

Universidade Federal do Piauí

**Identificação filogenética do complexo *Rhizoctonia solani* em
coentro**

Pâmela Ponce Martins

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para obtenção do título de “Mestre”.

Teresina

2018

Pâmela Ponce Martins
Bacharela em Ciências Biológicas

Identificação filogenética do complexo *Rhizoctonia solani* em coentro

Orientador: Prof. Dr. Maruzanete Pereira de
Melo

Coorientador: Prof. Dr. José Evando Aguiar
Beserra Júnior

Dissertação apresentada à Universidade
Federal do Piauí como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em Genética
e Melhoramento para a obtenção do título de
“Mestre”.

Teresina
2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

M386i Martins, Pâmela Ponce

Identificação filogenética do complexo *Rhizoctonia solani* em coentro. / Pâmela Ponce Martins – 2018.
52 f. : il.

Dissertação(Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Teresina 2018.

Orientação: Prof. Dr. Maruzanete Pereira de Melo

1. Fungos de solo 2. *Ceratobasidium* 3. *Waitea* I. Título.

CDD 632.49

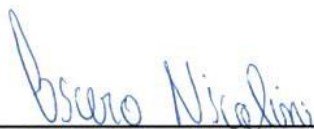
Identificação filogenética do complexo *Rhizoctonia solani* em coentro

Pâmela Ponce Martins

Bacharela em Ciências Biológicas

Aprovada em 04/05/2018

Comissão Julgadora:



Prof. Dr. Cícero Nicolini - UESPI CAMPUS TORQUATO NETO



Prof. Dr. Jean Herllington Araujo Monteiro - IFPI



Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior - CCA/UFPI



**Prof. Dr. Maruzanete Pereira de Melo- UFOPA
(Orientador)**

À minha mãe, Lucia, e à minha irmã, Monique,
por tanto amor e carinho,
dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado em Genética e Melhoramento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Dr. Maruzanete Pereira de Melo, pela disponibilidade, atenção, paciência na orientação, dedicação, profissionalismo e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

Ao meu coorientador, Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior, pelo apoio e incentivo dado durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Silvino Intra Moreira (UFLA), pelo auxílio na coloração de núcleos e a professora Kedma Matos (UFRR) pelo auxílio nas análises filogenéticas.

Ao corpo docente do programa por todo ensinamento passado. Em especial ao Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima pela atenção e pelo apoio que vem desde o período da graduação.

Aos amigos de turma do Mestrado em Genética e Melhoramento, em especial a Auricélia Sousa por toda ajuda durante a realização do trabalho, pela amizade e pelos ensinamentos. Ao Manoel Braz e ao Gérson Nascimento pelo companheirismo, amizade, carinho e por todos os momentos de descontração e alegria que me proporcionaram e que tornaram a caminhada mais leve.

À equipe do Laboratório de Fitopatologia da UFPI, Marta Suane, Antônia, Daniela de Sousa, Juliana Silva, Enayra e Izaias por toda a ajuda na realização deste trabalho e por juntos partilharmos experiências do dia a dia da pesquisa.

Aos meus amigos Nádia, Letícia, Urana, Ricardo e Fernando por todos os momentos que passamos juntos, pelas conversas e conselhos, por entenderem a minha ausência em alguns momentos e por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e ajudando quando preciso.

À minha irmã, Monique, à minha mãe, Lucia, e, ao Gabriel, pela ajuda na escrita desta dissertação, pelo apoio incondicional, por sempre acreditarem em mim, por aturarem meus surtos quando achei que nada daria certo, por todo amor, carinho e paciência que tiveram comigo.

Muito obrigada!

"Não são as ervas más que sufocam a boa semente e sim a negligência do
lavrador."
Confúcio

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 A cultura do coentro.....	15
2.2 Problemas fitossanitários na cultura do coentro.....	16
2.3 O complexo de espécies <i>Rhizoctonia solani</i>	18
3. METODOLOGIA	22
3.1 Coleta e Isolamento.....	22
3.2 Caracterização morfológica.....	23
3.3 Coloração de núcleo.....	24
3.4 Análise molecular.....	24
3.5 Teste de patogenicidade e agressividade.....	31
4. RESULTADOS	32
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44

RESUMO

MARTINS, P. P. **Identificação filogenética do complexo *Rhizoctonia solani* em coentro. 2018.** 52 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, 2018.

O coentro (*Coriandrum sativum*) é uma planta herbácea que pertence à família Apiaceae. É classificada como hortaliça folhosa e aromática. Possui centro de origem no sul da Europa e Oriente Médio. Rússia e Índia são os maiores produtores mundiais. Esta olerícola apresenta importância para a culinária devido ao uso de suas folhas em temperos. Existem alguns problemas fitossanitários de maior relevância, entre eles estão os patógenos que causam problemas no sistema radicular, como *Fusarium*, *Rhizoctonia* sp. e *Macrophomina phaseolina*. A ocorrência de sintomas de podridão radicular e tombamento em plantas de coentro já foram relatados em trabalhos no Brasil, no entanto, a identificação dos fitopatógenos foi realizada apenas com avaliação dos caracteres morfológicos. Desta forma, este estudo teve como objetivos: 1. Identificar quais são os agentes que causam tombamento e podridão radicular em coentro, através de abordagem morfológica e análise molecular. 2. confirmar se os fungos identificados causam tombamento. Amostras de plantas sintomáticas foram coletadas nos estados do Ceará, Piauí e Distrito Federal nos anos de 2016 e 2017. Foram obtidos 13 isolados de fungos de plantas sintomáticas. Inicialmente, os isolados foram cultivados em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e Aveia Agar (A.A.). As culturas em ambos os meios de cultura apresentaram, inicialmente, crescimento branco, tornando marrom ao 20º dia. Todos os isolados produziram microescleródios, no entanto em meio de cultura Aveia ágar a produção foi maior em relação ao meio de cultura BDA. Posteriormente, foi realizada a técnica de coloração de núcleos com marcador fluorescente DAPI e a contagem de núcleo por hifa em microscópio de fluorescência. Dez isolados apresentaram hifas multinucleadas e três, hifas binucleadas, indicando que estes pertenciam a gêneros semelhantes a *R. solani*. Na análise filogenética seis isolados multinucleados agruparam com isolados de referências do grupo de anastomose AG4 HGI, dois agruparam com isolado de referência AG2-2 e 2 isolados não agruparam com nenhum grupo de anastomose já descrito. Os isolados binucleados, dois agruparam com *Waitea circinata* e um isolado agrupou com *Ceratobasidium ramicola*. No teste de patogenicidade confirmou-se que todos os 13 fungos inoculados causaram tombamento em plântulas, e que isolados de *R. solani*, *Ceratobasidium* e *Waitea*, não apresentaram diferenças significativas nos níveis de agressividade. Este é o primeiro registro de *R. solani* AG2-2 e AG4-HGI, *Waitea* sp e *Ceratobasidium ramicola* em coentro no Brasil. Além disso, neste estudo foi identificado uma nova linhagem filogenética do complexo *R. solani*.

Palavras Chave: *Ceratobasidium*, Fungo de solo, *Waitea*

ABSTRACT

MARTINS, P. P. **Phylogenetic identification of *Rhizoctonia solani* complex of coriander.** 2018. 52 p. Dissertation (Master in Genetics and Breeding) - Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, 2018.

Coriander (*Coriandrum sativum*) is a herbaceous plant that belongs to the Apiaceae family. It is classified as a leafy and aromatic edible plant. Its center of origin is in southern Europe and the Middle East. Russia and India are the world's main producers. This edible plant is of culinary importance, due to the use of its leaves for seasoning. Among the phytosanitary problems, the most significant are the pathogens that cause problems to the root system, such as *Fusarium*, *Rhizoctonia* sp. and *Macrophomina phaseolina*. The occurrence of root rot symptoms and collapse in coriander plants has already been reported in studies in Brazil, but the plant pathogens were only identified by the evaluation of morphological characters. Thus, this study had the objectives of: 1. identifying which agents cause collapse and root rot in coriander, by means of a morphological approach and molecular analysis; 2. confirming if the identified fungi cause collapse. Samples of symptomatic plants were collected in the states of Ceará, Piauí and the Federal District in the years 2016 and 2017. Thirteen fungal isolates were obtained from symptomatic plants. Initially, the isolates were cultivated in Potato Dextrose Agar (PDA) and Oatmeal Agar (OA). The cultures in both media showed white growth at first, turning brown at 20 days. All the isolates produced microsclerotia, and the production was higher in OA than in PDA culture. Later, the nucleus staining technique was carried out, using a DAPI fluorescent marker, and nuclei in hyphae were counted under a fluorescence microscope. Ten isolates presented multinucleated hyphae, and three had binucleated hyphae, indicating that these belong to genera similar to *R. solani*. In the phylogenetic analysis, multinucleated six isolates grouped with reference isolates from the anastomosis group AG4 HGI, two grouped with reference isolate AG2-2 and two did not group in any already described anastomosis group. Among the binucleated isolates, two grouped with *Waitea circinata*, and one isolate grouped with *Ceratobasidium ramicola*. In the pathogenicity test, all 13 fungi that were inoculated were confirmed as causing collapse in the plantlets, and isolates of *R. solani*, *Ceratobasidium* and *Waitea* did not present significant differences in levels of aggressiveness. This is the first record of *R. solani* AG2-2 and AG4-HGI, *Waitea* sp. and *Ceratobasidium ramicola* in coriander in Brazil. In addition, a new phylogenetic lineage of the *R. solani* complex was identified in this study.

Key words: *Ceratobasidium*, Soil fungus, *Waitea*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - *Coriandrum sativum*: (A) Área de cultivo (B) Plântulas de coentro. (C) Cultivo de coentro em canteiros. (D) Flores e frutos..... 23
- Figura 2 - Análise filogenética construída por inferência bayesiana de sequências da região ITS mostrando a relação entre espécies do complexo *Rhizoctonia*. Os isolados utilizados nesse estudo estão destacados em negrito. *Waitea cicinata* e *Sclerotium* sp. foram usados como grupo externo..... 34
- Figura 3 - Análise filogenética construída por inferência bayesiana de sequências da região ITS mostrando a relação entre isolados de *Waitea* spp. Os valores de probabilidade estão representados nos entroncamentos da árvore. Os isolados utilizados nesse estudo estão destacados em negrito. *Rhizoctonia solani* foi usado como grupo externo..... 34
- Figura 4 - Análise filogenética construída por inferência bayesiana de sequências da região ITS mostrando a relação entre isolados de *Ceratobasidium ramicola*. Os valores de probabilidade estão representados nos entroncamentos da árvore. Os isolados utilizados nesse estudo estão destacados em negrito. *Waitea cicinata* foi usado como grupo externo..... 34
- Figura 5 - *Rhizoctonia solani*: (A) Aspecto de cultura de isolados do grupo de anastomose AG4-HG1 em meio de cultura BDA com a presença de crescimento concêntrico e em meio de cultura A.A. (B) Aspecto de cultura de isolado de nova linhagem filogenética, PP55, em meio de cultura BDA e A.A. com a produção de um micélio mais denso e microescleródios maiores. (C) Aspecto de cultura de isolados do grupo de anastomose AG2-2 em meio de cultura BDA e A.A. com a presença de crescimento concêntrico e produção de microescleródios. (D-E) Aspecto de cultura de isolado de nova linhagem filogenética, MPM227. *Waitea circinata*. (F) aspecto da cultura em meio BDA com a presença de microescleródios submersos no meio. (G) Aspecto da cultura em meio Aveia-ágar coma produção de um micélio tufo e produção de microescleródios grande e alaranjados. (H-I) Microescleródios de *Waitea* crescido em meio A.A. (J) Microescleródios submerso em meio de cultura BDA. (K) Morfologia de escleródios do isolado PP55. (L-M) Escleródios do isolado MPM227..... 36

- Figura 6 - Marcadores morfológicos de *Rhizoctonia solani*. (A) Hifas multinucleadas de *Thanatephorus curcumeris* (B-C) Basidiósporos e basídia. (D) Himênio sobre caule de coentro (E) Hifas multinucleadas de *Rhizoctonia solani* (F-G) Hifas binucleadas de *Ceratobasidium* e *Waitea*..... 37
- Figura 7 - Sintomas e teste de patogenicidade do complexo *Rhizoctonia* Setas indicando tombamento pós-emergência e asterisco indicando tombamento de pré-emergência..... 38
- Figura 8 - Análise estatística de agressividade dos isolados de *Rhizoctonia solani*, AG4 e AG2, ^B*Rhizoctonia solani* nova linhagem filogenética, ^C*Ceratobasidium ramicola* e ^D*Waitea* sp Mesmas letras não apresentam diferença estatística..... 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Acessos de <i>Rhizoctonia solani</i> proveniente de diversos hospedeiros depositados no Genbank e no TreeBASE	26
Tabela 2	- Informação de <i>Ceratobasidium</i> spp. (Binucleado de <i>Rhizoctonia</i>) isolados de referência e seus números de acesso ao GenBank	28
Tabela 3	Acessos de <i>Waitea</i> spp. (binucleado de <i>Rhizoctonia</i>) provenientes de diversos hospedeiros depositados no Genbank	30
Tabela 4	Análise cultural dos isolados do complexo <i>Rhizoctonia</i> obtidos de coentro (<i>Coriandrum sativum</i>) crescidos em meios Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e Aveia-Ágar (A.A.).....	35

1. INTRODUÇÃO

O coentro (*Coriandrum sativum* L.) é uma hortaliça folhosa pertencente à família Apiaceae e foi disseminada pelo mundo durante a colonização europeia. Esta espécie apresenta centro de origem no Sul da Europa e Oriente Médio. É uma cultura que apresenta adaptação a clima quente e é intolerante a baixas temperaturas (EMBRAPA, 2010).

