to AG – 7- and one AG-unmatch was grouped as AG-7. Two isolates were characterized as binucleate *Rhizoctonia* spp. and one of them assigned to AG – P and the other to AG – A. In regard to pathogenicity, 92% of isolates were pathogenic to cotton, 51% of which (18MG; 3BA; 1MS; 2GO) showed high aggressiveness, averaging 3.4 to 3.9 severity. Based on the obtained results 18 isolates were tested at temperatures of 15, 18, 21, 24, 27 and 30 °C for mycelial growth, sclerotium production and pathogenicity were evaluated. There was a significant interaction between isolates and temperatures for all three studied variables. For MGR, a better fit to the squared model at 21, 24 and 27 °C was observed. But also a better fit to the linear model and maximum MGR at 30 °C. The highest sclerotium count was observed at temperatures of 15 and 18 °C, for all isolates, except for a MS isolate for which the optimum temperature was 27 °C. Fourteen isolates (6 from MG; 2 from BA; 2 from GO; 3 from MT and 1 from MS) presented higher severity between 24 and 27 °C, better fitting to the squared model. However, three isolates (2 from MG; 1 from MT) were significantly similar for the evaluated temperatures and for only one isolate (BA 2 – I01), a better fit to the linear model was observed with consequent higher severity at 30 °C.

*Guidance Committee: Paulo Estevão de Souza – UFLA (Advisor) and Edson Ampélio Pozza - UFLA.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é cultivado em mais de sessenta países no mundo, distribuídos por todos os continentes, para produzir fibras e caroços. A fibra do algodão é o principal insumo têxtil mundial, com a produção estimada para a safra 2008/09 de 24,4 milhões de toneladas métricas em pluma. Os principais produtores são China, Índia, Estados Unidos, Paquistão e, em quinto lugar, o Brasil, com produção de 1,4 milhão de toneladas (Agrianual, 2009).

No centro-oeste brasileiro, o algodão tornou-se uma alternativa e também uma grande oportunidade de negócios, sendo utilizado na rotação de culturas com a soja. A segunda metade da década de 1990 foi um marco na migração da cultura do algodoeiro das áreas tradicionalmente produtoras para o cerrado brasileiro. Hoje, essa região responde por 95% da produção brasileira de algodão, tendo o estado de Mato Grosso como maior produtor.

O plantio no mês de novembro é recomendado para os estados da Bahia, Minas Gerais e Goiás. Nos chapadões de Goiás, o período pode ser ampliado até o final de dezembro, a exemplo dos vizinhos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, onde a época de semeadura recomendada é durante o mês de dezembro (Agrianual, 2009; Embrapa, 2009).

Durante a semeadura, vários fatores podem reduzir o *stand* de plantas, entre eles as doenças, principalmente o tombamento, ou *damping-off*, causado por diversos patógenos. O tombamento de plântulas de algodão tem sido responsável pela redução da população de plantas no campo e pela elevação dos custos de produção, causando prejuízos consideráveis (Pozza & Juliatti, 1994; Suassuna & Coutinho, 2007). Dentre os agentes etiológicos associados ao tombamento de plântulas, destaca-se *Rhizoctonia solani* Kühn. Em áreas infestadas com o fungo, o plantio, mesmo utilizando sementes de qualidade,

torna-se inviável, pois o patógeno sobrevive por vários anos no solo, na forma de escleródios (Marcos Filho, 1994). Este fungo infecta as sementes e as plântulas de algodoeiro, causando o tombamento de pré e pós-emergência (Sinclair, 1965; Moustafa-Mahmoud et al., 1993). Recentemente, foi observada a sintomatologia de “mela do algodoeiro”, em plântulas com até 45 dias, após a emergência, encontradas mortas e com os folíolos presos às hastes. (Medeiros & Oliveira, 2007)¹

Sabe-se que a espécie *R. solani* é dividida em subgrupos baseados na formação de anastomoses das hifas, sendo essa uma manifestação de compatibilidade ou incompatibilidade somática entre os isolados. As diferenças entre grupos e subgrupos de *Rhizoctonia* spp. são frequentemente associadas a diferentes comportamentos ecológicos e epidemiológicos e, conseqüentemente, a variações na virulência dos isolados (Anderson, 1982; Ogoshi, 1987). Assim, poderá estar ocorrendo variabilidade nos isolados de *R. solani* que estão causando doença nos plantios de algodão nos campos brasileiros, tanto nos sintomas de tombamento (sintoma típico) como nos de mela (sintoma atípico).

A temperatura pode influenciar a severidade da doença, tendo papel fundamental para o desenvolvimento da planta, pois ela não somente tem efeito marcante sobre a velocidade de germinação, como também sobre a atuação do patógeno. Por ser um patógeno que ataca, principalmente, na fase inicial de desenvolvimento da planta, o período durante o qual a cultura é suscetível à infecção é relativamente curto (Tanaka, 1994; Goulart, 2001). Outra preocupação está na sobrevivência saprofítica e na virulência dos isolados, pois não há uma regra para seu comportamento com o aumento ou a redução da temperatura. Entretanto, na literatura, a rhizoctoniose é citada como sendo mais severa entre temperaturas de 18° a 30°C e alta umidade no solo nos primeiros 20

¹ Comunicação pessoal. Medeiros, F. H. e Oliveira, A.C.C, 2007. Projeto de Tese Lavras: UFLA/DFP, 2007.

dias após a emergência da plântula (Cia & Salgado, 2005), condições edafoclimáticas observadas em regiões de cultivo no centro-oeste, no período de plantio e no sistema de plantio direto (Wanjura & Buxton, 1972; Cassetari Neto & Machado, 2000).

Em vista dos aspectos levantados, objetivou-se, com a realização deste trabalho, caracterizar, quanto ao grupo de anastomose, isolados de *Rhizoctonia solani* em diferentes regiões de cultivo do algodão e avaliar o efeito da temperatura na morfologia e na virulência dos isolados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos de variabilidade populacional de *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani Kühn é a fase assexuada de *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk, um basidiomiceto da família Ceratobasidiaceae (Sneh et al., 1991), sendo a espécie mais estudada dentro do gênero. A descrição original de *R. solani* foi formulada por Kuhn (1858), entretanto, atualmente, as características estudadas para classificação do patógeno seguem a descrição proposta por Parmeter & Whitney (1970). São elas: algumas tonalidades de marrom na pigmentação das hifas; compressão das hifas no local de formação dos septos; septos bem definidos; células multinucleadas e ramificação formando ângulo de 90° próximo do septo das células vegetativas nas hifas jovens, podendo, ainda, associarem-se características como células intumescidas, escleródios, hifas superiores a 5 µm de diâmetro, rápida taxa de crescimento micelial e patogenicidade.

A espécie *R. solani* apresenta de 3 a 28 núcleos em cada célula da hifa vegetativa, sendo também multinucleadas as espécies *R. zaeae* e *R. oryzae*. O gênero *Rhizoctonia* apresenta, ainda, outras espécies com células contendo apenas dois núcleos (binucleadas) que são agrupados no grupo taxonômico “Binucleated *Rhizoctonia* spp.” (BnR) (Sneh et al., 1991).

R. solani possui grupos de indivíduos relacionados, mas geneticamente isolados, os quais são agrupados com base na anastomose de hifas, sendo essa uma manifestação de compatibilidade somática entre os indivíduos (Anderson, 1982). Pode-se observar a fusão de hifas de isolados representando o mesmo grupo de anastomose (*anastomose group* - AG), enquanto essa reação pode ser inexistente com isolados representando diferentes AGs. Atualmente, são reconhecidos 14 grupos de anastomose de hifas em *R. solani* e numerosos subgrupos (Sneh et al., 1991; Carling et al., 2002).

A caracterização de grupos de anastomose e de grupos intraespecíficos (*intraspecific group* - ISG) baseada na morfologia, na fisiologia, na genética e na patologia representa resultados mais consistentes na tentativa de se obter padrões da variação genética existente em espécies de *Rhizoctonia*. Várias outras características podem ser empregadas para agrupar isolados de *R. solani* em AGs e ISGs. Dentre elas, o requerimento de vitaminas, taxa de crescimento micelial, temperatura ótima para crescimento e tipo de escleródio produzido, incluindo estudos de similaridade de sequência de bases do DNA na determinação de AGs (Ogoshi, 1987; Sneh et al., 1991).

Em trabalhos realizados anteriormente à década de 1970, há registro de correlação positiva entre diferentes AGs de *R. solani* e morfologia da colônia, assim como fisiologia e patogenicidade dos isolados; outros trabalhos contrastam com estes resultados, não encontrando correlação entre características culturais e patogenicidade de alguns AGs (O'Sullivan & Kavenagh, 1991).

Apesar de não terem hospedeiros específicos, os diferentes AGs possuem tendência a infectar um ou um grupo de hospedeiros. Logo, na cultura do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) há relatos de quatro grupos de anastomose causando doença. Entre eles está o grupo de anastomose AG-4, que é identificado frequentemente associado aos sintomas de tombamento de pré e pós-emergência (Moustafa-Mahmoud et al., 1993; Goulart, 2001; Santos et al., 2005) e, recentemente, o subgrupo AG-4 HGI tem sido especulado como o causador do sintoma denominado de “mela do algodoeiro” (Goulart, 2009)². Entretanto, o AG-4 apresenta distribuição mais ampla, em termos de plantas hospedeiras e de sintomas (Bolkan & Ribeiro, 1985; O'Sullivan & Kavanagh, 1991; Meinhardt et al., 2002; Kuramae et al., 2003). Isolados de AG-7 foram

² Comunicação pessoal. Goulart, A. C. P., 2007, Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS

registrados na Geórgia e no Mississippi (USA), também causando tombamento em algodoeiro (Baird, 1997; Baird et al., 2000). Além disso, o AG-7 já foi relatado causando doença em soja, arroz e rabanete, em Arkansas (USA) (Rothrock et al., 1993). Os isolados de *R. solani* AG-4 e AG-7 têm gama similar de hospedeiro, morfologia cultural e produzem sintomas similares, consequentemente, isolados AG-7, no Estados Unidos, podem ter sido equivocadamente identificados como AG-4 (Carling citado por Baird et al., 2000).³

Doubledee et al. (2006), estudando a diversidade de *R. solani* em algodão e arroz, também encontraram os grupos de anastomose AG-4 e AG-7, além do AG-11, obtidos tanto de amostras de sementes como de solo. E a caracterização do último grupo de anastomose, denominado como AG-13, foi obtida de raízes doentes em plantas de algodão em campos da Geórgia (Carling et al., 2002).

Na caracterização de grupos de anastomose também são empregados métodos moleculares. O operon, que codifica o RNA ribossomal (rDNA), foi extensivamente utilizado 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). Também é utilizada a sequência de nucleotídeos das regiões espaçadoras internas do rDNA (ITS1 e ITS2) que podem, 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 intraespecíficos (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 sequências de DNA, devido à quantidade e à reprodutibilidade das informações que encerram, são também utilizados para estudos de genética de populações de fungos (Carbone & Kohn, 2004). Meinhardt et al. (2002), com base na análise

³ Carling, observação pessoal, de um dos autores no artigo; (Baird et al., 2000).

de restrição da região ribossomal ITS1/5,8S/ITS2, produziram um padrão de bandas específico para o grupo de anastomose 4 (AG-4) e seus subgrupos. Esse padrão obtido permitiu identificar de cinco a onze genótipos entre os dezoito isolados de *R. solani* de feijão no estado de São Paulo. O AG-4 foi dividido em diferentes subgrupos com base em uma análise filogenética das regiões ITS1, ITS2 e 5.8S rDNA, por técnicas de sequenciamento (Kuninaga et al., 1997). O avanço das técnicas moleculares busca a possibilidade de identificar isolados de *R. solani* a partir de amostra de solo, não sendo necessário fazer o isolamento prévio do patógeno, diminuindo, assim, etapas fundamentais para estudos epidemiológicos (Lees et al., 2002).

Por meio de métodos filogenéticos, a análise da variação na sequência de DNA possibilitou examinar padrões ancestrais da diversidade genética atual encontrada (Carbone & Kohn, 2004). Conhecendo a história filogenética dos alelos é possível separar, entre um grupo de populações, eventos demográficos do passado dos eventos do presente (Templeton, 1998). Oliveira (2006), avaliando isolados padrão e isolados de campo, por árvore filogenética obtida com base na sequência de nucleotídeos, observou a aproximação entre os grupos de anastomose AG-4 e AG-7 que se agruparam com 93% de similaridade, enquanto o isolado de campo IB, caracterizado pela anastomose de hifas como AG-4, agrupou-se com 100% de similaridade com o próprio padrão AG-4.

2.2 Aspectos epidemiológicos da doença em algodoeiro

A espécie *R. solani* é frequentemente isolada de plantas doentes e do solo. Os isolados diferem quanto às suas características morfológicas, culturais e de patogenicidade. Essas diferenças são frequentemente associadas a variações na virulência de isolados de um mesmo grupo de anastomose (Ogoshi, 1987).

Por ser um fungo habitante natural do solo, conhecido como um fungo parasita necrotrófico, sobrevive como saprófita, colonizando matéria orgânica ou

na forma de escleródios (Ogoshi, 1987). Estudos de ecologia e de 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.

Sob determinadas condições, *R. solani* pode produzir estruturas de sobrevivência, formando tufos de células largas e curtas, denominados de escleródios. Depois de estabelecido na área, o fungo pode associar-se a vários hospedeiros e sobreviver em restos culturais e ser disseminado pela água da chuva ou de irrigação, por implementos agrícolas ou outros meios carregando solo contaminado, inclusive material propagativo (Agrios, 2004). Em áreas infestadas com o fungo, o plantio, mesmo utilizando sementes de qualidade, pode ser inviável, devido à presença do patógeno na forma de escleródios (Marcos Filho, 1994).

Baixas temperaturas geralmente condicionam o aumento da severidade da doença, tendo papel fundamental para o desenvolvimento da planta, pois a temperatura não somente tem efeito marcante sobre a velocidade de germinação, como também sobre a atuação do patógeno. Sementes expostas a temperaturas subótimas germinam mais lentamente, aumentando a possibilidade de infecção (Tanaka, 1994). Além disso, nessas condições, há um aumento da concentração de açúcares e aminoácidos exsudados pelas sementes e plântulas, que estimulam a atividade de estruturas de resistência dos fungos, aumentando o potencial de inóculo (Hayman, 1969; Cia & Salgado, 2005).

A temperatura pode também influenciar a virulência de *R. solani*. Baird et al. (2000) relatam *R. solani* AG-7 causando lesões marrom-escuras em raízes de algodão e sua patogenicidade foi confirmada a 18° e 24°C. Já na comparação entre isolados de *R. solani* AG-7 oriundos de Arkansas USA), Índia e Japão e também com isolados AG-4, Baird et al. (1996) observaram que os isolados do Japão apresentaram maior crescimento radial a 30° e 35°C e o AG-4 não diferiu

significativamente a 30°C, concluindo ainda que separar AGs baseados em temperatura pode não ser possível. No Brasil, trabalhos com o patossistema *Rhizoctonia* vs. algodão, utilizando o grupo AG-4, foram desenvolvidos, à temperatura média de 22°C (Goulart, 2002) e 25°C (Santos et al., 2005). Na cultura da soja, *R. solani* AG-4 apresentou crescimento micelial crescente a partir de 5° até 30°C, entretanto, a produção de escleródios foi maior a 20° e 25°C, decaindo na temperatura de 30°C (Harikrishnan & Yang, 2004).

Outro fator importante e que pode influenciar as condições climáticas favoráveis ao patógeno é a escolha da cultivar, pois plantas com maior vigor, em baixas temperaturas, conseguem ter maior população de plantas, permitindo que as mesmas tenham resistência parcial à infecção do patógeno, como foi observado por Rethwisch et al. (2006) quando compararam variedades de algodão vs *Rhizoctonia*.

O micélio de *R. solani* não resiste a períodos prolongados com baixa umidade (Cook & Papandick, 1972). Michereff Filho et al. (1996) observaram 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, 2000). Bruggen et al. (1986) observaram aumento na severidade da rhizoctoniose em plântulas de feijão com o 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).

Na região centro-oeste do Brasil, o plantio de algodão é feito, principalmente, nos meses de novembro e dezembro, época de maior precipitação pluvial, objetivando um bom desenvolvimento da cultura (Embrapa, 2009). Nesse período, as temperaturas são elevadas, podendo favorecer não apenas a germinação das sementes de algodão, mas também a infecção por *R. solani*, dependendo do isolado e/ou do grupo de anastomose que possa estar adaptado a essas condições. Segundo Botelho et al. (2005), em diferentes

temperaturas (20°, 25° e 30°C) e umidades (100%, 75% e 50%) da capacidade de campo para isolado de algodão, onde não foi caracterizado o AG, observou-se que, na temperatura de 25°C, houve maior severidade. Por outro lado, não houve diferença significativa entre as diferentes lâminas de água aplicadas, sabendo-se que existem diferenças de virulência entre isolados e/ou grupos de anastomose. Este último ensaio poderia apresentar resultados diferentes, quando comparados vários isolados.

2.3 Aspectos gerais do manejo da doença

O tombamento, ou *damping-off*, está entre as principais doenças do algodoeiro (Menten & Paradela, 1996; Davis et al., 1997; Wang & Davis, 1997; Goulart & Melo Filho, 2000; Goulart, 2001). Vários fungos podem ser agentes etiológicos do tombamento de plântulas de algodoeiro, porém, *Rhizoctonia solani* Kuhn. é considerado o principal dessa doença, seguido de *Fusarium* spp. e *Pythium* sp., considerados secundários, nas condições do Brasil (Tanaka et al., 1989; Tanaka & Menten, 1991; Santos et al., 1992).

As sementes de algodão, ao serem infectadas, podem apodrecer e morrer mesmo antes de iniciar o processo de germinação, caracterizando o tombamento de pré-emergência (Sinclair, 1965). As plântulas que conseguem emergir podem definharem em pouco tempo, em consequência da destruição das raízes ou, quando o sistema radicular permanece sadio, as lesões irregulares e deprimidas de coloração pardo-avermelhadas no hipocótilo podem estrangulá-lo, levando à morte da plântula, o que se chama tombamento de pós-emergência (Moustafa-Mahmoud et al., 1993). As plântulas sobreviventes geralmente originam plantas mais fracas com desenvolvimento retardado (Minton & Garber, 1983; Hillocks, 1992).

No Brasil, principalmente nos plantios do cerrado, o principal agente causal do tombamento de plântulas é *R. solani* grupo de anastomose AG-4,

devido à frequência de ocorrência (mais de 95% dos casos) e aos danos que causa na fase inicial de estabelecimento da lavoura (Goulart, 2001).

A recente sintomatologia de “mela do algodoeiro” vem sendo observada em plantios de algodão também no cerrado brasileiro, onde as plântulas conseguem ultrapassar a fase de tombamento, mas as mudas com 45 dias, em média, são encontradas em campo totalmente mortas e com os folíolos presos às hastes. Desse material é fácil se obter *Rhizoctonia solani*, mas, até o momento, não foi confirmado seu grupo de anastomose (Medeiros & Oliveira, observação pessoal).

A principal dificuldade em controlar doenças causadas por patógenos de solo, como 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 reduzir o inóculo inicial.

A resistência genética é uma possibilidade de manejo, entretanto, também tem algumas limitações, pois é preciso ter cultivares que apresentem alto vigor de germinação em baixas temperaturas, situação propícia ao patógeno, permitindo maior população de plantas e assim uma resistência parcial à infecção. Em algodão, os programas atuais de melhoramento priorizam cultivares desenvolvidas para o centro-oeste do Brasil, com resistência às principais doenças do algodoeiro (Freire & Farias, 2001). No entanto, a resistência a *R. solani* é uma tarefa difícil.

No Brasil, o primeiro relato do comportamento de cultivares de algodão na presença do patógeno foi feito por Goulart (2007), que observou menor incidência de tombamento e menor porcentagem de plântulas com sintoma da doença para as cultivares CNPA ITA 90 II e BRS Aroeira, seguidas da BRS Cedro. Rethwisch et al. (2006) verificaram que, em oito cultivares, mesmo tratadas com fungicidas, apenas uma, DPL 454BR, apresentou mais de 20.000 plantas vivas/acre.

Outra estratégia envolve a nutrição das plantas. A fertilização com sulfato de amônio proporcionou supressão da Rhizoctoniose em morango (Elmer & Lamondia, 1999) e feijão (Rodrigues et al., 2002), comparada com nitrato de cálcio e nitrato de sódio, respectivamente. Em beterraba, resíduo de nitrato no solo favoreceu a doença (Rush & Winter, 1990).

A fumigação reduz os efeitos nocivos da Rhizoctoniose, mas seu uso está proibido por diversas razões (Ghini et al., 2002). O tratamento térmico do solo, como a solarização, reduz o inóculo inicial ou o potencial de inóculo de *Rhizoctonia*. O aquecimento das camadas de solo induz processos envolvidos no controle de fitopatógenos, de forma a alterar a microbiota em favor de antagonistas, tornando o solo supressivo (Pullman et al., 1981; Ghini et al., 2002).

A incorporação de antagonistas à superfície das sementes de maneira dirigida é, portanto, uma alternativa que se busca para introduzir esses organismos em áreas nas quais agentes patogênicos estão estabelecidos, como parte de microflora do solo (Machado, 2000). A ação antagonista de *Trichoderma* spp. Ocorre, principalmente, em função da produção de metabólicos voláteis e não voláteis, como também pelo hiperparasitismo e pela competição por espaço, nutrientes e oxigênio (Martins Corder & Melo, 1998). Trabalhos no controle de *Rhizoctonia* spp. em sementes de algodão revelam que sementes tratadas com *T. harzianum* apresentaram porcentagens de germinação e emergência estatisticamente iguais às das sementes tratadas com os fungicidas carbendazim+thiram e carboxin+thiram e ainda proporcionaram a emergência de plântulas com mais vigor (Faria et al., 2003).

O tratamento de sementes com fungicidas vem sendo desenvolvido recentemente como manejo de socorro das infecções de semente e plântulas com *R. solani* em culturas como a da soja e a do algodão (Goulart, 2002; Dorrance, 2003; Goulart, 2007). Esses tratamentos têm mostrado resultados promissores,

entretanto, os melhores tratamentos, com até 100% de controle do tombamento, foram obtidos utilizando-SE mistura de fungicidas (triadimenol + pencycuron + tolylfluanid) que não apresentam registro para algodão no Ministério da Agricultura. O efeito da especificidade dos fungicidas contra *R. solani* é baseado na variabilidade e depende dos grupos de anastomose. Segundo estudos “*in vitro*”, nos quais isolados de quatro diferentes grupos de anastomose foram testados, observaram-se variáveis na sensibilidade a Carboxin, PCNB e triadimenfon, ao mesmo tempo em que muitos isolados são sensíveis a iprodione (Martin et al., 1984). Kataria et al. (1991) confirmam esses resultados e dividem esta sensibilidade de *Rhizoctonia* spp. em vários grupos de fungicidas.

Dentre o conjunto de práticas recomendadas no manejo de Rhizoctoniose, a rotação de culturas tem papel importante. A recomendação dessa prática requer cautela e estudos, pois o patógeno possui vasta gama de hospedeiros. É comum, ainda, o plantio de algumas espécies vegetais (aveia preta, tremoço e leguminosas), visando também aumentar o teor de matéria orgânica por meio da incorporação das plantas ao solo, antes da floração (Zambolim et al., 1999). Essa prática também favorece o desenvolvimento de saprófitas, alguns envolvidos no controle de *R. solani*. A eficácia dessa estratégia depende, ainda, do período durante o qual a cultura alvo não será cultivada na área infestada. Isso acarreta custo indireto para o produtor. A duração da rotação de culturas é variável, como se pode observar em recomendações para controle de *R. solani* (Prestes et al., 1999).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 4. ed. London: Academic, 2004. 635 p.

ALGODÃO brasileiro. Disponível em: <<http://www.algodao.agr.br/cms/index.php>>. Acesso em: 23 jul. 2009.

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

ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. São Paulo: FNP Consultorias e Agroinformativos, 2009. p. 157-169.

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

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

BAIRD, R. E.; CARLING, D. E.; MULLINIX, B. G. Characterization and comparison of isolates of *Rhizoctonia solani* AG-7 from Arkansas, Indiana, and Japão, and select AG-4 isolates. **American Phytopathological Society**, Saint Paul, v. 1, n. 1, p. 1421-1424, Jan./Dec. 1996.

BOLKAN, H. A.; RIBEIRO, W. R. C. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, n. 7, p. 599-604, July 1985.

BOTELHO, A. O.; SOUZA, P. E.; SANTOS, F. S.; OLIVEIRA, C. A.; BARRETO, S. S. Efeito de diferentes temperaturas e umidades do substrato sobre a severidade de *R. solani* em algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. S104, 2005. Suplemento.

BRUGGEN, A. H. C. V.; WHALEN, C. H.; ARNESON, P. A. Emergence, growth, and development of dry bean seedlings in response to temperature, soil moisture, and *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, n. 6, p. 568-572, June 1986.

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

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

CARLING, D. E.; LEINER, R. H. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* on potato. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, n. 10, p. 930-934, Oct. 1990.

CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A. Q. **Diagnose e controle de doenças do algodão**. Cuiabá: UFMT/FAMEV, 2000. 55 p.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 41-52.

COOK, R. J.; PAPANDICK, R. J. Influence of water potencial of soils and plants on root diseases. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 62, n. 3, p. 349-374, Mar. 1972.

DAVIS, R. M.; NUNEZ, J. J.; SUBBARAO, K. V. Benefits of cotton seed treatments for the control of seedling diseases in relation to inoculum densities of *Pythium* species and *Rhizoctonia solani*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 7, p. 766-768, July 1997.

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**, Saint Paul, v. 87, n. 5, p. 533-538, May 2003.

DOUBLEDEE, M. D. **Examining the diversity of *Rhizoctonia solani* from cotton and rice fields**. Missouri: Southern State University1, [200?]. Disponível em: <http://www.dep.anl.gov/p_undergrad/ugsymp/2006_abstracts/188.html>. Acesso em: 22 mar. 2007.

ELMER, W. H.; LAMONDIA, J. A. Influence of ammonium sulfate and rotation crops on strawberry black root rot. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, n. 2, p. 119-123, Feb. 1999.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Cultura do algodão no cerrado**. Campina Grande, 2003. (Sistemas de Produção, 2). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoCerrado/index.htm#topo>>. Acesso em: 23 jul. 2009.

FARIA, A. Y. K.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; CASSETARI NETO, D. Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro submetidas a tratamentos químico e biológico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 121-127, jul. 2003.

FENILLE, R. C.; SOUZA, N. L. 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.

FREIRA, E. C.; FARIAS, J. C. F. Cultivares de algodão para o Centro-Oeste. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. (Org.). **Algodão: tecnologia de produção**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2001. p. 159-180.

GHINI, R.; SCHOENMAKER, I. A. S.; BETTIOL, W. Solarização de solo e incorporação de fontes de matéria orgânica no controle de *Pythium* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1253-1261, set. 2002.

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 *R. solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 399-402, jul./ago. 2002.

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

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

GOULART, A. C. P.; MELO FILHO, G. A. **Quanto custa tratar as sementes de soja, milho e algodão com fungicidas?**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2000. (Boletim de Pesquisa, 7).

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

HAYMAN, D.S. The influence of temperature on the exudation of nutrients from cotton seeds and on pre-emergence damping-off by *Rhizoctonia solani*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 47, n. 12, p. 1663-1669, Dec. 1969.

HILLOCKS, R. J. Seedling diseases. In: HILLOCKS, R. J. (Ed.). **Cotton diseases**. Wallington: CAB International, 1992. cap. 1, p. 1-38.

KATARIA, H. R.; VERMA, P. R.; GISI, U. Variability in the sensitivity of *Rhizoctonia solani* anastomose groups to fungicides. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 133, n. 2, p. 121-133, Feb. 1991.

KUHN, J. G. **Die krankheiten der kulturegewachse, ihre ursachen und ihre verhutung**. Berlin: Gustav Bosselmann, 1858. 312 p.

KUNINAGA, S.; NATSUAKI, T.; TAKEUCHI, T.; YOKOSAWA, R. Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**, New York, v. 32, n. 3, p. 237-243, Sept. 1997.

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 Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 4, p. 391-395, July/Aug. 2003.

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

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

MARCOS FILHO, J. Utilização de testes de vigor em programas de qualidade de sementes. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 4, n. 2, p. 33-35, 1994.

MARKET INFORMATION IN THE COMMODITIES AREA. **Cotton world statistics**. São Paulo: Info Comm, 1998. Disponível em: <<http://r0.unctad.org/infocomm/anglais/cotton/market.htm>>. Acesso em: 23 jul. 2009.

MARTINS, S. B.; LUCAS, L. T.; CAMPBELL, C. L. Comparative sensitivity of *Rhizoctonia solani* and rhizoctonia-like fungi to selected fungicides in vivo. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, n. 7, p. 778-781, July 1984.

MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. Antagonismo de *Trichoderma spp.* e *Verticillium dahliae* Kleb. in vitro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 1, p. 1-7, jan./apr. 1998.

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

MENTEN, J. O. M.; PARADELA, A. L. Tratamento químico de sementes de algodão para controle de *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 22, n. 1, p. 60, jan./mar. 1996.

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, jan./abr. 1996.

MINTON, E. B.; GARBER, R. H. Controlling the seedling disease complex of cotton. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 1, p. 115-118, Jan. 1983.

