

# **INSTITUTO BIOLÓGICO**

## **PÓS-GRADUAÇÃO**

**Estudo de micovírus em *Rhizoctonia solani* como estratégia para o controle biológico de rizoctoniose em gramados.**

**MARIA AUREA SABOYA CHIARADIA PICARELLI**

Dissertação de Mestrado - Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Orientadora: Dra. Addolorata Colariccio

**São Paulo  
2015**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Núcleo de Informação e Documentação – IB**

---

Picarelli, Maria Aurea Saboya Chiaradia.

Estudo de micovirus em *Rhizoctonia solani* como estratégia para o controle biológico de rizoctoniose em gramados. / Maria Aurea Saboya Chiaradia Picarelli. – São Paulo, 2015.

73 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.  
Área de concentração: **Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema**.  
Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Addolorata Colariccio.

Versão do título para o inglês: Study on mycovirus in *Rhizoctonia solani* as a biological control strategy to *Rhizoctonia* disease of turfgrass .

1. *Rhizoctonia solani* 2. *Zoysia japonica* 3. Micovirus 4. Hipovirulência

I. Picarelli, Maria Aurea Saboya Chiaradia II. Colariccio, Addolorata III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

*IB/Bibl./2015/012*

---

Dedico este trabalho  
ao Massimo,  
minha referência de coragem, tenacidade e competência,  
ao Franco, Enrico e Marco, nossos filhos,  
acredito em vocês! Procurem o que seja instigante, o que demande muito de vocês, nada  
que é muito fácil, é muito bom!  
E aos meus pais,  
que desde sempre, me ensinaram esta lição.

## Agradecimentos

À Dra. Addolorata Colariccio, por ter me aceitado em sua disciplina antes que eu tivesse o interesse no curso de mestrado, e depois, pela orientação deste trabalho. Pelos conhecimentos e conceitos que envolvem o saber científico transmitidos, e finalmente pelo ensinamento sobre o rigor e exatidão da escrita,

À Dra. Flavia Patricio, pelo incentivo, entusiasmo e criatividade no laboratório, pelos imensos conhecimentos científicos compartilhados com precisão e leveza, e pelas ponderações sobre o cotidiano, da mesma forma, precisas e leves,

À Dra. Addolorata e à Dra Flavia, conjuntamente, por terem aceitado e cumprido bravamente o desafio de trabalhar com um hospedeiro que não lhes é habitual, respectivamente o fungo e a grama, e com a complexidade destas interações: o fungo não é o patógeno, a planta não é a hospedeira, um patógeno controla outro patógeno... Neste caminho eu não poderia estar melhor acompanhada!

À M.Sc. Danielle Gobatto, pela absoluta dedicação e presteza em todos os procedimentos do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia. Foi enriquecedor conviver com sua persistência, determinação e competência. Sem seu companheirismo, sua ajuda, este trabalho não teria sido bem concluído. Seu caminho na ciência será longo e auspicioso!

À Dra. Eliana Borges Rivas, pelas sugestões, esclarecimentos, disposição em ler tantas páginas, tantas vezes, e ensinamentos de forma lúdica: um “baldão” de 50 microlitros jamais será esquecido!

Ao Dr. Ricardo Harakava, do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, do instituto Biológico de São Paulo, pelo sequenciamento dos isolados, pela disposição em acrescentar conhecimentos, pelas opiniões, sugestões e pelos artigos indicados,

Ao Dr. Paulo Ceresini pelas sugestões dadas no exame de qualificação e mais tarde, quando foram requisitadas,

Ao Dr. Francisco A. O. Tanaka, pela gentileza, competência e dedicação com que me recebeu e acompanhou no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP.

À Dra. Addolorata Colariccio, Dra. Flavia R. A. Patricio, Dr. Francisco A. O. Tanaka, Dra. Eliana B. Rivas e Dr. Paulo C. Ceresini pela participação na banca desta dissertação de mestrado,

Aos pesquisadores e funcionários dos Laboratórios de Fitovirologia e Fisiopatologia, e Patologia de Sementes do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, do Instituto Biológico de São Paulo, e do Laboratório de Fitopatologia do Centro Experimental Central do Instituto Biológico de Campinas, onde trabalhei, sempre dispostos a ajudar e a dividir conhecimentos, especialmente ao Dr. Marcelo Eiras, pela prontidão no esclarecimento de qualquer dúvida,

Aos colegas de laboratório Dani, Leilane, Renato, Daniel, Manoel, Bianca, Karina, Kamila, Karen, Bia e Samantha, pela convivência agradável e cooperativa,

Ao bibliotecário Roberto-Tadeu da Silva, por conseguir rapidamente todos os artigos pesquisados neste trabalho,

A Dra. Christiane Ceriani Aparecido, pelo fornecimento do isolado de *R. solani* AG-2-2 IV, da Micoteca Mario Barreto Figueiredo, do Instituto Biológico de São Paulo,

Ao Eng. Agr. Daniel Tapias, pelo fornecimento de amostras de grama doente em campos de golfe, e por compartilhar sua expertise no manejo de alto desempenho de gramados esportivos,

À Associação Nacional de Paisagismo, pela divulgação deste trabalho, possibilitando a obtenção de amostras em jardins residenciais,

À Eng. Agr. Paula Arigoni, pelos esclarecimentos referentes à comercialização de grama,

Aos jardineiros José Paulino Cordeiro e Otávio Barbosa Filho, pela coleta de amostras e plantio dos vasos para os experimentos de patogenicidade,

Ao curso de Pós Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio por abrir novas janelas no conhecimento e a seus professores, pelo privilégio de assistir às aulas de ilustres pesquisadores,

A todos os colegas do curso de pós graduação, em especial à Amanda, pela companhia e pelas conversas esclarecedoras sobre biologia molecular, quando eu ainda supunha que era tudo ficção científica...

Ao Massimo, Franco, Enrico e Marco, por compreenderem a importância que este projeto adquiriu em minha vida profissional e pessoal, apoiando, incentivando e ajudando-me, privando-se da minha companhia, mesmo quando, muitas vezes, ela era necessária,

Aos meus pais e todos os familiares, que me incentivaram e souberam relevar minha ausência neste período,

Aos meus clientes que entenderam que minha atenção não pôde ser tão amíúde quanto deveria, mas que o benefício para seus jardins está chegando com a primavera.

Picarelli, M. A. S. C. **Estudo de micovírus em *Rhizoctonia solani* como estratégia para o controle biológico de rizoctoniose em gramados.** São Paulo- SP. 2015. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

## RESUMO

Rizoctoniose de gramados, causada pelo fungo cosmopolita *Rhizoctonia solani*, internacionalmente denominada “large patch”, é uma doença comum e severa que ocorre em *Zoyzia japonica*, (grama Esmeralda), em todas as regiões onde é cultivada. No Brasil, grama Esmeralda corresponde a 74% da grama comercializada e a doença está sempre presente nos períodos de temperaturas amenas, sob condições de umidade. *R. solani* é um complexo de espécies, dividido em grupos e sub-grupos de compatibilidade somática variada (grupos de anastomose). *R. solani* é um dos fungos fitopatogênicos parasitados por micovírus. Com o objetivo de identificar e caracterizar *R. solani* em 25 amostras de grama Esmeralda coletadas nos municípios de São Paulo, Cotia, Bragança Paulista, Ilhabela e Itapetininga empregou-se o isolamento direto e a preservação em tiras de papel filtro e para detectar a presença de micovírus relacionados à virulência deste fungo, empregou-se o método de cromatografia em celulose não iônica. As características morfológicas dos isolados avaliados foram hifas aéreas, células multinucleadas, ausência de zonação e de escleródios e colônias de coloração marrom escura após 30 dias de crescimento a 25°C. O crescimento micelial médio diário foi em torno de 25 mm/dia a 25°C e houve baixo crescimento em temperaturas inferiores a 10°C e superiores a 35°C. Houve virulência variável na patogenicidade a grama Esmeralda. Pela identificação molecular dos isolados de *R. solani*, verificou-se que os mesmos pertencem ao grupo de anastomose AG-2-2 LP, grupo que já está associado a esta doença em outros países. Pela extração, purificação e digestão do dsRNA com endonuclease S1, verificou-se, em eletroforese em gel de agarose, a presença de bandas cujos tamanhos variaram de 2000 a valores superiores a 10000 pb, confirmando a presença de dsRNAs em todos os isolados. Em preparações de contrastação negativa, ao microscópio eletrônico foram visualizadas partículas isométricas com cerca de 40nm de diâmetro, nestes isolados. Por estes resultados, pode-se sugerir a presença de micovírus nos isolados de *R. solani*, cuja hipovirulência não pôde ser confirmada.

**Palavras chave:** *Rhizoctonia solani*, *Zoyzia japonica*, micovírus, hipovirulência

Picarelli, M. A. S. C. **Study on mycovirus in *Rhizoctonia solani* as a biological control strategy to *Rhizoctonia* disease of turfgrass.** São Paulo- SP. 2014. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

### ABSTRACT

Rhizoctonia disease of turfgrass caused by the cosmopolitan fungus *Rhizoctonia solani*, also known as Large Patch, is a common and severe disease of *Zoyzia japonica* (Zoyzia grass), everywhere it is cultivated. In Brazil, Zoyzia grass corresponds to 74% of the total turfgrass sod commercialized in this country, and the disease always appears when the weather becomes cool and humid. *R. solani* is a complex species, comprising of groups and sub-groups that have a variety of somatic compatibility (anastomosis group). *R. solani* is among plant pathogenic fungi that are parasitized by mycovirus. To identify and characterize *R. solani* on Zoyzia grass and to detect mycovirus presence, isolation from infected plant tissue, preservation on paper and chromatographie on non-ionic cellulose was performed on 25 samples of turfgrass from São Paulo, Cotia, Bragança Paulista, Ilhabela e Itapetininga, cities of São Paulo state. Isolates showed aerial hyphae, multinucleated cells, absence of distinct zonation and of sclerotial formation, dark brown color colonies after 30 days at 25°C, average mycelial growth rate of 25 mm/day at 25°C, with reduced growth at 10°C and 35°C, and pathogenicity to Zoyzia grass with diverse virulence. The molecular identification showed that they belong to AG-2-2 LP, the same disease group present in other countries. After extraction of nucleic acids, purification and digestion by S1 nuclease, agarose gel electrophoresis showed bands ranged from 2000 to over than 10000 bp, confirming the dsRNA presence in all isolates. Transmission electron microscopic examination of extracts from these isolates showed the presence of isometric particles 40 nm in diameter. These results can suggest the infection of *R. solani* isolates by dsRNA mycovirus, but the hypovirulence couldn't be confirmed.