Em 2016, Rússia e Índia foram os maiores exportadores de semente de coentro do mundo, sendo a Índia o maior consumidor desta especiaria. No continente americano, Canadá, México, Estados Unidos e Argentina são os maiores produtores. No Brasil a produção de coentro é voltada principalmente para comercialização das folhas, no entanto nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Pernambuco há grande produção de semente para comercialização (NOVOSTI, 2016)

No Brasil, essa olerícola está entre as mais consumidas, principalmente nas regiões Norte e Nordeste. Suas folhas frescas são bastante utilizadas como temperos, em saladas e como elemento decorativo. As sementes também são usadas como condimento. A produção de coentro é voltada principalmente para comercialização das folhas, no entanto nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Pernambuco há grande produção de semente para comercialização (EMBRAPA, 2010).

Segundo dados da ABCSEM, em 2016 a área cultivada com coentro no Brasil foi de 73.938 hectares, com produção de 1.109.063 toneladas de coentro, gerando um faturamento de cerca de 575,88 milhões de dólares. No entanto, as perdas na produção dessa hortaliça chegaram a 35% somando-se perdas na produção e na comercialização.

Essa espécie apresenta diversos problemas relacionados a cultura e pode apresentar doenças tanto na parte aérea como no sistema radicular, sendo este os que causam maiores danos na produção (REIS e LOPES, 2015; NORONHA et al., 2015). Diferentes agentes etiológicos foram relatados causando problemas fitossanitários e prejuízos econômicos, como fungos, oomicotas, bactérias, vírus e nematoides. Os principais fitopatógenos encontrados são *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria dauci*, *Phytium* spp., *Pseudomonas syringae* e *Meloidogyne* spp. (INFANTE et al., 2018; KOIKE et al., 2017; CARZOLA et al.; 2005).

O complexo de espécies *Rhizoctonia solani* é formado por um conjunto de táxons de fungos que possuem mesmas características no estágio anamórfico, incluindo espécies do gênero *Rhizoctonia* e gêneros afins, *Ceratobasidium* e *Waitea*. Esses patógenos são encontrados em solo e geralmente estão associados às raízes das plantas, causando a podridão da raiz, tombamento de plântulas, mela e manchas foliares (GONZALEZ et al., 2001).

A classificação do complexo *Rhizoctonia* é baseada nas características morfológicas, na interação de hifas e na contagem de núcleos por célula. A interação de hifas compatíveis forma os grupos de anastomose (AGs), essa anastomose é a manifestação de compatibilidade somática entre indivíduos, e ocorre através da fusão de hifas de dois isolados (GARCIA et al., 2006).

No entanto a identificação baseada apenas nas características culturais dos grupos de anastomose e dos gêneros pertencentes a esse complexo não é precisa, pois possuem poucos marcadores morfológicos e possuem mesmas características. Dessa forma, para que seja feita uma correta identificação faz-se necessário o uso de técnicas moleculares. E a análise da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) tem sido bastante usada no estudo dessas espécies por ser uma região muito conservada (SHARON et al., 2008).

Em visitas a hortas comunitárias na região de Teresina, PI e em municípios vizinhos observa-se frequentemente sintomas de tombamento de plântulas de coentro. No Estado de Alagoas também foi constatado a presença desses sintomas em grande número de plantas de coentro, e associado a estes sintomas encontraram diversos gêneros de fungos de solo (INFANTE, 2016). Existem poucos trabalhos que relaciona a correta identificação de fitopatógenos associados a coentro, e é de fundamental importância conhecer o agente etiológico para aplicar as devidas medidas de controle desses agentes.

Diante do exposto, neste estudo pretendemos (i). Identificar os agentes causais do tombamento, mela e podridão radicular do coentro através de técnicas morfológica e de biologia molecular (ii). Realizar inoculações para confirmar se estes microrganismos causam doença (iii). Determinar os níveis de agressividade dos isolados estudados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do coentro

O coentro (*Coriandrum sativum*) é uma hortaliça folhosa de aspecto herbáceo, apresentando porte baixo, e possui centro de origem no Sul da Europa e Oriente (EMBRAPA, 2010). Esta espécie pertence à família Apiaceae e apresenta polinização cruzada, sendo os insetos os principais agentes polinizadores. É uma planta glabra com raiz pivotante, possui caule ereto e com poucas ramificações. Suas folhas são compostas, partidas e com disposição alternada. As inflorescências são do tipo umbela, com flores hermafroditas e pequenas. O fruto é um diaquênio ovoide, globuloso, de 3-4 mm de diâmetro, e pode separar-se em dois aquênios hemisféricos (CORRÊA, 1984). Essa cultura apresenta adaptação à clima quente, sendo intolerante à baixas temperaturas (PEDROSA et al., 1984).

A disseminação dessa espécie botânica ocorreu por diversas partes do mundo, através dos europeus, durante o período de colonização, alcançando países do continente Americano, com destaque para Brasil e México e países do sudoeste asiático (CUNHA et al., 2011). Essa hortaliça está distribuída em diversos países do mundo, sendo a Rússia e a Índia os maiores produtores mundiais (NOVOSTI, 2016) e Canadá, Estados Unidos, México e Argentina, os maiores produtores nas américas (BLADE et al., 2016).

Nos países europeus e nos Estados Unidos, os frutos maduros e secos são utilizados na culinária como condimentos e aromatizantes de pães e bolos; na indústria de bebidas, como aromatizantes de cervejas e licores e na área farmacêutica, por possuírem propriedades digestivas e calmantes (SILVA et al., 2011).

No Brasil, o coentro é uma das olerícolas mais consumidas, principalmente nas regiões Norte e Nordeste (PEDROSO, 2009). Esta hortaliça é amplamente utilizada na culinária de diversas formas, sendo o uso das folhas frescas bastante comum como tempero, em saladas e como elemento decorativo na finalização de pratos (FILGUEIRA, 1982; CARDOSO, 1997). Dessa forma, o seu cultivo no Brasil é voltado principalmente para a produção de folhas. No entanto, as sementes são importantes para propagação, os estados de São Paulo e Minas Gerais são os maiores produtores de sementes de coentro (EMBRAPA, 2010).

Em função do alto consumo de coentro no Brasil e por existir grande número de produtores envolvidos em seu cultivo, essa cultura apresenta grande importância

socioeconômica (PEREIRA e NASCIMENTO, 2003). Por ser uma cultura de ciclo precoce (45-60 dias) o retorno do capital investido é rápido, possibilitando o uso de mão de obra familiar nos tratos culturais, permitindo desta forma o aumento da renda familiar (HAAG e MINAMI, 1998).

As cultivares mais usadas no Brasil são: Verdão, Super-Verdão, Tabocas e Português. No entanto, em algumas regiões são utilizadas sementes locais de origens desconhecidas, produzidas pelos próprios agricultores (PEREIRA et al., 2005; FILGUEIRA, 2008).

O plantio é realizado através de semeadura em canteiros definitivos com espaçamento entre sulcos de 20 a 30 cm. Geralmente, os produtores utilizam grande quantidade de sementes, devido à baixa pureza e poder germinativo. Os pequenos produtores utilizam estratégias de dividir a semente com objetivo de obter maior rendimento na semeadura e melhoria na germinação (NASCIMENTO et al., 2006). A colheita é realizada quando as plantas atingem cerca de 10 a 15 cm de altura. Alternativamente, ramos são colhido quando as plantas possuem de 50 a 60 cm de altura, com o objetivo de realizar diversas colheitas (COTIA 1987; FILGUEIRA, 2000).

Devido a comercialização de sementes, no Brasil arrecadou cerca de 17,4 milhões de dólares com a produção de aproximadamente 780 toneladas de semente (ABCSEM, 2012). Em 2016, a área cultivada com coentro, por pequenos e médios produtores, foi de 73.938 hectares, produzindo cerca de 1.100.000 toneladas de sementes. Somando-se as perdas na produção e na comercialização dessa hortaliça, o valor chega a 35% neste ano, no entanto, o comércio dessa espécie gerou um faturamento de cerca de 576 milhões de dólares (ABCSEM, 2017). Observa-se que a produção de coentro se encontra em expansão, principalmente nos estados das regiões nordeste, centro-oeste e norte do Brasil (ABCSEM, 2012; WANDERLEY JUNIOR e NASCIMENTO, 2006). A região que apresenta maior produção de coentro no Brasil é a Nordeste, sendo o estado de Pernambuco o maior produtor, de folhas e de sementes (OLIVEIRA et al., 2003).

2.2 Problemas fitossanitários na cultura do coentro

Diversos problemas fitossanitários estão relacionados a cultura de coentro no Brasil e no mundo. A associação de agentes de diferentes etiologias que causam doenças já foi observada nesta cultura. Esses microrganismos afetam tanto a parte

aérea como o sistema radicular da planta, sendo este o que causa maiores danos à produção (REIS e LOPES, 2015; NORONHA et al., 2015). Associados às plântulas, causam sintomas como podridão radicular e tombamento interferindo na redução do estande de plantas (NORONHA et al., 2015). Essas questões, aliadas à poucas informações sobre a cultura, dificultam o seu cultivo e diminuem a sua produção (PEREIRA et al., 2005).

No Brasil, apesar do coentro ser uma importante cultura, existem poucos relatos de fungos fitopatogênicos. Em 2013 foi registrado um surto de tombamento em plântulas na região do agreste alagoano, e diversos fungos habitante de solo foram identificados (FERREIRA, 2013).

Infante et al. (2017) encontraram, nos campos de cultivo do estado de Alagoas, cerca de 90% das plantas com sintomas de tombamento. As plantas inicialmente, apresentaram sintomas de amarelecimento e, com o apodrecimento da raiz, declinaram. Após o isolamento do patógeno e sequenciamento dos genes ITS e Cox2, foi possível confirmar a identificação da cultura como *Pythium irregulare*. Esse foi o primeiro relato de *P. irregulare* causando tombamentos em plantações de coentro no Brasil. *Pythium* spp. foram relatados induzindo o amortecimento das mudas de coentro também na Itália, *P. ultimum* (GARIBALDI et al., 2010) e *P. disotocum* em Porto Rico (ROMERO et al., 2012).

No estado da Califórnia, foram encontradas plantas de coentro com raízes necrosadas e atrofiadas, além de folhagem amarelada e murcha. A incidência de plantas com esses sintomas nos campos de cultivos variou de 10 a 20%. Através de análise morfológica o fungo foi identificado como *Rhizoctonia solani* e foram utilizados primers para as regiões ITS1 e ITS4 para confirmar a identificação através do sequenciamento dos isolados. Após o sequenciamento concluiu-se que esse isolados pertencem aos grupos de anastomose AG2-1 e AG4-HGI de *R. solani* (KOIKE et al., 2017). *R. solani* também foi encontrado em cultivo de coentro na Argentina, entretanto, os autores não identificaram os grupos de anastomose dos isolados (MADIA e GAETAN, 1995).

Dentre as espécies de *Fusarium* que afetam coentro, as espécies já relatadas foram *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, causando sintomas de murcha e podridão radicular. Em plantas com murcha ocorre o escurecimento do tecido vascular. Em 2006, dois sistemas hidropônicos tiveram 100% de perdas de alface e coentro em Porto Rico devido à podridão radicular. Os sintomas apresentados pelas

plantas e a identificação morfológica do fungo mostrou que o patógeno era do complexo de espécies *Fusarium solani*. Essa identificação foi confirmada através de sequenciamento do gene ITS. (JENSEN e ABAD, 2009).

Outro importante fungo habitante de solo é *Macrophomina phaseolina*, e apesar de ser um patógeno com ampla gama de hospedeiro, existe apenas um registro de *M. phaseolina* em coentro no mundo. Em plantios de coentro na Bulgária, foram encontradas diversas plantas sintomáticas. Com base nas características culturais e esporos do fungo, os isolados foram identificados como *Macrophomina phaseolina* (RODEVA et al., 2010).

Além dos agentes causadores de podridão radicular na cultura do coentro, existem patógenos que foram encontrados causando manchas foliares. Em áreas de cultivo de coentro no estado da Florida (EUA), observou-se que cerca de 15% das plantas manifestavam sintomas de manchas foliares. Através da análise morfológica o fungo foi identificado como *Alternaria* sp. A análise molecular confirmou a identidade de *Alternaria dauci*. Este foi o primeiro relato de *A. dauci* em coentro nos Estados Unidos (POUDEL e ZHANG, 2017). A presença desse fungo em coentro também foi relatada em Porto Rico (WOUDEBERG et al., 2014).