MOUSTAFA-MAHMOUD, S. M.; SUMNER, D. R.; RAGAB, M. M.; RAGAB, M. M. Interaction of fungicides, herbicides, and planting date with seedling disease of cotton caused by *Rhizoctonia solani* AG-4. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, n. 1, p. 79-86, Jan. 1993.

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, Jan./Mar. 1991.

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

OLIVEIRA, A. C. C. **Metodologia de inoculação, variabilidade e controle de *Rhizoctonia solani* na cultura da cenoura**. 2006. 63 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PARMETER JÚNIOR, J. R.; WHITNEY, H. S. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. In: PARMETER JÚNIOR, J. R. **Biology and pathology of *Rhizoctonia solani***. Berkeley: University of California, 1970. p. 7-19.

POZZA, E. A.; JULIATTI, F. C. Efeito do tratamento de sementes com fungicidas no controle de doenças iniciais do algodoeiro (*Gossypium Hirsutum* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 384-389, jan./abr. 1994.

PRESTES, A. M.; VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C.; COSTA, H. Rotação de culturas no manejo de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 7, n. 1, p. 369-405, jan./dez. 1999.

PULLMAN, G. S.; DEVAY, G. S.; GARBER, S. H. Soil solarization and thermal death: a logarithmic relationship between time and temperature for four pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, n. 12, p. 959-964, Dec. 1981.

RETHWISCH, M. D.; REAY, M.; TURINI, T. A.; SWAN, R. Interaction of Cotton Varieties and *Rhizoctonia solani*: Effects on Resultant Plant Populations, 2005. **Arizona Cotton Report**, Tucson, v. 145, p.175-177, July 2006.

RODRIGUES, F. de A.; CARVALHO, E. M.; VALE, F. X. R. Severidade da podridão-radicular de *Rhizoctonia* do feijoeiro influenciada pela calagem, e pelas fontes e doses de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1247-1252, set. 2002.

ROTHROCK, C. S.; WINTERS, S. A.; KINNEY, P. M. Occurrence of *Rhizoctonia solani* AG-7 in Arkansas. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, n. 8, p. 1262, Aug. 1993.

RUSH, C. M.; WINTER, S. R. Influence of previous crops on *Rhizoctonia* root and crown rot of sugar beet. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, n. 4, p. 421-425, May 1990.

SANFUENTES, 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, C. M.; ALVARENGA, A. P.; SILVA, R. F.; ZAMBOLIM, L. Influência do substrato e do tratamento fungicida na germinação e na incidência de fungos em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 151-154, maio/ago. 1992.

SANTOS, F. S.; SOUZA, P. E.; OLIVEIRA, C. A.; MAGALHÃES, F. H. L.; LAURENTI, M. A. Ajuste do inóculo de *R. solani* AG-4 em substrato para estudo de Rhizoctoniose em algodoeiro e feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.3 1, n. 4, p. 374-376, out./dez. 2005.

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

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

SUASSUNA, N. D.; COUTINHO, W. M. Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro. In: FREIRE, E. C. **Algodão no cerrado brasileiro**. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2007. p. 479-522.

TANAKA, M. A. S. Patógeno causadores de tombamento do algodoeiro e seus efeitos sobre a germinação das sementes em diferentes temperaturas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 29-33, jan./abr. 1994.

TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M. Comparação de métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 17, n. 3-4, p. 218-226, jul./set. 1991.

TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M.; MARIANNO, M. J. A. Inoculação artificial de sementes de algodão com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e infecção das sementes em função do tempo de exposição ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 15, n. 3/4, p. 232-237, jul./set. 1989.

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.

WANG, H.; DAVIS, R. M. Susceptibility of selected cotton cultivars to seedling disease pathogens and benefits of chemical seed treatments. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 18, n. 9, p. 1085-1088, Sept. 1997.

WANJURA, D. F.; BUXTON, D. R. Hypocotyl and radicle elongation of cotton as affected by soil environment. **Agronomy Journal**, Madison, v. 64, n. 4, p. 431-434, July/Aug. 1972.

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

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H. LOPES, C. A.; VALE, F. X. R. Doenças de hortaliças em cultivo protegido. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 196, p. 114-125, jan. 1999.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE MORFOLÓGICA, GENÉTICA E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Rhizoctonia solani* PROVENIENTES DE REGIÕES PRODUTORAS DE ALGODÃO NO BRASIL

RESUMO

O conhecimento dos grupos de anastomose e dos grupos intraespecíficos (ISG) de populações de *Rhizoctonia solani* pode elucidar importantes aspectos ligados à sua etiologia e epidemiologia, fornecendo subsídios para o estabelecimento de medidas de controle mais eficientes no campo. Neste trabalho, 51 isolados desse fungo foram coletados em lavouras de algodão dos estados de Minas Gerais, Bahia, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e submetidos a estudos, com a finalidade de fazer a sua caracterização morfológica e molecular e determinar a sua patogenicidade. Na caracterização morfológica, avaliaram-se o número de núcleos, a morfologia da colônia e a identificação do grupo de anastomose (AG) e, na genética, foram sequenciados e analisados os fragmentos genômicos contendo as regiões do 5,8S, do ITS1 e do ITS2. A análise da patogenicidade foi feita avaliando-se a severidade da doença, com o auxílio de uma escala de infecção com notas variando de 1 a 4, sendo a nota 1 conferida para a planta sadia e a nota 4 à planta exibindo o máximo de severidade da doença. Considerando-se o grupo de anastomose, 36 dos 51 isolados de *R. solani* estudados foram identificados como AG-4 e dois isolados como AG-7. Os 13 restantes não puderam ser classificados com base nesse parâmetro. Na análise molecular, que comparou os 51 isolados de algodão com isolados de *Rhizoctonia* do *GenBank*, confirmaram-se, além dos 36 isolados identificados, mais 10 como AG-4. Os dois isolados AG-7 também foram confirmados, além de mais um, sendo os três da mesma região, no norte de Minas Gerais (MG) e dois sido caracterizados como *Rhizoctonia* spp. binucleada, sendo um isolado AG-P, oriundo do norte de Minas e um isolado AG-A, da Bahia (BA). Quanto à patogenicidade, estatisticamente, verificou-se que cinco isolados (3MG e 2MT) não diferiram da testemunha. Seis isolados (3MG, 1MT e 2BA) demonstraram baixa agressividade, enquadrando-se entre as médias 1,44 e 1,96. Agressividade intermediária foi observada em 16 (10MG, 4MT, 1BA e 1MS) e alta agressividade em 24 isolados (18MG; 3BA; 1MS; 2GO), que se enquadraram entre as médias 2,52 a 3,3 e 3,4 a 3,9, respectivamente. Observou-se que 92% dos isolados foram patogênicos e 51% destes apresentaram alta agressividade ao algodoeiro.

Palavras chave: *Rhizoctonia solani*. Tombamento. Algodão. Patogenicidade. Biologia molecular.

ABSTRACT

The understanding of anastomosis (AG) and infra-specific groups (ISG) of *Rhizoctonia solani* populations helps to elucidate important traits linked to its etiology and epidemiology, fostering the establishment of more efficient field disease management. In this work, 51 isolates were sampled from cotton growers located in Minas Gerais (MG), Bahia (BA), Goiás (GO), Mato Grosso (MT) and Mato Grosso do Sul (MS) States. Isolates were characterized in terms of morphology, gene sequence and pathogenicity. In the morphological characterization, the number of nuclei, colony morphology and AG identification were evaluated. The ITS1 and ITS2 from the 5.8S gene were sequenced and used for grouping inferences. The pathogenicity analysis was performed by evaluating the disease severity (ratings ranging from 1 to 4, where 1 were healthy seedlings and 4 for seedlings exhibiting maximum disease severity). Considering AGs, 36 out of 51 *R. solani* studied strains were identified as AG-4 and two of them as AG - 7. The 13 remaining strains could not be grouped with any of those. In the gene sequencing, which compared all 51 cotton isolates to the *Rhizoctonia GenBank*, the 36 above-mentioned strains as well as 10 of the AG unmatched ones were confirmed as AG-4, both isolates previously confirmed as AG - 7 as well as one AG unmatched were confirmed as AG - 7, and all those three AG - 7 isolates originated from the same geographical region (Northern MG State). Two isolates were characterized as binucleate *Rhizoctonia* spp., one of which was assigned to AG - P and was also originated from Northern MG and the other one was assigned to AG - A and originated from BA. In regard to the pathogenicity, five strains (3MG; 2MT) were statistically similar to the control. Six of them (3MG; 1MT; 2BA) demonstrated low aggressiveness and averaged 1.44 and 1.96 disease severity. An intermediate aggressiveness was observed for 16 isolates (10MG; 4MT; 1BA; 1MS) and a high severity for 24 isolates (18MG; 3BA; 1MS; 2GO) which averaged 2.52 to 3.3 and 3.4 to 3.9, respectively. Noteworthy 92% of all studied strains were pathogenic to cotton, 51% of which displayed high aggressiveness.

Keywords: *Rhizoctonia solani*. damping-off. Cotton. Pathogenicity. Biology.

1 INTRODUÇÃO

Rhizoctonia solani Kühn é a fase assexuada de *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk, um basidiomiceto da família Ceratobasidiaceae (Sneh et al., 1991). Este fungo infecta as sementes e as plântulas de algodoeiro, causando o tombamento em pré e pós-emergência (Sinclair, 1965; Moustafa-Mahmoud et al., 1993), além da recente sintomatologia de “mela do algodoeiro”, em que plântulas com aproximadamente 45 dias são encontradas mortas e com os folíolos presos às hastes (Medeiros & Oliveira, observação pessoal).

O conhecimento de características morfológicas, culturais, grupos de anastomose (AG) e de patogenicidade de populações de *R. solani* pode elucidar importantes aspectos ligados à sua etiologia e epidemiologia, fornecendo subsídios para o estabelecimento de medidas de controle mais eficientes no campo (Ogoshi, 1987).

A caracterização de grupos de anastomose (*anastomose group* - AG) e de grupos intraespecíficos (*intraspecific group* - ISG) pode ser baseada na morfologia, na fisiologia, na genética e na patologia, representando resultados mais consistentes na tentativa de se obter padrões da variação genética existente em espécies de *Rhizoctonia*. Várias outras características podem ser empregadas para agrupar isolados de *R. solani* em AGs e ISGs. Dentre elas, incluem-se requerimento de vitaminas, taxa de crescimento micelial, temperatura ótima para crescimento e tipo de escleródio produzido, incluindo estudos de similaridade de sequência de bases do DNA na determinação de AGs (Ogoshi, 1987; Sneh et al., 1991).

A anastomose de hifas é uma manifestação de compatibilidade somática entre os indivíduos que ocorre pela fusão de hifas de dois isolados, logo, pertencentes ao mesmo AG. Entretanto, essa reação pode ser inexistente, com isolados representando diferentes AGs (Anderson, 1982). Atualmente, são

reconhecidos quatorze grupos de anastomose de hifas em *R. solani* e numerosos subgrupos (Sneh et al., 1991; Carling et al., 1999).

Apesar de não terem hospedeiros específicos, os diferentes AGs tendem a infectar um ou um grupo de hospedeiros. Dentre eles, o AG-4 apresenta distribuição mais ampla, em termos de plantas hospedeiras e de sintomas (Bolkan & Ribeiro, 1985; O'Sullivan & Kavanagh, 1991; Meinhardt et al., 2002; Kuramae et al., 2003).

Em algodoeiro, o grupo de anastomose AG-4 é identificado frequentemente causando tombamento (Moustafa-Mahmoud et al., 1993; Goulart, 2001; Santos et al., 2005) e, recentemente, o subgrupo AG-4 HGI tem sido especulado como o causador do sintoma denominado de “mela do algodoeiro” (Goulart, dados não publicados). Isolados de AG-7 foram registrados na Geórgia e no Mississippi, EUA, também causando tombamento em algodoeiro (Baird, 1997; Baird et al., 2000). Os isolados de *R. solani* AG-4 e AG-7 têm gama similar de hospedeiro, morfologia cultural e produzem sintomas similares; conseqüentemente, isolados AG-7 nos Estados Unidos podem ter sido equivocadamente identificados como AG-4 (Baird et al., 2000).

Doubledee et al. (2006), estudando a diversidade de *R. solani* em algodão e arroz, também encontraram os grupos de anastomose AG-4 e AG-7, além do AG-11, obtidos tanto de amostras de sementes como de solo. E o último grupo de anastomose a ser identificado, foi o AG-13; os isolados foram obtidos de raízes doentes de algodoeiro em campos da Geórgia (Carling et al., 2002 a).

No Brasil, o principal agente causal do tombamento de plântulas é *R. solani* AG-4, devido à frequência com que ocorre (mais de 95% dos casos) e pelos danos que causa na fase inicial de estabelecimento da lavoura (Goulart, 2007). Entretanto, não foram encontrados relatos de *R. solani* AG-7, AG-11 e nem AG-13, associado ao algodoeiro no país.

Para inferir relações taxonômicas entre os diferentes AGs de *R. solani* por métodos moleculares, foi extensivamente utilizado o operon, que codifica o RNA ribossomal (rRNA) (White et al., 1990; Gonzáles et al., 2001), além da sequência de nucleotídeos das regiões espaçadoras internas do rDNA (ITS1 e ITS2) que podem, 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 intraespecíficos (AG-1-IA, 1-IB, 1-IC, 1-ID, 1-IE e 1-SE) baseados na técnica RFLP de rDNA e composições de isoenzimas. Os dados de sequências de DNA, devido à quantidade e à reprodutibilidade das informações que encerram, são também utilizados para estudos de genética de populações de fungos (Carbone & Kohn, 2004). Meinhardt et al. (2002), com base na análise de restrição da região ribossomal ITS1/5,8S/ITS2, produziram um padrão de bandas específico para o grupo de anastomose AG-4 e seus subgrupos, que permitiu identificar de cinco a onze genótipos entre os dezoito isolados de *R. solani*, obtidos de feijão.

Por meio de métodos filogenéticos, a análise da variação na sequência de DNA possibilitou examinar padrões ancestrais da diversidade genética atual encontrada (Carbone & Kohn, 2004). Oliveira (2006), avaliando isolados padrão e de campo, por árvore filogenética obtida com base na sequência de nucleotídeos, observou a aproximação entre os grupos de anastomose AG-4 e AG-7, com 93% de similaridade, enquanto entre IB e AG-4, agrupou-se com 100% de similaridade.

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

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Epidemiologia e Fitovirologia Molecular do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA).

2.1 Ensaio 1: caracterização morfológica dos isolados de *Rhizoctonia solani* obtidos de áreas produtoras de algodão no Brasil

2.1.1 Coleta e isolamento

Para a obtenção dos isolados, foram selecionadas regiões produtoras de algodão nos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, cujas lavouras tinham histórico de doenças causadas por *R. solani*. Em cada lavoura foram coletadas plantas em reboleiras com sintoma de tombamento e/ou mela. As plantas foram acondicionadas em sacos de papel e armazenadas em ambiente fresco. Em seguida, realizou-se o isolamento direto, a partir de fragmentos das plantas coletadas, utilizando-se placas de Petri preenchidas com 12 mL de meio de cultura ágar-água (AA). Após 24 e 48 horas, as colônias com hifas características de *Rhizoctonia* sp. foram repicadas para placas de Petri com 12 mL de meio batata-dextrose-ágar (BDA) e monitoradas por 15 dias, observando-se hifas septadas, não formação de esporos e, superficialmente, características típicas de colônia de *Rhizoctonia* sp. Em ambas as etapas, as placas foram incubadas em câmara de germinação (BOD), à temperatura de 20°C. Os isolados foram mantidos em tubos de ensaio com meio BDA, para posterior estudo de caracterização dos isolados.

2.1.2 Morfologia da colônia

Os isolados foram repicados para placas de Petri (9 cm) preenchidas com 12 mL de meio BDA e incubadas, à temperatura de 20°C, no escuro (Sanfuentes, 2000).

Após 15 dias, foram observadas a aparência das colônias, a formação de anéis concêntricos no micélio, a pigmentação e a presença de escleródios. Pequenos fragmentos contendo hifas características foram depositados em lâminas, coradas com azul de tripan 0,05% em lactofenol e examinados ao microscópio de luz (x 400). Foram realizadas, no mínimo, 25 medições, em cada isolado, para sua caracterização (Carling et al., 1987).

2.1.3 Número de núcleos

As hifas de culturas ativas dos isolados mantidos em BDA foram transferidas para lâminas coradas com Safranim-O (Bandoni, 1979, citado por Carling et al., 1987) ou, ainda, micélios crescidos por 2 dias, em meio líquido de batata-dextrose (BD), foram corados pelo método HCL-Giemsa (Herr, 1973), sendo, em seguida, transferidos para lâminas com tampão fosfato e observados ao microscópio de luz (x 400). Foram feitas, pelo menos, 50 observações por isolado (Carling et al., 1987).

2.1.4 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 flambadas contendo meio ágar-água 2% foram pareados os discos de micélio do isolado-teste (Tabela 1) e do isolado de campo, em extremidades opostas. As lâminas foram acondicionadas em câmara úmida e incubadas em BOD, a 20°C por 24-48 horas, monitoradas em microscópio de luz até a observação da sobreposição. Em seguida, as lâminas foram coradas com azul de tripan 0,05% em lactofenol e reexaminadas ao microscópio estereoscópio trinocular com câmara digital, quanto à anastomose da hifa. Para a certificação da anastomose, a fusão da parede celular e plasmalema, acompanhada da morte de células adjacentes (reação K), foi visualizada em, pelo menos, dez sítios de fusão para cada leitura

de anastomose positiva. Os isolados-testes foram os mesmos utilizados por Oliveira (2006).

TABELA 1 Origem dos isolados-testes de grupos de anastomose de *Rhizoctonia solani*

Código da cultura	Grupo de anastomose de hifas	Hospedeiro ou substrato de origem	Procedência	Cedido por:
CSIW	AG1-IA	Oriza sativa	China, Japão	¹ Z.L. LIU**
PS4	AG2-1	<i>Pisum sativum</i> L.	China, Japão	² 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	Beta vulgaris	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**

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

²Dr. Zoglin L. Liu and Dr. J. B. Sinclair, Plant Patology, University of Illinois 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
Fonte: Oliveira (2006)

2.2 Ensaio 2: caracterização molecular dos isolados de *Rhizoctonia solani* obtidos de áreas produtoras de algodão no Brasil

2.2.1 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 polivinil pirrolidona (PVP). 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, agitou-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, adicionaram-se 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 ficaram incubados em gelo durante 30 minutos, após a adição de 225µL de NH₄Ac 5M e homogeneização. Em seguida, a amostra foi centrifugada, 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, com incubação a -20°C, durante 30 minutos e centrifugação a 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%).

2.2.2 Amplificação dos fragmentos ITS 1, 5.8 S e ITS 2

Os fragmentos de DNA foram amplificados pela técnica PCR (*polymerase chain reaction*), utilizando-se um par de *primers* para as regiões do rDNA, denominados ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') e ITS 5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG'). A reação foi composta por 2µL do DNA, 5µL do tampão 10X (0,5M Tris-HCl, 0,7M KCl, 0,1M MgCl₂ pH 8,0), 1,5µL de MgCl₂ (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%).

2.2.3 Purificação e sequenciamento do DNA amplificado

A purificação do DNA foi feita direto do produto de PCR, utilizando-se o kit Wizard[®](Promega), seguindo-se as recomendações do fabricante. A qualidade e a concentração do DNA foram estimadas por eletroforese em gel de agarose (0,7%). Os isolados que não apresentaram bom resultado ou que apresentaram mais de uma banda foram repetidos, utilizando-se a purificação a partir do gel de agarose, também utilizando o kit Wizard[®](Promega), seguindo-se as recomendações do fabricante.

O sequenciamento foi realizado no Laboratório NBA, do Núcleo de Biologia Aplicada, Embrapa, Sete Lagoas, MG. Utilizando-se o par de *primers* ITS 4, ITS 5 e o kit Big Dye[®] (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento foi composta por 2µL do Mix Big Dye Terminator, 1µL do *primer* ITS4 ou ITS5, 2µL do tampão 5X (*buffer dilution*), 3,5µL de água ultrapura. O mix foi preparado sem a adição do DNA, distribuindo-se 8,5µL do mix em cada poço da

placa de sequenciamento de 96 poços e, em seguida, foi adicionado 1,5µL de DNA. A amplificação foi realizada no termociclador, utilizando-se o programa ABI, empregando-se 30 ciclos de 20 segundos a 96°C, 10 segundos de 50°C, 4 minutos a 60°C. Em seguida, realizou-se a purificação da reação de sequenciamento, adicionando-se 40µL de isopropanol a 75% (v/v), que foi homogeneizada e mantida no escuro por 15 minutos, centrifugada a 4.000 rpm por 45 minutos. Retirou-se o isopropanol, adicionaram-se 100µL de etanol a 70% e centrifugou-se, na velocidade máxima, por 10 minutos. Retirou-se o etanol e a placa foi seca por 15 minutos no escuro ao ar livre e mais 3 minutos em estufa, a 65°C. As amostras foram ressuspensas em 10µL de formamida Hi-Di, o DNA desnaturado por 5 minutos, esfriado em gelo e injetado no sequenciador ABI3100.

2.2.4 Análise das sequências

Após a correção, com o auxílio dos cromatogramas, as sequências foram analisadas, fazendo-se a comparação das mesmas entre si e com outros 15 isolados de *R. solani* disponíveis no Gene Bank (National Center For Biotechnology Information, 2009) [u1] (Tabela 2). Para o alinhamento múltiplo, foi utilizado o programa Clustalw (European Molecular Biology Laboratory, 2009) e, para a análise filogenética, foi utilizado o programa Mega 4.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, 2009). Foram construídas árvores filogenéticas, com bootstrap de 2.000 repetições, considerando-se somente os valores superiores a 50%.

TABELA 2 Origem dos isolados publicados no banco internacional de dado de *Rhizoctonia solani* e *Rhizoctonia* binucleada.

Isolados	Referência	AG*	Procedência
AB286941	Mycoscience 49, 93-114 (2008)	AG-P	Japão
AY684924	Não publicado	AG-4	Taiwan
DQ102449	Não Publicado	AG-4	Israel
EF429313	Não publicado	AG-A	China
AF354100	Mycologia 93 (6), 1138-1150 (2001)	AG-7	México
EF203246	Não publicado	AG-4	Vietnan
EF203248	Não publicado	AG-4	Vietnan
EF203251	Não publicado	AG-4	Vietnan
EU244842	Não publicado	AG-4	Suíça
FJ440198	Não publicado	AG-4	China
FJ746914	Não publicado	AG-4	Estados Unidos
FJ746938	Não publicado	AG-4	Estados Unidos
FJ746974	Não publicado	AG-4	Estados Unidos
AY270002	Não publicado	AG-4	GO, Brasil
FJ746939	Não publicado	AG-4	Estados Unidos

* AG = grupo de anastomose

2.3 Ensaio 3: determinação da patogenicidade dos isolados de *Rhizoctonia solani* obtidos das regiões produtoras de algodão no Brasil

A patogenicidade dos 51 isolados de algodão foi determinada utilizando-se o método *in vitro* (Eken & Demirci, 2004, modificado por Oliveira et al., 2008). Sementes de algodão da cultivar Delta Opal foram desinfestadas com NaOCl (1,0%), superficialmente, por cinco minutos e secas em câmara de fluxo laminar. Em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, preenchidas com 20 mL de meio AA, foram distribuídas 10 sementes de algodão de forma circular e, subsequentemente, no centro de cada placa, foi semeado um disco de 9 mm, provindo de colônias do patógeno com três dias de idades, desenvolvidas no escuro, a 20°C. A testemunha foi obtida sem a adição do disco de inóculo. As

placas foram, então, incubadas em BOD, à temperatura de 20°C, mantidas por quatro dias no escuro e por mais seis dias, em fotoperíodo de 12 horas.

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

Todos os isolados obtidos neste estudo foram depositados na micoteca do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

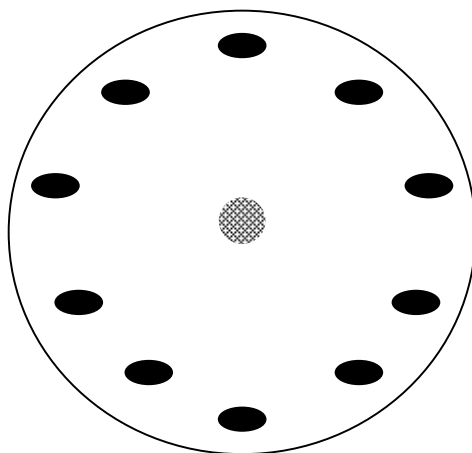


FIGURA 1 Modelo esquemático da unidade experimental. Placa de Petri de 15 cm (\varnothing), preenchida com 20 mL de meio agar-água, com dez sementes de algodão, distribuídas de forma circular e disco de meio de cultura acrescido de estruturas de *Rhizoctonia solani*, no centro da placa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio 1: caracterização morfológica dos isolados de *Rhizoctonia solani*, obtidos de áreas produtoras de algodão no Brasil

Foram considerados, neste estudo, 51 isolados, dos quais 20 foram obtidos na região norte de Minas e, ainda, 14 do Triângulo Mineiro, 6 da Bahia, 2 de Goiás, 7 do Mato Grosso e 2 do Mato Grosso de Sul, nas cidades descritas na Tabela 3. Os 51 isolados foram identificados como *R. solani*, pois apresentaram hifas septadas, bem definidas e foram observados mais de dois núcleos dentro de cada célula vegetativa da hifa, sendo então, classificada como multinucleada. As colônias apresentaram coloração de bege a marrom e todas produziram escleródios, obedecendo aos critérios de classificação baseados na citomorfologia da hifa e morfologia da colônia, sugeridos por Sneh et al. (1991)

Quanto ao grupo de anastomose, dos 51 isolados testados, 36 (70,59%) se comportaram como AG-4, sendo 14 da região norte de Minas, 11 do Triângulo Mineiro, 4 da Bahia, 1 de Goiás, 5 do Mato Grosso e 1 do Mato Grosso do Sul. O grupo de anastomose AG-4 apresenta distribuição ampla, em termo de plantas hospedeiras e de sintomas (Bolkan & Ribeiro, 1985; O'Sullivan & Kavanagh, 1991; Meinhardt et al., 2002; Kuramae et al., 2003). No algodoeiro, é frequentemente encontrado causando tombamento de pré e pós-emergência (Sinclair, 1965; Moustafa-Mahmoud et al., 1993; Goulart, 2007). Mais recentemente, especula-se ser o subgrupo AG-4 HGI o agente etiológico da “mela do algodoeiro” (Goulart, dados não publicados). Pertencentes a AG-7, apenas 2 isolados (3,92%), ambos do norte de Minas. Entretanto, o grupo de anastomose AG7 também é relatado causando tombamento em plântulas de

TABELA 3 Identificação, grupos de anastomose e procedência dos isolados de *Rhizoctonia solani*, obtidos de plântulas de algodão

Código da cultura	Grupo de anastomose	Procedência
MG 1 – I01	AG-4	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I02	AG-7*	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I03	AG-4	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I04	AG-4	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I05	AG-4	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I07	AG-P*	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I08	AG-4	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I09	AG-4	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I11	AG-7	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I14	AG-4*	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I15	AG-4	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I17	AG-4	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I19	AG-4	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I20	AG-4	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I21	AG-4	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I22	AG-7	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I24	AG-4*	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I25	AG-4	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I26	AG-4	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I28	AG-4	Buriatizeiro - MG
MG 2 – I01	AG-4	Presidente Olegário - MG
MG 2 – I03	AG-4	Presidente Olegário - MG
MG 2 – I05	AG-4	Presidente Olegário - MG
MG 2 – I06	AG-4	Presidente Olegário - MG
MG 3 – I01	AG-4*	Varjão de Minas - MG
MG 3 – I02	AG-4	Varjão de Minas - MG
MG 3 – I05	AG-4	Varjão de Minas - MG
MG 4 – I01	AG-4	Patos de Minas - MG
MG 4 – I02	AG-4*	Patos de Minas - MG
MG 4 – I03	AG-4	Patos de Minas - MG
MG 4 – I04	AG-4	Patos de Minas - MG
MG 5 – I01	AG-4	Uberlândia - MG
MG 6 – I01	AG-4*	Patos de Minas - MG
MG 7 – I01	AG-4	Uberlândia - MG
MT 1 – I01	AG-4	Nova Mutum - MT
MT 1 – I02	AG-4*	Nova Mutum - MT
MT 1 – I03	AG-4	Nova Mutum - MT
MT 1 – I04	AG-4	Nova Mutum - MT

...continua...

“Tabela 3, Cont.”

MT 1 – I05	AG-4*	Nova Mutum - MT
MT 2 – I01	AG-4	Nova Mutum - MT
MT 3 – I02	AG-4	Rondonópolis - MT
BA 1 – I03	AG-4	Roda Velha - BA
BA 1 – I05	AG-4	Roda Velha - BA
BA 1 – I06	AG-4*	Roda Velha - BA
BA 2 – I01	AG-4	Luiz Eduardo - BA
BA 2 – I02	AG-A*	Luiz Eduardo - BA
BA 3 – I01	AG-4	Luiz Eduardo - BA
GO 1 – I01	AG-4	Posse - GO
GO 1 – I02	AG-4*	Posse - GO
MS 1 – I01	AG-4	Dourados - MS
MS 2 – I03	AG-4*	Dourados - MS

* Isolados não caracterizados nos estudos morfológicos e sim pelos estudos moleculares.

algodão, por Baird (1997), Baird et al. (2000) e Doubledee et al. (2006). Neste trabalho, faz-se o primeiro relato do AG-7 causando tombamento no Brasil. Entretanto, os grupos de anastomose AG-4 e AG-7 apresentam grande semelhança na gama de hospedeiros, na morfologia da colônia e nos sintomas, consequentemente, dificulta a classificação correta dos isolados (Baird et al., 2000).