Key words: *Rhizoctonia solani*, *Zoyzia japonica*, mycovirus, hypovirulence

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Micovírus relatados em fungos fitopatogênicos, adaptado de Ghabrial e Suzuki (2009); King <i>et al.</i> (2012); Boine (2012); Xie e Jiang (2014); Das <i>et al.</i> (2014); Li <i>et al.</i> ( 2014); Zheng <i>et al.</i> , 2014; Zijin <i>et al.</i> , 2014, e site do ICTV (Vírus Taxonomy: 2014 Release) .....	9
Tabela 2. Local e data de coleta das amostras de grama Esmeralda e grama Bermuda, utilizadas para isolamento de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	18
Tabela 3. Coloração do micélio dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> após 15 dias de incubação a 25°C .....	44
Tabela 4. Patogenicidade dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> em hastes de grama Esmeralda .....	48
Tabela 5. Avaliação da severidade dos sintomas causados pelos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> em grama Esmeralda, pelo programa Corel Photo Paint X7 .....	49

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sintoma de <i>Rhizoctonia solani</i> em <i>Zoyzia japonica</i> .....	17
Figura 2. Coleta realizada no perímetro da mancha, com vasador de buracos de campos de golfe.....	19
Figura 3. Bainhas de grama Esmeralda preparadas para isolamento de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	20
Figura 4. Isca de haste de feijão para captura de <i>Rhizoctonia solani</i> presente no solo.....	21
Figura 5: Notas atribuídas a cor do micélio dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	23
Figura 6. Vasos do experimento de patogenicidade dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> em amostras de grama Esmeralda .....	26
Figura 7. Imagem da área e perfil do vaso no experimento de patogenicidade de <i>Rhizoctonia solani</i> em grama Esmeralda (isolado AM18).....	26
Figura 8. Interface do programa Corel Photo X7 mostrando a seleção de pixels verdes na fotografia da área do vaso no teste de patogenicidade em isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> de grama Esmeralda .....	27
Figura 9. Sintoma de <i>Rhizoctonia solani</i> em grama Esmeralda, com manchas de coloração palha, com leve rebrota no centro, e bordas com coloração alaranjadas. ....	40
Figura 10. Micélio castanho de <i>Rhizoctonia solani</i> presente em bainha de grama Esmeralda utilizada no isolamento direto, observada ao microscópio estereoscópico (40x).....	41
Figura 11. Micélio de <i>Rhizoctonia solani</i> corado com safranina, isolados de grama Esmeralda e observado ao microscópio de luz (400x).....	42
Figura 12. Micélio de <i>Rhizoctonia solani</i> isolado de grama Esmeralda visto em microscópio estereoscópico (40x).....	42
Figura 13. Micélio aéreo do isolado AM11de <i>Rhizoctonia solani</i> coletado em grama Esmeralda .....	43
Figura 14. Cor do micélio de todos os isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> coletados em grama Esmeralda e do isolado de <i>R. solani</i> AG-2-2 IV da coleção Mario Barreto, após 15 dias de incubação a 25°C .....	43
Figura 15. Comparação do isolado de <i>Rhizoctonia solani</i> AG2-2 IV da coleção Mario Barreto (colônia clara, com zonação e escleródios) com o isolado AM16 de <i>R. solani</i> de grama Esmeralda (colônia castanha, sem zonação e ecleródios).....	45
Figura 16. Núcleos corados com safraninaO contados nas pontas das hifas aleatórias dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> (1000x).....	45

- Figura 17. Crescimento micelial (mm/dia) dos isolados de *Rhizoctonia solani* AM04, AM07, TEE15 e TEE16 obtidos em grama Esmeralda e do isolado de *R. solani* AG-2-2 IV da Micoteca Mario Barreto nas temperaturas 10°, 15°, 20°, 25°, 30°, 35°C ..... 46
- Figura 18. Crescimento micelial (mm/dia) dos isolados de *Rhizoctonia solani* AM07S, AM15, AM18 e AM20 obtidos em grama Esmeraldem e do isolado de *R. solani* AG-2-2 IV da Micoteca Mario Barreto nas temperaturas 10°, 15°, 20°, 25°, 30° e 35°C. .... 46
- Figura 19. Crescimento micelial (mm/dia) dos isolados de *Rhizoctonia solani* AM11, AM16, AM19, AM21, obtidos em grama Esmeralda e do isolado de *R. solani* AG-2-2 IV da Micoteca Mario Barreto nas temperaturas 10°, 15°, 20°, 25°, 30°, 35°C ..... 47
- Figura 20. Efeito patogênico do isolado AM11 de *Rhizoctonia solani* em hastes de grama Esmeralda ..... 48
- Figura 21. Patogenicidade dos isolados de *Rhizoctonia solani* coletados em grama Esmeralda e isolado de *R. solani* AG-2-2 IV da Micoteca Mario Barreto, avaliados pela cobertura da superfície do vaso..... 50
- Figura 22. Patogenicidade dos isolados de *Rhizoctonia solani* coletados em grama Esmeralda e isolado de *R. solani* AG-2-2 IV da Micoteca Mario Barreto, avaliados pela altura da grama ..... 50
- Figura 23. Patogenicidade avaliada pela cobertura da superfície do vaso e altura da grama nos isolados AM15 (não patogênico em ambos experimentos), AM19 (maior virulência em ambos experimentos) de *Rhizoctonia solani* coletados em grama Esmeralda, isolado de *R. solani* AG-2-2 IV da Micoteca Mario Barreto (não patogênico no experimento cobertura da superfície e patogênico com pouca virulência no experimento altura da grama) e controle negativo..... 50
- Figura 24. Eletroforese em gel de agarose 1%: C= Cromatografia; T= Trizol; NS- Nucleo Spin RNA; 1= AM04-C; 2= AM07-C; 3=TEE15-C; 4=TEE16-C; 5=AM04-T; 7=AM07-T; 8=TEE15-T; 9=TEE16-T; 10=TEE15-NS; 11=TEE16-NS; 12=Potyvírus de Hippeastrum; 6=Marcador Righ Ranger 1Kb ..... 53
- Figura 25. Eletroforese em gel de agarose 1%: 1 e 8= Marcador Righ Ranger 1kb; 2= AM04-T; 3= AM04-TE; 4= AM04-TC; 5= AM04-TCE; 6= AM04-C; 7= AM04-CE; 9= AM07-T; 10= AM07-TE; 11= AM07-TC; 12= AM07-TCE; 13=AM07-C; 14= AM07-CE ..... 54
- Figura 26. Eletroforese em gel de agarose 1%: 1 e 6= Marcador Righ Ranger 1kb; 2= AM04-TC; 3= AM04-TCE; 4= AM04-C; 5= AM04-CE; 7= AM07-TC; 8= AM07-TCE; 9= AM07-C; 10= AM07-CE ..... 54
- Figura 27. Eletroforese de todos os isolados de *Rhizoctonia solani* coletados em grama Esmeralda (2-13) e *R. solani* AG-2-2IV (1) da micoteca Mario Barreto L=Marcador Righ Ranger 1kb;1= AG-2-2 IV 2=TEE16; 3=TEE15; 4= AM21; 5= AM20; 6= AM19; 7= AM18; 8= AM16; 9= AM15; 10=AM11; 11= AM07S; 12= AM07; 13= AM04..... 55
- Figura 28. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão dos isolados AM04, TEE15 e TEE16 de *Rhizoctonia solani* coletado em grama Esmeralda ..... 56
- Figura 29. Eletroforese em gel de agarose 1%: L= Marcador Righ Ranger 1kb; 1 a 7 Produtos de RT- PCR obtidos na detecção de “dsRNA” M2. 1= AM 04; 2= AM 07; 3= 11; 4= AM 19; 5= AM 20; 6= TEE15; 7= TEE16..... 58



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1 Gramados constituídos por diferentes espécies de gramíneas.....	3
2.2 <i>Rhizoctonia solani</i> , complexo de espécies patogênicas a plantas .....	4
2.3 <i>Rhizoctonia solani</i> em gramados.....	5
2.4 Ocorrência de vírus em fungos.....	7
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
3.1 <i>Rhizoctonia solani</i> .....	17
3.1.1 Obtenção e preservação dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> : .....	17
3.1.1.1 Obtenção de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	19
3.1.1.2 Preservação dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	22
3.1.2 Caracterização dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	23
3.1.2.1 Formação de escleródios e zonação .....	23
3.1.2.2 Cor do micélio.....	23
3.1.2.3 Condição nuclear:.....	24
3.1.2.4 Crescimento micelial dos isolados em diferentes temperaturas.....	24
3.1.2.5 Patogenicidade dos isolados de <i>R. solani</i> .....	25
3.1.2.5.1 Patogenicidade dos isolados em segmentos de bainhas de grama Esmeralda25	
3.1.2.5.2 Patogenicidade dos isolados em vasos de grama Esmeralda .....	25
3.1.3 Identificação molecular de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	28
3.1.3.1 Extração de DNA total .....	28
3.1.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	28
3.1.3.2.1 Utilização de iniciadores específicos para detecção de <i>R. solani</i> AG-2-2 LP 28	
3.1.3.2.2 Amplificação da região ITS.....	29
3.1.3.3 Purificação dos produtos da PCR.....	29
3.1.3.4 Sequenciamento.....	30
3.1.3.5 Clonagem .....	30
3.1.3.6 Uso de iniciadores específicos para identificação de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-2-2 LP31	
3.2 Detecção de micovírus em <i>Rhizoctonia solani</i> .....	32
3.2.1 Extração de RNA total .....	32
3.2.2 Purificação de dsRNA por cromatografia em celulose .....	34
3.2.3 Tratamento com endonuclease S1 .....	36