2.3 O complexo de espécies *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani Kuhn é um fungo pertencente ao filo Basidiomycota, habitante de solo considerado um fitopatógeno cosmopolita, que causa doenças em diversas espécies botânicas, e apresenta capacidade de ação saprofítica no solo. Tem como forma sexuada *Thanatephorus curcumeris* Frank. Por não produzir esporos na fase assexuada, os inóculos produzidos nesta fase são micélio vegetativo e microescleródios. Na fase sexuada, produz basidiósporos, no entanto, a reprodução da fase sexuada é difícil de ser observada, provavelmente, devido a fatores genéticos do fungo ou devido a fatores nutricionais e condições de temperatura, luz e nutricionais não favoráveis (GONZALEZ et al., 2001; SNEH et al., 2013).

O morfogênero *Rhizoctonia* é considerado um conjunto heterogêneo de táxons de fungos filamentosos que não produz esporos na fase assexuada e possui hifas grossas, com ramificação em de 90° graus, além de constrição dos septos. As espécies representadas por *Rhizoctonia* e gêneros afins são geralmente encontradas em solo, principalmente associadas às raízes, causando importantes

doenças em plantas de interesse agrícola, como olerícolas, florestais e cereais. *Rhizoctonia solani* causa doenças como podridão de raízes, tombamento de plântulas, mela e manchas foliares (GONZALEZ et al., 2001).

A identificação de *R. solani* na fase anamórfica é baseada em características, como ramificação em ângulo reto observada próximo ao septo distal das hifas, ramificação de hifas com constrição na extremidade basal, número de núcleos por célula, coloração e morfologia da colônia, diâmetro da hifa, morfologia e tamanho de escleródios (CARLING e SUMMER, 1992).

R. solani é um grupo complexo, formado por 14 grupos e diversos subgrupos. Esses grupos são determinados através da anastomose de hifas e são denominados de grupos de anastomose AG-1 a AG-13. Além disso dentro de cada grupo de anastomose existem os subgrupos. O último grupo de anastomose encontrado foi obtido de plantas de citros do Brasil (CARLING et al., 2002; CARLING et al., 1999; CARLING et al., 1996).

A anastomose é uma manifestação de compatibilidade somática entre indivíduos do mesmo grupo, que ocorre pela fusão de hifas de dois isolados, e dessa forma ocorre a troca de material genético entre eles. Enquanto hifas de AGs diferentes não conseguem se fundir, e, conseqüentemente, não trocam material genético, ou seja, não ocorre a anastomose (ANDERSON, 1982). Esse conceito de grupo de anastomose de é importante para fitopatologistas e melhoristas de plantas, sob o ponto de vista etiológico, pois cada grupo de anastomose é considerado uma linhagem filogenética distinta (CUBETA e VILGALYS, 1997; GONZALEZ et al., 2001).

Morfologicamente, a classificação atual de *R. solani* é baseada nas características culturais e na interação de hifas compatíveis que formam os grupos de anastomose. Apesar dos marcadores morfológicos serem utilizados durante muito tempo na taxonomia desta morfoespécie, eles não são considerados precisos na correta identificação, pois esse gênero possui poucos marcadores morfológicos, não sendo possível diferenciar corretamente os isolados. Outro problema é que além do gênero *Rhizoctonia*, os gêneros *Waitea* e *Ceratobasidium*, possuem as mesmas características morfológicas, formando o morfo-gênero *Rhizoctonia* e dificultando a diferenciação desses gêneros somente pela avaliação morfológica (GARCIA et al., 2006).

Apesar da técnica de compatibilidade de hifas (grupos de anastomose) ser frequentemente utilizada na identificação dos grupos, algumas vezes ocorrem inconsistências, pois ela não determina os subgrupos e podem existir falhas na interpretação dos resultados. Além disso Campos e Ceresini (2006) observaram que entre isolados do grupo AG-1 IA houve incompatibilidade somática. A correta identificação do grupo de anastomose do complexo *R. solani* é importante, pois existem grupos genéticos isolados. E cada grupo se comporta de forma diferente no ambiente, tanto nos aspectos bioquímicos como genéticos. Em estudo conduzido com isolados obtidos de diferentes hospedeiros hortícolas, observou-se que o agente etiológico de tombamento em brócolis, tomate e melão são pertencentes ao grupo de anastomose AG4-HGI, AG4-HGIII e AG1-IB (KUMARAE et al., 2002). Existe confirmação que a correta identificação dos grupos de anastomose de *Rhizoctonia* é útil para estudos de resistência de plantas, além de estudos relacionados a epidemiologia e ecologia da doença (CARLING et al., 1996).

Fatores relacionados a severidade e a agressividade dos isolados de *R. solani* podem variar devido ao grupo de anastomose. Isolados de *R. solani* AG2-2IIIB e AG-4 causam podridões em raízes e hipocótilos. No entanto, observa-se diferenças quanto à agressividade entre os grupos de anastomose. Isolados AG2-2IIIB são mais agressivos em raízes, enquanto que isolados AG-4 são mais agressivos em hipocótilos (MUYOLO et al., 1993).

A identificação de grupos de anastomose tem sido confirmada pelo uso de técnicas baseadas na análise de DNA. Análise de sequências da unidade transcrita 5.8S e da região espaçadora transcrita interna (ITS, do inglês Internal Transcribed Spacer) tem sido usada para confirmar a taxonomia e relações filogenéticas entre os diferentes grupos de anastomose do complexo *Rhizoctonia solani* facilitando, dessa forma, a identificação deste complexo de espécies. O complexo *Rhizoctonia solani* vem passando por modificações taxonômicas devido à utilização de estudos filogenéticos (SHARON et al., 2008; CARLING et al., 2002).

Os gêneros *Ceratobasidium* e *Waitea*, além de apresentarem os mesmos marcadores morfológicos, estão filogeneticamente próximos a *Rhizoctonia*. *Ceratobasidium* é um importante patógeno de plantas, causando sintomas denominados de queima-do-fio. Esse gênero apresenta fase anamórfica de isolados binucleados de *Rhizoctonia* (BENCHIMOL et al., 2001; SNEH et al. 2013).

O gênero *Waitea* se divide em três importantes clados, sendo *Waitea circinata* conhecido como a fase sexuada de *R. oryzae* e *R. zae* (GUNNELL, 1986; ONIKI et al., 1985). Essa espécie foi reclassificada em três variedades, sendo *W. c. var. oryzae*, *W. c. var. zae* e *W. c. var. circinata*. Essa reclassificação foi baseada nas características da colônia e aspecto do micélio (GUNNELL, 1987). As espécies pertencentes ao gênero *Waitea* são patógenos que, geralmente, causam doenças em plantas da família *Poaceae*, como arroz, milho e gramados (CHANG e LEE, 2016).

3. METODOLOGIA

3.1 Coleta e Isolamento

Em julho 2016 e fevereiro de 2017 foram realizadas coletas em áreas produtoras de coentro em Teresina e José de Freitas no Piauí, em Tianguá e Ubajara no Ceará e em Brasília no Distrito Federal. Foram realizadas 10 amostragens onde coletaram-se plantas com sintomas de mela, podridão radicular e tombamento (Figura 1).

As amostras com sintomas foram lavadas em água esterilizada para retirada do excesso de solo, em seguida foram cortadas e os fragmentos colonizados foram colocados em álcool 70% por um minuto, posteriormente foram desinfetados com hipoclorito de sódio a 1% por três minutos, em seguida lavados com água esterilizada para retirada do excesso de hipoclorito. Os fragmentos foram depositados em papel filtro estéril para retirar o excesso de umidade. Após uma hora, os fragmentos foram transferidos para placa de Petri contendo meio de cultura BDA (Dextrose Batata Agar) com antibiótico estreptomina (0,050g.L⁻¹). Em seguida as placas foram incubadas em estufa incubadora a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. As placas foram avaliadas diariamente, as avaliações foram realizadas em microscópio estereoscópio. Ao observar hifas próximo ao tecido sobre o tecido, realizou a transferência de fragmentos de hifas da borda da cultura crescidas do tecido lesionado foram transferidos para nova placa de Petri contendo meio de cultura BDA. As placas foram novamente colocadas em estufa incubadora, após 10 dias de cultivo, foram coletados discos de micélio de cada isolado e armazenados em microtubos. Todos os isolados se encontram depositados na coleção de fungos fitopatogênicos na Universidade Federal do Piauí (UFPI).

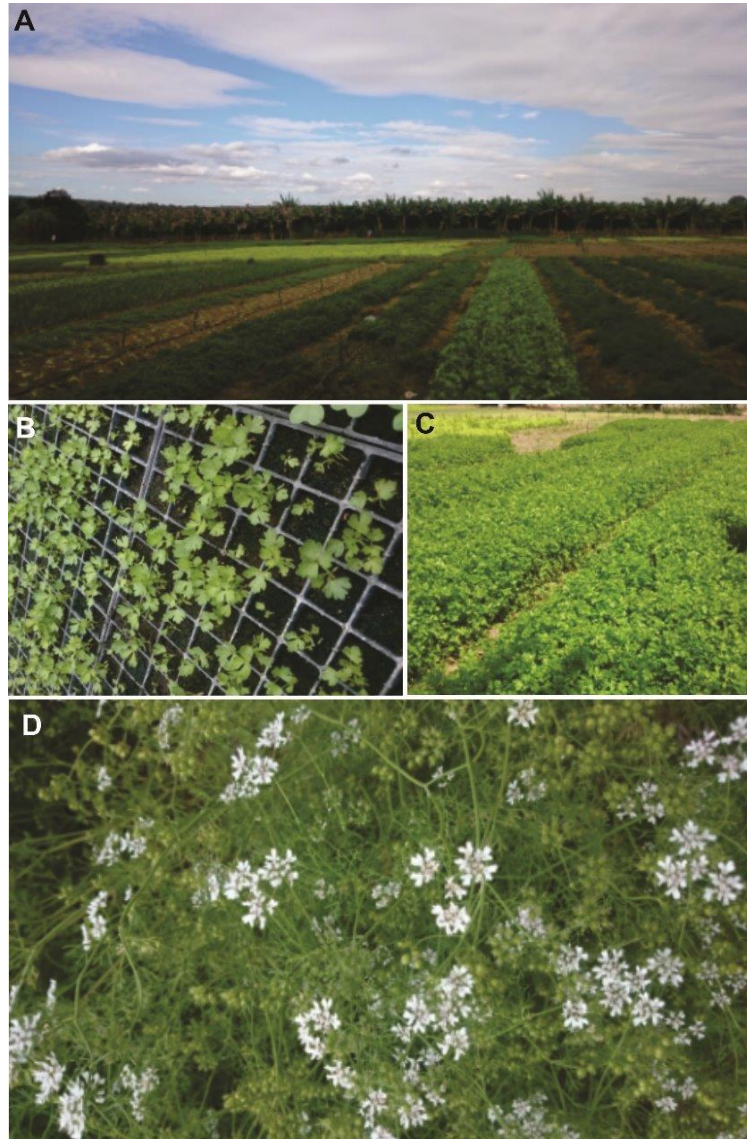


Figura 1: *Coriandrum sativum*: (A) Área de cultivo em Ubajara - CE. (B) Plântulas de coentro. (C) Cultivo de coentro em canteiros. (D) Flores e frutos.

3.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi adaptada de Gonzalez et al. (2006). Cada isolado foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e Aveia Ágar (A.A.), em cada placa foi colocado um disco contendo o micélio do isolado. As placas foram incubadas no escuro por 20 dias. Após esse período foram avaliadas as características morfológicas de cada placa, como aspecto da cultura, pigmentação, formação de anéis concêntricos e formação de escleródios.

3.3 Coloração de núcleo

A coloração de núcleos foi realizada no laboratório de microscopia da Universidade Federal de Lavras em Minas Gerais, com protocolo adaptado de Ceresini et al. (1996). A condição nuclear foi determinada usando pequenos fragmentos de hifas obtidos da margem da colônia com idade de três dias. Fragmentos com 0.5 cm de diâmetro foram fixados em solução de Karnovsky com pH 7.2. A determinação do número de núcleos por célula foi feita com o marcador fluorescente DAPI (4'6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) (VectaShield® H-1200 Vector®) e os meios de montagens e o septos com Calcofluor White (Sigma®) 0.1 mg.mL⁻¹ tampão fosfato de potássio pH 7.2. Os fragmentos fixados foram colocados sobre gotas da solução DAPI, em seguida depositou-se as lamínulas sobre a gota para observação da marcação do núcleo, após 5 minutos observou-se a lâmina em microscópio Laser Confocal Zeiss. Foi utilizado o software Zen 2012 para adquirir as imagens, com objetiva de 40x em óleo de imersão.

3.4 Análise molecular

Os isolados fúngicos foram enviados para o Instituto Biológico em São Paulo para realização do sequenciamento.

A extração do DNA genômico dos isolados foi realizada utilizando-se o kit "AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep" (Axygen Biosciences, Union City, CA, Estados Unidos). A biomassa para extração de DNA foi produzida em placas contendo meio BDA e transferida para um microtubo de 1,5 mL. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 1 min. O sobrenadante (meio de cultura) foi descartado, ficando apenas o precipitado (biomassa fúngica). Ao final da extração de DNA, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com SYBR Safe (Invitrogen Brasil®), e a quantificação e mensuração do tamanho do DNA genômico foram realizadas por comparação de altura e intensidade de banda com o marcador 1 Kb Ladder (Invitrogen Brasil®).