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

3.2 Ensaio 2: caracterização molecular dos isolados de *Rhizoctonia solani* obtidos de áreas produtoras de algodão no Brasil

Os primers ITS 4 e ITS 5 permitiram a amplificação de fragmentos com aproximadamente 700pb, obtendo-se as regiões ITS 1, 5,8S rDNA e ITS 2 completas, para 98% dos isolados de *R. solani* do algodoeiro estudados. As

sequências apresentaram entre 203 a 240pb na região ITS1, 155 a 163pb no gene 5,8S e 261 a 282pb na região ITS2.

Analisando-se a identidade de nucleotídeos entre os isolados estudados, nessas três regiões, observou-se que a maior variabilidade ocorreu nas regiões ITSs, enquanto a menor variabilidade foi observada na região 5,8S. Na região ITS1, as identidades variaram de 29% a 100%, entretanto, a maioria delas foi acima de 80% (Tabela 1, anexo). As menores identidades foram apresentadas pelos isolados BA2-I01 e BA2-I02, da Bahia e o MG1-I07, de Minas Gerais, que estão entre os isolados não caracterizados quanto ao seu grupo de anastomose. O MG1-I07 apresentou identidade de 29% com o BA2-I02 e identidades entre 69% e 71% com os demais isolados, e os dois isolados da Bahia apresentaram identidades entre si de 77% e de 69% a 99% com os demais isolados. Diversos isolados apresentaram 100% de identidade entre si, como os três isolados da Bahia, do município de Roda Velha (BA1-I01, BA1-I 05, BA1-I 06) e alguns isolados dos demais estados (GO1-I02, MG4-I03, MG4-04, MG1-01, MG1-I14, MG1-I17, MG1-I19, MG1-I24, MG6-I01, MS2-I03, MT1-I02, MT1-I03, MT1-I04 e MT1-I05). Destes 17 isolados, 11 foram caracterizados como AG-4 e 6 não apresentaram anastomose nos estudos morfológicos.

Comparando-se esses isolados com os 15 extraídos do banco internacional de dados, a menor identidade foi de 29% entre os isolados BA2-I02, da Bahia e o AB286941, do Japão, que é um isolado AG-P, e MG1-I07 de Minas Gerais e o EF429313, que é um isolado do tipo AG-A da China (Tabela 2B). Por outro lado, a identidade máxima, de 100%, foi obtida entre esse isolado da Bahia e o da China, e entre o de Minas Gerais e o do Japão. Identidades de 100% foram apresentadas também para os 17 isolados já citados, com os isolados EF203246, EF203248 e AY27002, estes classificados como AG-4 (Tabela 2). Outros isolados também apresentaram 100% de similaridade, como o FJ746974 e FJ746939 vs MG5-I01, MG1-I09 e MG1-I28, o isolado AY684924

vs MG1-I08 e MG1-I15, o isolado DQ102449 vs BA3-I01 e EF203251 vs BA2-I01, todos classificados como AG-4. Observou-se, ainda, que o isolado AF354100, que é classificado como AG-7, apresentou sua identidade máxima, de 98%, com os isolados MG1-I02, MG1-I11 e MG1-I22, dos quais 2 já haviam sido classificados com AG-7 nos estudos morfológicos. Segundo Kuninaga & Yokosawa, (1984) e Carling et al. (2002b), com valores de similaridade superiores a 85% na região ITS 1, os isolados podem ser considerados pertencentes a um AG e seus subgrupos. Logo, pode-se afirmar que os isolados de algodão desse estudo, pertencem aos grupos de anastomose citados.

Na região ITS2, novamente, os dois isolados da Bahia e o de Minas Gerais, com grupos de anastomose não identificados, apresentaram as maiores variações. As identidades do MG7-I01 variaram de 71% a 90% e as identidades dos isolados baianos, BA2-I01 e BA2-I02, com exceção das apresentadas como o MG7-I01, que foram de 71% e 84%, respectivamente, ficaram numa faixa 85% e 86% a 88% e 90%. Os demais isolados apresentaram identidades acima de 90% até 100% (Tabela 5B, 6B).

Na região 5,8 S, a identidade entre a maioria dos isolados foi acima de 90%, sendo de 100% para um grande número deles. Os isolados BA2-I01 e BA2-I02 apresentaram identidade mínima de 89%, tendo as identidades do segundo sido de 100% com diversos isolados. A variabilidade dessa região foi maior no MG1-I07, que apresentou identidades entre 75% e 90% (Tabela 3B, 4A).

Analisando-se as árvores filogenéticas baseadas na sequência de nucleotídeos das regiões ITS1 e ITS2, dos 51 isolados estudados e dos obtidos no GenBank (Figura 2, 3, 4 e 5), observa-se que os isolados AG-7 ficaram num mesmo grupo, juntamente com o isolado AF3354100, do México, também classificado dentro desse grupo. Quanto aos demais isolados, houve tendência de aparecer um

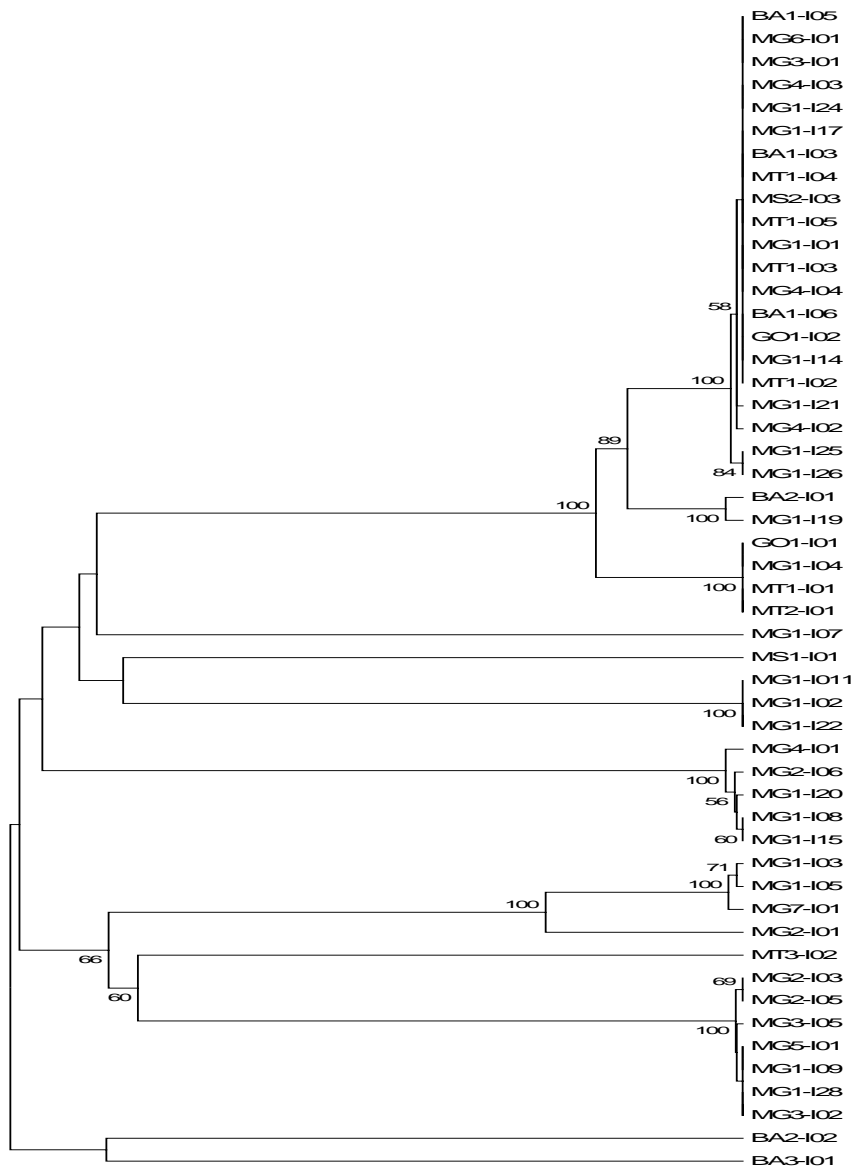


FIGURA 2 Árvore filogenética obtida com base nas sequências de nucleotídeos da região ITS 1 do rDNA de 51 isolados de *Rhizoctonia solani*. Os valores de *bootstrap* (UPGMA) foram obtidos por meio do programa MEGA versão 4.1, com 1.000 repetições, sendo mostrados os valores acima de 50%

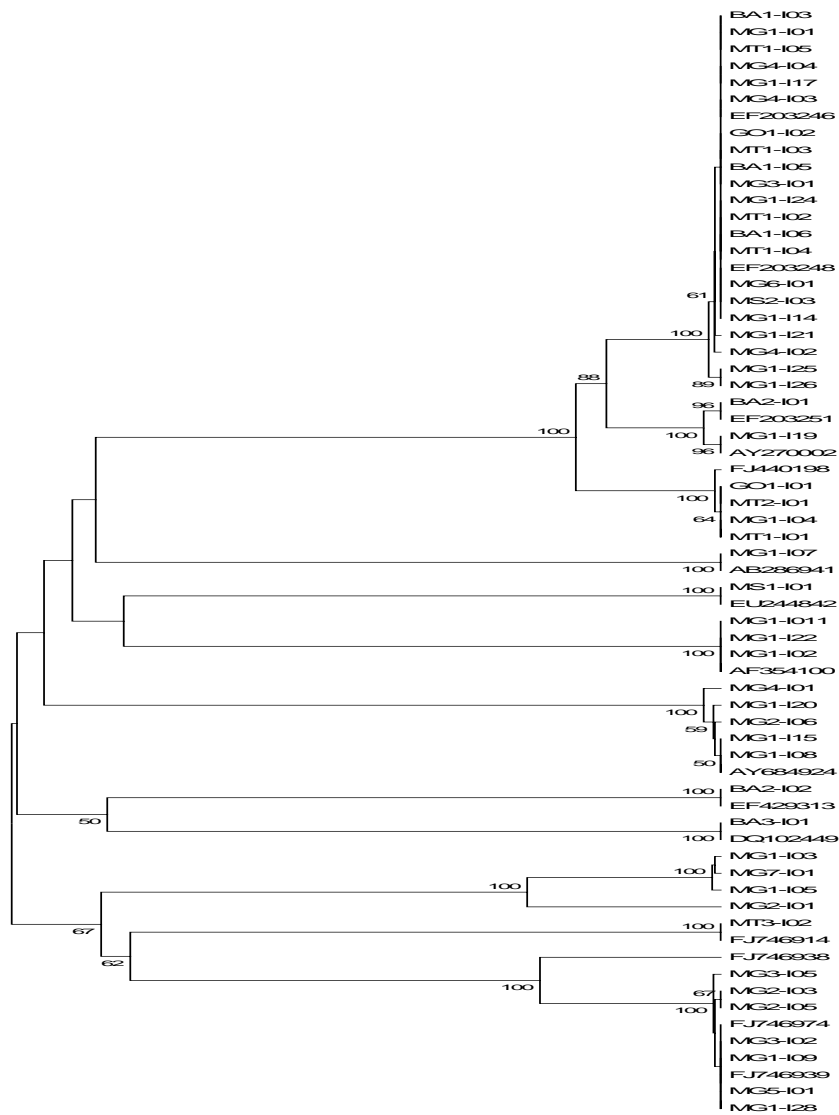


FIGURA 3 Árvore filogenética obtida com base nas seqüências de nucleotídeos da região ITS 1 do rDNA de isolados de *Rhizoctonia solani*, sendo 51 seqüenciados e estudados neste trabalho e os demais obtidos no *Gene Bank*. Os valores de *bootstrap* (UPGMA) foram obtidos por meio do programa MEGA versão 4.1, com 1.000 repetições, sendo mostrados os valores acima de 50%

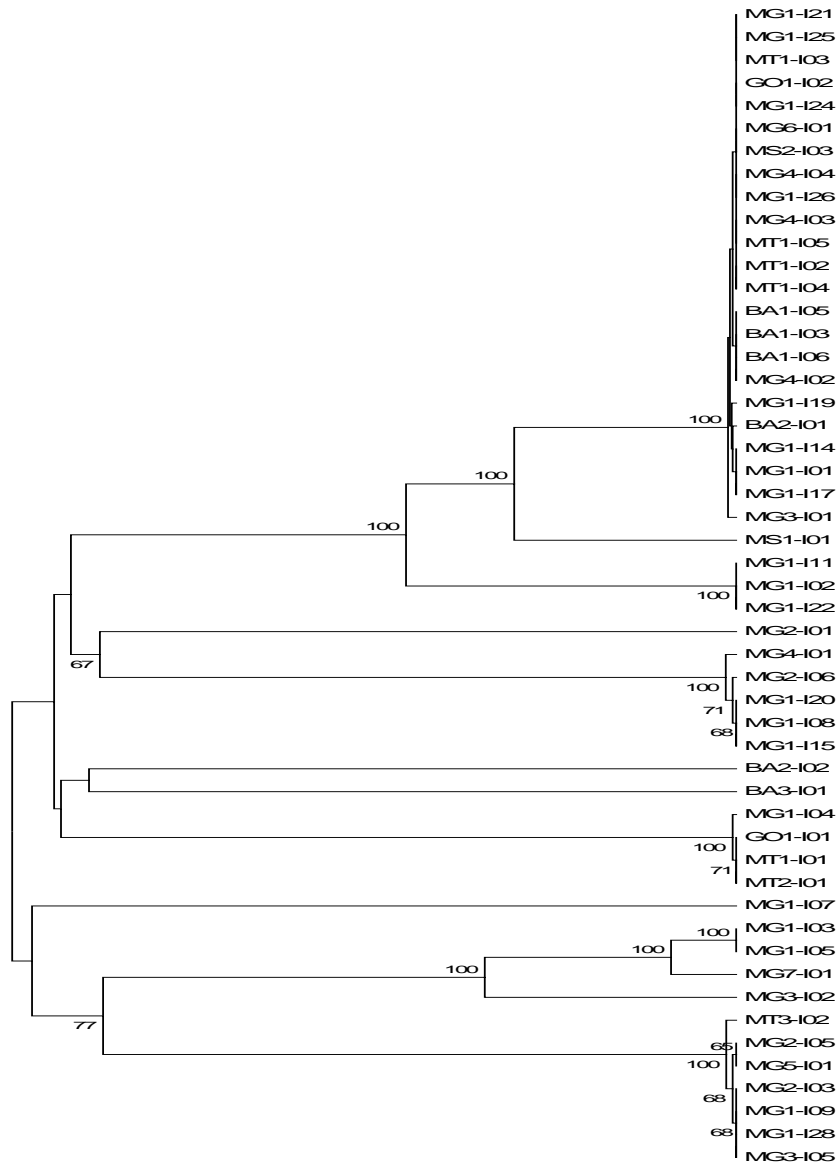


FIGURA 4 Árvore filogenética obtida com base nas sequências de nucleotídeos da região ITS 2 do rDNA de 51 isolados de *Rhizoctonia solani*. Os valores de *bootstrap* (UPGMA) foram obtidos por meio do programa MEGA versão 4.1, com 1.000 repetições, sendo mostrados os valores acima de 50%

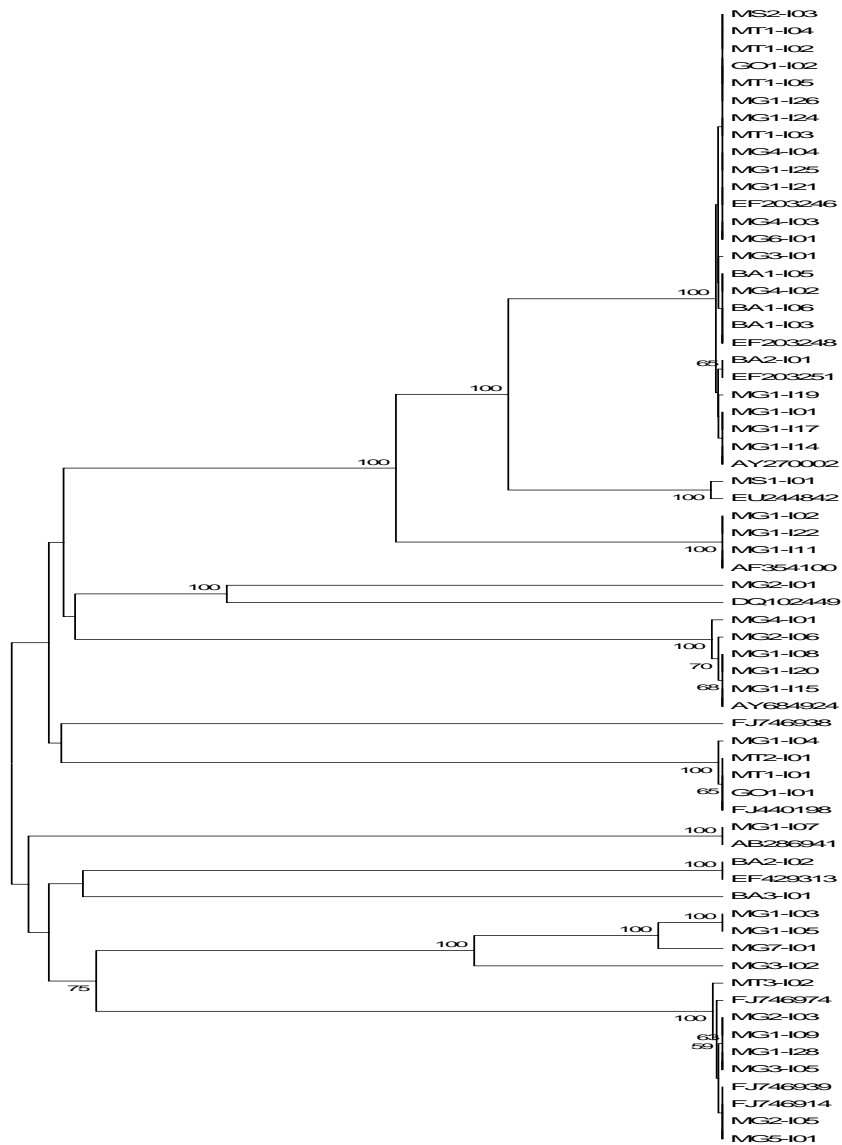


FIGURA 5 Árvore filogenética obtida com base nas seqüências de nucleotídeos da região ITS 2 do rDNA de isolados de *Rhizoctonia solani*, sendo 51 sequenciados e estudados neste trabalho e os demais obtidos no *Gene Bank*. Os valores de *bootstrap* (UPGMA) foram obtidos por meio do programa MEGA versão 4.1, com 1.000 repetições, sendo mostrados os valores acima de 50%

grupo com um maior número de isolados dentre os classificados como AG-4, sendo 27 do Brasil e 5 do GenBank, na árvore referente ao ITS1 (Figura 3) e 23 do Brasil e 4 do GenBank na referente ao ITS2 (Figura 5). A árvore construída com base nos nucleotídeos da região 5,8S para os 51 isolados sequenciados apresentou poucos subgrupos e todos com alta similaridade, ficando sem agrupamento apenas os isolados BA3-I01 e MG1-I07 (Figura 6). Para a árvore em que se encontravam os isolados do *Gene Bank*, os isolados do tipo AG-7 se agruparam com os AG-4 sem um padrão distinto entre eles (Figura 7). Entretanto, os agrupamentos observados não se deram por região geográfica nem apresentaram um padrão específico de comportamento, confirmando a proximidade entre isolados AG-4 e AG-7, observada por Oliveira (2006), quando estudou a árvore filogenética obtida com base na sequência de nucleotídeos, para isolados de cenoura obtidos em campo de grupos de anastomose padrão.

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

Os resultados apresentados sugerem que a análise genética das regiões ITS 1 e ITS 2 pode constituir um dos critérios para a separação de diferentes AGs, concordando com Rosa et al, (2005) que, utilizando a mesma região para o estudo de isolados de *R. solani* provenientes de batata, conseguiram separá-los tanto em grupos como subgrupos de anastomose. Meinhardt et al. (2002) para

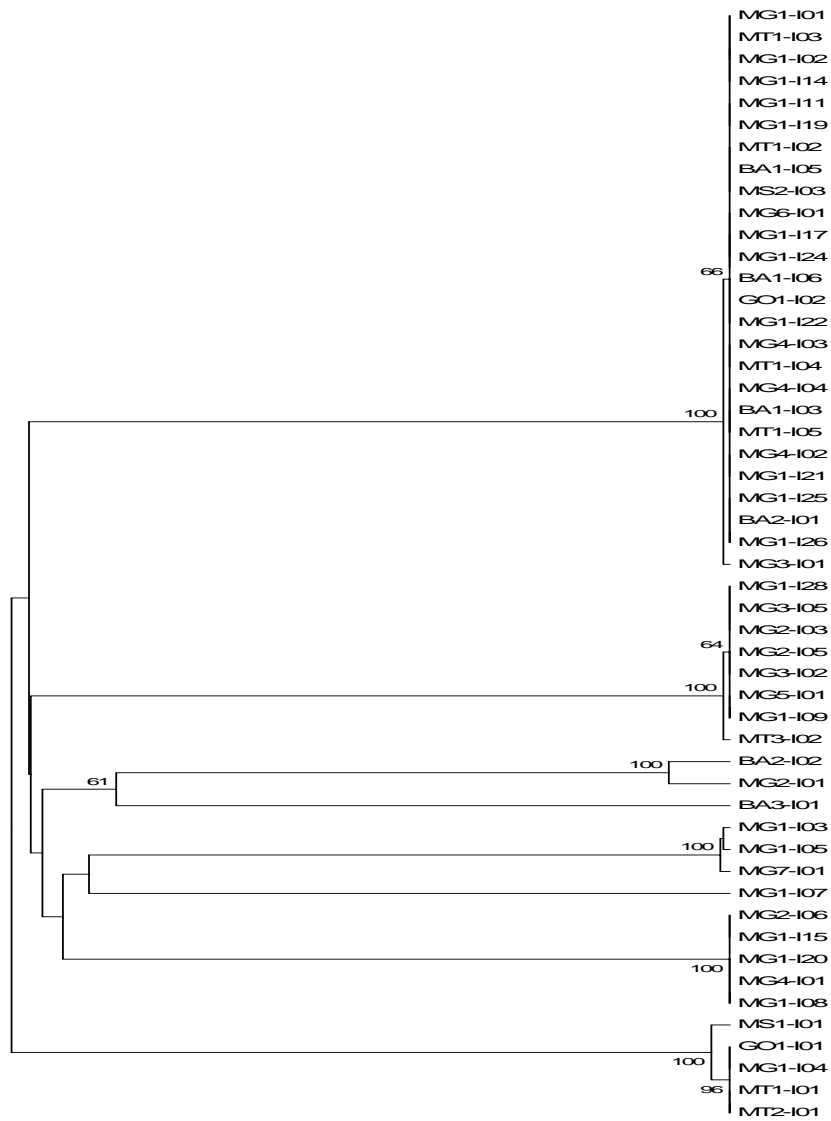


FIGURA 6 Árvore filogenética obtida com base nas sequências de nucleotídeos do gene 5,8S do rDNA de 51 isolados de *Rhizoctonia solani*. Os valores de *bootstrap* (UPGMA) foram obtidos por meio do programa MEGA versão 4.1, com 1.000 repetições, sendo mostrados os valores acima de 50%

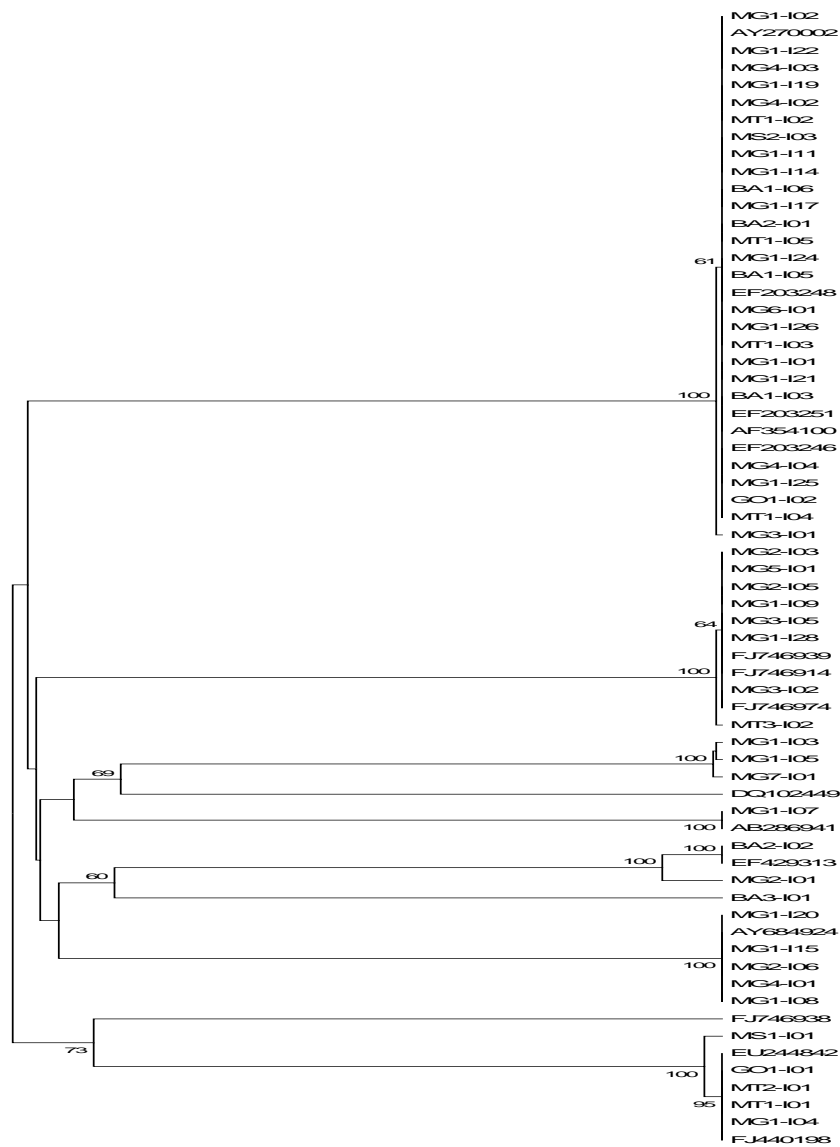


FIGURA 7 Árvore filogenética obtida com base nas seqüências de nucleotídeos do gene 5,8S do rDNA de isolados de *Rhizoctonia solani*, sendo 51 sequenciados e estudados neste trabalho e os demais, obtidos no *Gene Bank*. Os valores de *bootstrap* (UPGMA) foram obtidos por meio do programa MEGA versão 4.1, com 1.000 repetições, sendo mostrados os valores acima de 50%

isolados de feijão, obtiveram padrão de bandas capaz de separar o grupo AG-4 e seus subgrupos, entretanto, a técnica incluía não só PCR com também RFLP.

Logo, pela análise molecular, que comparou os 51 isolados de algodão a 15 isolados de *Rhizoctonia* do *GenBank*, confirmaram-se os 36 isolados e mais 10 como AG-4; os 2 isolados AG-7 também foram confirmados, além de mais 1, sendo os 3 isolados AG-7 da mesma região, no norte de Minas Gerais (MG) e 2 foram caracterizados como *Rhizoctonia* binucleada (espécie de *Rhizoctonia* com apenas dois núcleos) sendo um AG-P, oriundo do norte de Minas e um AG-A, da Bahia (BA). Nas árvores filogenéticas, os dois isolados binucleados permaneceram próximos a isolados multinucleados de *R. solani*.

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

3.3 Ensaio 3: determinação da patogenicidade dos isolados de *Rhizoctonia solani* obtidos das regiões produtoras de algodão no Brasil

Os isolados diferiram significativamente para a variável severidade da doença ($P = 0,00$) (Tabela 7B). Verificou-se, estatisticamente, que cinco isolados não diferiram da testemunha, sendo três do norte de Minas Gerais, dos quais pertenciam ao grupo de anastomose AG-7 e um AG-4, assim como mais dois isolados do Mato Grosso do grupo AG-4 (Tabela 4). Seis isolados demonstraram baixa agressividade, enquadrando-se entre as médias 1,60 e 1,96. Destes, três são do norte de Minas, sendo um AG-7 e dois AG-4, mais dois isolados da Bahia, sendo um AG-A e outro AG-4 e, ainda, um isolado do Mato Grosso, também pertencente ao grupo AG-4. Com agressividade intermediária de 2,52 a 3,30, enquadraram-se 16 isolados, sendo sete do norte de

TABELA 4 Dados médios da severidade da doença na patogenicidade de isolados de *Rhizoctonia solani*, em plântulas de algodão

Isolados	Médias
Testemunha	1,00 a
MG 1 – I11 (AG-7)	1,22 a
MG 1 – I20 (AG-4)	1,26 a
MT 2 – I01 (AG-4)	1,40 a
MG 1 – I22 (AG-7)	1,42 a
MT 2 – I03 (AG-4)	1,45 a
MG 1 – I02 (AG-7)	1,60 b
MG 1 – I04 (AG-4)	1,65 b
BA 2 – I02 (AG-A)	1,89 b
MG 1 – I21 (AG-4)	1,94 b
BA 3 – I01 (AG-4)	1,94 b
MT 2 – I02 (AG-4)	1,96 b
MS 2 – I03 (AG-4)	2,52 c
MG 1 – I17 (AG-4)	2,89 c
MG 1 – I07 (AG-P)	2,93 c
MG 1 – I09 (AG-4)	2,96 c
MG 1 – I25 (AG-4)	2,97 c
MG 2 – I01 (AG-4)	3,03 c
MG 2 – I06 (AG-4)	3,03 c
MG 1 – I01 (AG-4)	3,03 c
MG 1 – I26 (AG-4)	3,04 c
MT 2 – I05 (AG-4)	3,11 c
MG 3 – I05 (AG-4)	3,14 c
MG 1 – I19 (AG-4)	3,17 c
MT 3 – I02 (AG-4)	3,17 c
MT 1 – I01 (AG-4)	3,23 c
MT 2 – I04 (AG-4)	3,28 c
BA 1 – I05 (AG-4)	3,30 c
MG 3 – I01 (AG-4)	3,40 d
MG 1 – I05 (AG-4)	3,42 d
MG 1 – I15 (AG-4)	3,43 d
MG 1 – I03 (AG-4)	3,45 d
MG 1 – I14 (AG-4)	3,49 d
MG 4 – I04 (AG-4)	3,51 d
BA 1 – I03 (AG-4)	3,56 d
GO 1 – I02 (AG-4)	3,56 d
MG 4 – I02 (AG-4)	3,59 d
MG 1 – I28 (AG-4)	3,60 d

...continua...