3.2.4	Eletroforese .....	37
3.2.5	Purificação do vírus .....	37
3.2.6	Observação de partículas virais.....	38
3.2.7	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) ...	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
4.1	Isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	40
4.1.1	Obtenção dos isolados de <i>R. solani</i> .....	40
4.1.2	Caracterização dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	41
4.1.2.1	Crescimento micelial dos isolados .....	45
4.1.2.2	Patogenicidade dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	47
4.1.3	Identificação molecular dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> em grama Esmeralda.....	51
4.2	Detecção molecular e por microscopia eletrônica de transmissão de micovírus ...	52
<b>5</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil são cultivados 17mil ha de grama. Cerca de um milhão de metros quadrados de grama são disponibilizados para o mercado, movimentando em torno de 350 milhões de reais por ano. Das espécies cultivadas no Brasil, *Zoyzia japonica* (grama Esmeralda) representa 74% da grama comercializada (ZANON, 2010; 2003). Avalia-se que o crescimento deste setor tenha sido de 60% nos últimos 10 anos.

Inúmeros agentes, abióticos e bióticos, afetam gramados, sendo os fungos os fatores bióticos mais frequentes, danificando folhas, raízes ou ambas. Dentre os muitos fungos causadores de doenças em gramados, algumas espécies do gênero *Rhizoctonia* (*R. cerealis*, *R. zea*, *R. oryzae* e *R. solani*) causam doenças importantes, porém no Brasil, pouco se conhece sobre quaisquer doenças de gramados, sendo necessários estudos para minimizar os danos causados por elas.

*Rhizoctonia solani*, um fungo cosmopolita, com ampla gama de hospedeiros, que ocasiona danos significativos em várias culturas de importância econômica, e também em gramados, compreende um complexo de espécies formado por grupos de indivíduos geneticamente semelhantes, denominados grupos de anastomose (AG). Estes diferentes grupos podem induzir doenças em gramados com sintomatologias distintas (MARTIN, 1983), e que requerem manejos específicos.

A grama Esmeralda, em condições adequadas de umidade e temperatura, pode ser infectada por *R. solani*, sendo um dos sintomas, o aparecimento de manchas levemente alaranjadas, que favorecidas pela umidade, aumentam em diâmetro durante os meses frios do ano, danificando intensamente o gramado. “Large patch”, como é internacionalmente conhecida uma das doenças causadas por *R. solani*, é considerada a mais comum e mais severa de *Z. japonica*, em todos os lugares onde ela é cultivada, sendo o patógeno pertencente ao grupo de anastomose AG-2-2 LP (OBASA, 2012). No Brasil não é conhecido o grupo de anastomose ao qual a rizoctoniose de gramados está associada.

Considerando-se que os gramados estão inseridos dentro do ambiente urbano, o controle de pragas e doenças deve causar o mínimo de agressão ao meio ambiente e à sociedade. Particularmente, no caso de gramados, o uso de fungicidas não está autorizado pelo Ministério da Agricultura, pois não há registro de produtos domissanitários com este fim, tornando o manejo da doença difícil e muitas vezes ineficiente.

Na busca por métodos de controle de menor impacto ambiental, o controle biológico pelo uso de micovírus interferindo na virulência de fungos é uma alternativa promissora. Já foi descrita a ocorrência de vírus de diferentes famílias que infectam fungos mediando

hipovirulência, entre eles *Reoviridae*, *Narnaviridae*, *Hypoviridae* em *Cryphonectria parasitica* (queima das castanheiras); *Totiviridae* e *Chrysoviridae* em *Helminthosporium victoriae* (murcha de aveia); *Narnaviridae* em *Ophiostoma novo-ulmi* (doença do olmo); *Narnaviridae* em *Sclerotinia homoeocarpa* (“dollar spot” em Gramados); *Partitiviridae* em *Fusarium graminearum* (sarna de grãos) e *Partitiviridae* e *Narnaviridae* em *Rhizoctonia solani* AG-2 (rizoctoniose de couve, rabanete, milho e vagem) e AG-3 (rizoctoniose de batata), respectivamente.

Em *R. solani*, dsRNAs de etiologia viral são onipresentes, já foram relacionados à virulência, à hipovirulência ou a nenhum efeito sobre a virulência de seu hospedeiro, o que, provavelmente, é devido à diversidade genética dos dsRNAs e do próprio fungo hospedeiro (JIAN *et al.*, 1998). No Brasil ainda há poucos estudos sobre micovírus em fungos fitopatogênicos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Gramados constituídos por diferentes espécies de gramíneas

Gramados têm importância na qualidade de vida das pessoas. Entre tantas contribuições, acrescentam beleza a jardins públicos e residenciais, fazem parte de campos esportivos, ajudam na segurança de aeroportos e estradas, controlam a erosão causada pela água, sedimentos e vento, e reduzem a poluição do ar e sonora (SMILEY *et al.*, 2007).

Gramados são cultivados em todas as regiões do mundo, e entre as plantas que os compõem, as pertencentes a Poaceae, conhecidas como gramíneas, são as mais frequentes, pois possuem grande capacidade de adaptação às diferentes regiões climáticas. A família Poaceae é composta por aproximadamente 7500 espécies agrupadas em 600 gêneros. As gramíneas cultivadas como gramados pertencem a 7 tribos das subfamílias Festuscoideae, Eragrostoideae e Panicoideae (SMILEY *et al.*, 2007).

Festuscoideae abriga gramíneas utilizadas em gramados de regiões de clima frio, classificadas como plantas C3, que tem seu ótimo crescimento entre 15 e 25°C, (SMILEY *et al.*, 2007) e que, por não se adaptarem a altas temperaturas, não são muito utilizados no Brasil.

Eragrostoideae e Panicoideae, por sua vez, abrigam gramíneas utilizadas em gramados de regiões de clima quente, classificadas como plantas C4, tem seu ótimo crescimento entre 25 e 35°C, que é limitado por baixas temperaturas (SMILEY *et al.*, 2007). Entre estas gramíneas encontram-se *Paspalum notatum* (grama Batatais), *Axonopus compressus* (grama São Carlos), *Stenotaphrum secundatum* (grama Santo Agostinho), *Cynodon dactylum* (grama Bermudas), *Zoysia tenuifolia* (grama Coreana) e *Zoysia japonica* (grama Esmeralda), todas cultivadas no Brasil.

No Brasil, *Z. japonica* representa 74% da grama comercializada (ZANON, 2010). Foi introduzida nos anos 70, trazida dos Estados Unidos (ZANON, 2003). Na região sudeste concentra-se 57% de sua produção, sendo o estado de São Paulo responsável por 42,4% da produção (ZANON, 2010).

Grama Esmeralda é uma gramínea tolerante a seca e a altas temperaturas, de baixo requerimento nutricional, baixa manutenção, macia ao toque, de tonalidade verde brilhante e muito densa, qualidades que a tornaram muito utilizada em gramados. Porém, é muito afetada por *R. solani*.

## 2.2 *Rhizoctonia solani*, complexo de espécies patogênicas a plantas

*Rhizoctonia* é um gênero de fungo basidiomiceto, cujas espécies são ecologicamente diversas, podendo ser patógeno de plantas, saprófitas de solo ou micorrizas de orquídeas (OBASA, 2012).

Este gênero foi primeiramente descrito por De Candolle, que em 1815 designou *Rhizoctonia crocorum* como a espécie tipo (DAS, 2013). Em 1858, Julius Kuhn descreveu a espécie *Rhizoctonia solani* em batatas.

O gênero *Rhizoctonia* pode ser caracterizado pela forma particular de suas hifas, como ramificação de hifas em ângulos retos, regiões das hifas próximas às ramificações com septos e constrições, septos doliporos e ausência de grampos de conexão. As hifas podem ter diâmetros maiores (6 a 10  $\mu\text{m}$ ), apresentando 3 ou mais núcleos por célula (multinucleadas), ou podem ter diâmetros menores (4 a 7  $\mu\text{m}$ ), apresentando 2 núcleos (binucleadas). Não possuem rizomorfos e seus escleródios não são divididos em crosta e medula. Sua reprodução é assexuada, não produzem conídios e raramente produzem basidiósporos (CERESINI, 1999).

*R. solani*, teleomorfo *Thanatephorus cucumeris*, é um fungo parasita facultativo, cosmopolita, com ampla gama de hospedeiros, incluindo muitas culturas de importância econômica como arroz, batata, algodão, tabaco, trigo e beterraba (FENILLE, 2001).

Diversos mecanismos de infecção são utilizados, como aqueles que envolvem enzimas extracelulares que degradam pectina e celulose e enzimas após a infecção, como DNases, RNases, amilases, quitinases, glucanases, xilanases, proteases e ureases; “pegs” de penetração e toxinas como o ácido fenil acético e seus derivados hidroxílicos (OBASA, 2012).