A reação de PCR foi realizada utilizando os reagentes nas seguintes proporções: 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 10pmol/µL, 1µL de Taq DNA polimerase (5un/µL), 35,5µL de água ultrapura. As regiões gênicas Internal Transcribed Spacer (ITS) foram amplificadas usando os primers ITS 1 (5'-TCC GTA GGT GA.A. CCT GCG G-3') e ITS 4 (5'-TCC

TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White et al., 1990). A amplificação foi realizada no termociclador PCT-100 (MJ Research, Inc. USA), empregando-se 35 ciclos de 40 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C, 2 minutos a 72°C, seguido de um ciclo final de 5 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 2% corado com GelRed™ (Biotium Inc.) e tampão TAE 1 × (SAMBROOK et al., 1989) e visualizado sob luz UV. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Brasil). O sequenciamento foi realizado pelo Instituto Biológico de São Paulo.

As sequências de nucleotídeos foram editadas usando SeqAssem (HEPPERLE, 2004). Sequências adicionais de isolados de referência de *Rhizoctonia*, de diferentes hospedeiros, foram obtidas no GenBank (Tabela 1). As sequências foram alinhadas usando o programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994), como implementado no software MEGA v. 6 (TAMURA et al., 2011). Análises de inferência Bayesiana foram realizadas com todas as sequências empregando o método de cadeias Monte Carlo (MCMCMC). O Mr Modeltest 2.3 (POSADA e BUCLEY, 2004) foi usado para determinar o modelo de substituição dos nucleotídeos que melhor se ajustou aos dados, o modelo utilizado foi GTR+G para ITS. A análise filogenética foi realizada no CIPRES web portal (MILLER et al., 2010) usando a versão MrBayes v. 3.2. (RONQUIST et al., 2012). Cadeias de Markov foram executadas simultaneamente, a partir de árvores aleatórias para 10.000.000 gerações. Árvores foram amostradas cada 1000th gerações para um total de 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas como *burn-in* de cada análise e as 7.500 árvores restantes foram utilizadas para o cálculo das probabilidades posteriores dos ramos determinados pelo consenso de maioria das árvores amostradas. Árvores foram visualizadas em Figtree (RAMBAUT, 2009) e exportadas para programas gráficos. Nesta análise, isolados de *Sclerotium rolfsii* foram utilizados como grupo externo. As sequências obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank (Tabelas 1, 2 e 3).

Tabela 1 – Acessos de *Rhizoctonia solani* provenientes de diversos hospedeiros depositados no Genbank e no TreeBASE

Nome da espécie	Número da coleção da Cultura	Isolado	Grupo/subgrupo de anastomose	Hospedeiro/ Substrato	Origem	Acesso no GenBank. ITS ^c
<i>R. solani</i>		PP 13	AG1-HG-I	<i>Coriandrum sativum</i>	Tianguá, CE	
<i>R. solani</i>		PP 17	AG1-HG-I	<i>Coriandrum sativum</i>	Tianguá, CE	
<i>R. solani</i>		RHIZ 546	AG1-HG-I	<i>Coriandrum sativum</i>	Brasilândia, DF	
<i>R. solani</i>		RHIZ 639	AG1-HG-I	<i>Coriandrum sativum</i>	Gama, DF	
<i>R. solani</i>		EMJS 17	AG2-2	<i>Coriandrum sativum</i>	Teresina, PI	
<i>R. solani</i>		MPM 227	AG2-2	<i>Coriandrum sativum</i>	Teresina, PI	
<i>R. solani</i>		MPM 235	Desconhecido	<i>Coriandrum sativum</i>	José de Freitas, PI	
<i>R. solani</i>		PP 55	Desconhecido	<i>Coriandrum sativum</i>	José de Freitas, PI	
<i>Waitea</i>		PP 41		<i>Coriandrium sativum</i>	Teresina, PI	
<i>Waitea</i>		PP 48		<i>Coriandrum sativum</i>	Teresina, PI	
<i>Ceratobasidium</i>		PP 37		<i>Coriandrum sativum</i>	Tiaguá, CE	
<i>R. solani</i>		SJ16	AG1-IA	<i>Glycine Max</i>	Brasil	AY270010
<i>R. solani</i>		R147	AG1-IB	<i>Trifolium repens</i>	Japão	AB122139
<i>R. solani</i>		DR-BV22	AG1-IB	<i>Phaseolus vulgaris</i>	República dominicana	AF308626
<i>R. solani</i>		P10	AG1-IC	<i>Beta vulgaris</i>	Japão	AB122142
<i>R. solani</i>		RCP13	AG1-ID	<i>Coffea arábica</i>	Japão	AB122130
<i>R. solani</i>		PS-4	AG2-1	Desconhecido	Desconhecido	AY154317
<i>R. solani</i>		23R01	AG2-3	<i>Glycine max</i>	Japão	U57740
<i>R. solani</i>		221	AG2-4	<i>Zea mays</i>	Estados Unidos	AB054878
<i>R. solani</i>		15Rsc	AG2-2 IIIB	<i>Juncus sp.</i>	Japão	AF354116
<i>R. solani</i>		RI-64	AG2-2 IV	<i>Beta vulgaris</i>	Japão	AY270014
<i>R. solani</i>		G4	AG2-2 LP	<i>Zoysia grass</i>	Japão	AJ238163
<i>R. solani</i>		TE2-4	AG2 BI	Solo	Japão	AB054873
<i>R. solani</i>		1600NC	AG3 TB	<i>Nicotiana tabacum</i>	Estados Unidos	AF153774
<i>R. solani</i>		F82	AG3 PT	Solo	Austrália	AB019023
<i>R. solani</i>		HG-I GM-3	AG4 HG-I	Soja	Japão	AB000018
<i>R. solani</i>		HG-I R97	AG4 HG-I	Beterraba	Japão	AB000031
<i>R. solani</i>		HG-II 77-26R-1	AG4 HG-II	<i>Beta vulgaris</i>	Japão	AB000006
<i>R. solani</i>		EP-2	AG4 HG-III	<i>Spinacia oleracea</i>	Brasil	AY154659

Continua

Conclusão						
Nome da espécie	Número da coleção da Cultura	Isolado	Grupo/subgrupo de anastomose	Hospedeiro/ substrato	Origem	Acesso no GenBank. ITS ^c
<i>R. solani</i>		31Rs	AG5	<i>Beta vulgaris</i>	Japão	AF354113
<i>R. solani</i>		OT2-1	AG6	Desconhecido	Japão	AF153780
<i>R. solani</i>		91ST8057-2A-RSA	AG7	Solo	Estados Unidos	AF354100
<i>R. solani</i>		(ZG1-3) SA1512	AG8	<i>Hordeum vulgare</i>	Austrália	AF354068
<i>R. solani</i>		111Rs	AG9	<i>Solanum tuberosum</i>	Estados Unidos	AF354108
<i>R. solani</i>		93017	AG10	Solo	Austrália	AF153800
<i>R. solani</i>			AG11	Desconhecido	Desconhecido	AY154313
<i>R. solani</i>		H1	AG12	<i>Pterostylis acuminata</i>	Austrália	AF153804
<i>Waitea circinata</i>		IMI 375117		<i>Oryza sativa</i>	Japão	AJ000195
<i>Sclerotium rolfsii</i>		FSR-052		Desconhecido	Desconhecido	AY684917

^aEstados do Brasil: MG = Minas Gerais; PI = Piauí; DF = Distrito Federal. ^b ITS-5.8S rDNA região analisada no sequenciamento

Tabela 2 - Informação de *Ceratobasidium* spp. (Binucleado de *Rhizoctonia*) isolados de referência e seus números de acesso ao GenBank

Haplótipo	Grupo de anastomose	Nome da espécie	Número da coleção da Cultura ^a	Isolado	Hospedeiro/ Substrato	Origem ^b	Acesso no GenBank. ITS ^c
-	-	<i>C. chavesanum</i> sp. nov.	CML 3470	DK10c2a	<i>D. kaki</i>	SP, Brasil	EU810045
-	-	<i>C. chavesanum</i> sp. nov.	CML 3471	DK11c2a	<i>D. kaki</i>	SP, Brasil	EU810047
-	-	<i>C. chavesanum</i> sp. nov.	CML 3472	DK11b1a	<i>D. kaki</i>	SP, Brasil	EU810046
-	-	<i>C. chavesanum</i> sp. nov.	CML 3474T	10BRCA25	<i>C. arábica</i>	ES, Brasil	KX870113
-	-	<i>C. niltonsouzanum</i> sp. nov.	CML 3477	CS161	<i>Camellia sinensis</i>	SP, Brasil	EU810032
-	-	<i>C. niltonsouzanum</i> sp. nov.	CML 3478	CS94a	<i>C. sinensis</i>	SP, Brasil	EU810043
-	-	<i>C. niltonsouzanum</i> sp. nov.	CML 3596	MPM 201	<i>Azadirachta indica</i>	PI, Brasil	KX870111
-	-	<i>C. niltonsouzanum</i> sp. nov.	CML 3597	MPM 110	<i>Eugenia uniflora</i>	PI, Brasil	KU175889
-	-	<i>C. niltonsouzanum</i> sp. nov.	CML 3598 T	MPM 109	<i>E. uniflora</i>	PI, Brasil	KU175888
-	-	<i>C. albasitensis</i>	CBS 152.32	-	<i>Pteridium aquilinum</i>	Reino Unido	AJ427402
-	-	<i>C. bicorne</i>	-	1231	<i>Polytrichastrum formosum</i>	Finlândia	AF200514
-	-	<i>C. bulbillifaciens</i>	CBS 132236	-	Bark of <i>Fraxinus</i>	Alemanha	KC336072
-	-	<i>C. angustiporum</i>	CBS 568.83	-	<i>Pterostylis mutica</i>	Australia	AJ427403
-	-	<i>C. cereale</i>	-	Sequência 19 Da Patente WO0151653	-	Suíça	AX195387

Continua

Conclusão							
Haplótipo	Grupo de anastomose	Nome da espécie	Número da coleção da Cultura ^a	Isolado	Hospedeiro/ substrato	Origem ^b	Acesso no GenBank. ITS ^c
-	-	<i>C. cereale</i>	-	Sequência 22 Da Patente WO0151653	-	Suíça	AX195390
-	-	<i>C. cereal</i>	CBS 559.77	-	<i>Triticum aestivum</i>	Alemanha	AJ302009
-	-	<i>C. cereale</i>	-	99125	<i>Agrostis palustris</i>	Canadá	AF222793
-	-	<i>C. cornigerum</i>	CBS 133.82	-	<i>Pittosporum</i> sp.	EUA	AJ301899
-	-	<i>C. cornigerum</i>	CBS 137.82	-	<i>Erigeron canadenses</i>	EUA	AJ301902
-	-	<i>C. cornigerum</i>	-	Eab-aB	<i>Medicago sativa</i>	Espanha	AJ302010
-	-	<i>C. noxium</i>	CBS 154-35	-	<i>Coffea arabica</i>	Índia	EU810056
-	-	<i>C. papillatum</i>	CBS 570.83	-	<i>Sarcochilus dilatatus</i>	Austrália	AJ427401
-	-	<i>C. ramicola</i>	CBS 758.79	-	<i>Pittosporum</i> sp.	EUA	AJ427404

^aColeções de cultura: CBS = *Centra.A.I bureau voor Schimmelcultures-Fungal Biodiversity Center*, Utrecht, Holanda; CML= Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil. ^bEstados do Brasil: AC = Acre; AM = Amazonas; ES = Espírito Santo; PI = Piauí; SP = São Paulo. ^c ITS-5.8S rDNA Sequências utilizadas em análise filogenética. T: tipos de espécies

Tabela 3 – Acessos de *Waitea* spp. (binucleado de *Rhizoctonia*) provenientes de diversos hospedeiros depositados no Genbank

Nome da espécie	Número da coleção da Cultura	Hospedeiro/ Substrato	Origem	Acesso no GenBank. ITS
<i>Waitea circinata</i>	PP 41	<i>C. sativum</i>	Teresina, PI	
<i>Waitea circinata</i>	PP 48	<i>C. sativum</i>	Teresina, PI	HQ270161.1
<i>W. c. var. zaeae</i>		<i>Zea maydis</i>	China	AB213593.1
<i>W. c. var. zaeae</i>	UR 01	<i>Agrostis palustres</i>	Japão	
<i>W. c. var. zaeae</i>	UR 02	<i>Agrostis palustres</i>	Japão	LC187269.1
<i>W. c. var. zaeae</i>	UR 03	<i>Agrostis palustres</i>	Japão	
<i>W. c. var. zaeae</i>	UR 04	<i>Agrostis palustres</i>	Japão	LC 187268.1
<i>W. c. var. zaeae</i>	UR 05	<i>Agrostis palustres</i>	Japão	AB 213588.1
<i>W. c. var. zaeae</i>		<i>Agrostis palustres</i>	Japão	AB 213590.1
<i>Rhizoctonia</i> sp		<i>Agrostis palustres</i>	Japão	
<i>Rhizoctonia</i> sp		<i>Agrostis palustres</i>	Japão	AB 213574.1
<i>Rhizoctonia</i> sp		<i>Agrostis palustres</i>	Japão	
<i>W.c.v. circinata</i>		Solo	Japão	AB 213575.1
<i>W.c.v. circinata</i>		Solo	Alasca, EUA	AB213585.1
<i>W.c.v. circinata</i>		Solo	Alasca, EUA	AB 213586.1
<i>W. circinata</i>		<i>V. unguiculata</i>	Índia	HE 820286.1
<i>W. circinata</i>		<i>V. unguiculata</i>	Índia	HE 964994.1

3.5 Teste de patogenicidade e agressividade

Para o teste de patogenicidade e agressividade utilizou-se bandejas de germinação de 200 células. Em cada célula foi colocado substrato comprado já esterilizado, em seguida depositou-se no centro da célula quatro discos (2mm) de micélio cultivados em meio de cultura BDA, quatro 4 sementes de coentro da variedade Verdão foram depositadas em cima desses discos de micélio. Posteriormente, cobriram-se as sementes com uma pequena porção de substrato esterilizado.