“Tabela 4, Cont”

MS 1 – I01 (AG-4)	3,60 d
MG 7 – I01 (AG-4)	3,65 d
MG 5 – I01 (AG-4)	3,65 d
MG 4 – I03 (AG-4)	3,67 d
GO 1 – I01 (AG-4)	3,73 d
BA 1 – I06 (AG-4)	3,73 d
MG 6 – I01 (AG-4)	3,74 d
MG 2 – I05 (AG-4)	3,76 d
BA 2 – I01 (AG-4)	3,76 d
MG 4 – I01 (AG-4)	3,79 d
MG 1 – I08 (AG-4)	3,80 d
MG 3 – I02 (AG-4)	3,85 d
MG 1 – I24 (AG-4)	3,86 d
MG 2 – I03 (AG-4)	3,91 d

Minas e três do Triângulo Mineiro, quatro do Mato Grosso e, ainda, um da Bahia e outro do Mato Grosso do Sul. E, com alta agressividade, 24 isolados se enquadraram com médias entre 3,4 a 3,9, sendo 7 isolados do norte de Minas, 11 do Triângulo Mineiro, 3 da Bahia, 2 de Goiás e 1 do Mato Grosso do Sul, observando-se que todos pertenciam ao grupo AG-4. Logo, 92% dos isolados foram patogênicos e 51% deles apresentaram alta agressividade.

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

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

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

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

4 CONCLUSÕES

- A metodologia aplicada nos estudos morfológicos permitiu identificar 51 isolados como *R. solani*.
- Os grupos de anastomose identificados na caracterização morfológica foram confirmados na caracterização molecular.
- Houve divergência entre a caracterização morfológica e molecular para os isolados binucleados.
- Os isolados AG-4 foram encontrados em maior número e, na grande maioria, mais agressivos.
- O grupo de anastomose AG-7 foi identificado causando tombamento no Brasil.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

BANONI, R. J. Safranin as a rapid nuclear stain for fungi. **Mycologia**, New York, v. 71, n. 4, p. 873-874, July/Aug. 1979.

BOLKAN, H. A.; RIBEIRO, W. R. C. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, n. 7, p. 599-604, July 1985.

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

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

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

CARLING, D. E.; KUNINAGA, S.; BRAINARD, K. A. Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 1, p. 43-50, Feb. 2002b.

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

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

DOUBLEDEE, M. D. **Examining the diversity of *Rhizoctonia solani* from cotton and rice fields**. Missouri: Southern State University1, [200?]. Disponível em: <http://www.dep.anl.gov/p_undergrad/ugsymp/2006_abstracts/188.html>. Acesso em: 25 mar. 2007.

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

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

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

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

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

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

HERR, L. J. Disk-plate method for selection of *Rhizoctonia solani* Kuehn responsible for various symptoms of the root rot of Japanese radish. **Bulletin of the Shikoku Agricultural Experiment Station**, Zentsuju-Shi, v. 42, p. 1-11, Jan. 1973.

KUNINAGA, S.; YOKOSAWA, R. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn IV. Genetics relatedness within AG-4. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 50, n. 5, p. 322-330, June 1984.

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, July/Aug. 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**, Ontario, v. 15, n. 4, p. 272-280, Dec. 1993.

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

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

MOLLER, E. M.; 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.

MOUSTAFA-MAHMOUD, S. M.; SUMNER, D. R.; RAGAB, M. M.; RAGAB, M. M. Interaction of fungicides, herbicides, and planting date with seedling disease of cotton caused by *Rhizoctonia solani* AG-4. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, n. 1, p. 79-86, Jan. 1993.

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

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, Jan./Mar. 1991.

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

OLIVEIRA, A. C. C. **Metodologia de inoculação, variabilidade e controle de *Rhizoctonia solani* na cultura da cenoura**. Lavras: UFLA, 2006. 63 p.

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

OLKAN, H. A.; RIBEIRO, W. R. C. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, n. 7, p. 599-604, July 1985.

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

SANFUENTES, 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 *R. solani* AG-4 em substrato para estudo de Rhizoctoniose em algodoeiro e feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 31, n. 2, p. 374-376, abr./jun. 2005.

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

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

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

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE ISOLADOS DE *Rhizoctonia solani* OBTIDOS EM ÁREAS PRODUTORAS DE ALGODÃO, NOS ESTADOS DA BAHIA, GOIÁS, MATO GROSSO, MATO GROSSO DO SUL E MINAS GERAIS

RESUMO

A temperatura é importante para estudos com *Rhizoctonia solani*, devido ao fato de o patógeno ser cosmopolita e polífago. Objetivou-se avaliar a influência da temperatura no crescimento micelial, na produção de escleródios e na patogenicidade de isolados de *R. solani*. Obtiveram-se 18 isolados de plântulas de algodão, oriundos dos estados de Minas Gerais (8), Bahia (3), Goiás(2), Mato Grosso (4) e Mato Grosso do Sul (1), que foram testados nas temperaturas de 15°, 18°, 21°, 24°, 27° e 30°C. Para o crescimento micelial, os isolados foram semeados em placas de Petri (9 cm de diâmetro), contendo meio batata-dextrose-ágar. As placas foram acondicionadas em câmaras de germinação (BODs) com fotoperíodo de 12 horas. Realizaram-se medições ortogonais do diâmetro da colônia, diariamente, por 8 dias e quantificou-se o índice de crescimento micelial (ICM). As placas foram mantidas por três meses nas respectivas BODs para análise da produção de escleródios, os quais foram quantificados. Para a determinação de patogenicidade e a avaliação da severidade da doença, seguiu-se o método descrito por Oliveira et al. (2008). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. Houve interação significativa entre isolados e temperaturas, nas três variáveis estudadas. Dos oito isolados de MG, um apresentou maior ICM a 24°C e três a 27°C, observando-se relação ao modelo quadrático. Três isolados apresentaram melhor ajuste ao modelo linear e um não diferiu estatisticamente para as temperaturas avaliadas. Os isolados de GO apresentaram maior ICM nas temperaturas de 24° e 27°C. Para os isolados do MT, dois tiveram ajuste ao modelo linear, enquanto os outros dois tiveram ao modelo quadrático, nas temperaturas de 21° e 24°C. Já o isolado do MS foi ajustado ao modelo quadrático, a 27°C, enquanto todos os três isolados da BA foram ajustados ao modelo linear. O maior número de escleródios foi observado nas temperaturas de 15° e 18°C, para todos os isolados, com exceção do isolado do MS, que foi a 27°C. Verificou-se que 14 isolados (6 de MG, 2 da BA, 2 de GO, 3 de MT e 1 de MS) apresentaram maior severidade entre 24° e 27°C, ajustando-se ao modelo quadrático, enquanto três isolados (2 de MG e 1 de MT) não diferiram significativamente para as temperaturas avaliadas e apenas um isolado (BA 2 – I01) ajustou-se melhor ao modelo linear. Logo, maior severidade foi a 30°C.

Palavras chave: *Rhizoctonia solani*. Tombamento. Algodão. Temperatura. Epidemiologia.

ABSTRACT

Temperature is important for *Rhizoctonia solani* studies, due to the cosmopolite and polyphagic pathogen behavior. The objectives of this work were to evaluate the influence of temperature on the mycellial growth, sclerotium production and pathogenicity of *R. solani* isolates. For that, eighteen isolates, obtained from cotton seedlings originated from Minas Gerais (MG), Bahia (BA), Goiás (GO), Mato Grosso (MT) and Mato Grosso do Sul (MS) States, were tested under the temperatures of 15, 18, 21, 24, 27 and 30 °C. For mycellial growth, isolates were sown in Petri plates (9 cm diameter), containing potato-dextrose agar medium. Plates were incubated in germination chambers (BODs) with photoperiod set for 12 hours. Transversal colony diameter measurements were daily performed for eight days and the mycellial growth rate was calculated (MGR). Plates were kept for three months in the respective BODs to analyze to quantify the sclerotium production by counting the number of that fungal structure. And to evaluate pathogenicity and disease severity, following the previously Oliveira et al. (2008)'s describe method. The obtained data was submitted to variance analysis. A significant interaction among strains and temperatures was found, for the three studied variables. From the eight MG strains, one of them presented higher MGR at 24 °C and three at 27 °C, observing best fit to the squared model. More than three strains displayed higher fit to the linear model, thus, maximum MGR was observed at 30 °C. And one was statistically similar for the evaluated temperatures. The GO isolates showed higher MGR at 24 and 27 °C. For the MT isolates, two of them better fitted the linear model, while the other two fitted the squared one at 21 and 24 °C. In regard to the MS isolate, it better fitted the squared model at 27 °C, while all three BA isolates fitted the linear model. The higher sclerotium count was observed at 15 and 18 °C, regardless of the considered isolate, except for the MS isolate, where the Best temperature was 27 °C. The 14 isolates (6 from MG; 2 from BA; 2 from GO; 3 from MT and 1 from MS) showed higher severity between 24 and 27 °C and fitted the squared model. While three strains (2 from MG; 1 from MT) were significantly similar for the evaluated temperatures and only one isolate (BA 2 – I01), better fitted the linear, thus the highest severity was observed at 30 °C.

Keywords: *Rhizoctonia solani*. damping-off. Cotton. Temperature. Epidemiologic.

1 INTRODUÇÃO

O tombamento, ou *damping-off*, está entre as principais doenças do algodoeiro, sendo responsável pela redução da população de plantas no campo e pela elevação dos custos de produção (Pozza & Juliatti, 1994; Menten & Paradela, 1996; Wang & Davis, 1997; Davis et al., 1997; Goulart & Melo Filho, 2000; Goulart, 2001). Vários fungos podem ser agentes etiológicos do tombamento de plântulas de algodoeiro, porém, *Rhizoctonia solani* Kuhn. é considerado o principal agente dessa doença, seguido de *Fusarium* spp. e *Pythium* sp., considerados secundários, nas condições do Brasil (Tanaka et al., 1989; Tanaka & Menten, 1991; Santos et al., 1992).

As sementes de algodão, ao serem infectadas podem apodrecer e morrer, mesmo antes de iniciar o processo de germinação, denominando o tombamento de pré-emergência, considerado por Sinclair (1965) como mais prejudicial, por provocar maior intensidade no tombamento. As plântulas que conseguem emergir podem definharem em pouco tempo, em consequência da destruição das raízes. Ou quando o sistema radicular permanece sadio, as lesões no hipocótilo podem estrangulá-lo, levando a plântula à morte, o que é denominado tombamento de pós-emergência (Moustafa-Mahmoud et al., 1993). As plântulas sobreviventes, geralmente, originam plantas mais fracas, com desenvolvimento retardado (Minton & Garber, 1983).

O fungo *Rhizoctonia solani* Kühn tem sua fase assexuada conhecida como *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk, um basidiomiceto da família Ceratobasidiaceae (Sneh et al., 1991). Este patógeno é frequentemente isolado de plantas doentes e do solo. Os isolados diferem quanto às suas características morfológicas, culturais e de patogenicidade. Essas diferenças são frequentemente associadas a variações na virulência de isolados e ao grupo de anastomose (AG) (Ogoshi, 1987).

Apesar de não terem hospedeiros específicos, os diferentes AGs possuem tendência para essa característica. Dentre eles, o AG-4 apresenta distribuição mais ampla, em termos de plantas hospedeiras, sintomas e ambiente (Bolkan & Ribeiro, 1985; O'Sullivan & Kavanagh, 1991; Meinhardt et al., 2002; Kuramae et al., 2003). No Brasil, principalmente nos plantios do cerrado, o principal agente causal do tombamento de plântulas é *R. solani* grupo de anastomose AG-4, devido à frequência com que ocorre (mais de 95% dos casos) e pelos danos que causa na fase inicial de estabelecimento da lavoura (Goulart, 2001).

Por ser um fungo habitante natural do solo, sob determinadas condições, *R. solani* pode produzir estruturas de sobrevivência, formando tufo de células largas e curtas, chamados escleródios. Depois de estabelecido na área, o fungo pode associar-se a vários hospedeiros e sobreviver em restos culturais, colonizando matéria orgânica e como saprófito. Sua disseminação pode ser pela água da chuva ou de irrigação, por implementos agrícolas ou outros meios carregando solo contaminado, inclusive material propagativo (Ogoshi, 1987; Agrios, 1997).

Baird et al. (2000) verificaram que a temperatura influencia a virulência de *R. solani* AG-7, a 18° e 24°C, causando lesões marrom escuras em raízes de algodão. Já na comparação entre isolados de *R. solani* AG-7 oriundos de Arkansas (EUA), Índia e Japão e também com isolados AG-4, Baird et al. (1996) observaram que os isolados do Japão apresentaram maior crescimento radial a 30° e 35°C e o AG-4 não diferiu significativamente, a 30°C, concluindo, ainda, que separar AGs baseados em temperatura pode não ser possível. No Brasil, trabalhos com o patossistema *Rhizoctonia* vs. algodão, utilizando o grupo AG-4, foram desenvolvidos na temperatura média de 22°C (Goulart, 2002) e 25°C (Santos et al., 2005). Na cultura da soja, *R. solani* AG-4 apresentou crescimento micelial maior na faixa de 5° a 30°C, entretanto, a produção de

escleródios foi maximizada na faixa entre 20° e 25°C, decaindo na temperatura de 30°C (Harikrishnan & Yang, 2004).

Temperaturas subótimas geralmente condicionam o aumento da severidade da doença, tendo papel fundamental para o desenvolvimento da planta, pois a temperatura não somente tem efeito marcante sobre a velocidade de germinação, como também sobre a atuação do patógeno. Sementes expostas a temperaturas subótimas germinam mais lentamente, aumentando a possibilidade de infecção (Tanaka, 1994). Além disso, nessas condições, há um aumento da concentração de açúcares e aminoácidos exsudados pelas sementes e plântulas, que estimulam a atividade de estruturas de resistência dos fungos, aumentando o potencial de inóculo (Hayman, 1969).

Além do “tombamento”, a recente sintomatologia de “mela” vem sendo observada em plantios de algodão também no cerrado brasileiro, onde as plântulas conseguem ultrapassar a fase de tombamento, mas as mudas com 45 dias, em média, são encontradas em campo totalmente mortas e com os folíolos presos às hastes. Desse material é fácil se obter *R. solani*, mas, até o momento, não foi confirmado seu grupo de anastomose (Medeiros & Oliveira, observação pessoal). Especula-se a probabilidade de ser o subgrupo AG4-HG I, que também pode estar associado a sintomas foliares (Goulart, dados não publicados).

Objetivou-se, com a realização deste estudo, avaliar o efeito da temperatura na morfologia do patógeno, observando sua influência no crescimento micelial e na produção de escleródios e também na virulência dos isolados de *R. solani* obtidos em áreas produtoras de algodão, nos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA).

2.1 Ensaio 1: efeito da temperatura sobre crescimento micelial e produção de escleródios de *Rhizoctonia solani* isolados de algodão

Foram selecionados 18 isolados, provenientes de plântulas de algodão, caracterizados como *R. solani* AG-4 e AG-7 (Tabela 1). A partir de colônias do patógeno com três dias de idade, desenvolvidas no escuro, a 20°C, obtiveram-se discos de 3 mm de diâmetro (\emptyset), que foram distribuídos em placas de Petri de 8,5 cm, preenchidas com 12 mL de meio batata-dextrose-ágar (BDA). Estas placas foram incubadas em câmaras de germinação (BODs), nas temperaturas de 15°, 18°, 21°, 24°, 27° e 30°C. Realizaram-se medições ortogonais do diâmetro da colônia, diariamente, por oito dias (período suficiente para o crescimento máximo de 8,5 cm) e o índice de crescimento micelial por dia foi calculado.

As placas foram mantidas nas respectivas BODs por mais um período de três meses, para observação da produção de escleródios, que foi avaliado pelo número de escleródios produzidos. Realizou-se a distribuição de todas as estruturas de resistência em placas de Petri, preenchidas com 12 mL de meio ágar-água (AA). Estas placas foram, então, incubadas em BOD, a 20°C e, após 24 e 48 horas, contou-se o número de escleródios que apresentaram a formação de hifas características de *R. solani*, calculando-se a porcentagem de escleródios viáveis.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com esquema fatorial 18 x 6 (18 isolados por seis temperaturas), com cinco repetições e sendo a unidade experimental uma placa de Petri. Para a produção

de escleródios foi descartada uma placa por tratamento, objetivando-se maior uniformidade entre as placas, devido a contaminações ou a ressecamento do meio de cultura na mesma.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar[®] (Ferreira, 2000). As variáveis significativas no teste F foram ajustadas a modelos de regressão. O experimento foi repetido por duas vezes para obter maior precisão dos dados e utilizou-se a média dos dados.

TABELA 1 Origem dos isolados de *Rhizoctonia solani* obtidos de plântulas de algodão

Código da cultura	Grupo de anastomose	Procedência
MG 1 – I02	AG-7	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I11	AG-7	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I22	AG-7	Buriatizeiro - MG
MG 1 – I24	AG-4	Buriatizeiro - MG
MG 2 – I03	AG-4	Presidente Olegário - MG
MG 3 – I02	AG-4	Varjão de Minas - MG
MG 4 – I01	AG-4	Patos de Minas - MG
MG 5 – I01	AG-4	Uberlândia - MG
MT 1 – I01	AG-4	Nova Mutum - MT
MT 1 – I04	AG-4	Nova Mutum - MT
MT 1 – I05	AG-4	Nova Mutum - MT
MT 3 – I02*	AG-4	Rondonópolis - MT
BA 1 – I03	AG-4	Roda Velha - BA
BA 1 – I06	AG-4	Roda Velha - BA
BA 2 – I01	AG-4	Luiz Eduardo Magalhães - BA
GO 1 – I01	AG-4	Posse - GO
GO 1 – I02	AG-4	Posse - GO
MS 2 – I03	AG-4	Dourados - MS

Os isolados foram obtidos de plântulas de algodão com sintoma de tombamento.

* isolado obtido de plântula de algodão com sintoma de mela.

2.2 Ensaio 2: efeito da temperatura sobre a patogenicidade de *Rhizoctonia solani* isolado de algodão

A patogenicidade dos 18 isolados de *R. solani* oriundos de algodoeiros foi determinada utilizando-se o método *in vitro* (Eken & Demirci, 2004 modificado por Oliveira et al., 2008). Sementes de algodão da cultivar Delta Opal foram desinfestadas superficialmente com NaOCl (1,0%), por cinco minutos e secas em câmara de fluxo laminar, antes do uso. Em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, preenchidas com 20 mL de meio AA, foram distribuídas 10 sementes de forma circular e, subsequentemente, no centro de cada placa, foi semeado um disco de 9 mm de diâmetro, proveniente de colônias do patógeno com três dias de idades, desenvolvidas no escuro, a 20°C. As placas preenchidas foram, então, incubadas em BODs, nas temperaturas de 15°, 18°, 21°, 24°, 27° e 30°C, mantidas por quatro dias no escuro e por mais seis dias em fotoperíodo de 12 horas.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com esquema fatorial 18 x 6 (18 isolados por seis temperaturas), com cinco repetições, sendo a unidade experimental uma placa com 10 sementes. A severidade da doença foi medida adaptando-se escala com notas de 1 a 4, sendo: 1 – sem sintomas, plântula sadia; 2 – radícula infectada e hipocótilo sadio; 3 – radícula e hipocótilo infectados e 4 – necrose completa da plântula ou completamente podre ou ainda, semente não germinada.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar[®] (Ferreira, 2000). As variáveis significativas no teste F foram ajustadas a modelos de regressão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio 1: efeito da temperatura sobre crescimento micelial e produção de escleródios de *Rhizoctonia solani* isolados de algodão

Houve interação significativa entre isolados e temperaturas para a variável índice de crescimento micelial – ICM ($P = 0,000$) (Tabela 8B, anexo). Entre os quatro isolados do norte de Minas, dois (MG 1 – I22 e MG 1 – I24) ajustaram-se ao modelo quadrático a 24° e 27°C, um (MG 1 – I11) apresentou melhor ajuste ao modelo linear e um (MG 1 – I02) não diferiu estatisticamente para as temperaturas avaliadas (Figura 1). Observou-se que os isolados MG 1 – I02, MG 1 – I11 e MG 1 – I22, pertencentes ao grupo de anastomose AG-7 e o isolado MG 1 – I24, pertencente ao AG-4, apresentaram temperaturas distintas para o maior ICM. Tal como observado por Baird et al. (1996), de que não é possível separar AGs baseados em temperaturas.

Dos quatro isolados do Triângulo Mineiro, dois (MG 2 – I03; MG 3 – I02) apresentaram maior ICM a 27°C, observando-se uma relação quadrática. Os outros dois isolados (MG 4 – I01 e MG 5 – I01) apresentaram relação linear. Logo, o maior ICM foi a 30°C; os quatro isolados pertencem ao AG-4. Harikrishnan & Yang (2004), em estudo semelhante utilizando isolado de *R. solani* AG-4 obtido na cultura da soja, observam que o índice de crescimento micelial aumentava com o aumento da temperatura até 25°C. Entretanto, baseado no R^2 , os isolados apresentaram ajuste ao modelo linear, indo até 30°C. As pequenas divergências entre os dois resultados apresentados podem ser explicadas pela diferença nos intervalos de observação das temperaturas, que foram de 3° e 5°C, respectivamente.

Os isolados de Goiás apresentaram maior ICM nas temperaturas de 24° e 27°C e o isolado do Mato Grosso do Sul, maior ICM na temperatura de 27°C;

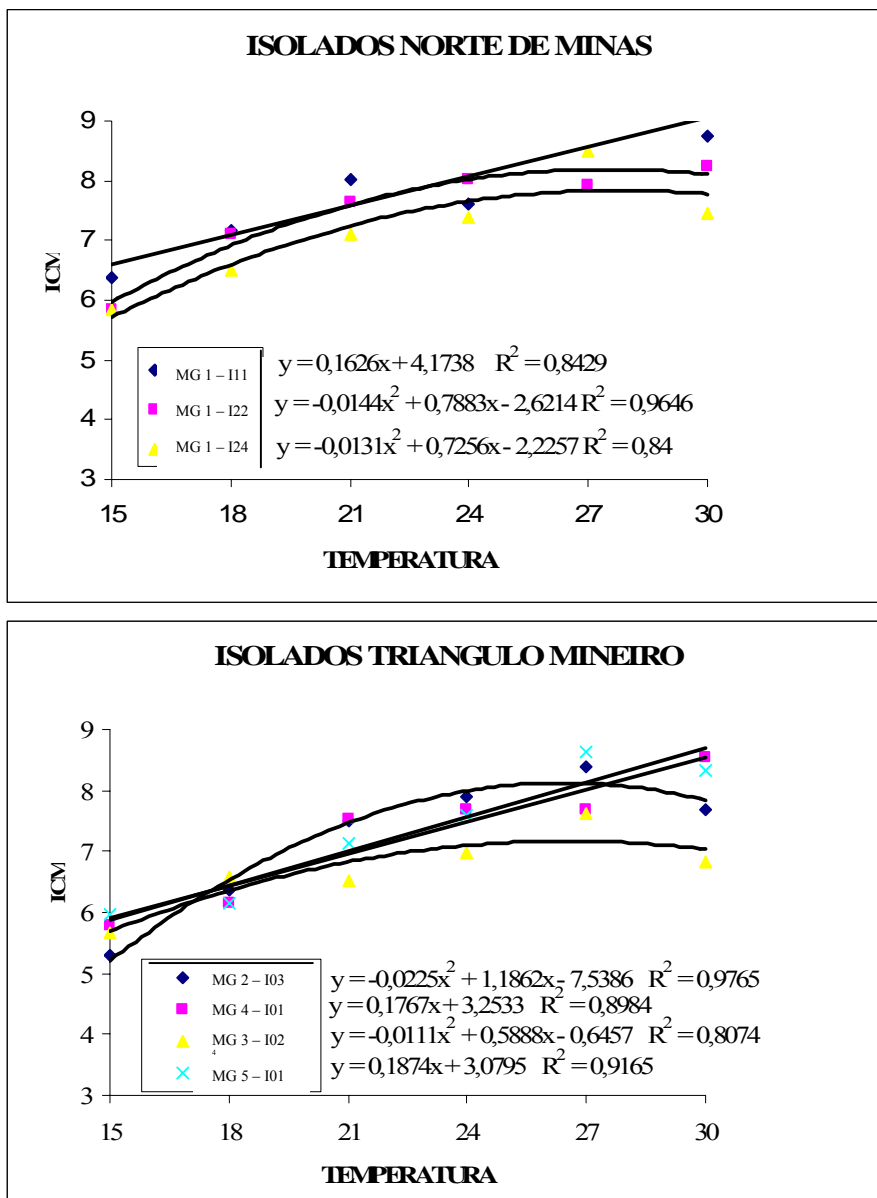
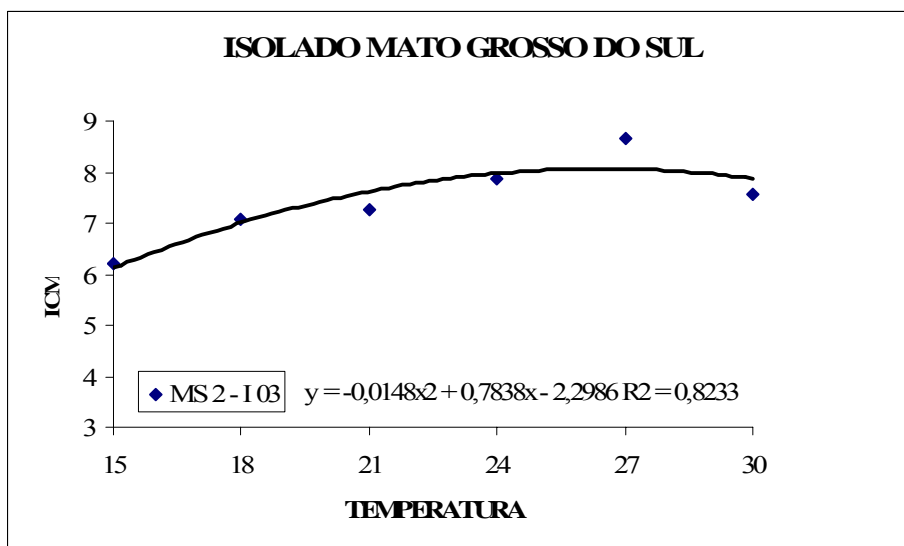
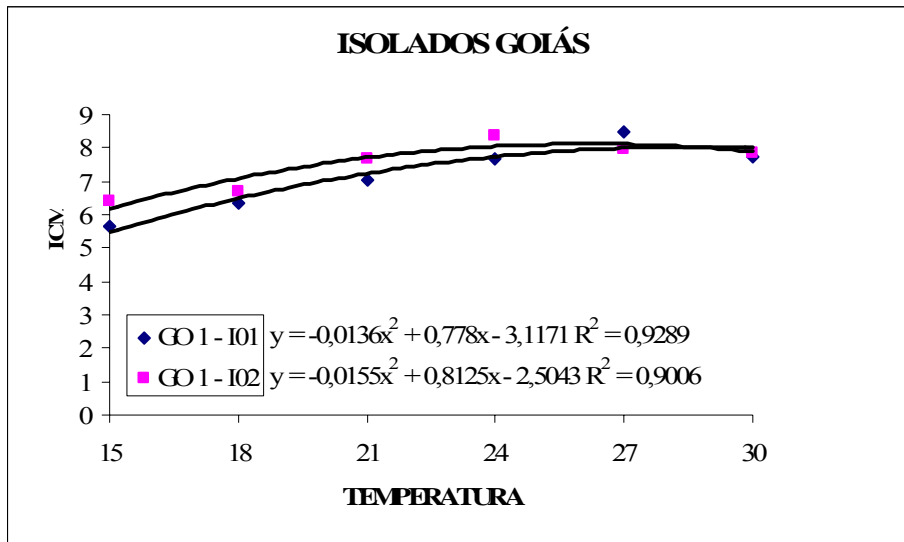
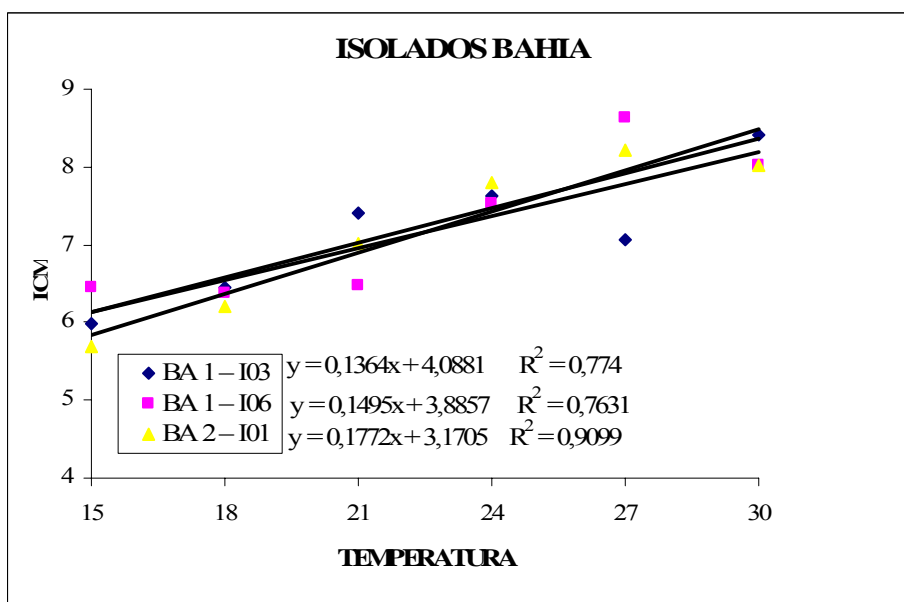
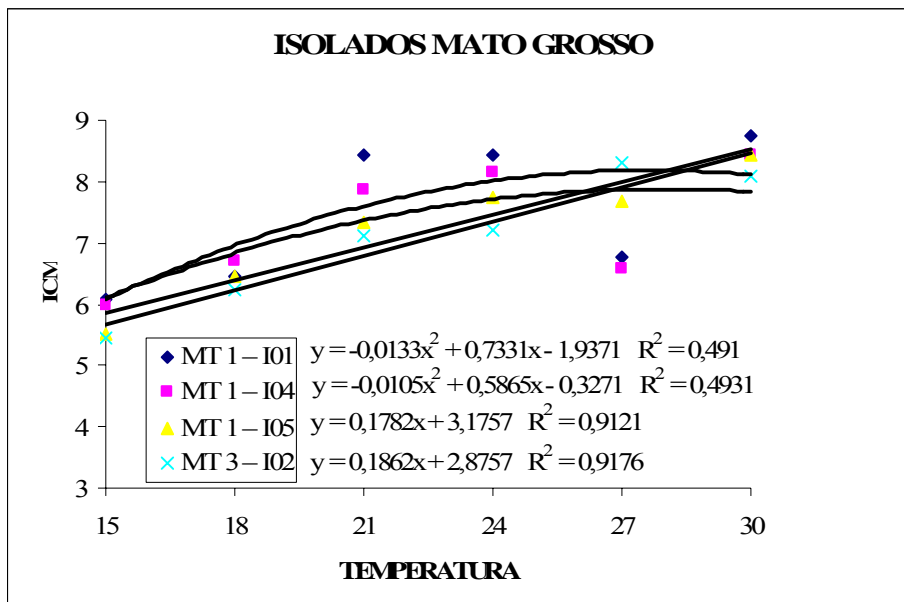


FIGURA 1 Índice de crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* isolado de plântulas de algodão, relacionado por região ou por estados, em seis temperaturas

“Figura 1, Cont.”