Como *R. solani* não produz conídios e raramente produz basidiósporos, sua identificação até o fim dos anos 60, era feita por características morfológica de colônias crescidas em laboratório e patogenicidade a vários hospedeiros, quando se passou a utilizar a interação entre as hifas para separar grupos geneticamente diferentes. Nestas interações eram observadas presenças ou ausências de fusões entre paredes celulares e entre membranas celulares, troca de material citoplasmático, e morte ou não das hifas pareadas (DAS, 2013). Desta forma, isolados cujas hifas se reconheciam e se fundiam eram geneticamente semelhantes, pertenciam a um mesmo grupo de anastomose (AG), enquanto que isolados cujas hifas não se fundiam, eram geneticamente diferentes, pertenciam a diferentes AGs. Muitos ajustes a esta técnica foram feitos até que no fim dos anos 80, Carling *et al.* (1988) definiram um parâmetro para a classificação dos isolados em grupos de anastomose, de acordo com os tipos de interações entre as hifas de um isolado a ser caracterizado pareado com um isolado de AG conhecido. Assim, quatro tipos de reações

foram descritos: reação C3 ocorreria entre isolados idênticos ou muito semelhantes, sendo o isolado desconhecido confirmado no mesmo AG do conhecido; reação C2 ocorreria entre isolados distantes, mas ainda pertencentes ao mesmo AG; reação C1 ocorreria entre isolados pouco relacionados de um mesmo AG ou entre isolados de AGs diferentes sendo o isolado confirmado ou no AG conhecido e reação C0 quando não havia interação entre isolados, que eram confirmados em AGs diferentes (DAS, 2013)

Desta forma, para acomodar a grande variedade que existe entre os isolados de *R. solani*, utilizam-se a frequência de anastomose de hifas, morfologia da colônia, patogenicidade, gama de hospedeiros, requerimentos nutricionais e propriedades genéticas e bioquímicas (DAS, 2013). Hoje se conhecem 14 AGs: AG-1, AG-2, AG-3, AG-4, AG-5, AG-6, AG-7, AG-8, AG-9, AG-10, AG-11, AG-12, AG-13 e AG BI, dos quais sete são subdivididos em grupos intra-específicos (ISGs), sendo que alguns grupos intraespecíficos, por sua vez também são subdivididos (DAS, 2013). AG-2 é o grupo de anastomose mais heterogêneo, possuindo vários grupos intra-específicos e ainda subgrupos, que infectam diferentes hospedeiros: AG-2-1, AG-2-2 IIIB, AG-2-2 IV, AG-2-2 LP, AG-2-3, AG-2-4, AG-2 BI (OBASA, 2012).

*R. solani* de quatro diferentes AGs parasitam gramados: AG1-IA, AG-4, AG-5, e AG-2, e neste último, os subgrupos AG 2-2 IIIB, AG 2-2 IV e AG 2-2 LP abrigam os patógenos das principais doenças de gramado (OBASA, 2012).

### 2.3 *Rhizoctonia solani* em gramados

Gramados de clima quente ou frio são afetados por diferentes espécies de *Rhizoctonia*, que causam as doenças “brown patch” e “large patch” (*R. solani*), “leaf and sheat spot” (*R. zae* e *R. oryzae*) e “yellow patch” (*R. cerealis*) (SMILEY *et al.*, 2007).

Os sintomas das doenças variam muito de acordo com a espécie ou subespécie de *Rhizoctonia*, com a grama hospedeira, e com as condições às quais ela está submetida. Por exemplo, os sintomas em gramas com altura de corte alto e baixo são diferentes. Além disso, os sintomas são facilmente confundidos com o de outras doenças (SMILEY *et al.*, 2007).

As duas principais doenças de gramados causados por *R. solani* são “brown patch”, em gramas de clima frio (plantas C3), e “large patch”, em gramas de clima quente (plantas C4) (SMILEY *et al.*, 2007), cujos patógenos pertencem, respectivamente, aos sub-grupos AG2-2 IIIB e AG2-2 IV ou AG2-2 LP (HYAKUMACHI *et al.*, 1998).

Em geral estas doenças se manifestam em condições de alta umidade, em longos períodos de folhas molhada, quando as gramas hospedeiras estão enfraquecidas pela condição climática desfavorável a elas. Desta forma, “brown patch”, que afeta gramas de

clima frio, ocorre nas estações quentes, no verão dos países do hemisfério norte, e “large patch”, que afeta gramas de clima quente, ocorre nas estações frias, na primavera e outono dos países do hemisfério norte (SMILEY *et al.*, 2007), e no inverno do Brasil.

Internacionalmente conhecida como “large patch”, é considerada a doença mais comum e mais severa de grama Esmeralda, em todos os lugares onde ela é cultivada (OBASA, 2012; AOYAGI *et al.*, 1998), sendo também chamada nos Estados Unidos de “Zoyzia patch”, onde ela é particularmente importante nas regiões de transição entre o plantio de gramas de clima frio e gramas de clima quente (SMILEY *et al.*, 2007). *R. solani* também é patógeno das grama Santo Agostinho e Bermudas (OBASA, 2012).

No gramado, os sintomas são manchas de tecido seco, grosseiramente circulares, que começam pequenas, mas evoluem para grandes tamanhos, às vezes metros de diâmetro (OBASA, 2012), e que podem coalescer. As bordas das manchas geralmente são alaranjadas. A área da mancha se apresenta totalmente seca ou, às vezes, aparece com a forma de anel, pois o gramado de dentro das manchas se recupera, apresentando infestação por plantas daninhas (SMILEY *et al.*, 2007). A folha, em geral, não apresenta lesões, mas se destaca facilmente da planta, pois a bainha apodrece, mostrando sintomas de encharcamento e/ou escurecimento (SMILEY *et al.*, 2007). Os sintomas aparecem em temperaturas em torno de 15°C, em solos compactados, de drenagem insuficiente e com excessiva umidade sobre as folhas e desaparecem quando as temperaturas voltam a subir (OBASA, 2012).

Considerações sobre a ausência de sintomas da doença no verão, uma vez que as temperaturas ótimas de crescimento do patógeno estão entre 25 e 30°C, têm sido feitas. A temperatura do colchão (camada formada pela mistura de folhas, hastes e raízes vivas e mortas situada entre a região de crescimento da grama e o solo onde está plantada) foi avaliada pois se supunha que ela adquirisse valores altos, limitantes ao crescimento do fungo, porém observou-se que isto não era verdadeiro (OBASA, 2012). Os fatores que envolvem a supressão dos sintomas ainda não estão claros. Imagina-se que, sendo a grama Esmeralda uma planta C4, com ótimo crescimento no verão, ela possa superar o crescimento do patógeno. Também se acredita que alterações na sua expressão gênica, em altas temperaturas, possam influenciar o desenvolvimento da doença (OBASA, 2012).

*R. solani* sobrevive em condições desfavoráveis a seu crescimento, formando estruturas de resistência como micélio engrossado, bulbilhos e células monilioides, que resistem a condições climáticas adversas e a pesticidas (SMILEY *et al.*, 2007), cresce como saprófita de solo e quando as condições voltam a ser favoráveis, ela reinicia seu ciclo.

O controle da doença é feito por manejo adequado da água (irrigação em horários que não favoreçam um longo período de folha molhada, melhorias na drenagem do solo, da aeração dos gramados através de podas de arbustos e árvores, e redução do colchão); da adubação (controle da época de aplicação e do tipo de fertilizantes utilizados) e da aplicação

de defensivos químicos (SMILEY et al., 2007). Fora do Brasil, há uma ampla gama de defensivos disponíveis para o controle de *R. solani* em gramados, como fungicidas inibidores de respiração, de síntese de quitina, da biossíntese de esteroides e da síntese de membranas, e com estudos definindo para a correta época de aplicação (LATIN, 2011).

No Brasil, rizoctoniose está sempre presente em grama Esmeralda, quando as condições climáticas são favoráveis ao fungo, mas não à grama, sendo uma doença de difícil controle, principalmente em jardins, onde o uso de defensivos químicos não é autorizado pelo Ministério da Agricultura.

O sucesso do manejo de uma doença depende do conhecimento do hospedeiro, do patógeno, e das condições onde ele ocorre. Porém, não há estudos brasileiros sobre a identificação e caracterização de *R. solani* em gramados.

## 2.4 Ocorrência de vírus em fungos

Micovírus são vírus que se replicam em células de fungos. Como os fungos, durante grande parte de seus ciclos de vida, produzem muitos tipos de esporos e trocam material citoplasmático na fusão de hifas vegetativamente compatíveis, os micovírus, parasitas obrigatórios, tiveram sua disseminação e dispersão garantidas (MILGROOM; HILLMAN, 2011).

Representantes de micovírus encontram-se em todos os filos de fungos verdadeiros e também nos gêneros *Pythium* e *Phytophthora* de oomicetos (PEARSON et al., 2009), e já foram relatados em cogumelos comestíveis (espécies de *Agaricus*, *Lentinula*, *Pleurotus* e *Tcholoma*) (KIM, et al., 2013) e em leveduras (espécies de *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*) (SCHMITT; BREINING, 2006); em fungos de importância médica (espécies de *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, entre outras) (SANDE et al., 2010; REFOS et al., 2013); em fungos entomopatogênicos (*Metarhizium anisopliae*, *Bouveria bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus*) (TIAGO et al., 2004); em fungos endofíticos (HERRERO et al., 2009) e em muitos fungos fitopatogênicos. Mais de 250 micovírus já foram sequenciados e estão registrados no National Center of Biotechnology Information (XIE; JIANG, 2014), embora sejam poucos os trabalhos científicos publicados sobre micovírus quando comparados aos publicados sobre vírus em plantas e animais (PEARSON et al., 2009).

O primeiro relato de doença em fungos aconteceu em 1948 na Pensilvânia, numa produção de cogumelos comestíveis *Agaricus bisporus* que mostrava má formação e perda na produção, porém só em 1962 foram encontradas partículas virais nos esporóforos de cogumelos doentes, data considerada o nascimento da micovirologia, um ramo novo da

virologia (GHABRIAL; SUZUKI, 2009). Nesta mesma época, a descoberta de que os dsRNAs virais presentes nos extratos de isolados de *Penicillium stoloniferum* induziam a síntese de interferon, uma proteína antiviral produzida por animais, desencadeou o interesse nestes microorganismos (BUCK, 1988). Atualmente, a maior parte do conhecimento sobre micovírus está relacionada a perdas na produção de cogumelos, a efeitos sobre leveduras durante a fermentação e, principalmente, à redução de virulência de fungos fitopatogênicos.