O experimento foi realizado contendo 13 tratamentos, nove repetições e uma testemunha para cada tratamento. As bandejas foram acondicionadas em sala climatizada de 25 °C por 15 dias.

No teste de patogenicidade avaliou-se somente a presença de sintomas nas plântulas. E sementes não germinadas e plântulas com sintomas de tombamento foram consideradas como infectadas. Essas plantas foram coletadas e o patógeno foi reisolado em meio de cultura BDA para confirmação da sua identidade (OLIVEIRA et al., 2008).

No teste de agressividade foi avaliado o número de sementes não germinadas e de plântulas com tombamento em cada célula. Os dados foram transformados em $\sqrt{x} + 0,5$, para atender às pressuposições da ANOVA. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (1953) com auxílio do programa estatístico R. Versão 4.1.

4. RESULTADOS

Neste estudo foram obtidos 13 isolados do complexo *Rhizoctonia* de plantas e plântulas de coentro de cinco municípios de duas regiões geográficas distintas.

Baseado na análise filogenética os isolados formaram cinco grupos filogenéticos distintos pertencentes ao complexo *Rhizoctonia*. Sendo três grupos de *R. solani* e dos gêneros *Ceratobasidium* e *Waitea*.

Os isolados PP 13, PP 17, RHIZ 546, RHIZ 639, RHIZ 692 e SAM 2 agruparam com isolados de referência do grupo de anastomose AG4-HGI. Os isolados MPM 227 e EMJS 17 agruparam com isolados de referência pertencentes ao grupo de anastomose AG2-2. Em ambos os agrupamentos, formaram-se grupos com alto suporte de Bayesian probability (Bpp maior que 0,87). Os isolados MPM 235 e PP 55 formaram um clado distinto de todos os grupos de anastomose já descrito de *R. solani* (Bpp = 1.00) (Figura 2). Os isolados PP 41 e PP 48 formaram grupo com suporte elevado (Bpp = 1.00), junto com isolados de *Waitea circinata* (Figura 3). O isolado PP 37 agrupou com isolados de *Ceratobasidium ramicola* com suporte elevado (Bpp = 1.00) (Figura 4).

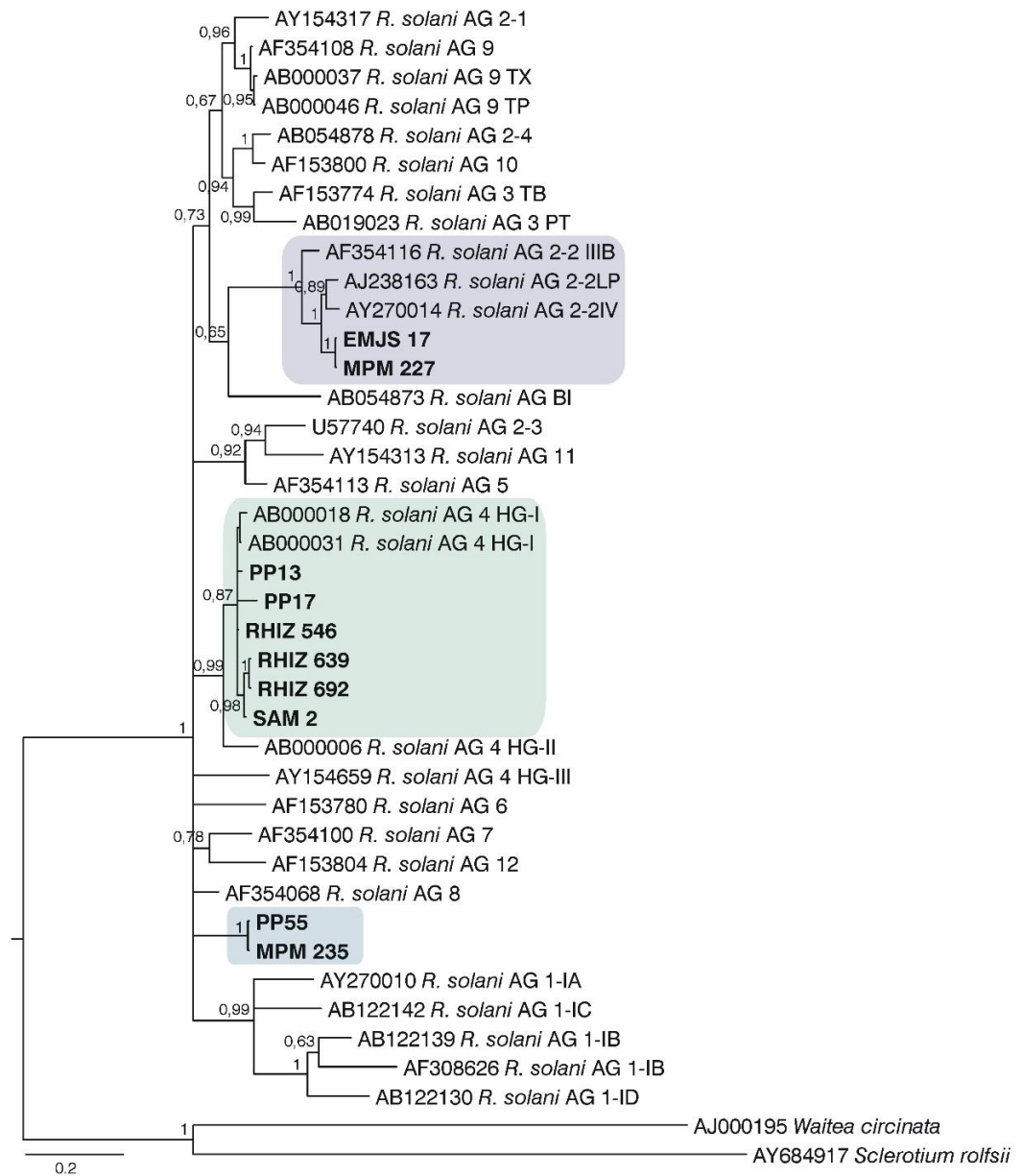


Figura 2. Análise filogenética construída por inferência bayesiana de sequências da região ITS mostrando a relação entre espécies do complexo *Rhizoctonia*. Os valores de probabilidade estão representados nos entroncamentos da árvore. Os isolados utilizados nesse estudo estão destacados em negrito. *Waitea cicinata* e *Sclerotium* sp. foram usados como grupo externo

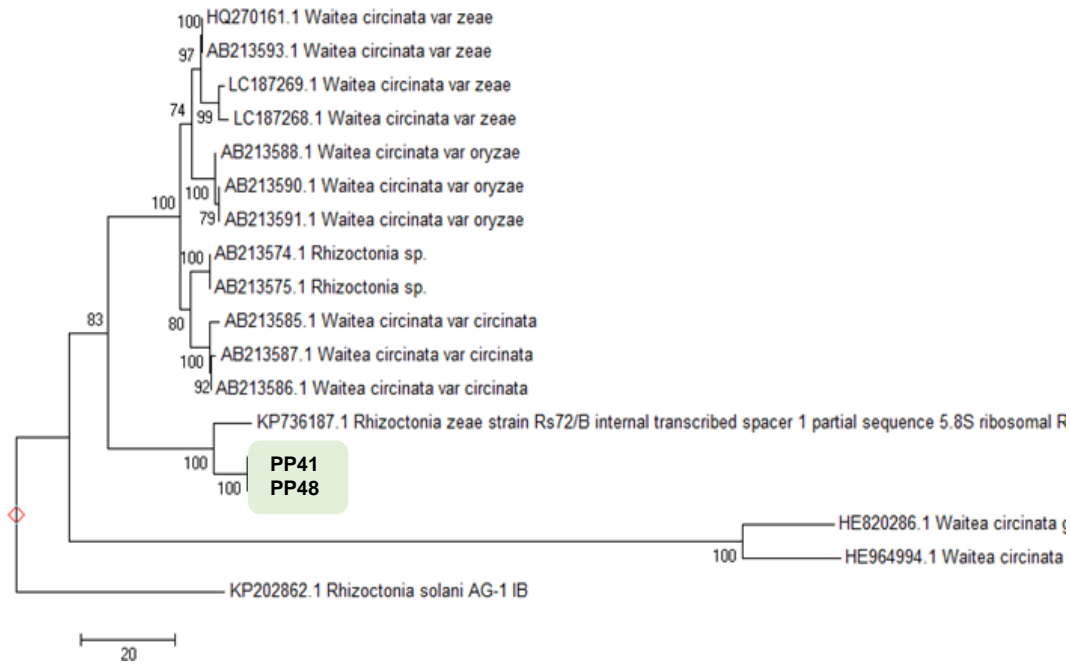


Figura 3. Análise filogenética construída por inferência bayesiana de sequências da região ITS mostrando a relação entre isolados de *Waitea* spp. Os valores de probabilidade estão representados nos entroncamentos da árvore. Os isolados utilizados nesse estudo estão destacados em negrito. *Rhizoctonia solani* foi usado como grupo externo

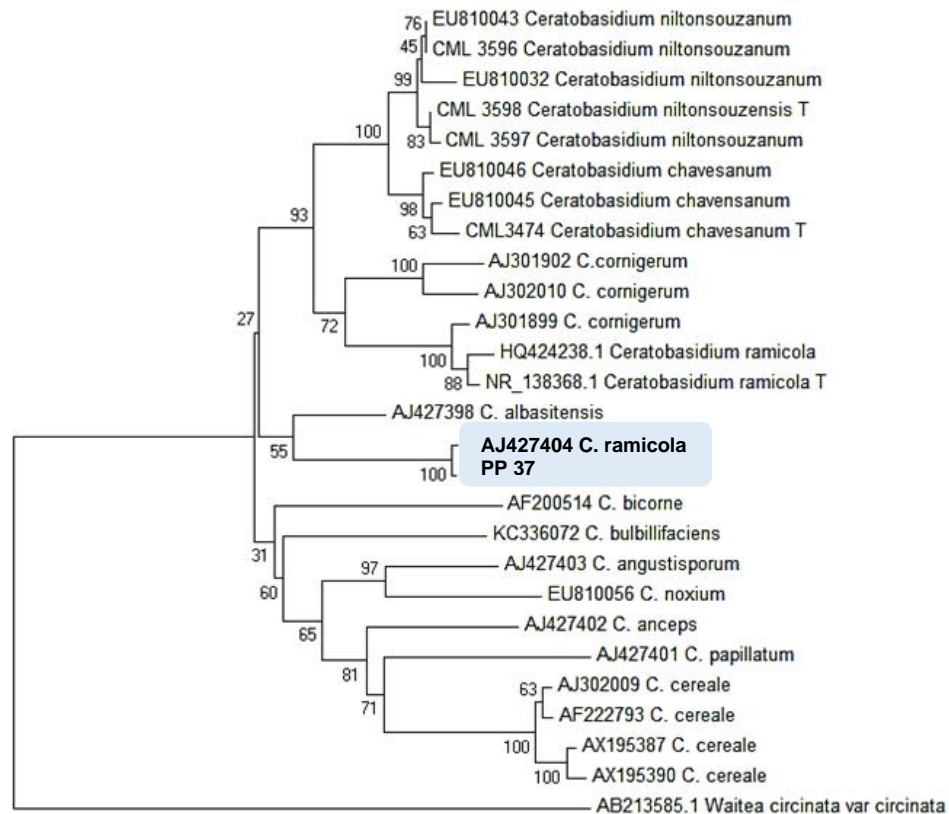


Figura 4. Análise filogenética construída por inferência bayesiana de sequências da região ITS mostrando a relação entre isolados de *Ceratobasidium ramicola*. Os valores de probabilidade estão representados nos entroncamentos da árvore. Os isolados utilizados nesse estudo estão destacados em negrito. *Waitea cicinata* foi usado como grupo externo

Na avaliação cultural (Tabela 4) a maioria dos isolados do complexo *Rhizoctonia* apresentaram crescimento ralo nos meios de cultura BDA e A.A. Inicialmente, apresentaram coloração branca, tornando-se bege a marrom com 15 dias de cultivo (Figura 5A, C e D). Observou-se a formação de microescleródios de alguns isolados com formatos irregulares e coloração inicialmente marrom (Figura 5B, C, D, E). Os isolados da nova linhagem, PP55 e MPM235 apresentaram características culturais divergente dos outros isolados de *R. solani*, como a produção de um micélio mais denso (Figura 5B) e a produção de escleródios maiores e mais escuros (Figura 5D, E, K, L e M). Os isolados PP41 e PP48 de *Waitea*, apresentaram um micélio mais denso em meio de cultura A.A. e a produção de microescleródios submersos no meio de cultura A.A. (figura 5F e J) e microescleródios maiores e de cor laranja em meio de cultura BDA (Figura 5G, H e I). Os isolados EMSJ 17 e MPM 227 apresentaram maior produção de microescleródios. Em meio de cultura BDA a produção de microescleródios foi menor em relação ao meio de cultura A.A. (Tabela 4). Em relação aos isolados PP 41 e PP 48, ao serem cultivados em meio de cultura BDA, produziram micélio ralo de coloração branca a bege, e não foi observada a produção de microescleródios. No entanto, no meio A.A., ambos os isolados formaram colônias inicialmente róseo, tornando-se salmão aos 20 dias de cultivo. Já o isolado PP 37 de *Ceratobasidium*, não produziu escleródios em nenhum dos meios de cultura.