“Figura 1, Cont.”



todos ajustaram-se ao modelo quadrático. Esses resultados mostram o aumento do crescimento micelial com o aumento da temperatura até 27°C e, passando dessa temperatura, o ICM decaí. A resposta de crescimento micelial, neste estudo, é semelhante ao que foi informado por Sneh et al. (1991).

Dos quatro isolados do Mato Grosso, dois (MT 1 – I05 e MT 3 – I02) tiveram ajuste ao modelo linear e dois (MT 1 – I01 e MT1 – I04) tiveram ajuste ao modelo quadrático, com maior ICM nas temperaturas de 21° e 24°C, apresentando a menor temperatura observada neste estudo. Os três isolados da Bahia ajustaram-se ao modelo linear, portanto, o maior ICM foi a 30°C.

Pelos resultados, verifica-se que os isolados *R. solani*, provenientes de algodão, apresentaram maior ICM em temperaturas mais elevadas, configurando que os mesmos estão bem adaptados às condições edafoclimáticas das regiões onde o algodoeiro está sendo plantado no Brasil. Entretanto, este resultado, de forma isolada, não é o suficiente para justificar a ocorrência da doença.

Houve interação entre isolados e temperaturas, quanto ao número de escleródios ($P=0,000$) (Tabela 9B). Entretanto, apenas sete isolados apresentaram R^2 superior a 60% e, em todos, os melhores ajustes foi o do modelo quadrático (Figura 2). O isolado MG 2 – I03 foi o único com a produção de escleródios crescente até 21°C e, a partir de 24°C, começou a decair. Os demais tiveram produção máxima de escleródios a 15° e a 18°C. Os resultados encontrados discordam dos de Tyner & Sanford (1935) que afirmam ser entre 18° e 21°C, a faixa de temperatura ótima para a produção de escleródios de *R. solani*, em meio de cultura, assim como Harikrishnan & Yang (2004), que afirmam ser crescente a produção de escleródios com o aumento da temperatura até 25°C. É importante salientar que a avaliação do número de escleródios foi subjetiva, devido à variação no tipo de escleródios, alguns isolados produziram macroescleródios, geralmente em pouca quantidade, enquanto outros isolados produziram microescleródios em quantidades diversas.

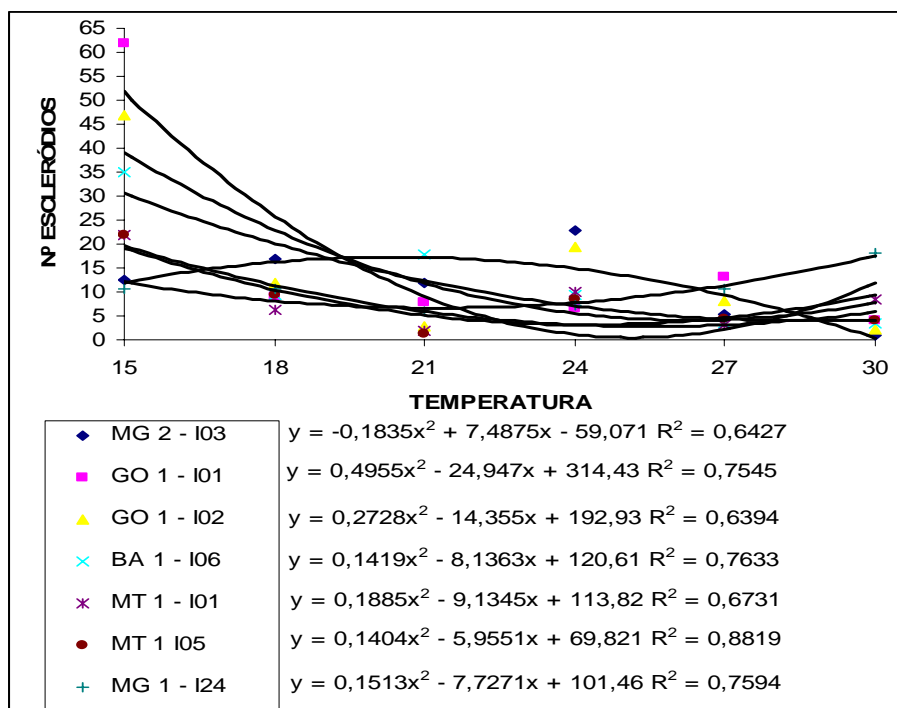
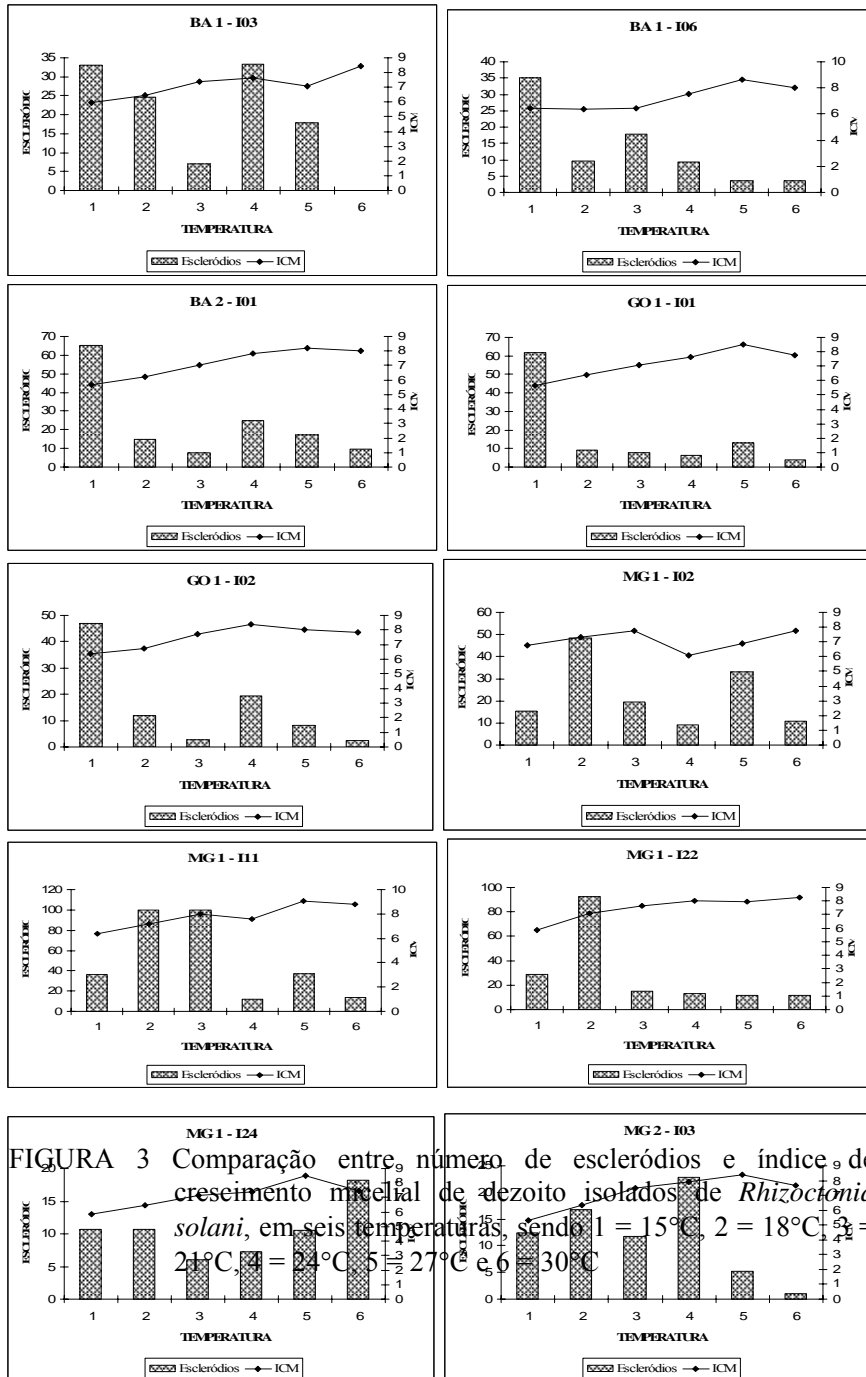
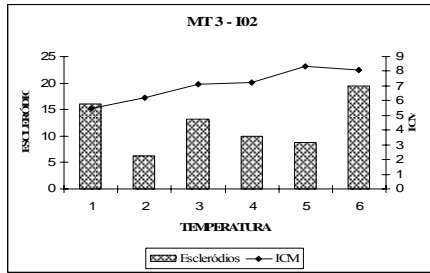
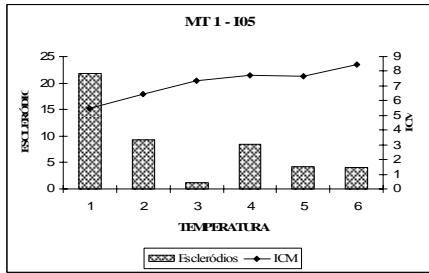
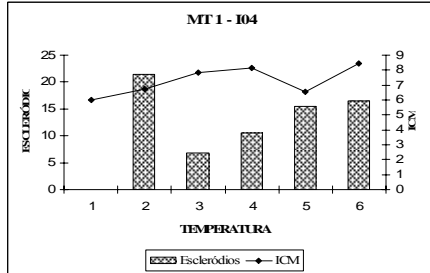
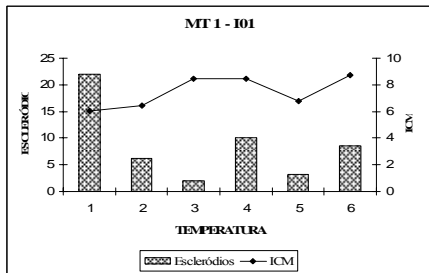
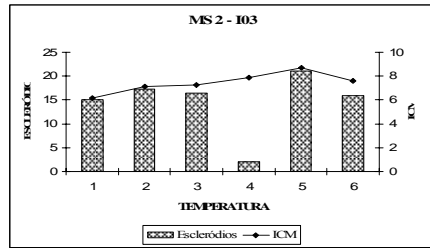
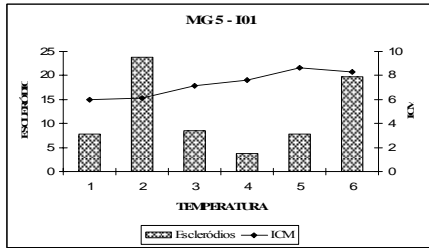
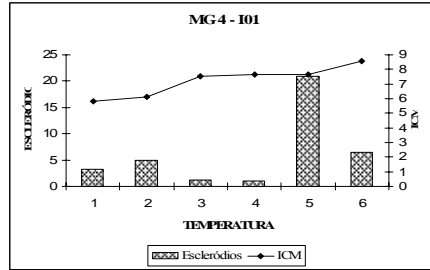
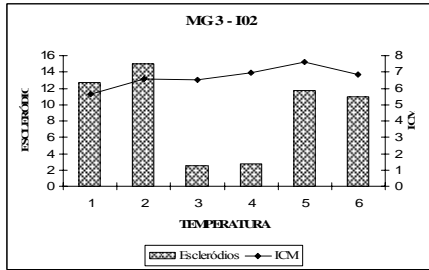


FIGURA 2 Análise de regressão da produção de escleródios de sete isolados de *Rhizoctonia solani* provenientes de algodão, incubados em seis temperaturas

Quando foram comparados o crescimento micelial e a produção de escleródios de cada isolado nas seis temperaturas (Figura 3), observou-se que a maioria dos isolados produziu mais escleródios nas temperaturas mais baixas, ou seja, de 15° e 18°C, justamente nas quais foi observado um menor ICM. Isso confirma que *R. solani*, em condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento, produz estruturas de sobrevivência (Ogoshi, 1987; Agrios, 1997). O isolado do Mato Grosso do Sul (MS 2 – I03) foi uma exceção, produzindo maior número de escleródios a 27°C, mesma temperatura que apresentou maior ICM.

“Figura 3, Cont.”





Não houve diferença significativa quanto à porcentagem de escleródios germinados, variando de 82,6% a 100% de germinação, não se observando também variações entre as temperaturas estudadas, assim como também entre os isolados AG-4 e AG-7.

3.2 Ensaio 2: efeito da temperatura sobre a patogenicidade de *Rhizoctonia solani* isolado de algodão

Houve interação significativa entre os 18 isolados e as temperaturas estudadas para a patogenicidade ($P=0,000$) (Tabela 10B).

Ajustaram-se modelos de regressão para as temperaturas de cada isolado (Tabela 11B). Verificou-se que 14 isolados (BA 1 – I03, BA 1 – I06, MG 1 – I02, MG 1 – I11, MG 1 – I22, MG 1 – I24, MG2 – I03, MG 5 – I01, GO 1 – I01, GO1 – I02, MS 1 – I03, MT 1 – I04, MT 1 – I05 e MT3 – I02) apresentaram maior severidade entre 24° e 27°C, logo, ajustaram-se ao modelo quadrático (Figura 4), enquanto um isolado da Bahia (BA 2 – I01) ajustou-se melhor ao modelo linear. Três isolados não diferiram significativamente para as temperaturas avaliadas, sendo dois de Minas Gerais (MG 3 – I02 e MG 4 – I01) e um do Mato Grosso (MT 1 – I01), discordando de Tanaka (1994) que verificou maior incidência do patógeno nas sementes e plântulas de algodão, quando foram utilizadas temperaturas mais baixas. Rejeita-se a teoria desse autor de que, com temperaturas subótimas, há o aumento da severidade da doença, pois a temperatura não somente teria influência sobre a velocidade de germinação da semente como também sobre a atuação do patógeno. Assim, sementes expostas a baixas temperaturas germinam lentamente, aumentando a possibilidade de infecção.

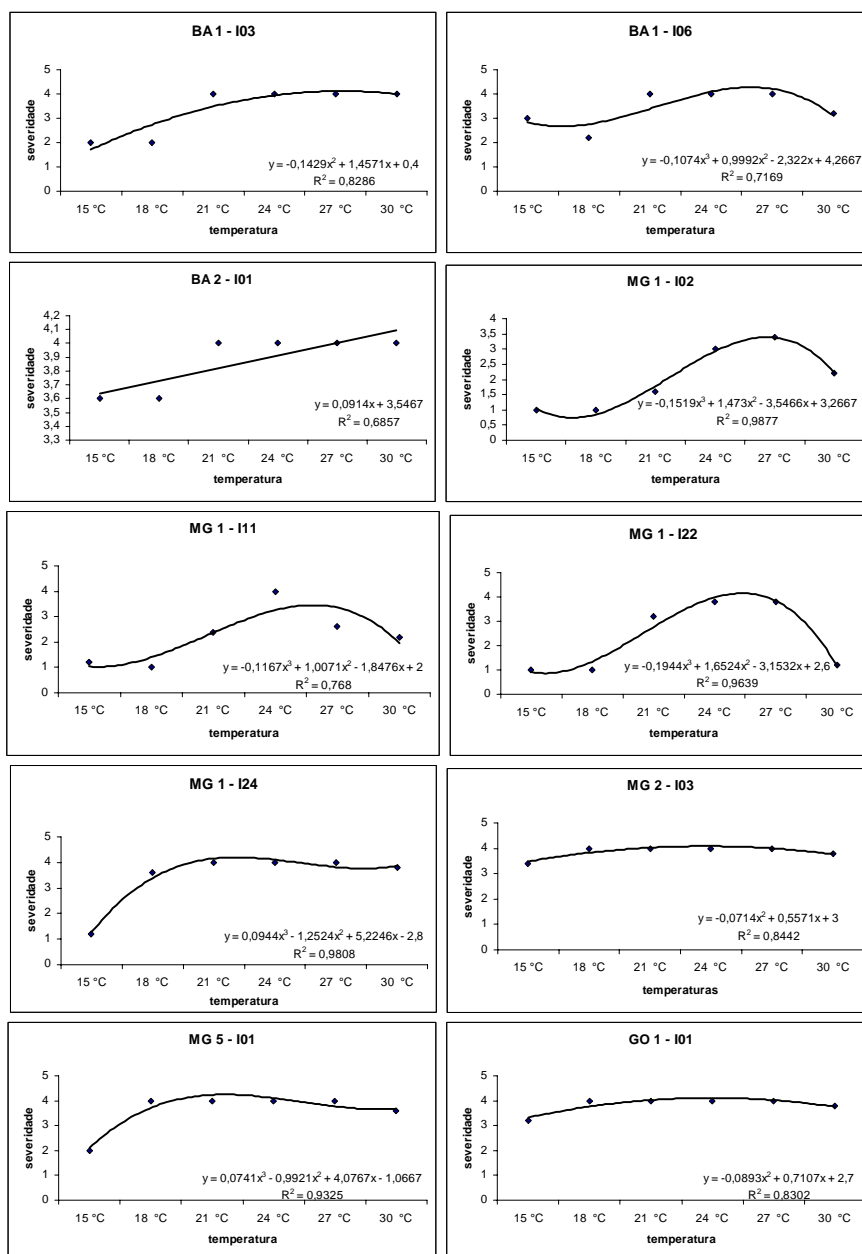
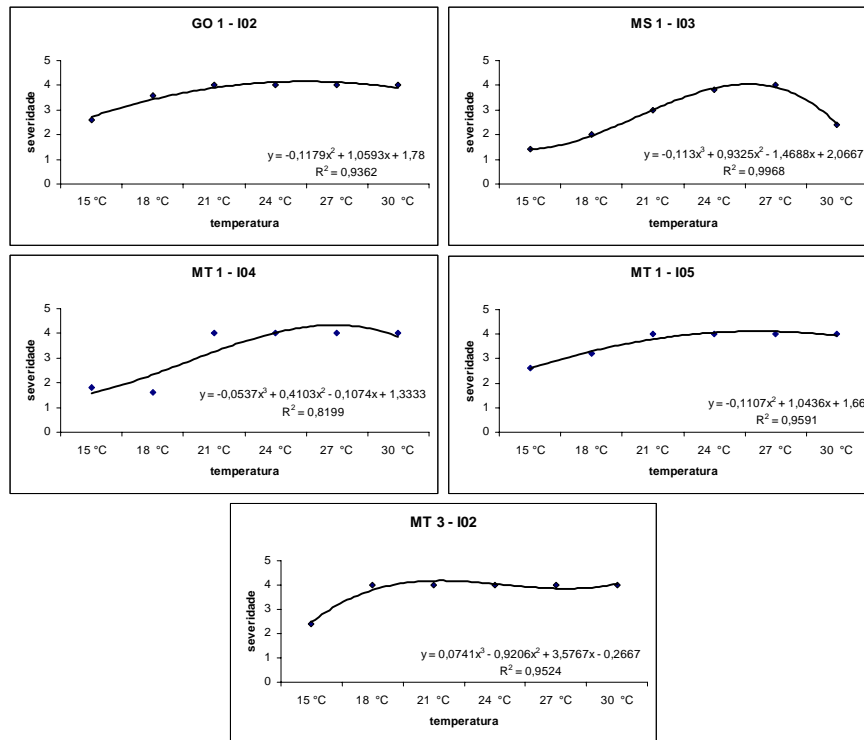


FIGURA 4 Análise de regressão para a patogenicidade de quinze dos dezoito isolados de *Rhizoctonia solani* incubados em seis temperaturas

“Figura 4, Cont.”



Analisando-se o desdobramento dos 18 isolados dentro de cada temperatura, observa-se que houve interação ($P=0,000$) (Tabela 12B). Na temperatura de 15°C, os isolados de maior agressividade que obtiveram notas entre 3,6 e 3,8 foram o da Bahia (BA 2 – I01), que havia apresentado regressão linear, seguido dos três que não diferiram nas seis temperaturas (MG 3 – I02, MG 4 – I01 e MT 1 – I01) (Tabela 2). Observa-se que os quatro isolados são AG-4, grupo de anastomose mais adaptado a condições adversas e gama de hospedeiros (Bolkan & Ribeiro, 1985; O’Sullivan & Kavanagh, 1991; Meinhardt et al., 2002; Kuramae et al., 2003).

TABELA 2 Dados médios da severidade da doença na patogenicidade de dezoito isolados de *Rhizoctonia solani*, em plântulas de algodão, nas temperaturas de 15°, 18°, 21°, 24°, 27° e 30°C

Isolados	Médias					
	15 °C	18 °C	21 °C	24 °C	27 °C	30 °C
MG 1 – I22	1,00 f	1,00 e	3,20 b	3,80 a	3,80 a	1,20 d
MG 1 – I02	1,00 f	1,00 e	1,60 d	3,00 b	3,40 b	2,20 c
MG 1 – I11	1,20 f	1,00 e	2,40 c	4,00 a	2,60 c	2,20 c
MG 1 – I24	1,20 f	3,60 b	4,00 a	4,00 a	4,00 a	3,80 a
MS 1 – I03	1,40 f	2,00 c	3,00 b	3,80 a	4,00 a	3,40 b
MT 1 – I04	1,80 e	1,60 d	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a
MG 5 – I01	2,00 e	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	3,60 b
BA 1 – I03	2,00 e	2,00 c	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a
MT 3 – I02	2,40 d	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a
GO 1 – I02	2,60 d	3,60 b	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a
MT 1 – I05	2,60 d	3,20 b	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a
BA 1 – I06	3,00 c	2,20 c	4,00 a	4,00 a	4,00 a	3,20 b
GO 1 – I01	3,20 b	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	3,80 a
MG 2 – I03	3,40 b	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	3,80 a
BA 2 – I01	3,60 a	3,60 b	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a
MG 3 – I02	3,60 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a
MT 1 – I01	3,80 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a
MG 4 – I01	3,80 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a

Médias seguidas da mesma letra, minúscula, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Os três isolados do norte de Minas (MG 1 – I02, MG 1 – I11 e MG 1 – I22), que pertencem ao grupo de anastomose AG-7, à temperatura de 18°C, apresentaram a nota menor de severidade, 1,0 e mantiveram-se com baixa patogenicidade a 21° e 30°C. Os isolados MG 1 – I11 apresentou severidade com a nota máxima de 4,00, à temperatura de 24°C e o isolado MG 1 – I22 apresentou severidade máxima com a nota 3,8 nas temperaturas de 24°C e 27°C. Segundo Baird et al. (2000), *R.solani* AG-7 causa lesões marrom-escuras em raízes de algodão e sua patogenicidade foi confirmada a 18° e a 24°C. Este

resultado é semelhante ao encontrado neste estudo, entretanto, a maior agressividade foi encontrada não só a 24°C, como também a 27°C.

Os demais isolados são pertencentes ao AG-4 e apresentaram alta agressividade e patogenicidade com notas entre 3,00 e 4,00, nas temperaturas de 21°, 24°, 27° e 30°C. Observou-se que os isolados AG-4 apresentaram ampla faixa de temperatura, em que sua alta agressividade foi mantida. Para os isolados AG-7, essa faixa foi reduzida apenas nas temperaturas de 24° e 27°C. Associação da virulência de *R. solani* com temperatura vem sendo estudada por vários autores, tendo maior virulência para o AG-4 sido observada por Oliveira (2006). Ao avaliar porcentagem de tombamento de pós-emergência de isolados *R. solani* obtidos de áreas produtoras de cenoura e também os grupos de anastomose padrão do AG-1 ou AG-7, este autor verificou que, à temperatura de 20°C, os únicos isolados que diferenciaram da testemunha foram os pertencentes ao AG-4. Para soja, o grupo AG4 também apresentou maior desenvolvimento da colônia a 20°C (Hrikrishnam & Yang, 2004). Já para feijão, na Turquia, a temperatura de 25°C causou lesões tanto no hipocótilo como nas raízes (Eken & Demirci, 2004). Para beterraba, a maior agressividade do AG-4 foi entre as temperaturas de 12°C e 30°C (O'Sullivan & Kavanagh, 1991). Portanto, o grupo AG-4 está bem adaptado a longas faixas de temperaturas, podendo ocasionar doenças a diversas culturas.

O isolado (MT3-I02) foi proveniente de plântula com sintoma de mela, entretanto, o mesmo apresentou agressividade semelhante aos isolados de tombamento, pertencentes ao mesmo grupo de anastomose AG-4. Isso pode ter ocorrido porque, neste estudo, avaliou-se a interação do patógeno com o hospedeiro, apenas na fase de germinação, aos 10 dias, quando o sintoma de mela é observado em plântulas de algodão aos 45 dias.

4 CONCLUSÕES

- Os isolados de *R. solani* foram influenciados pela temperatura, tanto para o crescimento micelial quanto para a produção de escleródios.
- Maiores agressividades dos isolados ocorreram nas temperaturas de 24° e 27°C.
- Os isolados pertencentes ao grupo de anastomose AG-7 foram menos agressivos que o isolado AG-4.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 4. ed. London: Academic, 1997. 635p.
- BAIRD, R. E. First report of *Rhizoctonia solani* AG-7 in Georgia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 7, p. 832, July 1997.
- BAIRD, R.; BATSON, W.; CARLING, D.; SCRUGGS, M. First report of *Rhizoctonia solani* AG-7 on cotton in Mississippi. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 10, p. 1156, Oct. 2000.
- BAIRD, R. E.; CARLING, D. E.; MULLINIX, B. G. Characterization and comparison of isolates of *Rhizoctonia solani* AG-7 from Arkansas, Indiana, and Japão, and select Ag-4 isolates. **American Phytopathological Society**, Saint Paul, v. 1, n. 1, p. 1421-1424, Jan./Dec. 1996.
- BOLKAN, H. A.; RIBEIRO, W. R. C. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, n. 7, p. 599-604, July 1985.
- DAVIS, R. M.; NUNEZ, J. J.; SUBBARAO, K. V. Benefits of cotton seed treatments for the control of seedling diseases in relation to inoculum densities of *Pythium* species and *Rhizoctonia solani*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 7, p. 766-768, July 1997.
- EKEN, C.; DEMIRCI, E. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* isolates from bean in Erzurum, Turkey. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 86, n. 1, p. 49-52, Jan. 2004.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.
- GOULART, A. C. P. Efeito do tratamento de sementes de algodão com fungicidas no controle do tombamento de plântulas causado por *R. solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 399-402, jul./ago. 2002.