Ghabrial e Suzuki (2009) agruparam 186 micovírus, incluindo espécies definitivas, e ainda não classificadas, segundo seu tipo de genoma (dsDNA, RNA com transcrição reversa, dsRNA, ssRNA senso positivo), em 10 famílias e 13 gêneros, e citaram 42 micovírus classificados e 4 não atribuídos encontrados em fungos fitopatogênicos, distribuídos entre 10 famílias e 12 gêneros. À medida que novos relatos de vírus em fungos são apresentados, tem sido proposta a criação de gêneros e também famílias que possam agrupá-los. Na Tabela 1 foi feita uma compilação de fungos fitopatogênicos adaptada destes autores, da revisão de Jiatao Xie e Daohong Jiang (XIE; JIANG, 2014), do material disponibilizado eletronicamente pelo International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, 2014), bem como de recentes publicações científicas (DAS *et al.*, 2014; LI, *et al.*, 2014; ZHENG, *et al.*, 2014; BOINE, 2012 e ZIJIN, *et al.*, 2014).

Os vírus mais comuns em fungos fitopatogênicos são os de genoma de dsRNA, geralmente possuindo partículas isométricas com capsídeo simples, exceto para *Reoviridae*, que tem capsídeo duplo e *Endornaviridae*, que não possui capsídeo (Tab.1), podendo ser segmentados ou não. Micovírus de ssRNA, geralmente, não possuem capsídeo e ocorrem em sua forma replicativa (dsRNA), possuindo genomas lineares de um único segmento (GHABRIAL; SUZUKI, 2009). Recentemente foi relatado o primeiro micovírus de genoma de DNA (YU, *et al.*, 2010).

**Tabela 1.** Micovírus relacionados em fungos fitopatogênicos, adaptado de Ghabrial e Suzuki (2009); King et al. (2012); Boine (2012); Xie e Jiang (2014); Das et al. (2014); Li et al. (2014); Zheng et al., 2014; Zijin et al., 2014, e site do ICTV (Virus Taxonomy: 2014 Release)

Fungo hospedeiro	Genoma	Família	Morfologia e tamanho da partícula	Número de segmentos e tamanho do genoma	Gênero	Espécie
<i>Cladospodium fulvum</i>	RNA (com RT)	Metaviridae	irregular /50nm	1 segmento de 4 a 10kb	Metavirus	<i>Cladospodium fulvum T-1 virus</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>						<i>Fusarium oxysporum Skiopy virus</i>
<i>Chyphonectria parasitica</i>						<i>Mycareovirus 1</i>
<i>Chyphonectria parasitica</i>	Reoviridae	Reoviridae	Isométrico com capsídeo duplo/80nm	11 ou 12 segmentos de 4,1;3,8;3,2;2,2;2,0;2,0;1,5;1,0;9,0;7	Mycareovirus	<i>Mycareovirus 2</i>
<i>Rosellinia necatrix</i>						<i>Mycareovirus 3</i>
<i>Ustilago maydis</i>						<i>Ustilago maydis virus H1</i>
<i>Rosellinia necatrix</i>	dsRNA	Totiviridae	isométrico/30-40nm	1 segmento de 4,6 a 6,7kb	Victorivirus	<i>Rosellinia necatrix victorivirus 1</i>
<i>Chalara elegans</i>						<i>Chalara elegans RNA virus 1</i>
<i>Gremmeniella abietina</i>						<i>Gremmeniella abietina RNA virus L1</i>
<i>Helicobasidium mampoa</i>						<i>Helicobasidium mampoa totivirus 1-17</i>
<i>Helminthosporium victoriae</i>						<i>Helminthosporium victoriae virus 1905</i>
<i>Magnaporthe oryzae</i>						<i>Magnaporthe oryzae virus 1</i>
<i>Magnaporthe oryzae</i>						<i>Magnaporthe oryzae virus 2</i>
<i>Sphaeropsis sapinea</i>						<i>Sphaeropsis sapinea RNA virus 1</i>
<i>Sphaeropsis sapinea</i>						<i>Sphaeropsis sapinea RNA virus 2</i>
?						<i>Chery chlorotic rusty spot associated partitivirus</i>
<i>Helicobasidium mampoa</i>	Alphapartitivirus					<i>Helicobasidium mampoa partitivirus V70</i>
<i>Heterobasidium annosum</i>						<i>Heterobasidium partitivirus 1</i>
<i>Heterobasidium annosum</i>						<i>Heterobasidium partitivirus 3</i>
<i>Rosellinia necatrix</i>	Betapartitivirus					<i>Rosellinia necatrix partitivirus 2</i>
<i>Ceratocystis resinifera</i>						<i>Ceratocystis resinifera virus 1</i>
<i>Fusarium poae</i>						<i>Fusarium poae virus 1</i>
<i>Heterobasidium annosum</i>						<i>Heterobasidium partitivirus P</i>
<i>Heterobasidium parviporum</i>						<i>Heterobasidium partitivirus 2</i>
<i>Heterobasidium irregulare</i>						<i>Heterobasidium partitivirus 8</i>
<i>Rhizoctonia solani</i>						<i>Rhizoctonia solani virus 717</i>
<i>Rosellinia necatrix</i>						<i>Rosellinia necatrix virus 1</i>
<i>Discula destructiva</i>						<i>Discula destructiva virus 1</i>
<i>Discula destructiva</i>						<i>Discula destructiva virus 2</i>
<i>Fusarium solani</i>	Gamma partitivirus					<i>Fusarium solani virus 1</i>
<i>Gremmeniella abietina</i>						<i>Gremmeniella abietina RNA virus MS1</i>
<i>Gremmeniella abietina</i>						<i>Gremmeniella abietina RNA virus 1</i>
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	unassigned					<i>Gaeumannomyces graminis virus 019/6-A</i>
<i>Gaeumannomyces graminis</i>						<i>Gaeumannomyces graminis virus TI-A</i>
?						<i>Amasia chery disease associated chrysovirus</i>
<i>Chyphonectria nitschkei</i>	Chysoviridae		isométrico/30-35	4 segmentos de 2,7 a 3,5kb	Chysovirus	<i>Chyphonectria nitschkei chrysovirus 1</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>						<i>Fusarium oxysporum chrysovirus 1</i>
<i>Helminthosporium victoriae</i>						<i>Helminthosporium victoriae 1455 virus</i>
<i>Verticillium dahliae</i>						<i>Verticillium dahliae chrysovirus 1</i>
<i>Rosellinia necatrix</i>						<i>Rosellinia necatrix megabimavirus 1</i>
<i>Helicobasidium mampoa</i>	Endornaviridae		sem capsídeo	1 segmento de 14 a 17,6kb	Endornavirus	<i>Helicobasidium mampoa endornavirus 1</i>
<i>Phytophthora spp</i>						<i>Phytophthora endornavirus 1</i>

**Tabela 1 (Continuação).** Micovírus relatados em fungos fitopatogênicos, adaptado de Ghabrial e Suzuki (2009); King *et al.* (2012); Boine (2012); Xie e Jiang (2014); Das *et al.* (2014); Li *et al.* (2014); Zheng *et al.*, 2014; Zijin *et al.*, 2014, e site do ICTV (Virus Taxonomy: 2014 Release)