Tabela 4 – Análise cultural dos isolados do complexo *Rhizoctonia* obtidos de coentro (*Coriandrum sativum*) crescidos em meios Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e Aveia-Ágar

ISOLADO	BDA				A.A.			
	Tipo	Cor	C.C.	P. M.	Tipo	Cor	C.C.	P.M.
RHIZ546	Ralo	Bege	Não	Slm	Ralo	Bege	Não	Slm
RHIZ639	Ralo	Marrom	Slm	Não	Ralo	Bege	Slm	Slm
RHIZ692	Ralo	Bege	Não	Não	Ralo	Bege	Não	Não
MPM227	Ralo	Marrom	Slm	Slm	Ralo	Marrom	Não	Slm
MPM235	Ralo	Bege	Slm	Slm	Ralo	Bege	Não	Slm
EMJS17	Ralo	Marrom	Slm	Slm	Ralo	Bege	Slm	Slm
PP13	Ralo	Bege	Slm	Slm	Ralo	Bege	Não	Não
PP17	Ralo	Bege	Slm	Não	Ralo	Bege	Não	Slm
^A PP37	Ralo	Bege/róseo	Não	Não	Tufoso	Bege	Não	Não
^B PP41	Ralo	Bege	Não	Não	Ralo	Bege/róseo	Não	Slm
^B PP48	Ralo	Bege	Não	Não	Ralo	Bege/róseo	Slm	Slm
PP55	Tufoso	Bege	Não	Slm	Tufoso	Bege	Não	Slm
SAM2	Ralo	Bege	Não	Não	Ralo	Bege	Não	Slm

Tipo: Densidade do micélio. Cor: cor do micélio. C.C.: Crescimento concêntrico, formação de anéis na placa cultivada. P.M.: Produção de microescleródios. ^AIsolado: *Ceratobasidium ramicola* · ^BIsolado: *Waitea circinata*.

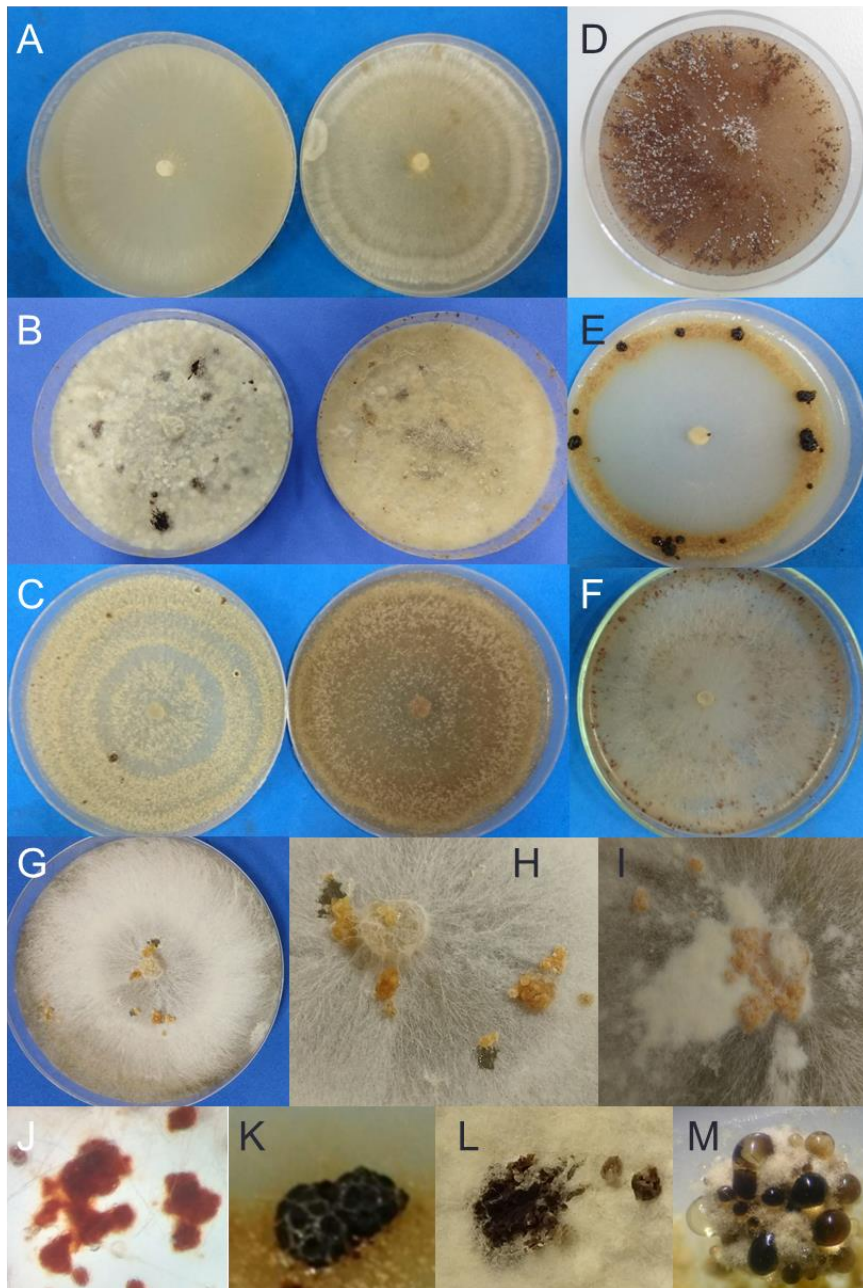


Figura 5: *Rhizoctonia solani*: (A) Aspecto de cultura de isolados do grupo de anastomose AG4-HG1 em meio de cultura BDA com a presença de crescimento concêntrico e em meio de cultura A.A. (B) Aspecto de cultura de isolado de nova linhagem filogenética, PP55, em meio de cultura BDA e A.A. com a produção de um micélio mais denso e microscleródios maiores. (C) Aspecto de cultura de isolados do grupo de anastomose AG2-2 em meio de cultura BDA e A.A. com a presença de crescimento concêntrico e produção de microscleródios. (D-E) Aspecto de cultura de isolado de nova linhagem filogenética, MPM227. *Waitea circinata*. (F) aspecto da cultura em meio BDA com a presença de microscleródios submersos no meio. (G) Aspecto da cultura em meio Aveia-ágar como produção de um micélio tufo e produção de microscleródios grande e alaranjados. (H-I) Microscleródios de *Waitea* crescido em meio A.A. (J) Microscleródios submerso em meio de cultura BDA. (K) Morfologia de escleródios do isolado PP55. (L-M) Escleródios do isolado MPM227.

Em uma das amostras de plantas com sintomas de mela observou-se a formação de tufos de micélio fortemente aderidos às folhas e caule. Ao realizar análise microscópica, constatou-se a presença de himênio e basidiósporos. Os basidiósporos apresentaram formatos obovoides e unicelulares. Os basidiósporos produzidos são referentes à nova linhagem filogenética do complexo *R. solani* e indicam a fase sexuada de *R. solani* (*T. curcumeris*) (Figura 6A, B, C e D).

Na contagem de núcleos observou-se que os isolados RHIZ 639, RHIZ 546, SAM2, MPM227, MPM235, EMJS17, PP13, PP17 e PP55 são multinucleados, com uma variação de 3-7 núcleos por célula (Figura 6E). Enquanto os isolados PP 37, PP 41 e PP 48 foram binucleados (Figura 6F e G).

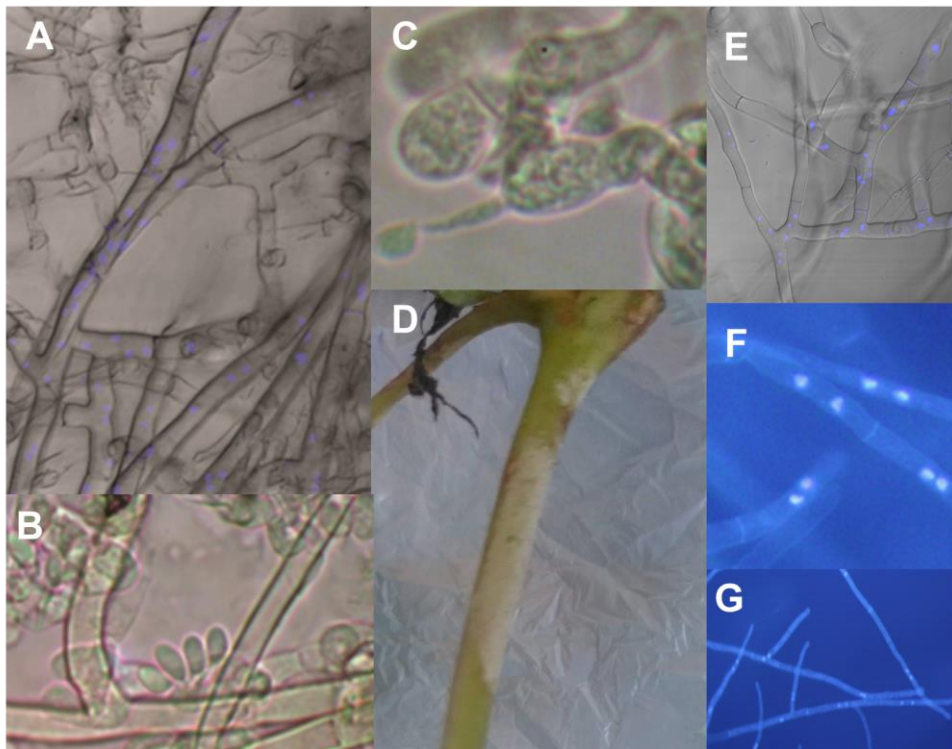


Figura 6: Marcadores morfológicos complexo *R. solani*. (A-E) Hifas multinucleadas de *Rhizoctonia solani* (B-C) Basidiósporos e basídia. (D) Presença de himênio em caule de coentro (E). (F-G) Hifas binucleadas de *Ceratobasidium* e *Waitea*

Todos os isolados foram patogênicos ao coentro, causando sintomas de tombamento de pré e pós-emergência (Figura 7), além disso observou a formação de micélio de coloração branca sobre o tecido caulinar atacado, enquanto as sementes não germinadas apresentaram micélio em sua superfície, provocando podridão das sementes, sendo que está se desintegrando facilmente.



Figura 7: Sintomas e teste de patogenicidade do complexo *Rhizoctonia* em coentro. Setas indicando tombamento pós-emergência e asterisco indicando tombamento de pré-emergência.

No teste de agressividade observou-se que não houve diferenças estatísticas significativas nos níveis de agressividade entre os isolados. Na testemunha observou-se que a presença de plantas com sintomas de tombamento, provavelmente, devido à presença de fungos saprófitos associados a sementes, que interferiu na germinação (Figura 8)

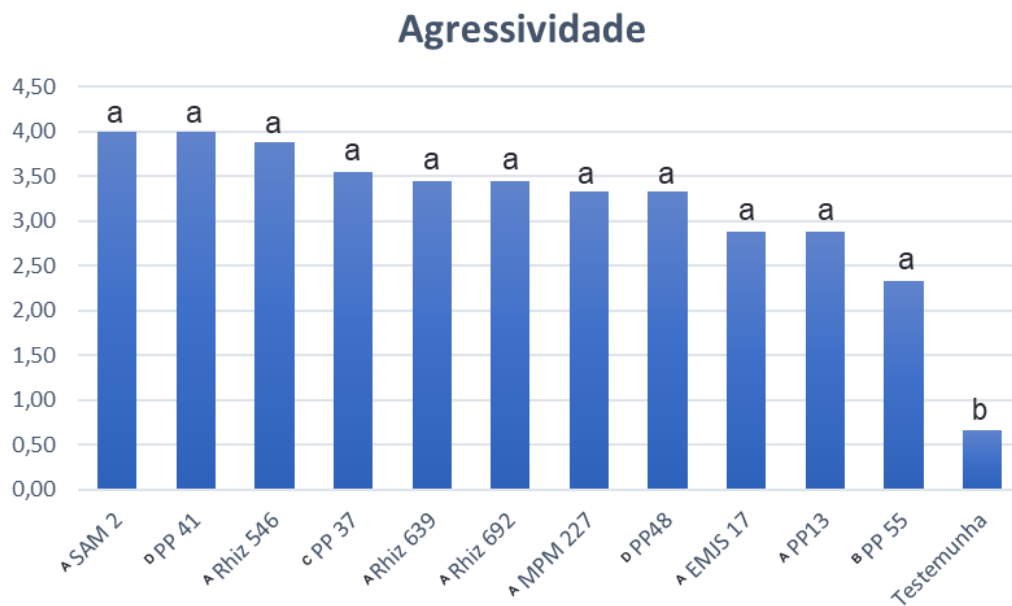


Figura 8: Gráfico indicando os níveis de agressividade de isolados de ^A*Rhizoctonia solani*, AG4 e AG2, ^B*Rhizoctonia solani* nova linhagem filogenética, ^C*Ceratobasidium ramicola* e ^D*Waitea circinata*. Mesmas letras não apresentam diferença estatística.