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

GOULART, A. C. P.; MELO FILHO, G. A. **Quanto custa tratar as sementes de soja, milho e algodão com fungicidas?**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2000. (Boletim de Pesquisa, 7).

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

HAYMAN, D.S. The influence of temperature on the exudation of nutrients from cotton seeds and on pre-emergence damping-off by *Rhizoctonia solani*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 47, n. 12, p. 1663-1669, Dec. 1969.

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 Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 4, p. 391-395, July/Aug. 2003.

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

MENTEN, J. O. M.; PARADELA, A. L. Tratamento químico de sementes de algodão para controle de *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 22, n. 1, p. 60, jan./mar. 1996.

MINTON, E. B.; GARBER, R. H. Controlling the seedling disease complex of cotton. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 1, p. 115-118, Jan. 1983.

MOUSTAFA-MAHMOUD, S. M.; SUMNER, D. R.; RAGAB, M. M.; RAGAB, M. M. Interaction of fungicides, herbicides, and planting date with seedling disease of cotton caused by *Rhizoctonia solani* AG-4. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, n. 1, p. 79-86, Jan. 1993.

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

OLIVEIRA, A. C. C. **Metodologia de inoculação, variabilidade e controle de *Rhizoctonia solani* na cultura da cenoura**. 2006. 63 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

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

POZZA, E. A.; JULIATTI, F. C. Efeito do tratamento de sementes com fungicidas no controle de doenças iniciais do algodoeiro (*Gossypium Hirsutum* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 384-389, jan./abr. 1994.

SANTOS, F. S.; SOUZA, P. E.; OLIVEIRA, C. A.; MAGALHÃES, F. H. L.; LAURENTI, M. A. Ajuste do inóculo de *R. solani* AG-4 em substrato para estudo de Rhizoctoniose em algodoeiro e feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.3 1, n. 4, p. 374-376, out./dez. 2005.

SANTOS, C. M.; ALVARENGA, A. P.; SILVA, R. F.; ZAMBOLIM, L. Influência do substrato e do tratamento fungicida na germinação e na incidência de fungos em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 151-154, maio/ago. 1992.

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

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

TANAKA, M. A. S. Patógeno causadores de tombamento do algodoeiro e seus efeitos sobre a germinação das sementes em diferentes temperaturas. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 29-33, jan./abr. 1994.

TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M. Comparação de métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 17, n. 3/4, p. 218-226, jul./set. 1991.

TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M.; MARIANNO, M. J. A. Inoculação artificial de sementes de algodão com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e infecção das sementes em função do tempo de exposição ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 15, n.3 -4, p. 232-237, jul./set. 1989.

TYNER, L. E.; SANFORD, G. B. On the production of sclerotia by *Rhizoctonia solani* Kuhn in pure culture. **Science Agriculture**, Ankara, v. 16, n. 3, p. 197-207, 1935.

WANG, H.; DAVIS, R. M. Susceptibility of selected cotton cultivars to seedling disease pathogens and benefits of chemical seed treatments. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 9, p. 1085-1088, Sept. 1997.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conhecer os grupos de anastomose que causam doenças em algodoeiro no Brasil é de fundamental importância, pois a cultura é utilizada como alternativa em substituição à soja na rotação de culturas. Sendo assim, o plantio de algodão em áreas com histórico de rhizoctoniose pode não ser uma boa alternativa, verificando-se que os grupos de anastomose que causam doença em algodão são os mesmos que também podem infectar a cultura da soja.

O tombamento do algodoeiro, sob condições favorecidas, diminui o *stand* de plantas, sendo necessário fazer o replantio, onerando assim o custo de produção. A cultura do algodão já apresenta alto custo, devido à necessidade de maquinário específico e ao alto preço dos insumos. Aliando-se à queda do dólar em relação ao real, que torna o produto pouco competitivo no mercado internacional, a conicultura brasileira passa por constantes crises, levando à diminuição na área de produção.

Neste estudo, atingiu-se o objetivo de caracterizar os isolados de *R. solani* obtidos de plântulas de algodão, confirmando-se a prevalência do AG-4, como agente etiológico do tombamento do algodoeiro, assim como foi possível verificar a presença do AG-7 também causando tombamento nas áreas produtoras de algodão no Brasil, sendo uma ferramenta importante para estudos no patossistema *Rhizoctonia* x algodão.

Foi possível observar diferenças no comportamento dos isolados obtidos de algodão em relação às temperaturas estudadas, verificando-se que os mesmos, na grande maioria, estão adaptados a uma ampla faixa de temperatura, o que pode levar ao agravamento do problema, principalmente na rotação de culturas, com a utilização de plantas hospedeiras do patógeno.

Durante a obtenção dos isolados, foi possível observar que a melhor forma de isolar *R. solani* de plântulas com sintoma de tombamento é pelo isolamento direto, sem a desinfestação dos fragmentos em álcool e hipoclorito.

ANEXOS

ANEXO A		Página
FIGURA 1A	Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene ITS1 do rDNA de isolados estudados e de isolados disponíveis no banco de dados.....	090
FIGURA 2A	Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene 5,8S do rDNA de isolados estudados e de isolados disponíveis no banco de dados	096
FIGURA 3A	Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene ITS2 do rDNA de isolados estudados e de isolados disponíveis no banco de dados	101

ANEXO B

Página

TABELA 1B	Porcentagem de similaridade da sequência de nucleotídeos da região ITS 1 do rDNA entre os isolados estudados.....	108
TABELA 2B	Porcentagem de similaridade da sequência de nucleotídeos da região ITS 1 do rDNA entre os isolados estudados e os isolados publicados no banco de dados.....	110
TABELA 3B	Porcentagem de similaridade da sequência de nucleotídeos da região 5,8S do rDNA entre os isolados estudados.....	114
TABELA 4B	Porcentagem de similaridade da sequência de nucleotídeos da região 5,8S do rDNA entre os isolados estudados e os isolados publicados no banco de dados.....	116
TABELA 5B	Porcentagem de similaridade da sequência de nucleotídeos da região ITS 2 do rDNA entre os isolados estudados.....	120

TABELA 6B	Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos da região ITS 2 do rDNA entre os isolados estudados e os isolados publicados no banco de dados.....	122
TABELA 7B	Análise de variância dos dados referentes à soma de quadrados sequenciais da severidade da doença, provenientes da avaliação da patogenicidade de <i>Rhizoctonia solani</i> , isolados de plântulas de algodão.....	126
TABELA 8B	Análise de variância dos dados referentes à soma de quadrados sequenciais do índice de crescimento micelial, provenientes da avaliação do efeito da temperatura <i>in vitro</i> no crescimento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> , isolados de plântulas de algodão.....	126
TABELA 9B	Análise de variância dos dados referentes à soma de quadrados sequenciais do número de escleródios, provenientes da avaliação do efeito da temperatura <i>in vitro</i> na produção de escleródios de <i>Rhizoctonia solani</i> , isolados de plântulas de algodão.....	127
TABELA 10B	Análise de variância dos dados referentes à severidade da doença, provenientes da avaliação da patogenicidade de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> para plântulas de algodão em seis temperaturas.....	127
TABELA 11B	Análise de variância dos dados referentes ao desdobramento de seis temperaturas dentro de cada um dos dezoito isolados de <i>Rhizoctonia solani</i>	128
TABELA 12B	Análise de variância dos dados referentes ao desdobramento de dezoito isolados dentro de cada uma das seis temperaturas.....	128

```

BA2-I01 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
EF203251 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
G01-I01 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MG1-I04 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MT1-I01 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MT2-I01 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
FJ440198 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MS1-I01 -----AATTAATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 46
EU244842 -----AATTAATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 46
MG5-I01 GGATCATTATTGAATTAATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 58
MG3-I05 GGATCATTATTGAATTAATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 58
MG1-I09 GGATCATTATTGAATTAATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 58
MG1-I28 GGATCATTATTGAATTAATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 58
FJ746974 GGATCATTATTGAATTAATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 58
FJ746939 GGATCATTATTGAATTAATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 58
MG3-I02 GGATCATTATTGAATTAATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 58
MG2-I01 -GATCATTATTGAATTAATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 57
MG2-I03 GGATCATTATTGAATTAATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 58
MG2-I05 GGATCATTATTGAATTAATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 58
MG1-I03 -GATCATTATTGAATTAATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 57
FJ746938 GGATCATTATTGAATTAATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 58
MG1-I05 -GATCATTATTGATTTAATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 57
MT3-I02 --ATCATTATTGAATTAATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 56
FJ746914 --ATCATTATTGAATTAATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 56
MG7-I01 -GATCATTATTGAATTAATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 57
MG1-I21 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MG1-I14 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MG1-I17 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MG3-I01 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
EF203248 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
EF203246 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MT1-I05 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MT1-I04 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MT1-I03 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MT1-I02 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MS2-I03 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MG6-I01 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MG1-I24 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MG1-I01 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MG4-I04 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MG4-I03 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
G01-I02 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
BA1-I06 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
BA1-I05 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
BA1-I03 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MG4-I02 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MG1-I25 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MG1-I26 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
AY270002 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MG1-I19 -----AATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 42
MG2-I06 -----TTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 33
MG4-I01 -----TTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 33
MG1-I08 -----TTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 33
MG1-I15 -----TTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 33
AY684924 -----TTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 33
MG1-I20 -----TTTGGTTGTAGCTGGCCCTA-ATTAAC TTGGGG- 33
MG1-I07 ----AGTTGGTTGTAGCTGTTGCCTTGGGATTTTTTAAAT---TA-ATTATTCGGAC- 50
AB286941 ----AGTTGGTTGTAGCTGTTGCCTTGGGATTTTTTAAAT---TA-ATTATTCGGAC- 50
MG1-I02 -----AATGTGGA--TTGGTTGTGGCTGGCCCTGA-TTCATTTTCTAT- 40
AF354100 -----ANTGTGNN--TNGGTTGTGGCTGGCCCTGA-TTCATTTTCTAN- 40

```

FIGURA 1A Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene ITS1 do rDNA de isolados estudados e de isolados disponíveis no banco de dados

“FIGURA 1A, Cont.”

```

MG1-I011 -----AATGTGGA--TTGGTTGTGGCTGGCCTTGA-TTCATTTTCTAT- 40
MG1-I22 -----AATGTGGA--TTGGTTGTGGCTGGCCTTGA-TTCATTTTCTAT- 40
BA3-I01 -----AATTAATGTAGAGTT-GGTTGTAGCTGGCATTTCCTTTAATTTGGGGA 47
DQ102449 -----AATTAATGTAGAGTT-GGTTGTAGCTGGCATTTCCTTTAATTTGGGGA 47
BA2-I02 -----ATTATTGAATGAAGCTTAGAG-TCGGTTGTCGCTGGCTG-----TCTTTTGCAG- 47
EF429313 -----ATTATTGAATGAAGCTTAGAG-TCGGTTGTCGCTGGCTG-----TCTTTTGCAG- 47
                                     * * * * *

BA2-I01 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
EF203251 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
GO1-I01 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MG1-I04 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MT1-I01 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MT2-I01 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
FJ440198 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MS1-I01 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 102
EU244842 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 102
MG5-I01 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 114
MG3-I05 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 114
MG1-I09 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 114
MG1-I28 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 114
FJ746974 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 114
FJ746939 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 114
MG3-I02 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 114
MG2-I01 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 113
MG2-I03 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 114
MG2-I05 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 114
MG1-I03 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 113
FJ746938 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 114
MG1-I05 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 113
MT3-I02 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 112
FJ746914 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 112
MG7-I01 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 113
MG1-I21 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MG1-I14 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MG1-I17 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MG3-I01 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
EF203248 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
EF203246 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MT1-I05 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MT1-I04 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MT1-I03 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MT1-I02 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MS2-I03 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MG6-I01 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MG1-I24 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MG1-I01 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MG4-I04 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MG4-I03 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
GO1-I02 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
BA1-I06 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
BA1-I05 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
BA1-I03 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MG4-I02 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MG1-I25 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MG1-I26 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
AY270002 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MG1-I19 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 98
MG2-I06 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 89
MG4-I01 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 89
MG1-I08 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 89
MG1-I15 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 89
AY684924 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 89
MG1-I20 --GCATGTG-CACACCTTCTCTTTCATCC-CATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGA 89
MG1-I07 --AAATGTGGCAGCGCTTCTCTTTCATCC--ACACACACCTGTGCACCTGTGAGGCGAGA 106
AB286941 --AAATGTGGCAGCGCTTCTCTTTCATCC--ACACACACCTGTGCACCTGTGAGGCGAGA 106

```

“FIGURA 1A, Cont.”

```

MG1-I02          --GCATGTG-CACACCTTCT-CTTTCATCC--ACACACACCTGTGCACCTGTGAGACAG- 93
AF354100        --GCATGTG-CACACCTTCT-CTTTCATCC--ACACACACCTGTGCACCTGTGAGACAG- 93
MG1-I011        --GCATGTG-CACACCTTCT-CTTTCATCC--ACACACACCTGTGCACCTGTGAGACAG- 93
MG1-I02         --GCATGTG-CACACCTTCT-CTTTCATCC--ACACACACCTGTGCACCTGTGAGACAG- 93
BA3-I01         TTGCATGTG-CACACCTTCT-CTTTCATCC--ACACACCCCTGTGCACCTGTGAGACAGA 103
DQ102449        TTGCATGTG-CACACCTTCT-CTTTCATCC--ACACACCCCTGTGCACCTGTGAGACAGA 103
BA2-I02         ---CATGTG-CACGCCTTCTCTTTTCATCCACACACACCCCACTGTGCACCTGTGAGACTGG 103
EF429313        ---CATGTG-CACGCCTTCTCTTTTCATCCACACACACCCCACTGTGCACCTGTGAGACTGG 103
                ***** ** *
                ***** * * * * *
                ***** * * * * *

BA2-I01         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 155
EF203251        TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 155
G01-I01         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 156
MG1-I04         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 156
MT1-I01         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 156
MT2-I01         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 156
FJ7440198       TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 156
MS1-I01         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 161
EU244842        TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 161
MG5-I01         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 171
MG3-I05         CGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 171
MG1-I09         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 171
MG1-I28         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 171
FJ746974        TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 171
FJ746939        TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 171
MG3-I02         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 171
MG2-I01         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 170
MG2-I03         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 171
MG2-I05         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 171
MG1-I03         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 172
FJ746938        TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 173
MG1-I05         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 172
MT3-I02         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 171
FJ746914        TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 171
MG7-I01         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 172
MG1-I21         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
MG1-I14         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
MG1-I17         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
MG3-I01         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
EF203248        TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
EF203246        TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
MT1-I05         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
MT1-I04         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
MT1-I03         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
MT1-I02         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
MS2-I03         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
MG6-I01         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
MG1-I24         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
MG1-I01         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
MG4-I04         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
MG4-I03         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
G01-I02         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
BA1-I06         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
BA1-I05         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
BA1-I03         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
MG4-I02         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
MG1-I25         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
MG1-I26         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACTCTCTGTCTACT 157
AY270002        TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 155
MG1-I19         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 155
MG2-I06         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 146
MG4-I01         TGTTTTCTAGAGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 146
MG1-I08         TGTTTTCTATGGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 146
MG1-I15         TGTTTTCTATGGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 146
AY684924        TGTTTTCTATGGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 146
MG1-I20         TGTTTTCTATGGGGG-AAGGAACTTTATTGGACCTACTCTCTTGGACT--CTGTCTACT 146

```

“FIGURA 1A, Cont.”

```

MG1-I07      TG---GCTGGAGTCCTTTATTAATTTATTGAAC-----TCCT--AACT--CTGTCTACT 153
AB286941    TG---GCTGGAGTCCTTTATTAATTTATTGAAC-----TCCT--AACT--CTGTCTACT 153
MG1-I02      -----TTGGGGTGG--GAGGACTTTATTGGACTCTCTCTCC-----CTCTCTGTCTACT 140
AF354100    -----TTGGGGTGG--GAGGACTTTATTGGACTCTCTCTCC-----CTCTCTGTCTACT 140
MG1-I011    -----TTGGGGTGG--GAGGACTTTATTGGACTCTCTCTCC-----CTCTCTGTCTACT 140
MG1-I22     -----TTGGGGTGG--GAGGACTTTATTGGACTCTCTCTCC-----CTCTCTGTCTACT 140
BA3-I01     TTGCTTTTGGAGGG--GGAACTTTATTGGACCCCTTCTTTTT--GGCTCTCTGTCTACT 159
DQ102449    TTGCTTTTGGAGGG--GGAACTTTATTGGACCCCTTCTTTTT--GGCTCTCTGTCTACT 159
BA2-I02     AGGCCGTAAAAAAGC--CTTCAGTCTGCTAAAT-----TCATATACAAAGTCATTTAAT 155
EF429313    AGGCCGTAAAAAAGC--CTTCAGTCTGCTAAAT-----TCATATACAAAGTCATTTAAT 155
                * * * * *
BA2-I01     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 213
EF203251    TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 213
GO1-I01     TAATCT--ATATAAACTCAGTTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 214
MG1-I04     TAATCT--ATATAAACTCAGTTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 214
MT1-I01     TAATCT--ATATAAACTCAGTTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 214
MT2-I01     TAATCT--ATATAAACTCAGTTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 214
FJ440198    TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 214
MS1-I01     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 219
EU244842    TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 219
MG5-I01     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTA-----218
MG3-I05     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTA-----218
MG1-I09     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTA-----218
MG1-I28     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTA-----218
FJ746974    TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTA-----218
FJ746939    TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTA-----218
MG3-I02     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTA-----218
MG2-I01     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTA-----218
MG2-I03     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTA-----218
MG2-I05     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTA-----218
MG1-I03     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGT-----218
FJ746938    TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGT-----218
MG1-I05     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGT-----218
MT3-I02     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTA-----218
FJ746914    TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTA-----218
MG7-I01     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTA-----218
MG1-I21     TAATCT--ATATAAACTCAATT-----177
MG1-I14     TAATCT--ATATAAACTCAATT-----177
MG1-I17     TAATCT--ATATAAACTCAATT-----177
MG3-I01     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACATATCTAAT 215
EF203248    TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 215
EF203246    TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 215
MT1-I05     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 215
MT1-I04     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 215
MT1-I03     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 215
MT1-I02     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 215
MS2-I03     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 215
MG6-I01     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 215
MG1-I24     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 215
MG1-I01     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 215
MG4-I04     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 215
MG4-I03     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 215
GO1-I02     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 215
BA1-I06     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 215
BA1-I05     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 215
BA1-I03     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 215
MG4-I02     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 215
MG1-I25     TAATCT--ATATAAACTCTTTTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 215
MG1-I26     TAATCT--ATATAAACTCTTTTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 215
AY270002    TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 213
MG1-I19     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 213
MG2-I06     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 204
MG4-I01     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 204
MG1-I08     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 204
MG1-I15     TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 204

```


“FIGURA 1A, Cont.”

AY684924 TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 204
 MG1-I20 TAATCT--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 204
 MG1-I07 TAATTT--ACACACACTCTATTTAATTT----- 179
 AB286941 TAATTT--ACACACACTCTATTTAATTT----- 179
 MG1-I02 CAATTTTACACAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTCATTGATGTAACGCATCTAAT 200
 AF354100 CAATTTTACACAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTCATTGATGTAACGCATCTAAT 200
 MG1-I011 CAATTTTACACAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTCATTGATGTAACGCATCTAAT 200
 MG1-I22 CAATTTTACACAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTCATTGATGTAACGCATCTAAT 200
 BA3-I01 TAATTA--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 217
 DQ102449 TAATTA--ATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAAT 217
 BA2-I02 TGAACT--GAATGTACTTGATGTAAC----- 179
 EF429313 TGAACT--GAATGTACTTGATGTAAC----- 179

* * * * *

BA2-I01 ACT----- 216
 EF203251 ACT----- 216
 GO1-I01 ACTA----- 218
 MG1-I04 ACTA----- 218
 MT1-I01 ACTA----- 218
 MT2-I01 ACTA----- 218
 FJ440198 ACTA----- 218
 MS1-I01 ACTA----- 223
 EU244842 ACTA----- 223
 MG5-I01 -----
 MG3-I05 -----
 MG1-I09 -----
 MG1-I28 -----
 FJ746974 -----
 FJ746939 -----
 MG3-I02 -----
 MG2-I01 -----
 MG2-I03 -----
 MG2-I05 -----
 MG1-I03 -----
 FJ746938 -----
 MG1-I05 -----
 MT3-I02 -----
 FJ746914 -----
 MG7-I01 -----
 MG1-I21 -----
 MG1-I14 -----
 MG1-I17 -----
 MG3-I01 ACT----- 218
 EF203248 ACT----- 218
 EF203246 ACT----- 218
 MT1-I05 ACT----- 218
 MT1-I04 ACT----- 218
 MT1-I03 ACT----- 218
 MT1-I02 ACT----- 218
 MS2-I03 ACT----- 218
 MG6-I01 ACT----- 218
 MG1-I24 ACT----- 218
 MG1-I01 ACT----- 218
 MG4-I04 ACT----- 218
 MG4-I03 ACT----- 218
 GO1-I02 ACT----- 218
 BA1-I06 ACT----- 218
 BA1-I05 ACT----- 218
 BA1-I03 ACT----- 218
 MG4-I02 ACT----- 218
 MG1-I25 ACT----- 218
 MG1-I26 ACT----- 218
 AY270002 ACT----- 216
 MG1-I19 ACT----- 216
 MG2-I06 ACTAAGTTTCAACA 218
 MG4-I01 ACTAAGTTTCAACA 218

“FIGURA 1A, Cont.”

MG1-I08	ACTAAGTTTCAACA	218
MG1-I15	ACTAAGTTTCAACA	218
AY684924	ACTAAGTTTCAACA	218
MG1-I20	ACTAAGTTTCAACA	218
MG1-I07	-----	
AB286941	-----	
MG1-I02	ACT-----	203
AF354100	ACT-----	203
MG1-I011	ACT-----	203
MG1-I22	ACT-----	203
BA3-I01	AC-----	219
DQ102449	-----	
BA2-I02	-----	
EF429313	-----	

```

BA2-I02 -----GCATCATTGAACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 38
EF429313 -----GCATCATTGAACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 38
MG2-I06 -----ACGGATCTCTTGGC 14
MG4-I01 -----ACGGATCTCTTGGC 14
MG1-I08 -----ACGGATCTCTTGGC 14
MG1-I15 -----ACGGATCTCTTGGC 14
MG1-I20 -----ACGGATCTCTTGGC 14
AY684924 -----ACGGATCTCTTGGC 14
BA3-I01 -----TAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 26
DQ102449 -----ACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 28
GO1-I01 -----AGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 24
MG1-I04 -----AGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 24
MT1-I01 -----AGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 24
MT2-I01 -----AGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 24
FJ440198 -----AGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 24
EU244842 -----AGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 24
MS1-I01 -----AGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 24
MG1-I11 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MG1-I14 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MG1-I19 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MG1-I21 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MG1â€"I22 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MG1-I24 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MG1-I25 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MG1-I26 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
AY270002 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
EF203251 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
EF203248 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
EF203246 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
AF354100 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MT1-I05 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MT1-I04 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MT1-I03 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MT1-I02 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MS2-I03 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MG6-I01 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MG1-I17 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MG1-I02 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MG1-I01 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MG4-I04 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MG4-I03 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MG4-I02 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
GO1-I02 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
BA2-I01 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
BA1-I06 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
BA1-I05 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
BA1-I03 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MG3-I01 -----AAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 25
MG2-I03 -----ACACATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 39
MT3-I02 -----ACACATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 39
MG2-I05 -----ACACATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 39
MG5-I01 -----ACACATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 39
MG1-I09 -----ACACATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 39
MG1-I28 -----ACACATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 39
MG3-I02 -----ACACATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 39
MG3-I05 -----ACACATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 39
FJ746914 -----ACACATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 39
FJ746974 -----ACACATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 39
FJ746939 -----ACACATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 39
MG1-I05 -----AACACATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 40
MG7-I01 -----AACACATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 40

```

FIGURA 2A Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene 5,8S do rDNA de isolados estudados e de isolados disponíveis no banco de dados

“FIGURA 2A, Cont.”

```

MG1-I03 -----AACACATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 40
MG1-I07 AAACCTGAATGTAATTGATGTAACGCATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 60
AB286941 AAACCTGAATGTAATTGATGTAACGCATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 60
FJ746938 -----TAACACATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 41
MG2-I01 -----CACATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 38
***** **

BA2-I02 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 98
EF429313 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 98
MG2-I06 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 74
MG4-I01 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 74
MG1-I08 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 74
MG1-I15 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 74
MG1-I20 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 74
AY684924 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 74
BA3-I01 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 86
DQ102449 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 88
G01-I01 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 84
MG1-I04 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 84
MT1-I01 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 84
MT2-I01 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 84
FJ440198 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 84
EU244842 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 84
MS1-I01 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 84
MG1-I11 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MG1-I14 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MG1-I19 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MG1-I21 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MG1a@I22 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MG1-I24 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MG1-I25 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MG1-I26 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
AY270002 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
EF203251 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
EF203248 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
EF203246 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
AF354100 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MT1-I05 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MT1-I04 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MT1-I03 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MT1-I02 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MS2-I03 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MG6-I01 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MG1-I17 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MG1-I02 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MG1-I01 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MG4-I04 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MG4-I03 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MG4-I02 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
G01-I02 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
BA2-I01 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
BA1-I06 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
BA1-I05 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
BA1-I03 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MG3-I01 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 85
MG2-I03 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 99
MT3-I02 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 99
MG2-I05 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 99
MG5-I01 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 99
MG1-I09 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 99
MG1-I28 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 99
MG3-I02 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 99
MG3-I05 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 99
FJ746914 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 99
FJ746974 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 99

```

“FIGURA 2A, Cont.”

```

FJ746939      TCTCGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 99
MG1-I05      TCTCGCATCGATGAAAAACGACGCGAAATGCGATAAGTAAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 100
MG7-I01      TCTCGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 100
MG1-I03      TCTCGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 100
MG1-I07      TCTCGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 120
AB286941     TCTCGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 120
FJ746938     TCTCGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 101
MG2-I01      TCTCGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 98
*****
BA2-I02      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 158
EF429313    GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 158
MG2-I06      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 134
MG4-I01      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 134
MG1-I08      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 134
MG1-I15      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 134
MG1-I20      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 134
AY684924    GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 134
BA3-I01      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 146
DQ102449    GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 148
GO1-I01      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 144
MG1-I04      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 144
MT1-I01      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 144
MT2-I01      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 144
FJ440198    GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 144
EU244842    GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 144
MS1-I01      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 144
MG1-I11      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MG1-I14      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MG1-I19      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MG1-I21      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MG1â€”I22    GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MG1-I24      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MG1-I25      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MG1-I26      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
AY270002    GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
EF203251    GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
EF203248    GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
EF203246    GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
AF354100    GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MT1-I05      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MT1-I04      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MT1-I03      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MT1-I02      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MS2-I03      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MG6-I01      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MG1-I17      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MG1-I02      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MG1-I01      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MG4-I04      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MG4-I03      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MG4-I02      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
GO1-I02      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
BA2-I01      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
BA1-I06      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
BA1-I05      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
BA1-I03      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MG3-I01      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTT 145
MG2-I03      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCC---- 155
MT3-I02      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCC---- 155
MG2-I05      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCC---- 155
MG5-I01      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCC---- 155
MG1-I09      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCC---- 155
MG1-I28      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCC---- 155
MG3-I02      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCC---- 155
MG3-I05      GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCC---- 155

```

“FIGURA 2A, Cont.”

FJ746914	GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCC----	155
FJ746974	GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCC----	155
FJ746939	GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCC----	155
MG1-I05	GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGC-----	155
MG7-I01	GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGC-----	155
MG1-I03	GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGC-----	155
MG1-I07	GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGC-----	163
AB286941	GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGC-----	163
FJ746938	GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGC-----	155
MG2-I01	GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCT---	155

BA2-I02	TGAGT-----	163
EF429313	TGAGT-----	163
MG2-I06	TGAGTATCATGAAATCTTCAA	155
MG4-I01	TGAGTATCATGAAATCTTCAA	155
MG1-I08	TGAGTATCATGAAATCTTCAA	155
MG1-I15	TGAGTATCATGAAATCTTCAA	155
MG1-I20	TGAGTATCATGAAATCTTCAA	155
AY684924	TGAGTATCATGAAATCTTCAA	155
BA3-I01	TGAGTATCATGAAATCT---	163
DQ102449	TGAGTATCATGAAAT-----	163
GO1-I01	TGAGTATCATG-----	155
MG1-I04	TGAGTATCATG-----	155
MT1-I01	TGAGTATCATG-----	155
MT2-I01	TGAGTATCATG-----	155
FJ440198	TGAGTATCATG-----	155
EU244842	TGAGTATCAT-----	154
MS1-I01	TGAGTATCAT-----	154
MG1-I11	TGAGTATCAT-----	155
MG1-I14	TGAGTATCAT-----	155
MG1-I19	TGAGTATCAT-----	155
MG1-I21	TGAGTATCAT-----	155
MG1â€”I22	TGAGTATCAT-----	155
MG1-I24	TGAGTATCAT-----	155
MG1-I25	TGAGTATCAT-----	155
MG1-I26	TGAGTATCAT-----	155
AY270002	TGAGTATCAT-----	155
EF203251	TGAGTATCAT-----	155
EF203248	TGAGTATCAT-----	155
EF203246	TGAGTATCAT-----	155
AF354100	TGAGTATCAT-----	155
MT1-I05	TGAGTATCAT-----	155
MT1-I04	TGAGTATCAT-----	155
MT1-I03	TGAGTATCAT-----	155
MT1-I02	TGAGTATCAT-----	155
MS2-I03	TGAGTATCAT-----	155
MG6-I01	TGAGTATCAT-----	155
MG1-I17	TGAGTATCAT-----	155
MG1-I02	TGAGTATCAT-----	155
MG1-I01	TGAGTATCAT-----	155
MG4-I04	TGAGTATCAT-----	155
MG4-I03	TGAGTATCAT-----	155
MG4-I02	TGAGTATCAT-----	155
GO1-I02	TGAGTATCAT-----	155
BA2-I01	TGAGTATCAT-----	155
BA1-I06	TGAGTATCAT-----	155
BA1-I05	TGAGTATCAT-----	155
BA1-I03	TGAGTATCAT-----	155
MG3-I01	TGAGTATCAT-----	155
MG2-I03	-----	
MT3-I02	-----	
MG2-I05	-----	
MG5-I01	-----	
MG1-I09	-----	
MG1-I28	-----	

“FIGURA 2A, Cont.”