Fungo hospedeiro	Genoma	Família	Morfologia e tamanho da partícula	Número de segmentos e tamanho do genoma	Gênero	Espécie
<i>Chyphonectria parasitica</i>						<i>Chyphonectria mitovirus 1</i>
<i>Ophiostoma novo-ulmi</i>		Narnaviridae	sem capsídeo	1 segmento de 2,5 a 2,9 kb	Mitovirus	<i>OMV3a</i>
<i>Ophiostoma novo-ulmi</i>						<i>OMV4</i>
<i>Ophiostoma novo-ulmi</i>						<i>OMV5</i>
<i>Ophiostoma novo-ulmi</i>						<i>OMV6</i>
<i>Chyphonectria parasitica</i>	ssRNA(+)	Hypoviridae	viscúlas pleiomórficas/50-80nm	1 segmento de 9 a 13kb	Hypovirus	<i>CHV1</i>
<i>Chyphonectria parasitica</i>						<i>CHV2</i>
<i>Chyphonectria parasitica</i>						<i>CHV3</i>
<i>Chyphonectria parasitica</i>						<i>CHV4</i>
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		Alphaflexiviridae	sem capsídeo	1 segmento de 5,5kb	Sclerodarnavirus	<i>SsDRV</i>
<i>Botrytis cinerea</i>		Gammalflexiviridae	flexuoso/600-700nm	1 segmento de 7kb	Botrexvirus	<i>BVX</i>
<i>Botrytis cinerea</i>	ssDNA circ	Gammaviridae ??	flexuoso/600-650nm	1 segmento de 6,8kb	Mycoflexivirus	<i>BVF</i>
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	ssRNA(+)	Gammaviridae ??			??	<i>SsHADV-1</i>
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	dsRNA	Rubi-like viruses??				<i>SsRV-L</i>
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	dsRNA	não segmentado			Partitivirus	<i>SsPV-5</i>
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	ssRNA(+)	Hypoviridae			?	<i>SsNSV-L</i>
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	ssRNA(+)	Hypoviridae			Hypovirus	<i>SsHV1</i>
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	ssRNA(+)	Hypoviridae			Hypovirus	<i>SsHV2</i>
<i>Valsa ceratosporna</i>	ssRNA(+)	Hypoviridae		ds 9,5kb	Hypovirus	<i>VcHV1</i>
<i>Fusarium graminearum</i>	ssRNA(+)	Hypoviridae		ds 13kb	Hypovirus	<i>FgHV1</i>
<i>Rosellinia necatrix</i>	dsRNA	Quadriviridae ??			Hypovirus	<i>RnQV-1</i>
<i>Rosellinia necatrix</i>	dsRNA	Quadriviridae ??				<i>RnQV-2</i>
<i>Botrytis cinerea</i>	ssRNA(+)		sem capsídeo	3kb	Botrytis cinereae mitovirus 1	<i>BcMV1</i>
<i>Botrytis parvi</i>	dsRNA	Partitiviridae	35nm	e seg 6,2 e 5,8kb	Partitivirus diferente	<i>BpRV1</i>
<i>Fusarium graminearum</i>	ssRNA(+)	Hypoviridae ?				<i>FgV1</i>
<i>Fusarium graminearum</i>	ssRNA(+)	Hypoviridae			Fusarium graminearum hypovirus 1	<i>FgHV1</i>
<i>Rhizoctonia solani</i>		Bromoviridae ??		6,4kb	Rhizoctonia solani M1	<i>M1</i>
<i>Rhizoctonia solani</i>		Narnaviridae ??	sem capsídeo	3,6kb	Rhizoctonia solani M2	<i>M2</i>
<i>Magnaporthe oryzae</i>		Chrysovirus ??		5 seg de 3 a 3,5kb	Magnaporthe oryzae chrysovirus 1	<i>MocV1</i>
<i>Ustilagoideae vires</i>		Partitivirus ??		2 seg 1,7 e 1,6kb	Partitivirus ??	<i>UWPV1</i>
<i>Ustilagoideae vires</i>		Victorivirus ??		1 seg 5,6kb	Victorivirus ??	<i>UVRV1</i>
<i>Phytophthora infestans</i>		nova família??		4 dsRNAs que variam de 2,9 a 11,2 kb	Phytophthora infestans RNA virus 1	<i>PIRV-1</i>
<i>Phytophthora infestans</i>		nova família??			Phytophthora infestans RNA virus 2	<i>PIRV-2</i>
<i>Phytophthora infestans</i>		nova família??			Phytophthora infestans RNA virus 3	<i>PIRV-3</i>
<i>Phytophthora infestans</i>		Narnaviridae			Phytophthora infestans RNA virus 4	<i>PIRV-4</i>
<i>Sclerophthora macrospora</i>	ssRNA(+)	nova família??	icosaédrico 30nm	1 seg	Sclerophthora macrospora virus B	<i>SmVB</i>
<i>Sclerophthora macrospora</i>	ssRNA(+)	nova família??	icosaédrico 35nm	3 seg	Sclerophthora macrospora virus A	<i>SmVA</i>
<i>Plasmopara halstedii</i>	ssRNA(+)	nova família??	icosaédrico 37nm	2 segmentos de 3 e 1,6kb	Plasmopara halstedii virus A	<i>PHVA</i>
<i>Rhizoctonia cerealis</i>	dsRNA	Endornaviridae		1 segmento de 17,48kb	Rhizoctonia cerealis endornavirus 1	<i>RCEV1</i>
<i>Rhizoctonia solani</i>	dsRNA	Endornaviridae		1 segmento de 16kb	Rhizoctonia solani endornavirus RS002	<i>RsEV-RS002</i>
<i>Rhizoctonia solani</i>	dsRNA	Partitiviridae	icosaédrico 30nm	2 segmentos de 1,79 e 2,02kb	Rhizoctonia solani partitivirus 2	<i>RsPV 2</i>

A maioria dos vírus de fungos possui genoma de RNA, provavelmente por que vírus com este tipo de genoma possuem maior capacidade de adaptação a novos ambientes, uma vez que sua população é mais dinâmica e heterogênea devido às altas taxas de mutação que ocorrem na replicação do RNA (PEARSON *et al.*, 2009). O fato de a quase totalidade de micovírus fitopatogênicos possuir genoma de RNA de fita dupla ou fita simples e senso positivo pode ser explicado tanto pela dificuldade na detecção de vírus sem capsídeo como também pelo dogma estabelecido nos anos 70 de que a maioria dos micovírus seria de dsRNA ou ssRNA, o que condicionou a proposição de metodologias específicas para estes dois tipos de genoma, que não detectam ssRNA de senso negativo ou DNA (MILGROOM; HILLMAN, 2011). Porém, Yu *et al.* (2010) relataram pequenos micovírus de DNA em *Sclerotinia sclerotiorum* e, posteriormente, numa descoberta inovadora, demonstraram a infecção de protoplastos e fragmentos de hifas por partículas virais purificadas do micovírus de ssDNA circular SsHADV-1 (*Sclerotinia sclerotiorum* hypovirulence-associated DNA vírus 1) (YU, *et al.*, 2012).

A origem dos micovírus é desconhecida, mas é explicada por meio de duas hipóteses. Na hipótese de que ela seja muito antiga, micovírus e hospedeiros teriam co-evoluído ao longo dos tempos, influenciando-se mutuamente (PEARSON, *et al.* 2009). Na hipótese de que seja recente, patógenos conquistariam novos hospedeiros próximos, em eventos raros, mas possíveis, justificando as semelhanças entre sequências de vírus de fungos, de plantas ou de animais (MILGROOM; HILLMAN, 2011). Esta troca de vírus, que em novo hospedeiro podem perder partes de segmentos que não lhes sejam úteis, pode ser exemplificada pelos micovírus alongados e flexuosos *BVX* (*Alphaflexiviridae*) e *BVF* (*Gammapflexiviridae*) muito semelhantes a *Potexvírus* e *Allexvírus* de plantas, respectivamente (PEARSON, *et al.* 2009), mas que diferem destes na gama de hospedeiros e na falta de proteínas de movimento, entre outras características (GHABRIAL; SUZUKI, 2009). Porém, o contrário também pode ter ocorrido: vírus de plantas evoluíram dos micovírus, adquirindo, por exemplo, a capacidade de codificar proteínas de movimento quando acrescentaram uma fase extracelular aos seus ciclos de vida (BOINE, 2012).

Micovírus são, geralmente, crípticos ou latentes (PEARSON, 2009), causam pequenas ou imperceptíveis alterações morfológicas sobre o hospedeiro. Isto ocorre provavelmente porque sendo parasitas intracelulares, dependem do hospedeiro para sua multiplicação e transmissão, pois não têm fase extracelular e nem vetores conhecidos. Portanto, as alterações deletérias que eventualmente provoquem no desempenho de seu hospedeiro podem prejudicar sua própria sobrevivência (MILGROOM; HILLMAN, 2011). Estes autores consideram que a barreira à transmissão horizontal imposta pela incompatibilidade vegetativa entre indivíduos e a dependência da transmissão vertical contribuíram, ao longo do tempo, para que os micovírus evoluíssem para serem benéficos ou benignos (MILGROOM;

HILLMAN, 2011). No entanto, alterações sutis em taxa de crescimento, esporulação e virulência, que interferem na dinâmica do vírus e de seu hospedeiro, são observadas e, juntamente com o fato de não ocorrerem sempre em altas frequências, suscitam a dúvida de que micovírus sejam realmente tão benignos quanto parecem (MILGROOM; HILLMAN, 2011). Ademais, alterações no ambiente externo ou interno ao fungo, além da presença de outros micovírus, quando ocorrem infestações mistas, podem interferir nas interações vírus-fungo, como virulência ou transmissão (PEARSON *et al.*, 2009). Assim, há micovírus que causam alterações significativas, aumentando ou diminuindo o desempenho de seu hospedeiro, em relações que variam de harmônicas a competitivas.

As relações chamadas de mutualismo ocorrem quando os micovírus aumentam a virulência do hospedeiro, trazendo-lhe benefícios. Em *R. solani* AG-3 de batata foi relatado o dsRNA M1, de 6,4kb (JIAN *et al.*, 1997) e em *Nectria radicola*, patógeno de ginseng o dsRNA L1, de 6kb (AHN; LEE, 2001), em que ambos se beneficiam da maior capacidade de colonização e reprodução que induzem em seus hospedeiros. Mas há relatos de outros dois tipos de mutualismo. Em um deles a levedura “killer” *Saccharomyces cerevisiae* contém dois tipos distintos de dsRNAs - L e M. Estes dois dsRNAs juntos induzem a produção de uma toxina letal para leveduras não “killer” e de imunidade para esta toxina nas leveduras “killer”, proporcionando uma vantagem competitiva, quando estão juntas (SCHMITT; BREINING, 2006). No outro, existe um mutualismo complexo entre o fungo endofítico *Curvularia protuberata*, o micovírus com genoma de dsRNA *Curvularia thermal tolerance virus* (CThTV), e a gramínea *Dicanthelium lanuginosum*. Nas situações em que ocorre o CThTV no fungo endofítico, a gramínea pode crescer em solos geotermais, a altas temperaturas. Quando o vírus não ocorre no fungo endofítico, a gramínea não cresce nas condições mencionadas. Esta combinação foi testada na cultura de tomate, com resultados promissores (ROOSSINCK, 2011).

Os micovírus que induzem hipovirulência em seus hospedeiros são exceções, mas mesmo assim, são os mais estudados (MILGROOM; HILLMAN, 2011) por representarem uma alternativa ao controle convencional de fungos fitopatogênicos. Alguns micovírus com esta habilidade já foram estudados, entre eles *CHV1*, *CHV2*, *CHV3*, *CpMYRV1* e *CpMYRV2* de *Cryphonectria parasitica* (TURINA; ROSTAGNO, 2007), *HvV190S* e *HvV145S* de *Helminthosporium victoriae* (ZHAO *et al.*, 2006), *SsHADR-1* e *SsNsV-L* de *Sclerotinia sclerotiorum* (HU *et al.*, 2014), *MoV1* e *MoV2* de *Magnaporthe oryzae* (MAEJIMA *et al.*, 2008), *BVF* e *BVX* de *Botrytis cinerea* (BOINE, 2012), *RnMYRV3* e *RnMBV1* em *Rosellinia necatrix* (CHIBA *et al.* 2009).

Todavia, não basta constatar a hipovirulência causada pelos micovírus para que o controle biológico seja exequível. Além da obtenção de um isolado hipovirulento do fungo, é

necessário que ele sobreviva em condições naturais e que possa transmitir o vírus causador da hipovirulência (MILGROOM; HILLMAN, 2011).