5. DISCUSSÃO

Dos treze isolados deste estudo, dez apresentaram hifas multinucleadas e três binucleadas. A contagem de núcleos por célula é um importante técnica na caracterização do complexo *Rhizoctonia*, uma vez que para o gênero *Rhizoctonia* os grupos de anastomose são multinucleados, enquanto espécies e linhagem filogenética dos gêneros *Waitea* e *Ceratobasidium* são binucleados. A determinação do número de núcleos por célula é uma característica importante na taxonomia deste grupo de fungos (SNEH et al., 1991).

Baseado na análise filogenética, este estudo confirma a existência de cinco táxons do complexo *Rhizoctonia solani* na cultura do coentro, sendo os grupos de anastomose AG4-HG-1 e AG2-2, além de uma nova linhagem filogenética e a identificação dos gêneros *Ceratobasidium* e *Waitea*. No Brasil, estudos realizados por Bolkan e Ribeiro (1985) detectaram um isolado de *R. solani* AG-4 causando tombamento em coentro. Reis e Lopes (2016) também relataram a associação deste fungo com esta cultura. Porém não realizaram a identificação do grupo de anastomose. Nestes dois estudos a identificação foram realizadas baseada apenas com avaliação dos marcadores morfológicos e reação de anastomose, tornando o resultado falho e impreciso. Pois pode ocorrer incompatibilidade somática entre isolados do mesmo grupo (CAMPOS e CERESINI, 2006).

Em outros países também foi relatado a presença de *R. solani* em coentro, como na Argentina, no entanto não houve determinação do grupo de anastomose (MADIA e GAETAN, 1995). Na Itália relatou-se *R. solani* AG1-IB (GARIBALDI et al., 2010) e, nos Estados Unidos, isolados *R. solani* AG2-1 e AG4-HGI foram identificados através de sequenciamento da região gênica ITS. Ambos os grupos de anastomose causaram sintomas de tombamento em plântulas de coentro (KOIKE et al., 2018).

O complexo *R. solani* é composto por 14 linhagens filogenética distinta, onde cada grupo de anastomose representa uma linhagem filogenética (GONZALEZ et al., 2006). Existem alguns grupos de anastomose que são ecologicamente adaptados a infecção de órgãos aéreos das plantas, desta forma acredita-se que estes grupos são relativamente especializados (BAKER, 1970). Os principais grupos de anastomose que foram observados na parte aérea das plantas são: AG1-IA, AG1-IB, AG1-IE, AG1-IF e AG2-2WB (GODOY-LUTZ et al., 2008). No Brasil, foi detectado a associação dos grupos de anastomose AG1-IA causando manchas

areolada em seringueira, e AG1-IB causando queima foliar em plantas medicinais da família Lamiaceae (MELO et al., 2018; GAINO et al., 2010).

Isolados do grupo de anastomose AG4-HG-I são amplamente distribuídos e causam doença em diversas plantas cultivadas. Este grupo de anastomose é reconhecido como sendo uma linhagem não especializada e geralmente ataca órgãos de plantas que entram em contato com a superfície do solo, causando tombamento de pré e pós-emergência. Enquanto os isolados do grupo AG2-2 são representados por linhagens que geralmente estão associadas a manchas foliares (SNEH et al., 1991).

As pesquisas que envolvem estudos de identificação do complexo *Rhizoctonia* e plantas olerícola são escassos. Geralmente a identificação do agente causal é baseada na morfologia da hifa e características culturais. No Brasil, a única pesquisa que emprega técnicas de sequenciamento de nucleotídeos que envolvem isolados de *R. solani* de plantas olerícola foi realizado na região Sudeste, e neste estudo foram identificados os grupos de anastomose AG1-IB em alface, AG4-HG-I em tomate e melão, AG4-HG-III em brócolis e espinafre (KURAMAE et al., 2002).

Em uma das coletas observou plantas, com presença de himênios e basidiósporos aderidos e caule e folhas. Provavelmente, estes basidiósporos podem ser fonte de inóculo podendo ser dispersos pelo vento ou através de respingo de gotas de água de irrigação, alcançando as folhas de coentro e causando sintomas de mela na parte aérea. Esporos sexuais de *R. solani* são importantes no processo de infecção, pois, geralmente, o resultado da infecção são sintomas de manchas foliares (GONZALEZ et al., 2001, SNEH et al., 1991).

No Brasil, a fase sexuada de *R. solani* (*T. curcumeris*) foi registrada em diversos patossistemas. Em árvores de eucalipto foram obtidos isolados de AG1-1B (SILVEIRA et al., 2000). Em plantas de soja isolados dos grupos de anastomose AG1-IA (FENILLE et al., 2002), em árvores de seringueiras, AG2-2 Hb (GAIANO et al., 2010), em plantas de algodão com sintomas de mela foram encontrados isolados do grupo de anastomose AG4-HGI (GOURLART et al., 2011) e AG1-IB em plantas da família Lamiaceae (MELO et al., 2018). Ainda não existem informações sobre os fatores ambientais necessários para a formação das estruturas de reprodução sexuada desse grupo de fungos. Devido a heterogeneidade filogenética, estas condições ambientais diferem entre os táxons e entre os isolados pertencentes à mesma espécie. A umidade é essencial para a produção da fase sexual de

Rhizoctonia spp. onde a umidade relativa ótima deve estar entre 40-100% (SIMS, 1956).

Todos os isolados deste estudo incitaram sintomas de tombamento de pré e pós-emergência. Fungos habitantes de solo têm habilidade de causar três tipos de tombamento. Inicialmente, estes microrganismos atacam as sementes, ocorrendo o processo de apodrecimento, conseqüentemente, ocorre à redução do poder germinativo. *Rhizoctonia solani* é considerado um patógeno necrotrófico que degrada o tecido do hospedeiro antes da colonização, esta característica está associada à produção de enzimas extracelulares ou toxinas. Na fase da germinação, o patógeno causa podridão do tecido tenro das plântulas e por último o tombamento de plântulas, sendo que este é o sintoma visível. Estes sintomas provavelmente estão ligados a produção de enzimas líticas. Isolados de *R. solani* AG-4 secretam enzimas pectolíticas e celulolíticas que provavelmente estão associadas com a degradação de tecidos (REIS e LOPES, 2016; VAN KAN, 2006; AGRIOS, 2005; MARCUS et al.,1986).

Neste estudo foram encontrados dois isolados que não se agruparam com nenhum grupo de anastomose descrito de *R. solani*. No futuro estes isolados poderão ser descritos como novo grupo de anastomose. Para isso devem ser realizados estudos adicionais, como sequenciamento de outros genes e compatibilidade somática de hifas com os grupos de anastomose descritos. Este resultado evidencia a importância do uso de sequenciamento na identificação de *Rhizoctonia*. O último grupo de anastomose descrito foi associado a plantas de Citros, provenientes do estado do Acre (GAIANO et al. 2006).

Neste estudo foi encontrado isolados dos gêneros *Ceratobasidium* e *Waitea circinata* causando doenças em plantas de coentro. Estes dados reforçam a importância do sequenciamento de nucleotídeos de genes marcadores nas técnicas de identificação desses patógenos, tendo em vista a semelhança morfológica destes gêneros. Blanco et al. (2018) obteve diversos isolados com morfologia de *R. solani* de solos cultivados e ambiente natural. A caracterização através de sequenciamento de nucleotídeos identificou 14 táxons de diferentes grupos de anastomose de *R. solani*, *Waitea circinata* e *Ceratobasidium* spp. Alguns registros mencionam a presença de *Rhizoctonia* binucleados causando doenças em plantas de interesse agrícola, no entanto quando o isolado é binucleado se trata dos gêneros semelhantes, *Waitea* e *Ceratobasidium*. No Brasil, foi registrado a ocorrência de

Rhizoctonia binucleada causando tombamento e mancha foliar em culturas de eucalipto, feijão caupi, soja e feijoeiro (FENILLE et al., 2002; SILVEIRA et al., 2000; CERESINI et al., 1996; NECHET e HALFELD-VIEIRA, 2006).

No teste de agressividade observou-se que não houve diferenças significativas entre os isolados de *R. solani* e nem entre os isolados dos gêneros *Ceratobasidium* e *Waitea*. No entanto alguns estudos mostram que agressividade dos grupos de anastomose *R. solani* pode ser variável. Cárdenas et al. (2015) mostraram que em plantas de tabaco isolados do grupo de anastomose AG2-1 foi mais agressivo quando comparado com isolados dos grupos de anastomose AG4-HGI e AG4-HGIII.

A correta identificação dos agentes que causam podridão radicular e tombamento em plântulas de coentro poderá auxiliar no manejo e no controle dos agentes fitopatogênicos. E a identificação do grupo de anastomose de *R. solani* é importante, uma vez que cada grupo de anastomose apresenta variação no nível de agressividade, gama de hospedeiro e na sensibilidade a fungicida, podendo ser útil para programas de melhoramento de coentro futuramente (JHONES et al., 1989; PASCUAL et al., 2000).

6. CONCLUSÕES

Este estudo confirma a presença de cinco táxons pertencentes ao complexo *Rhizoctonia solani* em coentro.

Uma nova linhagem filogenética pertencente a *R. solani* foi identificada

Todos os isolados inoculados foram patogênicos, causando sintomas de tombamento de pré e pós-emergência em plântulas de coentro.

Os isolados de *Rhizoctonia solani*, *Ceratobasidium* e *Waitea* apresentam os mesmos níveis de agressividade.

REFERÊNCIAS

- ABCSEM. Associação Brasileira de Sementes e Mudanças, 2012. Disponível em: <<http://www.abcsem.com.br>>. Acesso em: 24 de setembro de 2017.
- ABCSEM. Pesquisa de Mercado de sementes de hortaliças 2017. Disponível em: <<http://www.abcsem.com.br>>. Acesso em: 24 de setembro de 2017.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. San Diego: Academic Phytopathological Society, 5. Ed, p.922, 2004.
- ANDERSON, N. A. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 20, n. 1, p. 329-347, 1982.
- BAKER, K. F. Type of *Rhizoctonia* disease and their occurrence. In: Parmeter JR Jr (ed) *Rhizoctonia solani: Biology and Pathology*. University of California Press, London, p.20-30, 1970.
- BENCHIMOL, R. L.; POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R.; ALBUQUERQUE, F.C. White-thread-blight: Five new hosts in the state of Pará, **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.4, p.778-788, 2001.
- BLADE, S. et al. Coriander. **Agri-facts: practical information for Alberta's Agriculture Industry**, v. 147, 2016.
- BOLKAN, H. Á.; RIBEIRO, W. R. C. Anastomosis group and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. **Plant Disease**, v.69, n. 7, p.599-601, 1985.
- CAMPOS A. P. S.; CERESINI, P. C. Incompatibilidade somática em *Rhizoctonia* AG-1 IA da soja. **Summa Phytopatologica** v. 32, n. 3, p. 247-254, 2006.
- CÁRDENAS, G. E. et al. Molecular identification and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. from tobacco growing areas in northwestern Argentina, **Tropical Plant Pathology**, v. 40, n.3, p. 160-168, 2015.
- CARDOSO, M. O., **Hortaliças não-convencionais da Amazônia**. Brasília, DF: Embrapa-SPI / Manaus, CPA.A., 150p, 1997.
- CARLING, D. E. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In: *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. **Springer Netherlands**, p. 37-47, 1996.
- CARLING, D. E.; BAIRD, R. E.; GITAITIS, R. D.; BRAINARD, K. A.; KUNINAGA, S. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v. 92, n. 8, p. 893-899, 2002
- CARLING, D. E.; POPE, E. J.; BRAINARD, K. A.; CARTER, D. A. Characterization of mycorrhizal isolates of *Rhizoctonia solani* from an orchid, including AG-12, a new anastomosis group. **Phytopathology**. v. 89, n.10, p. 942-946, 1999.

CARLING, D. E.; SUMMER, D. R. *Rhizoctonia*. In **'Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. (Eds LL Singleton, JD Mihail, M Rush) p. 157–165, 1992.

CAZORLA, F.M.; VÁZQUEZ, M.A.; ROSALES, J.; ARREBOLA, E.; NAVARRO, J.; PÉREZ-GARCIA, A.; DE VICENTE, A. First report of bacterial leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *coriandricola*) in Coriander in Spain. **Journal of Phytopathology**, v.153, p. n.3, 181-184, 2005.

CERESINI, P. C; FENILLE, R. C; SOUZA, N. L. Associação de *Rhizoctonia* spp. binucleadas e de *R. solani* GA 4 HGI a vagens de amendoimzeiro (*Arachis hypogaea*) no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.22, n. 2, p.145-156. 1996

CHANG, T.; LEE, Y. S. Occurrence of brown blight caused by *Waitea ciricinata* var. *zeae* on cool season turfgrass in Korea. **Mycobiology**, v. 44, n.4, p. 330-334. 2016

COOPERATIVA AGRÍCOLA DE COTIA. **Manual de cultivo das principais hortaliças**. Cotia: Cooperativa Central- Departamento de Sementes e Mudas-DIA, 1987.