MG3-I02	-----
MG3-I05	-----
FJ746914	-----
FJ746974	-----
FJ746939	-----
MG1-I05	-----
MG7-I01	-----
MG1-I03	-----
MG1-I07	-----
AB286941	-----
FJ746938	-----
MG2-I01	-----

```

BA1-I03 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
BA1-I05 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
BA1-I06 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MG4-I02 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
EF203248 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MG1-I21 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MG3-I01 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
GO1-I02 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MG4-I03 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MG4-I04 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MG1-I24 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MG1-I25 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MG1-I26 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MG6-I01 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MS2-I03 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MT1-I02 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MT1-I03 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MT1-I04 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MT1-I05 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
EF203246 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MG2-I06 -----AGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 22
MG4-I01 -----AGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 22
MG1-I08 -----AGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 22
MG1-I15 -----AGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 22
MG1-I20 -----AGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 22
AY684924 -----AGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 22
BA2-I02 -----ATCATGAAATCTCAAAGTAA-ACCTTTTGTTAACTCA 37
EF429313 -----ATCATGAAATCTCAAAGTAA-ACCTTTTGTTAACTCA 37
BA3-I01 -----TCAAAGTAATATCTTTTGTTAACTCA 26
DQ102449 -----CTTCAAAGTAATATCTTTTGTTAACTCA 28
MG1-I02 -----GAAATCTTCAAAGTGA-ATCTTTTGTTAACTCA 32
MG1-I11 -----GAAATCTTCAAAGTGA-ATCTTTTGTTAACTCA 32
MG1-I22 -----GAAATCTTCAAAGTGA-ATCTTTTGTTAACTCA 32
AF354100 -----GAAATCTTCAAAGTGA-ATCTTTTGTTAACTCA 32
MG1-I19 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MG1-I01 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MG1-I14 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MG1-I17 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
AY270002 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MS1-I01 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTAGTTAACTCA 33
EU244842 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
GO1-I01 -----AAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 32
MT1-I01 -----AAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 32
MT2-I01 -----AAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 32
FJ440198 -----AAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 32
MG1-I04 -----AAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 32
EF203251 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
BA2-I01 -----GAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 33
MG2-I03 -----TGTTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 47
MG1-I09 -----TGTTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 47
MG1-I28 -----TGTTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 47
MG3-I05 -----TGTTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 47
MG2-I05 -----TGTTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 47
MG5-I01 -----TGTTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 47
FJ746914 -----TGTTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 47
FJ746939 -----TGTTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 47
FJ746974 -----TGTTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 47
MG1-I07 CTGGAGCATGCCTGTTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAGTAGAACCTTTTGTTAACTCA 59
AB286941 CTGGAGCATGCCTGTTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAGTAGAACCTTTTGTTAACTCA 59
MG7-I01 -----CTGTTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 48
FJ746938 -----CCTGTTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 49
MG1-I03 -----CTGTTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTTAACTCA 48

```

FIGURA 3A Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene ITS2 do rDNA de isolados estudados e de isolados disponíveis no banco de dados

“FIGURA 3A, Cont.”

MG1-I05 -----CTGTTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTAACTCA 48
 MT3-I02 -----TGTTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTAACTCA 47
 MG2-I01 -----GTTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTAACTCA 46
 MG3-I02 -----TGTTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAGTCAAACCTTTTGTAACTCA 47
 *** * **** * * **

BA1-I03 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 BA1-I05 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 BA1-I06 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MG4-I02 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 EF203248 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MG1-I21 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MG3-I01 AGTGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 GO1-I02 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MG4-I03 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MG4-I04 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MG1-I24 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MG1-I25 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MG1-I26 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MG6-I01 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MS2-I03 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MT1-I02 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MT1-I03 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MT1-I04 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MT1-I05 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 EF203246 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MG2-I06 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 77
 MG4-I01 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 77
 MG1-I08 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 77
 MG1-I15 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 77
 MG1-I20 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 77
 AY684924 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 77
 BA2-I02 ACTGGTCT--TGCTTTGGACTT--GGAGGTCT-TTGCAGATGTCACAGTCTGCTCCTCTTA 93
 EF429313 ACTGGTCT--TGCTTTGGACTT--GGAGGTCT-TTGCAGATGTCACAGTCTGCTCCTCTTA 93
 BA3-I01 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 81
 DQ102449 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 83
 MG1-I02 ATCGGTTT--TACTTTGGTATTTGGAGGTCTTTTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MG1-I11 ATCGGTTT--TACTTTGGTATTTGGAGGTCTTTTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MG1-I22 ATCGGTTT--TACTTTGGTATTTGGAGGTCTTTTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 AF354100 ATCGGTTT--TACTTTGGTATTTGGAGGTCTTTTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MG1-I19 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MG1-I01 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MG1-I14 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MG1-I17 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 AY270002 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MS1-I01 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 EU244842 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 GO1-I01 GTTGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 87
 MT1-I01 GTTGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 87
 MT2-I01 GTTGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 87
 FJ440198 GTTGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 87
 MG1-I04 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 87
 EF203251 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 BA2-I01 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCT-TCACA-CCTGCTCCTCTTT 88
 MG2-I03 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGC-TTCACA-CCTGCTCCTCTTT 102
 MG1-I09 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGC-TTCACA-CCTGCTCCTCTTT 102
 MG1-I28 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGC-TTCACA-CCTGCTCCTCTTT 102
 MG3-I05 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGC-TTCACA-CCTGCTCCTCTTT 102
 MG2-I05 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGC-TTCACA-CCTGCTCCTCTTT 102
 MG5-I01 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGC-TTCACA-CCTGCTCCTCTTT 102
 FJ746914 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGC-TTCACA-CCTGCTCCTCTTT 102
 FJ746939 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGC-TTCACA-CCTGCTCCTCTTT 102
 FJ746974 ATGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGC-TTCACA-CCTGCTCCTCTTT 102
 MG1-I07 ATGGTTCCTTACTTTGGTATT--GGAGGTCT-TTGCAGC-TTCACA-CCTGCTCCTCTTT 115
 AB286941 ATGGTTCCTTACTTTGGTATT--GGAGGTCT-TTGCAGC-TTCACA-CCTGCTCCTCTTT 115

“FIGURA 3A, Cont.”

```

MG7-I01      ATTGGTTC--TGCTTTGGTATG--GGAGGTCTATTGCAGC--TTCACA--CCTGCTCCTCTTT 103
FJ746938    ATTGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGC--TTCACA--CCTGCTCCTCTTT 104
MG1-I03      ATTGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGC--TTCACA--CCTGCTCCTCTTT 103
MG1-I05      ATTGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGC--TTCACA--CCTGCTCCTCTTT 103
MT3-I02      ATTGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGC--TTCACA--CCTGCTCCTCTTT 102
MG2-I01      ATTGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGC--TTCACA--CCTGCTCCTCTTT 101
MG3-I02      ATTGGTTC--TGCTTTGGTATT--GGAGGTCTATTGCAGCATTCA--CCTGCTCCTCTTT 103
                ***      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
BA1-I03      GTACA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
BA1-I05      GTACA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
BA1-I06      GTACA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MG4-I02      GTACA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
EF203248    GTACA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MG1-I21      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MG3-I01      GTACA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
G01-I02      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MG4-I03      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MG4-I04      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MG1-I24      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MG1-I25      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MG1-I26      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MG6-I01      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MS2-I03      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MT1-I02      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MT1-I03      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MT1-I04      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MT1-I05      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
EF203246    GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MG2-I06      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 136
MG4-I01      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 136
MG1-I08      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 136
MG1-I15      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 136
MG1-I20      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 136
AY684924    GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 136
BA2-I02      AATAAATTAGCTGGATCTCAGTAT--ACACTTGGTTCCTCACTCGCGTGATAAGT--ATCACT 151
EF429313    AATAAATTAGCTGGATCTCAGTAT--ACACTTGGTTCCTCACTCGCGTGATAAGT--ATCACT 151
BA3-I01      GTTCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 140
DQ102449    GTTCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 142
MG1-I02      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MG1-I11      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MG1-I22      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
AF354100    GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MG1-I19      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MG1-I01      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MG1-I14      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MG1-I17      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
AY270002    GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MS1-I01      GTTCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
EU244842    GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
G01-I01      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 146
MT1-I01      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 146
MT2-I01      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 146
FJ440198    GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 146
MG1-I04      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 146
EF203251    GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
BA2-I01      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 147
MG2-I03      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 161
MG1-I09      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 161
MG1-I28      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 161
MG3-I05      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 161
MG2-I05      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 161
MG5-I01      GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 161
FJ746914    GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 161
FJ746939    GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 161
FJ746974    GTGCA--TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCTCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 161

```

“FIGURA 3A., Cont.”

MG1-I07 GTTCA-TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCACTCAGCGTGATAAGT-ATCTAT 173
 AB286941 GTTCA-TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCACTCAGCGTGATAAGT-ATCTAT 173
 MG7-I01 GTGCA-TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 162
 FJ746938 GTGCA-TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 163
 MG1-I03 GTGCA-TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 162
 MG1-I05 GTGCA-TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 162
 MT3-I02 GTGCA-TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 161
 MG2-I01 GTGCA-TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 160
 MG3-I02 GTGCA-TTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGTTCCACTCAGCGTGATAAGTTATCTAT 162
 * * * * *

BA1-I03 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 BA1-I05 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 BA1-I06 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MG4-I02 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 EF203248 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MG1-I21 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MG3-I01 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 GO1-I02 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MG4-I03 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MG4-I04 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MG1-I24 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MG1-I25 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MG1-I26 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MG6-I01 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MS2-I03 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MT1-I02 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MT1-I03 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MT1-I04 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MT1-I05 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 EF203246 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MG2-I06 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 178
 MG4-I01 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 178
 MG1-I08 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 178
 MG1-I15 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 178
 MG1-I20 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 178
 AY684924 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 178
 BA2-I02 CGCTGAGGACACT-----GTAAAAAG-----GTGGCCAGGC--AATA 186
 EF429313 CGCTGAGGACACT-----GTAAAAAG-----GTGGCCAGGC--AATA 186
 BA3-I01 TGCTGAGGACACTTTTCTACTCTGTAAAAAGAGTTTGGGAGGGGTGGCCAAGGTAAGT 200
 DQ102449 TGCTGAGGACACTTTTCTACTCTGTAAAAAGAGTTTGGGAGGGGTGGCCAAGGTAAGT 202
 MG1-I02 CGCTGAGGACACT-----GTAAAAAG-----GTGGCCAAGGTAAGT 184
 MG1-I11 CGCTGAGGACACT-----GTAAAAAG-----GTGGCCAAGGTAAGT 184
 MG1-I22 CGCTGAGGACACT-----GTAAAAAG-----GTGGCCAAGGTAAGT 184
 AF354100 CGCTGAGGACACT-----GTAAAAAG-----GTGGCCAAGGTAAGT 184
 MG1-I19 CGCTGAGGACACCCT-----GTTAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MG1-I01 CGCTGAGGACACCCT-----GTTAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MG1-I14 CGCTGAGGACACCCT-----GTTAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MG1-I17 CGCTGAGGACACCCT-----GTTAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 AY270002 CGCTGAGGACACCCT-----GTTAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MS1-I01 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 188
 EU244842 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 188
 GO1-I01 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 188
 MT1-I01 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 188
 MT2-I01 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 188
 FJ440198 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 188
 MG1-I04 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 188
 EF203251 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 BA2-I01 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 189
 MG2-I03 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 203
 MG1-I09 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 203
 MG1-I28 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 203
 MG3-I05 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 203
 MG2-I05 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 203
 MG5-I01 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 203
 FJ746914 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAAGT 203

“FIGURA 3A, Cont.”

```

FJ746939 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAATG 203
FJ746974 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAATG 203
MG1-I07 CGCTGAGGACACTGT-----AAAA-----AGGTGGCCAAGGTAATG 210
AB286941 CGCTGAGGACACTGT-----AAAA-----AGGTGGCCAAGGTAATG 210
MG7-I01 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAATG 204
FJ746938 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAATG 205
MG1-I03 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAATG 204
MG1-I05 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAATG 204
MT3-I02 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAATG 203
MG2-I01 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAATG 202
MG3-I02 CGCTGAGGACACCCTGT-----TAAAAAG-----GGGTGGCCAAGGTAATG 204
***** ** ***** *

BA1-I03 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
BA1-I05 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
BA1-I06 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MG4-I02 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
EF203248 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MG1-I21 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MG3-I01 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
GO1-I02 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MG4-I03 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MG4-I04 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MG1-I24 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MG1-I25 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MG1-I26 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MG6-I01 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MS2-I03 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MT1-I02 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MT1-I03 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MT1-I04 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MT1-I05 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
EF203246 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MG2-I06 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 238
MG4-I01 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATAGGATC 238
MG1-I08 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 238
MG1-I15 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 238
MG1-I20 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 238
AY684924 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 238
BA2-I02 CAGATGAACCGCTTCTAATAGTCCATTGACTTGGACAAATTA--CATTT-ATGATCTGATC 243
EF429313 CAGATGAACCGCTTCTAATAGTCCATTGACTTGGACAAATTA--CATTT-ATGATCTGATC 243
BA3-I01 CTGATGAACCGCTTCTAATAGTCCATTGACTTGGACAAATCAA-TATTT-ATGATCTGATC 258
DQ102449 CTGATGAACCGCTTCTAATAGTCCATTGACTTGGACAAATCAA-TATTT-ATGATCTGATC 260
MG1-I02 CAGATGAACCGCTTCTAATAGTCCATTGACTTGGACAAATC--CATTT-ATGATCTGATC 241
MG1-I11 CAGATGAACCGCTTCTAATAGTCCATTGACTTGGACAAATC--CATTT-ATGATCTGATC 241
MG1-I22 CAGATGAACCGCTTCTAATAGTCCATTGACTTGGACAAATC--CATTT-ATGATCTGATC 241
AF354100 CAGATGAACCGCTTCTAATAGTCCATTGACTTGGACAAATC--CATTT-ATGATCTGATC 241
MG1-I19 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MG1-I01 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MG1-I14 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MG1-I17 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
AY270002 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MS1-I01 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAA-ATTAATTTTATGATCTGATC 247
EU244842 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAA-ATTAATTTTATGATCTGATC 247
GO1-I01 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 248
MT1-I01 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 248
MT2-I01 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 248
FJ440198 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 248
MG1-I04 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 248
EF203251 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
BA2-I01 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 249
MG2-I03 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 263
MG1-I09 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 263
MG1-I28 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 263
MG3-I05 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 263
MG2-I05 CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC 263

```

“FIGURA 3A, Cont.”

MG5-I01	CAGATGAACTGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC	263
FJ746914	CAGATGAACTGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC	263
FJ746939	CAGATGAACTGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC	263
FJ746974	CGGATGAACTGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC	263
MG1-I07	CAGATGAACCGCTTCCAACAGTCCATTGACTTGGACAAATTA-----	253
AB286941	CAGATGAACCGCTTCCAACAGTCCATTGACTTGGACAAATTA-----	253
MG7-I01	CAGAAGAAGTCTTCTAACAGTC--TCAAATCAGGTAGGAATACCC-----	248
FJ746938	CAGATGAACTGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC	265
MG1-I03	CAGATGAACTGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC	264
MG1-I05	CAGATGAACTGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC	264
MT3-I02	CATATGAACTGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTCATTTTATGATCTGATC	263
MG2-I01	CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTGACTTGGACAAATATTAATTTTATGATCTGATC	262
MG3-I02	CAGATGAACCGCTTCTAACAGTCCATTCACTTGGACAAATATTAATTTTATGATATGATC	264
	* *	
BA1-I03	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
BA1-I05	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
BA1-I06	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
MG4-I02	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
EF203248	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
MG1-I21	TCATATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
MG3-I01	TCATATCAGGTAGGACTACCCCTGTAAC-----	277
G01-I02	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
MG4-I03	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
MG4-I04	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
MG1-I24	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
MG1-I25	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
MG1-I26	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
MG6-I01	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
MS2-I03	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
MT1-I02	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
MT1-I03	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
MT1-I04	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
MT1-I05	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
EF203246	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
MG2-I06	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAAGCATATCAATA	281
MG4-I01	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAAGCATATCAATA	281
MG1-I08	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAAGCATATCAATA	281
MG1-I15	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAAGCATATCAATA	281
MG1-I20	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAAGCATATCAATA	281
AY684924	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAAGCATATCAATA	281
BA2-I02	TCAAATCAGG-----	253
EF429313	TCAAATCAGG-----	253
BA3-I01	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCT-----	282
DQ102449	TCAAATCAGGTAGGACTACCCG-----	282
MG1-I02	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	272
MG1-I11	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	272
MG1-I22	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	272
AF354100	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	272
MG1-I19	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
MG1-I01	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
MG1-I14	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
MG1-I17	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
AY270002	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA-----	281
MS1-I01	CTCAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAA-----	274
EU244842	CTCAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAA-----	274
G01-I01	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAAG-----	281
MT1-I01	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAAG-----	281
MT2-I01	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAAG-----	281
FJ440198	TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAAG-----	281
MG1-I04	TCAAATCAGGTAGGACTACAAGCGAGCTTAG-----	279
EF203251	TCAAATCAGGTAGG-----	263
BA2-I01	TCAAATCAGGTAGG-----	263
MG2-I03	TCAAATCAGGTAGGACTA-----	281
MG1-I09	TCAAATCAGGTAGGACTA-----	281
MG1-I28	TCAAATCAGGTAGGACTA-----	281

“FIGURA 3A, Cont.”

MG3-I05	TCAAATCAGGTAGGACTA-----	281
MG2-I05	TCAAATCAGGTAGGACTA-----	281
MG5-I01	TCAAATCAGGTAGGACTA-----	281
FJ746914	TCAAATCAGGTAGGACTA-----	281
FJ746939	TCAAATCAGGTAGGACTA-----	281
FJ746974	TCAAATCAGGTAGGACTA-----	281
MG1-I07	-----	
AB286941	-----	
MG7-I01	-----	
FJ746938	TCAAATCAGGTAGGAC-----	281
MG1-I03	TCAAATCAGGTAGGACT-----	281
MG1-I05	TCAAATCAGGTAGGACT-----	281
MT3-I02	TCAAATCAGGTAGGACTA-----	281
MG2-I01	TCAAATCAGGTAGGACTAT-----	281
MG3-I02	TCAAATCAGGTAGGACTACACC-----	286

TABELA 1B Porcentagem de similaridade da sequência de nucleotídeos da região ITS 1 do rDNA entre os isolados estudados

Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1. BA1-I01	--																									
2. BA1-I05	100	--																								
3. BA1-I06	100	100	--																							
4. BA2-I01	98	98	98	--																						
5. BA2-I02	38	38	38	39	--																					
6. BA3-I01	86	86	86	88	77	--																				
7. GO1-I01	98	98	98	97	69	85	--																			
8. GO1-I02	100	100	100	98	38	86	98	--																		
9. MG2-I01	91	91	91	93	44	83	90	91	--																	
10. MG2-I03	91	91	91	93	44	83	90	91	98	--																
11. MG2-I05	91	91	91	93	44	83	90	91	98	100	--															
12. MG2-I06	94	94	94	94	65	81	94	94	87	87	87	--														
13. MG4-I01	94	94	94	93	65	81	93	94	86	86	86	99	--													
14. MG4-I02	99	99	99	98	38	86	98	99	90	91	91	94	93	--												
15. MG4-I03	100	100	100	98	38	86	98	100	91	91	91	94	94	99	--											
16. MG4-I04	100	100	100	98	38	86	98	100	91	91	91	94	94	99	100	--										
17. MG5-I01	91	91	91	93	44	83	90	91	99	99	99	87	86	90	91	91	--									
18. MG1-I01	100	100	100	98	38	86	98	100	91	91	91	94	94	99	100	100	91	--								
19. MG1-I02	85	85	85	83	70	84	83	85	77	77	77	81	81	85	85	85	77	85	--							
20. MG1-I03	91	91	91	91	44	82	91	91	97	98	98	87	86	91	91	91	97	91	76	--						
21. MG1-I04	98	98	98	97	69	85	100	98	90	90	90	94	93	98	98	98	90	98	83	91	--					
22. MG1-I05	91	91	91	91	44	81	91	91	96	97	97	87	86	91	91	91	97	91	76	99	91	--				
23. MG1-I07	69	69	69	70	29	71	68	69	69	70	70	70	70	70	69	69	70	69	71	69	68	69	--			
24. MG1-I08	94	94	94	93	65	81	94	94	86	87	87	99	98	94	94	94	86	94	81	86	94	86	71	--		
25. MG1-I09	91	91	91	93	44	83	90	91	99	99	99	87	86	90	91	91	100	91	77	97	90	97	70	86	--	
26. MG1-I11	85	85	85	83	70	84	83	85	77	77	77	81	81	85	85	85	77	85	100	76	83	76	71	81	77	--
27. MG1-I14	100	100	100	97	38	84	98	100	96	97	97	93	92	99	100	100	97	100	76	98	98	98	67	93	97	76
28. MG1-I15	94	94	94	93	65	81	94	94	86	87	87	99	98	94	94	94	86	94	81	86	94	86	71	100	86	81
29. MG1-I17	100	100	100	97	38	84	98	100	96	97	97	93	92	99	100	100	97	100	76	98	98	98	67	93	97	76
30. MG1-I19	100	100	100	98	69	86	99	100	92	92	92	95	94	99	100	100	92	100	85	92	99	92	70	95	92	85
31. MG1-I20	94	94	94	94	65	81	93	94	87	86	86	99	98	93	94	94	87	94	80	86	93	86	69	99	87	80
32. MG1-I21	99	99	99	96	38	83	97	99	97	97	97	93	92	98	99	99	96	99	76	97	97	97	67	92	96	76
33. MG1-I22	85	85	85	83	70	84	83	85	77	77	77	81	81	85	85	85	77	85	100	76	83	76	71	81	77	100
34. MG1-I24	100	100	100	98	38	86	98	100	91	91	91	94	94	99	100	100	91	100	85	91	98	91	69	94	91	85
35. MG1-I25	99	99	99	97	38	85	98	99	90	90	90	94	93	98	99	99	90	99	84	90	98	90	69	93	90	84
36. MG1-I26	99	99	99	97	38	85	98	99	90	90	90	94	93	98	99	99	90	99	84	90	98	90	69	93	90	84
37. MG1-I28	91	91	91	93	44	83	90	91	99	99	99	87	86	90	91	91	100	91	77	97	90	97	70	86	100	77
38. MG3-I01	99	99	99	98	38	86	98	99	91	91	91	94	93	99	99	99	91	99	85	91	98	91	69	94	91	85
39. MG3-I02	90	90	90	93	44	83	89	90	98	99	99	86	85	90	90	90	99	90	77	97	89	96	70	86	99	77

...continua...

TABELA 2B Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos da região ITS 1 do rDNA entre os isolados estudados e os isolados publicados no banco de dados

111

Isolados	AF354100	AY684924	DQ102449	EF203246	EF203248	EF203251	EF429313	EU244842	EJ440198	FJ746914	FJ746938	FJ746974	AB286941	AY270002	FJ746939
1. BA1-I01	82	94	86	100	100	98	38	98	99	91	91	91	69	100	91
2. BA1-I05	82	94	86	100	100	98	38	98	99	91	91	91	69	100	91
3. BA1-I06	82	94	86	100	100	98	38	98	99	91	91	91	69	100	91
4. BA2-I01	80	93	87	98	98	100	39	98	98	91	91	93	70	98	93
5. BA2-I02	72	65	77	38	38	39	100	71	69	44	44	44	29	69	44
6. BA3-I01	82	81	100	86	86	88	77	88	85	82	81	83	71	86	83
7. GO1-I01	80	94	84	98	98	97	69	99	99	91	91	90	68	99	90
8. GO1-I02	82	94	86	100	100	98	38	98	99	91	91	91	69	100	91
9. MG2-I01	78	86	84	91	91	93	44	93	90	96	96	99	69	92	99
10. MG2-I03	74	87	83	91	91	93	44	93	91	97	98	99	70	92	99
11. MG2-I05	74	87	83	91	91	93	44	93	91	97	98	99	70	92	99

...continua...

“Tabela 2B, Cont.”

12. MG2-I06	81	99	81	94	94	94	65	94	94	87	86	87	70	95	87
13. MG4-I01	81	98	81	94	94	93	65	93	94	86	85	86	70	94	86
14. MG4-I02	81	94	85	99	99	98	38	98	98	91	90	90	70	99	90
15. MG4-I03	82	94	86	100	100	98	38	98	99	91	91	91	69	100	91
16. MG4-I04	82	94	86	100	100	98	38	98	99	91	91	91	69	100	91
17. MG5-I01	73	86	84	91	91	93	44	93	90	97	97	100	70	92	100
18. MG1-I01	82	94	86	100	100	98	38	98	99	91	91	91	69	100	91
19. MG1-I02	98	81	83	85	85	83	70	83	84	76	76	77	71	85	77
20. MG1-I03	73	86	82	91	91	91	44	94	92	99	99	97	69	92	97
21. MG1-I04	80	94	84	98	98	97	69	99	99	91	91	90	68	99	90
22. MG1-I05	73	86	82	91	91	91	44	94	92	98	99	97	69	92	97
23. MG1-I07	71	71	71	69	69	70	29	69	68	68	69	70	100	70	70
24. MG1-I08	80	100	80	94	94	93	65	94	94	86	86	86	71	95	86
25. MG1-I09	73	86	84	91	91	93	44	93	90	97	97	100	70	92	100
26. MG1-I11	98	81	83	85	85	83	70	83	84	76	76	77	71	85	77
27. MG1-I14	72	93	84	100	100	97	38	98	98	97	98	97	67	98	97

“Tabela 2B, Cont.”

113

28. MG1-I15	80	100	80	94	94	93	65	94	94	86	86	86	71	95	86
29. MG1-I17	72	93	84	100	100	97	38	98	98	97	98	97	67	98	97
30. MG1-I19	81	95	85	100	100	98	69	99	99	92	91	92	70	100	92
31. MG1-I20	80	99	81	94	94	94	65	93	94	86	85	87	69	94	87
32. MG1-I21	72	92	83	99	99	96	38	97	98	97	97	96	67	98	96
33. MG1-I22	98	81	83	85	85	83	70	83	84	76	76	77	71	85	77
34. MG1-I24	82	94	86	100	100	98	38	98	99	91	91	91	69	100	91
35. MG1-I25	81	93	85	99	99	97	38	97	98	90	90	90	69	99	90
36. MG1-I26	81	93	85	99	99	97	38	97	98	90	90	90	69	99	90
37. MG1-I28	73	86	84	91	91	93	44	93	90	97	97	100	70	92	100
38. MG3-I01	81	94	85	99	99	98	38	98	98	91	91	91	69	99	91
39. MG3-I02	73	86	83	90	90	93	44	92	90	96	97	99	70	91	99
40. MG3-I05	73	86	83	90	90	93	44	92	90	96	97	99	69	91	99
41. MG6-I01	82	94	86	100	100	98	38	98	99	91	91	91	69	100	91
42. MG7-I01	73	86	80	91	91	90	44	93	91	97	97	96	68	91	96
43. MS1-I01	79	93	87	98	98	98	40	99	99	94	94	92	69	98	92

“Tabela 2B, Cont.”