Na natureza, a transmissão de micovírus ocorre célula a célula podendo ser horizontal, por fusão de hifas, ou vertical na produção de esporos sexuais ou assexuais. A transmissão vertical é a mais comum e ocorre com frequências variáveis, podendo atingir taxas de 100% na produção de esporos assexuais, o que dificulta a obtenção de isolados isogênicos sem o micovírus (MILGROOM; HILLMAN, 2011). A transmissão por esporos sexuais é variável entre os diversos tipos de fungos e vírus, mas não é considerado um evento raro (PEARSON, 2009). A transmissão horizontal, dada pela fusão de hifas e troca de material citoplasmático, inclusive vírus, é bastante variável, depende da compatibilidade vegetativa entre as hifas, geneticamente controlada, e se apresenta com taxas diferentes em condições de laboratório e de campo. Os genes de incompatibilidade vegetativa presentes em muitas espécies de fungos constituem a principal barreira ao sucesso do controle biológico por micovírus.

Embora a transmissão de micovírus entre espécies de fungos diferentes seja relativamente rara, ela possibilita a introdução do vírus em um novo hospedeiro. A semelhança genética entre os micovírus que ocorrem em diferentes espécies de fungos evidencia que a transmissão pode ocorrer entre espécies distantes, na natureza (MILGROOM; HILLMAN, 2011). Há relatos da ocorrência do dsRNA M2, em diferentes grupos de anastomose, somaticamente incompatíveis, de *R. solani* (CHARLTON *et al.*, 2008). Também há relatos de um mesmo micovírus, o *OM3a*, infectando fungos de gêneros diferentes, *Ophiostoma novo-ulmi* e *Sclerotinia homeocarpa*, causando efeitos opostos sobre a virulência destes dois hospedeiros (MILGROOM; HILLMAN, 2011).

Em laboratório, a transmissão pode ser feita pela anastomose de hifas ou por técnicas moleculares como fusão de protoplastos, transformação e transfecção. A técnica da genética reversa está bem estabelecida para alguns micovírus de *Cryphonectria parasitica* (NUSS, 2005). Nesta espécie de fungo, que causa a murcha das castanheiras, encontra-se o sistema fungo-micovírus mais bem estudado, no qual o biocontrole é efetivo há vários anos (NUSS, 2005), uma vez que a transmissão é bem sucedida. Esta doença ocorre nas castanheiras da Europa e dos EUA, *Castanea sativa* e *C. dentata*, respectivamente, tendo sido introduzida por mudas infectadas, vindas da Ásia, no fim do século XIX. Nos EUA, após trinta anos de sua introdução, a doença atingiu todas as regiões, dizimando as castanheiras. A dispersão do fungo ocorre pelos esporos, que são levados por pequenos animais e insetos, ou por ascósporos após a chuva, entrando por ferimentos nos troncos e ramos, atingindo o câmbio vascular e matando a planta. Nos anos 50, foi descoberto, na Itália, que isolados hipovirulentos transmitiam esta característica a isolados virulentos, através de anastomose de hifas. Tal descoberta foi usada como terapia em árvores europeias doentes, promovendo a cicatrização dos cancrios e recuperando-as em 5 anos. Nos anos 70, a técnica foi levada aos

EUA, porém com menor sucesso, e aí foi descoberta a presença de dsRNAs micovirais nos isolados hipovirulentos (ANAGNOSTAKIS, 1987). Atualmente, há sete micovírus descritos em *C. parasitica*, pertencentes às famílias *Reoviridae*, *Narnaviridae* e *Hypoviridae*, sendo conhecido o completo sequenciamento de cinco *Hypovirus* que infectam o fungo (MILGROOM; HILLMAN, 2011). O *Hypovirus* mais estudado em *C. parasitica* é o CHV-1 EP713, do qual foi possível a construção de um clone completo do DNA complementar, cujos transcritos induziram hipovirulência quando usados para iniciar a infecção. Há evidências de que a infecção pelo *Hypovirus* provoque o decréscimo de três tipos de moléculas envolvidas na transdução de sinal: laccase, cryparin e feromonios, alterando características fenotípicas do hospedeiro, como morfologia e pigmentação da colônia, crescimento micelial, erupção de pústulas estromais e formação de conídios, e assim diminua a virulência do fungo hospedeiro (TURINA; ROSTAGNO, 2007). No entanto, ainda não se sabe se os efeitos sobre a transdução de sinal são causas primárias ou secundárias da infecção viral pois não há evidências de uma interação direta entre as proteínas codificadas pelo vírus e qualquer elemento da transdução de sinal (TURINA; ROSTAGNO, 2007).

Outro controle biológico de sucesso está presente em algumas espécies de *Sclerotinia* infectada pelo mitovirus OM3a. Suspensões de micélio de *S. minor*, infectado pelo mitovirus, espalhadas sobre a alface em condições de campo e de casa de vegetação, reduzem as lesões em 50% e a produção de escleródios em 90%, porém é necessária a compatibilidade vegetativa entre o isolado que infecta a alface e o que está sendo aplicado como controle. Da mesma forma, utilizando-se suspensão de micélio de *S. homeocarpa* infectada pelo mitovirus OM3a sobre gramados, o controle da doença “dollar spot” é de 58%, semelhante ao do fungicida clorotalonil (MILGROOM; HILLMAN, 2011).

Em *R. solani*, o primeiro estudo associando dsRNAs a doença degenerativa foi feito por Castanho *et al.* (1978) que relataram que os dsRNAs ocorriam em isolados do fungo com sintomas de doença (redução na pigmentação do micélio, na taxa de crescimento e na produção de escleródios), mas não estavam presentes em isolados sadios. Este estudo também comprovou que os isolados obtidos por anastomose de hifas entre isolados sadios e doentes manifestavam sintomas da doença e presença de dsRNA (CASTANHO *et al.*, 1978). Finkler *et al.* (1985) obtiveram resultados diferentes, pois isolados hipovirulentos obtidos das pontas de hifas dos isolados virulentos não apresentavam dsRNAs, os repiques daqueles isolados hipovirulentos também não apresentavam dsRNAs, já os isolados virulentos obtidos da anastomose de hifas entre isolados virulentos e hipovirulentos apresentavam dsRNAs.

Zanziger *et al.*, (1984) encontraram uma alta frequência de dsRNA em isolados de *R. solani* pertencentes a vários AGs, independente de sua virulência. Propuseram que estes dsRNAs seriam de etiologia viral e que sua informação genética, e não sua mera presença, poderia influenciar a virulência do hospedeiro. Bandy e Tavantzis (1988), em estudos de

caracterização físico-química do micovírus do isolado 717 de *R. solani* mostraram que ambos dsRNAs extraídos do micélio e extraído das partículas virais purificadas do mesmo isolado não eram diferentes entre si e, mais tarde, Strauss *et al.* (2000), caracterizaram o genoma deste micovírus como sendo do gênero *Partitivirus*, o *Rhizoctonia solani vírus 717*. Hoje, denominado *RsV717*, encontra-se no gênero *Betapartitivirus*, da família *Partitiviridae*.

Nos anos 90, vários estudos foram feitos com isolados virulentos e hipovirulentos de *R. solani* AG-3, patógeno de batata. Lakshman e Tavantziz (1994) perceberam que isolados obtidos de setores (A1, A2 e A3) de um isolado virulento (AP), mostravam-se hipovirulentos e tinham outras características fenotípicas diferentes de seu parental. Na pesquisa dos dsRNAs encontraram 5 dsRNAs de tamanhos diferentes, os quais denominaram L1 (25Kb), L2 (23Kb), M1 (6,4Kb), M2 (3,6Kb) e S1 (1,2Kb) distribuídos entre os isolados, de forma que AP tinha L2 e M1, A1 tinha L1, L2, S1, M1 e M2; A2 tinha S1 e M2 e A3 tinha L1 e S1. Jian *et al.* (1997), continuando o trabalho verificaram que M1 estava associado a virulência e vigor, e M2 estava associado a hipovirulência. Estes pesquisadores relataram também que a aquisição de M1 através de anastomose de hifas tornava-os mais virulentos, enquanto que sua perda, por repique de pontas de hifas, tornava-os muito menos virulentos, e, finalmente, que isolados que continham M1 e M2 apresentavam hipovirulência proporcional à quantidade de M2 que possuíam (JIAN *et al.*, 1997). Este foi o primeiro trabalho que mostrou a presença de “dsRNAs” com efeitos opostos sobre a virulência, num mesmo isolado de *R. solani* (DAS *et al.*, 2013).

Jian *et al.* (1998) fizeram a caracterização molecular de M1, encontrando alguma similaridade com o gênero *Bromovirus* de plantas e com enzimas da cadeia transportadora de elétrons, esta última podendo justificar o aumento de vigor e virulência do patógeno. Lakshman *et al.* (1998), fizeram a caracterização molecular de M2, encontrando similaridade com *Chryphonectria mitovirus 1 (CMV1)* de *C. parasitica* e com repressores da rota bioquímica do ácido quínico. Posteriormente, Tavantzis *et al.* (2002) relataram que o dsRNA M2 codificava um polipeptídeo, denominado polipeptídeo A (pA ou p83), que funcionava como um repressor defeituoso da rota do ácido quínico, induzindo sua expressão contínua. Quando isto ocorria, a expressão da rota do ácido chiquímico era inibida, pois as duas rotas compartilham intermediários metabólitos. Sabendo que a rota do ácido chiquímico culmina na produção de aminoácidos aromáticos, os quais por sua vez participam da produção de ácido fenil acético (PAA), que é responsável por alguns dos sintomas de rizoctoniose, estes pesquisadores elucidaram a maneira como o dsRNA M2 induzia hipovirulência nos isolados de *R. solani* que os continham (TAVANTZIZ, *et al.* 2002). O dsRNA M2, relacionado à hipovirulência de *R. solani*, passou a ser pesquisado em isolados do gênero *Rhizoctonia*, e foi relatado por Charlton *et al.* (2008) em AG-1, AG-4, AG-6 de *R. solani* e AG-A, AG-F, AG-R E AG-U de outras espécies binucleadas de *Rhizoctonia*.