CORRÊA, M. P. Coentro. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. v. 2, p. 335-336, 1984.

CUBETA, M. A.; VILGALYS, R.; Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. **Phytopathology**, v. 87, n. 4, p. 480-484, 1997.

CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R.; & GASPAR, N. **Cultura e utilização das plantas medicinais e aromáticas**. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2011.

EMBRAPA HORTALIÇAS. Saiba tudo sobre Coentro. (2010). Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/bib/saibaque/coentro.htm>>. Acesso em: 08 maio 2017.

JENSEN, C. E.; ABAD, G. Z. *Fusarium solani* species complex new ly identified to cause root rot in hydroponically grow n lettuce and cilantro in Puerto Rico. **Plant Pathology**, v. 19, n. 2, p. 801, 2009.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, **ARS, USDA**. Disponível em: <<https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>. Acesso em: 08 de março de 2018.

FERREIRA, M. F. Epidemiologia de doenças radiculares na cultura do coentro no município de Arapiraca-AL. **Dissertação** (Mestrado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2013.

FENILLE R. C.; SOUZA N. L.; KURAMAE, E. E. Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, n.8, p.783-792, 2002.

FILGUEIRA, F. A. R. **Manual de olericultura: cultura e comercialização de hortaliças**. São Paulo, v.2, p.357, 357p. 1982.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: cultura e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, p.402p., 2008.

GAINO, A. P. S. C.; BASSETO, M. A.; GASPAROTTO, L.; POLTRONIEIRI L. S.; CERESINI, P. C. Inferência filogenética revela a complexa etiologia das manchas areolada e foliar em seringueira e em outras espécies cultivadas na Amazônia. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.32, n.3, p.385-395, 2010.

GARCÍA, V. G.; ONCO, M. A. RUBIO. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 1, p. 55-79, 2006.

GARIBALDI, A.; GILARDI, G.; GULLINO, M. L. First report of collar and root caused by *Phytophthora ultimum* on coriander in Italy. **Plant Disease**, v. 94, n.9, p. 1167, 2010.

GONZALEZ, G. V. G.; ONCO, M. A. P.; SUSAN, V. R. Review, biology and systematic of the form genus *Rhizoctonia*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.4, n.1, p.55-79, 2006.

GONZALEZ, D.; CARLING, D. E.; KUNINAGA, S.; VILGALYS, R.; CUBETA, M. A. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. **Mycologia**, v.93, n.6, p. 1138-1150, 2001.

GOULART, A. C. P.; ASSIS, J. B.; CIAMPI, M. B.; CERESINI, P. C. Ocorrência de mela causada por *Rhizoctonia solani* AG4-HGI em plântulas de algodoeiro no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.37, n.1, p.68–69, 2011.

GODOY-LUTZ, G.; KUNINAGA, S.; STEADMAN, J. R.; POWERS; K. Phylogenetic analysis of *Rhizoctonia solani* subgroups associated with web blight symptoms on common bean based on ITS- 5.8S rDNA. **Journal of General Plant Pathology**, v.74, n.1, p.32-40, 2008.

GUNNELL, P. S. Characterization of the teleomorphs of *Rhizoctonia oryzae-sativae*, *Rhizoctonia oryzae*, and *Rhizoctonia zaeae*, and the effect of cultural practices on aggregate sheath spot of rice, caused by *R. oryzae-sativae*. **Agriculture, plant pathology**. 1987.

HAAG, H. P.; MINAMI, K. **Nutrição mineral em hortaliças**. Campinas: Fundação Cargill, 2ª ed., p.28-29, 1998.

HEPPERLE, D. SeqAssem©: Win32-Version. a sequence analysis tool containing assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. 2004 Available at: <http://www.sequentix.de>

INFANTE, N. B.; FEIJO, F. M.; MENDES, A. L. S. F.; RAMOS-SOBRINHO, R.; REIS, L. S.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A. First report of coriander (*Coriandrum sativum*) seedling damping-off caused by *Phytophthora irregularis* in Brazil. **Plant Disease**, v.102, n.2, p.456, 2018.

ISHIKAWA, T.; KONDO, K.; KITAJIMA, J. Water-soluble constituents of coriander. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.51, n.1, p.32-39, 2003.

JONES, R. K.; BELMAR, S. B. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. Isolated from rice, soybean, and other crops grown in rotation with rice in Texas. **Plant Disease**, v.73, n.12, p.1004-1010, 1989.

JULIÁN, M. C.; DEBETS, F.; KEIJER, J. Independence of sexual and vegetative incompatibility mechanisms of *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) anastomosis group 1. **Phytopathology**, v. 86, n. 6, p. 566-574, 1996.

KOIKE, S. T.; DAUGOVISH, O.; MARTIN, F. N.; RAMON, M. L. Crown and root rot caused by *Rhizoctonia solani* on Cilantro in California. **Plant Disease**, v. 101, n.12, p. 2148, 2017.

KOIKE, S. T.; GORDON, T. R. First report of fusarium wilt of cilantro caused by *Fusarium oxysporum* in California. **Plant Disease**, v.89, n.10, p.1130, 2005.

KUMARAE, E. E.; BUZETO, A. L.; CIAMPI, M. B.; SOUZA, N. L. Identification of *Rhizoctonia solani* AG1-IB in Lettuce, AG4 HG-I in tomato and melon, and AG 4 HG-III in broccoli and spinach, in Brazil. **European Journal Plant Pathology**, v.109, n.4, p.391-395, 2002.

KURAMAE, E. E.; BUZETO, A. L.; NAKATANI, A. K.; SOUZA, N. L. rDNA-based characterization of a new binucleate *Rhizoctonia* spp. causing root rot on kale in Brazil. **European journal of plant pathology**, v. 119, n. 4, p. 469-475, 2007.

LI, H.; WU, B.; YAN, S. Aetiology of *Rhizoctonia* in Sheath blight of maize in Sichuan. **Plant Pathology**, v.47, n.5, p.16-21, 1998.

MADIA, M.; GAETAN, S. Crown and root rot in coriander caused by *Rhizoctonia solani* Khun. **Bol. Sanid. Veg.**, Plagas v.21, p.573, 1995.

MARCUS, L.; BARASH, I.; SNEH, B.; KOLTIN, Y.; FINKLER, A. Purification and characterization of pectolytic enzymes produced by virulent and hypovirulent isolates of *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.29, n.3, p.325-336, 1986.

MELO, M. P.; CABRAL, C.; REIS, A.; MATOS, K. S.; MARTINS, P. P.; BESERRA Jr, J. E. A.; NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. *Rhizoctonia solani* AG1-IB and AG4 HG-I causing leaf blight and root rot in plants from Lamiaceae family in Brazil. **Tropical Plant Pathology** v.43, n. 3, p.152-159, 2018.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. 1–8, in: **Proceedings of the**

Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA, 2010.

MUYOLO, N. G.; LIPPS, P. E.; SCHMITTHENNER, A. F. Anastomosis grouping and variation in virulence among isolates of *Rhizoctonia solani* associated with dry bean and soybean in Ohio and Zaire. **Phytopathology**, v. 83, n. 4, p. 438-444, 1993.

NASCIMENTO, W. M.; PEREIRA, R. S.; FREITAS, R. A.; BLUMER, L.; MUNIZ, M. F. B. Colheita e armazenamento de sementes de coentro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n.12, p. 1793-1801, 2006.

NECHET, K. L.; HALFERD-VIEIRA, B. A. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp., associado a Mela do feijão caupi (*Vigna unguiculata*), coletados em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**. v.35, n. 5, p. 505-508. 2006.

NORONHA, M. de A. Intensidade da queima das folhas do inhame no Estado de Alagoas. **Embrapa Tabuleiros Costeiros - Comunicado Técnico172 (INFOTECA-E)**, 2015.

NOVOSTI, RIA. Russia became the world leader in coriander exports, ahead of India **RIA Novosti**, 2016.

OLAYA, G.; ABAWI, G. S. Occurrence of the *Thanatephorus cucumeris* on table beets in New York State. **Phytopathology**, v.81, n. 8, p.800-804, 1991.

OLIVEIRA, A. C. C.; SOUZA, P. E.; POZZA, E. A.; MANERBA, F. C.; LOPES, M. F. Metodologia de inoculação de *Rhizoctonia solani* na cultura da cenoura. **Ciência Agrotecnológica**. v. 32, n.3, p.992-995. 2008.

OLIVEIRA, A. P.; WANDERLEY JÚNIOR, L. J. G.; MELO, P. C. T.; ALVES, U. A. Avaliação de genótipos de coentro sob condições de temperatura elevada. **Horticultura Brasileira** 21: Suplemento CD-Rom. 2003.

ONIK, I M.; OGOSHI, A.; ARAKI, T.; SAKAI, R.; TANAKA, S.; The perfect state of *Rhizoctonia oryzae* and *R. zaeae*, and the anastomosis groups of *Waitea circinata*. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, v.26, n.3, p.189-198, 1985.

PASCUAL, C. B; TODA, T; RAYMONDO, A. D; HYAKUMACHI, M. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. **Plant Pathology**, 49:108-118. 2000.

PEDROSA F. S.; NEGREIROS M. Z.; NOGUEIRA I. C. C. Aspectos da cultura do coentro. **Informe Agropecuário**, v. 10, p. 75-78, 1984.

PEDROSO, D. C. Associação de *Alternaria* spp. com sementes de Apiáceas: Métodos de inoculação e influência na qualidade fisiológica. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 118p. 2009.

PEREIRA, R. S.; NASCIMENTO, W. M. Avaliação da qualidade física e fisiológica de sementes de coentro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 21, 2003.

PEREIRA, R. S.; MUNIZ, M. F. B.; NASCIMENTO, W. M. Aspectos relacionados à qualidade de sementes de coentro. **Horticultura Brasileira** v. 23, n.3, p. 703-706, 2005.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Syst Biol** v.53, n.5, p.793-808, 2004.

POUDEL, B.; ZHANG, S. First report of alternaria leaf spot on cilantro (*Coriandrum sativum*) caused by *Alternaria dauci* in the United States. **Plant Disease**, v. 102, n.4, p.822. 2018.

RAMBAUT, A. FigTree, version 1.3. 1. **Computer program distributed by the author**. 2009. Disponível em < <http://treebioedacuk/software/figtree/> >, acesso em: 11 de março de 2018.

R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em <URL <https://www.R-project.org/>>

REIS, A.; LOPES, C. A. Doenças de coentro no Brasil. **Boletim Técnico**. Embrapa. v.1, p.6, 2016.

RODEVA, R.; S. DACHEVA Z.; STOYANOVA. Wilting and root rot of coriander caused by *Macrophomina phaseolina* in Bulgaria, **The Proceeding of 45th International Symposium on Agriculture**, 2010. Opatija, Croatia.

ROMERO, G.; JENSEN, C. E.; PALMATEER A. J. "First report of *Pythium dissotocum* affecting cilantro in hydroponic systems in Puerto Rico." **Plant Health Progress**. 2012.

RONQUIST, F.; et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic biology**, v. 61, n. 3, p. 539-542, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y, 1989.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v.30, n.3, p. 507-512, 1974.

SILVA, M. A. D.; COELHO JUNIOR, L. F.; SANTOS, A. P. Vigor de sementes de coentro (*Coriandrum sativum* L) provenientes de sistemas orgânicos e convencionais. **Revista Brasileira de plantas medicinais** v.14, p.192-196, 2012.

SILVEIRA, S. F.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; SUTTON, J. C. Characterization of *Rhizoctonia* species associated with foliar necrosis and leaf scorch of clonally-propagated Eucalyptus in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, n.1, p.27-36, 2000.

SIMS, A. C. Factors affecting basidiospore development of *Pillicularia filamentosa*. **Phytopathology**. v.46, p. 413-470, 1956.

SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. Identification of *Rhizoctonia* species, **APS Press**. 2 ed. St. Paul, 1991.

SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S. M.; DIJST, G. *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. **Springer Science & Business Media**, 2013.

SHARON, M. et al. Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. **Mycoscience** v.49, v.2, p.93–114, 2008.

SILVA, FILOMENAF.; FERREIRA, SUSANAS.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, FERNANDA F. C. "Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry". **Journal of Medical Microbiology**, v.60, n.10, p.1479-1486, 2011.

TAMURA, K., et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, v. 22, n.22, p. 4673-4680, 1994.

TUKEY, J. W. The problem of multiple comparisons. **Multiple Comparisons**, 1953.

WANDERLEY JUNIOR L. J. G.; NASCIMENTO W. M. Produção de sementes de coentro. In: **VI Curso sobre Tecnologia de Produção de Sementes de Hortaliças**, 2006, Goiânia. CD Rom, 2006.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. J. W. T.; TAYLOR, J. L. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

WANDERLEY JUNIOR L. J. G.; NASCIMENTO W. M. Produção de sementes de coentro. In: **VI Curso sobre Tecnologia de Produção de Sementes de Hortaliças**, 2006, Goiânia. CD Rom, 2006.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. J. W. T.; TAYLOR, J. L. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

WOUTENBERG, J. H. C.; TRUTER, M.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Large-spored *Alternaria* pathogens in section Porri disentangled. **Studies in mycology**, v. 79, n.2, p. 1-47, 2014.