44. MS2-I03	82	94	86	100	100	98	38	98	99	91	91	91	69	100	91
45. MT1-I01	80	94	84	98	98	97	69	99	99	91	91	90	68	99	90
46. MT1-I02	82	94	86	100	100	98	38	98	99	91	91	91	69	100	91
47. MT1-I03	82	94	86	100	100	98	38	98	99	91	91	91	69	100	91
48. MT1-I04	82	94	86	100	100	98	38	98	99	91	91	91	69	100	91
49. MT1-I05	82	94	86	100	100	98	38	98	99	91	91	91	69	100	91
50. MT2-I01	80	94	84	98	98	97	69	99	99	91	91	90	68	99	90
51. MT3-I02	75	86	82	91	91	91	44	94	92	100	98	97	68	92	97

TABELA 3B Porcentagem de similaridade da sequência de nucleotídeos da região 5,8S do rDNA entre os isolados estudados

Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
1. BA1-I01	--																										
2. BA1-I05	100	--																									
3. BA1-I06	100	100	--																								
4. BA2-I01	100	100	100	--																							
5. BA2-I02	96	96	96	96	--																						
6. BA3-I01	99	100	100	100	92	--																					
7. GO1-I01	100	99	99	99	96	100	--																				
8. GO1-I02	90	100	100	100	96	100	99	--																			
9. MG2-I01	90	90	90	90	92	91	90	90	--																		
10. MG2-I03	90	90	90	90	92	91	90	90	98	--																	
11. MG2-I05	92	90	90	90	92	91	90	90	98	100	--																
12. MG2-I06	92	92	92	92	89	97	93	92	83	83	83	--															
13. MG4-I01	100	92	92	92	89	97	93	92	83	83	100	--															
14. MG4-I02	100	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	--													
15. MG4-I03	100	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	100	--												
16. MG4-I04	90	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	100	100	--											
17. MG5-I01	100	90	90	90	92	91	90	90	98	100	100	83	83	90	90	90	--										
18. MG1-I01	100	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	100	100	100	90	--									
19. MG1-I02	90	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	100	100	100	90	100	--								
20. MG1-I03	99	90	90	90	92	90	89	90	98	99	99	83	83	90	90	90	99	90	90	--							
21. MG1-I04	89	99	99	99	96	100	100	99	90	90	90	93	93	99	99	99	90	99	99	89	--						
22. MG1-I05	100	89	89	89	91	90	89	89	97	98	98	82	82	89	89	89	98	89	89	99	89	--					
23. MG1-I07	82	82	82	82	80	79	81	82	89	90	90	75	75	82	82	82	90	82	82	91	81	90	--				
24. MG1-I08	90	92	92	92	89	97	93	92	83	83	83	100	100	92	92	92	83	92	92	83	93	82	75	--			
25. MG1-I09	100	90	90	90	92	91	90	90	98	100	100	83	83	90	90	90	100	90	90	99	90	98	90	83	--		
26. MG1-I11	100	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	100	100	100	90	100	100	90	99	89	82	92	90	--	
27. MG1-I14	92	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	100	100	100	90	100	100	90	99	89	82	92	90	100	
28. MG1-I15	100	92	92	92	89	97	93	92	83	83	83	100	100	92	92	92	83	92	92	83	93	82	75	100	83	92	
29. MG1-I17	100	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	100	100	100	90	100	100	90	99	89	82	92	90	100	
30. MG1-I19	92	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	100	100	100	90	100	100	90	99	89	82	92	90	100	
31. MG1-I20	100	92	92	92	89	97	93	92	83	83	83	100	100	92	92	92	83	92	92	83	93	82	75	100	83	92	
32. MG1-I21	100	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	100	100	100	90	100	100	90	99	89	82	92	90	100	
33. MG1-I22	100	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	100	100	100	90	100	100	90	99	89	82	92	90	100	
34. MG1-I24	100	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	100	100	100	90	100	100	90	99	89	82	92	90	100	
35. MG1-I25	100	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	100	100	100	90	100	100	90	99	89	82	92	90	100	
36. MG1-I26	90	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	100	100	100	90	100	100	90	99	89	82	92	90	100	
37. MG1-I28	99	90	90	90	92	91	90	90	98	100	100	83	83	90	90	90	100	90	99	90	98	90	83	100	90		
38. MG3-I01	90	99	99	99	96	99	98	99	90	90	90	92	92	99	99	99	90	99	99	89	98	89	81	92	90	99	
39. MG3-I02	90	90	90	90	92	91	90	90	98	100	100	83	83	90	90	90	100	90	90	99	90	98	90	83	100	90	

...continua...

“Tabela 3B, Cont.”

40. MG3-I05	90	90	90	90	92	91	90	90	98	100	100	83	83	90	90	90	100	90	90	99	90	98	90	83	100	90
41. MG6-I01	100	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	100	100	100	90	100	100	90	99	89	82	92	90	100
42. MG7-I01	89	89	89	89	91	90	89	89	97	98	98	82	82	89	89	89	98	89	89	99	89	98	90	82	98	89
43. MS1-I01	98	98	98	98	94	98	98	98	89	88	88	91	91	98	98	98	88	98	98	88	98	87	80	91	88	98
44. MS2-I03	100	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	100	100	100	90	100	100	90	99	89	82	92	90	100
45. MT1-I01	99	99	99	99	96	100	100	99	90	90	90	93	93	99	99	99	90	99	99	89	100	89	81	93	90	99
46. MT1-I02	100	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	100	100	100	90	100	100	90	99	89	82	92	90	100
47. MT1-I03	100	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	100	100	100	90	100	100	90	99	89	82	92	90	100
48. MT1-I04	100	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	100	100	100	90	100	100	90	99	89	82	92	90	100
49. MT1-I05	100	100	100	100	96	100	99	100	90	90	90	92	92	100	100	100	90	100	100	90	99	89	82	92	90	100
50. MT2-I01	99	99	99	99	96	100	100	99	90	90	90	93	93	99	99	99	90	99	99	89	100	89	81	93	90	99
51. MT3-I02	90	90	90	90	92	90	89	90	98	99	99	83	83	90	90	90	99	90	90	98	89	98	90	83	99	90

116

Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
1 a 26																											
Isolados	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51		
27. MG1-I14	-																										
28. MG1-I15	92	--																									
29. MG1-I17	100	92	--																								
30. MG1-I19	100	92	100	--																							
31. MG1-I20	92	100	92	92	--																						
32. MG1-I21	100	92	100	100	92	--																					
33. MG1-I22	100	92	100	100	92	100	--																				
34. MG1-I24	100	92	100	100	92	100	100	--																			
35. MG1-I25	100	92	100	100	92	100	100	100	--																		
36. MG1-I26	100	92	100	100	92	100	100	100	100	--																	
37. MG1-I28	90	83	90	90	83	90	90	90	90	90	--																
38. MG3-I01	99	92	99	99	92	99	99	99	99	99	90	--															
39. MG3-I02	90	83	90	90	83	90	90	90	90	90	100	90	--														
40. MG3-I05	90	83	90	90	83	90	90	90	90	90	100	90	100	--													
41. MG6-I01	100	92	100	100	92	100	100	100	100	100	90	99	90	90	--												
42. MG7-I01	89	82	89	89	82	89	89	89	89	89	98	89	98	98	89	--											
43. MS1-I01	98	91	98	98	91	98	98	98	98	98	88	97	88	88	98	87	--										
44. MS2-I03	100	92	100	100	92	100	100	100	100	100	90	99	90	90	100	89	98	--									
45. MT1-I01	99	93	99	99	93	99	99	99	99	99	90	98	90	90	99	98	98	99	--								
46. MT1-I02	100	92	100	100	92	100	100	100	100	100	90	99	90	90	100	89	98	100	99	--							
47. MT1-I03	100	92	100	100	92	100	100	100	100	100	90	99	90	90	100	89	98	100	99	100	--						
48. MT1-I04	100	92	100	100	92	100	100	100	100	100	90	99	90	90	100	89	98	100	99	100	100	--					
49. MT1-I05	100	92	100	100	92	100	100	100	100	100	90	99	90	90	100	89	98	100	99	100	100	100	--				
50. MT2-I01	99	93	99	99	93	99	99	99	99	99	90	98	90	90	99	89	98	99	100	99	99	99	99	--			
51. MT3-I02	90	83	90	90	83	90	90	90	90	90	99	89	99	99	90	98	88	90	89	90	90	90	90	89	--		

TABELA 4B Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos da região 5,8S do rDNA entre os isolados estudados e os isolados publicados no banco de dados

111

Isolados	AF354100	AY684924	DQ102449	EF203246	EF203248	EF203251	EF429313	EU244842	EJ440198	FJ746914	FJ746938	FJ746974	AB286941	AY270002	FJ746939
1. BA1-I01	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
2. BA1-I05	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
3. BA1-I06	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
4. BA2-I01	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
5. BA2-I02	96	89	93	96	96	96	100	96	96	92	91	92	80	96	92
6. BA3-I01	100	97	98	100	100	100	92	100	100	91	90	91	79	100	91
7. GO1-I01	99	93	100	99	99	99	96	100	100	90	89	90	81	99	90
8. GO1-I02	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
9. MG2-I01	90	83	92	90	90	90	92	90	90	98	97	98	89	90	98
10. MG2-I03	90	83	92	90	90	90	92	90	90	100	98	100	90	90	100
11. MG2-I05	90	83	92	90	90	90	92	90	90	100	98	100	90	90	100

...continua...

“Tabela 4B, Cont.”

118

12. MG2-I06	92	100	96	92	92	92	89	93	93	83	92	83	75	92	83
13. MG4-I01	92	100	96	92	92	92	89	93	93	83	82	83	75	92	83
14. MG4-I02	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
15. MG4-I03	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
16. MG4-I04	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
17. MG5-I01	90	83	92	90	90	90	92	90	90	100	98	100	90	90	100
18. MG1-I01	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
19. MG1-I02	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
20. MG1-I03	90	83	92	90	90	90	92	90	89	99	99	99	91	90	99
21. MG1-I04	99	93	100	99	99	99	96	100	100	90	89	90	81	99	90
22. MG1-I05	89	82	91	89	89	89	91	89	89	98	98	98	90	89	98
23. MG1-I07	82	75	80	82	82	82	80	82	81	90	92	90	100	82	92
24. MG1-I08	92	100	96	92	92	92	89	93	93	83	82	83	75	92	83
25. MG1-I09	90	83	92	90	90	90	92	90	90	100	98	100	90	90	100
26. MG1-I11	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
27. MG1-I14	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90

“Tabela 4B, Cont.”

119

28. MG1-I15	92	100	96	92	92	92	89	93	93	83	82	83	75	92	83
29. MG1-I17	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
30. MG1-I19	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
31. MG1-I20	92	100	96	92	92	92	89	93	93	83	82	83	75	92	83
32. MG1-I21	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
33. MG1-I22	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
34. MG1-I24	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
35. MG1-I25	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
36. MG1-I26	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
37. MG1-I28	90	83	92	90	90	90	92	90	90	100	98	100	90	90	100
38. MG3-I01	99	92	99	99	99	99	96	99	98	90	89	90	81	99	90
39. MG3-I02	90	83	92	90	90	90	92	90	90	100	98	100	90	90	100
40. MG3-I05	90	83	92	90	90	90	92	90	90	100	98	100	90	90	100
41. MG6-I01	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
42. MG7-I01	89	82	91	89	89	89	91	89	89	98	98	98	90	89	98
43. MS1-I01	98	91	98	98	98	98	94	98	98	88	87	88	80	98	88

“Tabela 4B, Cont.”

44. MS2-I03	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
45. MT1-I01	99	93	100	99	99	99	96	100	100	90	89	90	81	99	90
46. MT1-I02	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
47. MT1-I03	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
48. MT1-I04	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
49. MT1-I05	100	92	100	100	100	100	96	100	99	90	89	90	82	100	90
50.MT2-I01	99	93	100	99	99	99	96	100	100	90	89	90	81	99	90
51.MT3-I02	90	83	92	90	90	90	92	90	89	99	98	99	90	90	99

TABELA 5B Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos da região ITS 2 do rDNA entre os isolados estudados

Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1. BA1-I01	--																									
2. BA1-I05	100	--																								
3. BA1-I06	100	100	--																							
4. BA2-I01	98	98	98	--																						
5. BA2-I02	86	86	86	85	--																					
6. BA3-I01	88	88	88	90	84	--																				
7. GO1-I01	98	98	98	99	84	88	--																			
8. GO1-I02	99	99	99	99	85	88	98	--																		
9. MG2-I01	93	93	93	99	87	86	93	94	--																	
10. MG2-I03	94	94	94	99	88	86	93	94	99	--																
11. MG2-I05	93	93	93	100	87	86	94	94	98	99	--															
12. MG2-I06	95	95	95	95	81	87	95	95	90	91	90	--														
13. MG4-I01	94	94	94	94	80	86	95	95	90	90	90	99	--													
14. MG4-I02	100	100	100	98	86	88	98	99	93	94	93	95	94	--												
15. MG4-I03	99	99	99	99	85	88	98	100	94	94	94	95	95	99	--											
16. MG4-I04	99	99	99	99	85	88	98	100	94	94	94	95	95	99	100	--										
17. MG5-I01	93	93	93	100	87	86	94	94	98	99	100	90	90	93	94	94	--									
18. MG1-I01	99	99	99	99	86	88	98	99	94	95	94	96	95	99	99	99	94	--								
19. MG1-I02	94	94	94	91	86	90	94	94	90	90	90	90	89	94	94	94	90	95	--							
20. MG1-I03	93	93	93	100	87	86	93	93	98	99	99	90	89	93	93	93	99	94	89	--						
21. MG1-I04	97	97	97	99	85	88	98	97	94	94	95	94	93	97	97	97	95	98	93	94	--					
22. MG1-I05	93	93	93	100	87	86	93	93	98	99	99	90	89	93	93	93	99	94	89	100	94	--				
23. MG1-I07	84	84	84	84	80	83	84	83	84	90	89	80	80	84	84	84	89	84	84	90	83	90	--			
24. MG1-I08	95	95	95	95	81	87	95	96	90	90	90	99	98	95	96	96	90	95	89	90	94	90	79	--		
25. MG1-I09	94	94	94	99	88	86	93	94	99	100	99	91	90	94	94	94	99	95	90	99	94	99	90	90	--	
26. MG1-I11	94	94	94	91	86	90	94	94	90	90	90	90	89	94	94	94	90	95	100	89	93	89	84	89	90	--
27. MG1-I14	99	99	99	99	86	88	98	99	94	95	94	96	95	99	99	99	94	100	95	94	98	94	84	95	95	95
28. MG1-I15	95	95	95	95	81	87	95	96	90	90	90	99	98	95	96	96	90	95	89	90	94	90	79	100	90	89
29. MG1-I17	99	99	99	99	86	88	98	99	94	95	94	96	95	99	99	99	94	100	95	94	98	94	84	95	95	95
30. MG1-I19	98	98	98	99	86	88	98	99	94	94	94	95	95	98	99	99	94	99	95	93	97	93	84	95	94	95
31. MG1-I20	95	95	95	95	81	87	95	96	90	90	90	99	98	95	96	96	90	95	89	90	94	90	79	100	90	89
32. MG1-I21	99	99	99	98	85	88	98	99	93	94	93	95	94	99	99	99	93	99	94	93	97	93	84	95	94	94
33. MG1-I22	94	94	94	91	86	90	94	94	90	90	90	90	89	94	94	94	90	95	100	89	93	89	84	89	90	100
34. MG1-I24	99	99	99	99	85	88	98	100	94	94	94	95	95	99	100	100	94	99	94	93	97	93	84	96	94	94
35. MG1-I25	99	99	99	99	85	88	98	100	94	94	94	95	95	99	100	100	94	99	94	93	97	93	84	96	94	94
36. MG1-I26	99	99	99	99	85	88	98	100	94	94	94	95	95	99	100	100	94	99	94	93	97	93	84	96	94	94
37. MG1-I28	94	94	94	99	88	86	93	94	99	100	99	91	90	94	94	94	99	95	90	99	94	99	90	90	100	90
38. MG3-I01	98	98	98	98	85	88	97	98	94	94	94	94	93	98	98	98	94	98	92	94	94	94	83	94	94	92
39. MG3-I02	94	94	94	98	86	86	93	95	98	98	98	90	90	94	95	95	98	94	90	98	94	98	89	91	98	90

...continua...

“Tabela 5B, Cont.”

40. MG3-I05	94	94	94	99	88	86	93	94	99	100	99	91	90	94	94	94	99	95	90	99	94	99	90	90	100	90
41. MG6-I01	99	99	99	99	85	88	98	100	94	94	94	95	95	99	100	100	94	99	94	93	97	93	84	96	94	94
42. MG7-I01	83	83	83	84	71	76	83	83	88	89	89	79	79	83	83	83	89	83	77	90	83	90	83	79	89	77
43. MS1-I01	97	97	97	96	83	89	97	97	93	94	94	93	92	97	97	97	94	97	91	94	95	94	84	93	94	91
44. MS2-I03	99	99	99	99	85	88	98	100	94	94	94	95	95	99	100	100	94	99	94	93	97	93	84	96	94	94
45. MT1-I01	98	98	98	99	84	88	100	98	93	93	94	95	95	98	98	98	94	98	94	93	98	93	83	95	93	94
46. MT1-I02	99	99	99	99	85	88	98	100	94	94	94	95	95	99	100	100	94	99	94	93	97	93	84	96	94	94
47. MT1-I03	99	99	99	99	85	88	98	100	94	94	94	95	95	99	100	100	94	99	94	93	97	93	84	96	94	94
48. MT1-I04	99	99	99	99	85	88	98	100	94	94	94	95	95	99	100	100	94	99	94	93	97	93	84	96	94	94
49. MT1-I05	99	99	99	99	85	88	98	100	94	94	94	95	95	99	100	100	94	99	94	93	97	93	84	96	94	94
50. MT2-I01	98	98	98	99	84	88	100	98	93	93	94	95	95	98	98	98	94	98	94	93	98	93	83	95	93	94
51. MT3-I02	93	93	93	99	87	85	93	93	98	98	99	90	89	93	93	93	99	93	90	98	94	98	89	89	98	90

Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
1 a 26																											
Isolados	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51		
27. MG1-I14	--																										
28. MG1-I15	95	--																									
29. MG1-I17	100	95	--																								
30. MG1-I19	99	95	99	--																							
31. MG1-I20	95	100	95	95	--																						
32. MG1-I21	99	95	99	98	95	--																					
33. MG1-I22	95	89	95	95	89	94	--																				
34. MG1-I24	99	96	99	99	96	99	94	--																			
35. MG1-I25	99	96	99	99	96	99	94	100	--																		
36. MG1-I26	99	96	99	99	96	99	94	100	100	--																	
37. MG1-I28	95	90	95	94	90	94	90	94	94	94	--																
38. MG3-I01	98	94	98	97	94	98	92	98	98	98	94	--															
39. MG3-I02	94	91	94	94	91	94	90	95	95	95	98	95	--														
40. MG3-I05	95	90	95	94	90	94	90	94	94	94	100	94	98	--													
41. MG6-I01	99	96	99	99	96	99	94	100	100	100	94	98	95	94	--												
42. MG7-I01	83	79	83	83	79	83	77	83	83	83	89	83	89	89	83	--											
43. MS1-I01	97	93	97	97	93	96	91	97	97	97	94	95	93	94	97	82	--										
44. MS2-I03	99	96	99	99	96	99	94	100	100	100	94	98	95	94	100	83	97	--									
45. MT1-I01	98	95	98	98	95	98	94	98	98	98	93	97	93	93	98	83	97	98	--								
46. MT1-I02	99	96	99	99	96	99	94	100	100	100	94	98	95	94	100	83	97	100	98	--							
47. MT1-I03	99	96	99	99	96	99	94	100	100	100	94	98	95	94	100	83	97	100	98	100	--						
48. MT1-I04	99	96	99	99	96	99	94	100	100	100	94	98	95	94	100	83	97	100	98	100	100	--					
49. MT1-I05	99	96	99	99	96	99	94	100	100	100	94	98	95	94	100	83	97	100	98	100	100	100	--				
50. MT2-I01	98	95	98	98	95	98	94	98	98	98	93	97	93	93	98	83	97	98	100	98	98	98	98	--			
51. MT3-I02	93	89	93	94	89	93	90	93	93	93	98	93	97	98	93	89	93	93	93	93	93	93	93	93	--		

TABELA 6B Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos da região ITS 2 do rDNA entre os isolados estudados e os isolados publicados no banco de dados

Isolados	AF354100	AY684924	DQ102449	EF203246	EF203248	EF203251	EF429313	EU244842	EJ440198	FJ746914	FJ746938	FJ746974	AB286941	AY270002	FJ746939
1. BA1-I01	94	95	88	99	100	98	86	97	98	93	93	93	84	99	93
2. BA1-I05	94	95	88	99	100	98	86	97	98	93	93	93	84	99	93
3. BA1-I06	94	95	88	99	100	98	86	97	98	93	93	93	84	99	93
4. BA2-I01	91	95	91	99	98	100	85	98	99	100	100	99	84	99	100
5. BA2-I02	86	81	84	85	86	85	100	84	84	87	87	87	78	86	87
6. BA3-I01	90	87	99	88	88	90	84	89	88	86	85	86	80	88	86
7. GO1-I01	94	95	88	98	98	99	84	98	100	94	93	93	83	98	94
8. GO1-I02	94	96	88	100	99	99	85	98	98	94	93	93	84	99	94
9. MG2-I01	90	90	87	94	93	99	87	94	93	98	98	98	89	94	98
10. MG2-I03	90	90	87	94	94	99	88	95	93	99	98	99	90	95	99
11. MG2-I05	90	90	87	94	93	100	87	95	94	100	99	99	89	94	100

...continua...

“Tabela 6B, Cont.”

124

12. MG2-I06	90	99	86	95	95	95	81	94	95	90	90	90	80	96	90
13. MG4-I01	89	98	86	95	94	94	80	93	95	90	89	89	80	95	90
14. MG4-I02	94	95	88	99	100	98	86	97	98	93	93	93	84	99	93
15. MG4-I03	94	96	88	100	99	99	85	98	98	94	93	93	84	99	94
16. MG4-I04	94	96	88	100	99	99	85	98	98	94	93	93	84	99	94
17. MG5-I01	90	90	87	94	93	100	87	95	94	100	99	99	89	94	100
18. MG1-I01	95	95	88	99	99	99	86	98	98	94	93	94	84	100	94
19. MG1-I02	100	89	90	94	94	91	86	92	94	90	89	89	84	95	90
20. MG1-I03	89	90	86	93	93	100	87	95	93	99	99	99	90	94	99
21. MG1-I04	93	94	88	97	97	99	85	96	98	95	94	94	83	98	95
22. MG1-I05	89	90	86	93	93	100	87	95	93	99	99	99	90	94	99
23. MG1-I07	84	79	81	84	84	84	78	85	83	89	90	89	100	84	89
24. MG1-I08	89	100	86	96	95	95	81	94	95	90	89	90	79	95	90
25. MG1-I09	90	90	87	94	94	99	88	95	93	99	98	99	90	95	99
26. MG1-I11	100	89	90	94	94	91	86	92	94	90	89	89	84	95	90
27. MG1-I14	95	95	88	99	99	99	86	98	98	94	93	94	84	100	94

“Tabela 6B, Cont.”

125

28. MG1-I15	89	100	86	96	95	95	81	94	95	90	89	90	79	95	90
29. MG1-I17	95	95	88	99	99	99	86	98	98	94	93	94	84	100	94
30. MG1-I19	95	95	88	99	98	99	86	98	98	94	93	93	84	99	94
31. MG1-I20	89	100	86	96	95	95	81	94	95	90	89	90	79	95	90
32. MG1-I21	94	95	88	99	99	98	85	97	98	93	93	93	84	99	93
33. MG1-I22	100	89	90	94	94	91	86	92	94	90	89	89	84	95	90
34. MG1-I24	94	96	88	100	99	99	85	98	98	94	93	93	84	99	94
35. MG1-I25	94	96	88	100	99	99	85	98	98	94	93	93	84	99	94
36. MG1-I26	94	96	88	100	99	99	85	98	98	94	93	93	84	99	94
37. MG1-I28	90	90	87	94	94	99	88	95	93	99	98	99	90	95	99
38. MG3-I01	92	94	88	98	98	98	85	96	97	94	93	94	83	98	94
39. MG3-I02	90	91	86	95	94	98	86	94	93	98	97	98	89	94	98
40. MG3-I05	90	90	87	94	94	99	88	95	93	99	98	99	90	95	99
41. MG6-I01	94	96	88	100	99	99	85	98	98	94	93	93	84	99	94
42. MG7-I01	77	79	77	83	83	84	71	83	83	89	90	89	83	83	89
43. MS1-I01	91	93	89	97	97	96	83	98	97	94	93	94	84	97	94

“Tabela 6B, Cont.”

44. MS2-I03	94	96	88	100	99	99	85	98	98	94	93	93	84	99	94
45. MT1-I01	94	95	88	98	98	99	84	98	100	94	93	93	83	98	94
46. MT1-I02	94	96	88	100	99	99	85	98	98	94	93	93	84	99	94
47. MT1-I03	94	96	88	100	99	99	85	98	98	94	93	93	84	99	94
48. MT1-I04	94	96	88	100	99	99	85	98	98	94	93	93	84	99	94
49. MT1-I05	94	96	88	100	99	99	85	98	98	94	93	93	84	99	94
50.MT2-I01	94	95	88	98	98	99	84	98	100	94	93	93	83	96	94
51.MT3-I02	90	89	86	93	93	99	87	94	93	99	98	98	89	93	99

TABELA 7B Análise de variância dos dados referentes à soma de quadrados sequenciais da severidade da doença, provenientes da avaliação da patogenicidade de *Rhizoctonia solani*, isolados de plântulas de algodão

FV	GL	SQ	QM	Fc	Prob.>Fc
Isolados	51	186,3153	3,6532	32,930	0,000 **
Repetição	4	0,7894	0,1974	1,779	0,134 ns
Erro	209	23,1860	0,1109		
Total	264				

CV(%) = 11,14

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

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

TABELA 8B Análise de variância dos dados referentes à soma de quadrados sequenciais do índice de crescimento micelial, provenientes da avaliação do efeito da temperatura *in vitro* no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, isolados de plântulas de algodão

FV	GL	SQ	QM	FC	Prob.>Fc
Isolados (I)	17	28,9026	1,7002	7,797	0,000 **
Temperaturas (T)	5	313,9709	62,7942	287,977	0,000 **
I x T	85	106,7642	1,2560	5,760	0,000 **
Repetição	4	3,3594	0,8398	3,852	0,004 **
Erro	428	93,3267	0,2181		
Total	539	546,3238			

CV(%) = 6,43

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

TABELA 9B Análise de variância dos dados referentes à soma de quadrados sequenciais do número de escleródios, provenientes da avaliação do efeito da temperatura *in vitro* na produção de escleródios de *Rhizoctonia solani*, isolados de plântulas de algodão

FV	GL	SQ	QM	FC	Prob.>Fc
Isolados (I)	17	42735,234	2513,837	78,063	0,000 **
Temperaturas (T)	5	15538,401	3107,680	96,504	0,000 **
I x T	85	82215,058	967,236	30,036	0,000 **
Repetição	3	112,173	37,391	1,161	0,327 ns
Erro	321	10337,076	32,203		
Total	431				

CV(%) = 34,68

* = teste F significativo (F≤0,05).

TABELA 10B Análise de variância dos dados referentes à severidade da doença, provenientes da avaliação da patogenicidade de isolados de *Rhizoctonia solani* para plântulas de algodão em seis temperaturas

FV	GL	SQ	QM	Fc	Prob.<F
Isolados (I)	17	199,2148	11,7185	106,353	0,000**
Temperaturas(T)	5	157,7704	31,5541	286,373	0,000**
I x T	85	128,8296	1,5156	13,755	0,000**
Erro	432	47,6000	0,1102		
Total	539	533,4148			

CV (%) = 9,82

* = significativo (P≤0,05)

TABELA 11B Análise de variância dos dados referentes ao desdobramento de seis temperaturas dentro de cada um dos dezoito isolados de *Rhizoctonia solani*

FV	GL	SQ	QM	Fc	Prob.<F
Temperatura / MG 2 – I03	5	1,4667	0,2933	2,662	0,0219*
Temperatura / MG 4 –I01	5	0,1667	0,0333	0,303	0,9113ns
Temperatura / GO 1 – I01	5	2,5667	0,5133	4,659	0,0004*
Temperatura / GO 1 – I02	5	7,9000	1,5800	14,339	0,0000*
Temperatura / BA 1 – I03	5	26,6667	5,3333	48,403	0,0000*
Temperatura / BA 1 – I06	5	13,6000	2,7200	24,686	0,0000*
Temperatura / MT 1 – I01	5	0,1667	0,0333	0,303	0,9113ns
Temperatura / MT 1 – I04	5	35,3667	7,0733	64,196	0,0000*
Temperatura / MT 1 – I05	5	8,9667	1,7933	16,276	0,0000*
Temperatura / MG 3 –I02	5	0,6667	0,1333	1,210	0,3030ns
Temperatura / MG 1 –I11	5	29,3667	5,8733	53,304	0,0000*
Temperatura / MG 1 –I02	5	25,7667	5,1533	46,770	0,0000*
Temperatura / MG 1 –I22	5	49,4667	9,8933	89,788	0,0000*
Temperatura / MG 1 –I24	5	30,5667	6,1133	55,482	0,0000*
Temperatura / BA 2 – I01	5	1,0667	0,2133	1,936	0,0870*
Temperatura / MT 2 – I02	5	10,6667	2,1333	19,361	0,0000*
Temperatura / MS 1 – I03	5	26,1667	5,2333	47,496	0,0000*
Temperatura / MG 5 –I01	5	16,0000	3,2000	29,042	0,0000*
Resíduo	432	47,6000	0,1102		

TABELA 12B Análise de variância dos dados referentes ao desdobramento de dezoito isolados dentro de cada uma das seis temperaturas

FV	GL	SQ	QM	Fc	Prob.<F
Isolados / 15°C	17	86,7555	5,1032	46,315	0,000*
Isolados / 18°C	17	123,2000	7,2470	65,772	0,000*
Isolados / 21°C	17	40,4555	2,3797	21,598	0,000*
Isolados / 24°C	17	4,85555	0,2856	2,592	0,000*
Isolados / 27°C	17	10,4555	0,6150	5,582	0,000*
Isolados / 30°C	17	62,3222	3,6660	33,271	0,000*
Resíduo	432	47,6000	0,1101		

* = significativo ($P \leq 0,05$)