Das *et al.* (2013), em um trabalho com 43 isolados de *R. solani* AG-3 PT e AG-2-1, patógenos de batata na Nova Zelândia, constataram a presença de dsRNAs com tamanhos variáveis em todos os isolados, sendo que um grande dsRNA de 11,5 a 18 kb era comum a todos, independentemente de seus AGs, de seus graus de virulência ou de seus locais de origem. Estes autores encontraram perda de segmentos em alguns isolados e ganho de outros, quando compararam com o padrão dos parentais, o que já havia sido relatado por Tavantzis *et al.* (2002), ao observarem que isolados somaticamente compatíveis tinham o mesmo padrão de dsRNAs, enquanto que isolados incompatíveis tinham padrões diferentes, embora compartilhassem dsRNAs sem que estes fossem geneticamente iguais, e que isolados compatíveis, mas de regiões diferentes, apresentavam o mesmo padrão, variando no número de segmentos. Das *et al.* (2013) ponderaram que a diversidade dos dsRNAs encontrados em um único isolado poderia ser devido a diferentes vírus, a partes de vírus segmentados, e a eventos de deleção interna de um único grande dsRNA. Das, *et al.*, 2014, após a clonagem e sequenciamento de parte do genoma de alguns isolados, concluíram que os dsRNAs pertenciam aos gêneros *Endornavírus*, *Mitovírus* e *Partitivírus*, por fim sugerindo que o completo sequenciamento dos micovírus, bem como sua remoção individual, para estudos comparativos, contribuiria muito para o entendimento da influência que os micovírus exercem sobre este hospedeiro fitopatológico. Recentemente foram feitos outros relatos de novos vírus em espécies de *Rhizoctonia*: um *Alphapartitivírus* mediando hipovirulência em *R. solani* AG-1 IA, patógeno de arroz (ZHENG *et al.*, 2014) e um *Endornavírus* em *R. cerealis*, patógeno de trigo (LI, *et al.*, 2014).

Xie e Jiang, 2014, apontam novas direções para a pesquisa com micovírus, como as técnicas de transfecção que podem expandir a gama de hospedeiros de muitas micovirose; estudos com micovirose que provavelmente são capazes de suprimir o sistema de morte celular programado de fungos hospedeiros; a busca de moléculas que podem atenuar as reações de incompatibilidade vegetativa dos hospedeiros: a busca de micovirose altamente infectivas e por fim, a busca de um micovírus doador universal.

A pesquisa de micovírus nos isolados de *R. solani* AG-2-2 LP, patógeno de grama Esmeralda, pode contribuir para ampliar os conhecimentos em curso, uma vez que ainda não foram identificados micovírus nesta espécie de fungo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 *Rhizoctonia solani*

##### 3.1.1 Obtenção e preservação dos isolados de *Rhizoctonia solani*:

As etapas de isolamento, preservação e caracterização dos isolados de *Rhizoctonia solani* deste estudo foram feitos no Centro Experimental Central do Instituto Biológico, no Laboratório de Fitopatologia, em Campinas, SP.

As amostras foram coletadas em diversos locais cultivados com *Zoyzia japonica* (grama Esmeralda) e *Cynodon dactylon* (grama Bermudas), sendo retiradas de reboleiras com sintomas característicos de ataque de *R. solani* (Fig.1). Nos locais atingidos, principalmente onde ela se apresentava com coloração alaranjada, a grama se destacava facilmente, com um breve puxar de suas folhas.



**Figura 1.** Sintoma de *Rhizoctonia solani* em *Zoyzia japonica*

As coletas foram realizadas nos meses de junho a setembro de 2013 e maio a agosto de 2014, em jardins residenciais e campos de golfe, no período mais frio do ano, quando a doença se torna mais evidente nos gramados. No total foram 25 coletas, sendo 19 em grama Esmeralda de jardins residenciais, três em grama Esmeralda de campos de golfe, dois de grama Bermudas de campos de golfe, e uma em tapete de grama Esmeralda utilizado para implantação de gramados. A procedência e data de coleta das amostras estão relacionadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Local e data de coleta das amostras de grama Esmeralda e grama Bermuda, utilizadas para isolamento de *Rhizoctonia solani*

<b>Amostras</b>	<b>Local e município de coleta</b>	<b>Data da coleta</b>	<b>Espécie da grama</b>
AM 01	Jardim residencial - Carapicuíba SP	30.08.2013	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 02	Jardim residencial - Cotia SP	30.08.2013	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 03	Jardim residencial - Cotia SP	30.08.2013	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 04	Jardim residencial - São Paulo SP	22.08.2013	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 05	Jardim residencial - São Paulo SP	15.08.2013	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 06	Jardim residencial - São Paulo SP	05.08.2013	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 07	Jardim residencial - Cotia SP	15.06.2014	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 08	Jardim residencial - Cotia SP	12.08.2013	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 09	Jardim residencial - Cotia SP	15.08.2013	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 10	Jardim residencial - Cotia SP	05.09.2013	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 11	Jardim residencial - Ilhabela SP	14.06.2014	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 12	Jardim residencial - Cotia SP	05.09.2013	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 13	Jardim residencial - Cotia SP	05.09.2013	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 14	Jardim residencial - Cotia SP	10.09.2013	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 15	Jardim residencial - Cotia SP	12.05.2014	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 16	Jardim residencial - Cotia SP	12.05.2014	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 17	Campo de golfe - Bragança SP	24.06.2014	<i>Cynodon dactylon</i> (Bermudas)
AM 18	Campo de golfe - Bragança SP	24.06.2014	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 19	Jardim residencial - Cotia SP	30.06.2014	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 20	Jardim residencial - Cotia SP	30.06.2014	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 21	Tapete de instalação - Itapetininga SP	07.07.2014	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
AM 22	Jardim residencial - Ilhabela SP	30.08.2014	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
TEE15	Campo de golfe - São Paulo SP	29.07.2014	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
TEE16	Campo de golfe - São Paulo SP	29.07.2014	<i>Zoyzia japonica</i> (Esmeralda)
FW 13	Campo de golfe - São Paulo SP	29.07.2014	<i>Cynodon dactylon</i> (Bermudas)

As amostras foram constituídas pela retirada de discos de 10 cm de diâmetro por 8 cm de profundidade, empregando-se uma ferramenta para abrir buracos em campos de golfe (Fig. 2). Os discos foram retirados das margens de manchas características da doença, uma vez que o fungo é mais ativo nestes locais (AOYAGI *et al.*, 1998), na região entre tecido sadio e tecido doente, coletando-se um disco por mancha. Juntamente com a retirada dos discos, coletou-se cerca de 1kg de terra para ser usada em iscas de captura do fungo.



**Figura 2.** Coleta realizada no perímetro da mancha, com vasador de buracos de campos de golfe

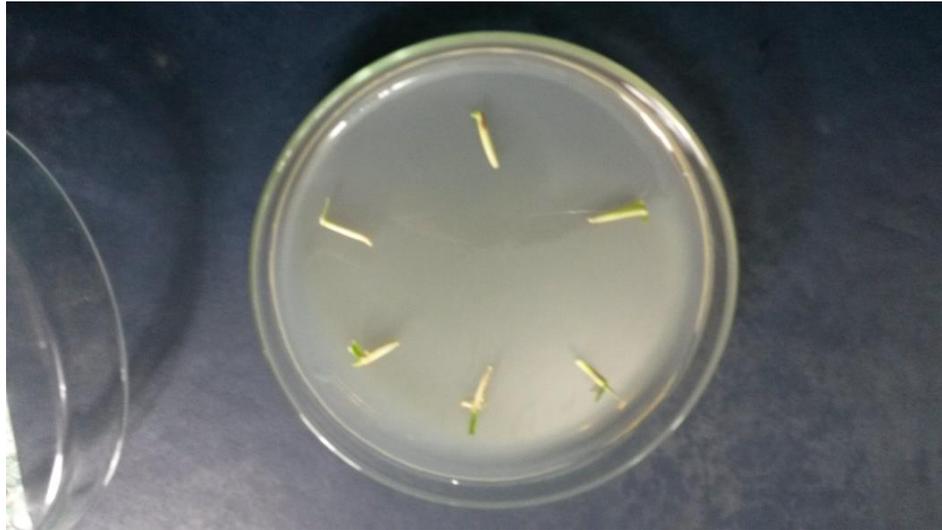
Os discos foram acondicionados em papel alumínio, sem ocluí-los, e levados ao laboratório, onde foram plantadas em vasos com substrato comercial, para preservação do patógeno no hospedeiro.

#### **3.1.1.1 Obtenção de isolados de *Rhizoctonia solani***

Para a obtenção dos isolados de *R. solani* foram testados os métodos de isolamento direto (OBASA, 2012) e iscas com hastes de feijão (PAPAVIZAS; DAVEY, 1959, 1962) ou sementes de rabanete (ALFENAS; MAFIA, 2007).

O isolamento direto do fungo foi feito pela retirada de bainhas das folhas dos discos coletados, que foram facilmente destacadas da planta, contendo lesões ou não. Ao microscópio estereoscópico procurou-se observar hifas castanhas, e ao microscópio óptico, hifas características do gênero *Rhizoctonia*.

Cerca de 1 cm das bainhas das folhas foram retirados e desinfestadas lavando-se abundantemente em água corrente, deixando-se trinta segundos em álcool 70%, um minuto em hipoclorito de sódio, lavando-se brevemente em água destilada e secando-se em papel filtro esterilizado. Seis pedaços de bainha de cada disco de grama foram colocados em placas de Petri de 9cm contendo 20 ml de meio  $\frac{1}{4}$  BDA, e vedados com filme plástico (Fig. 3), com três repetições por disco, conforme descrito por Obasa (2012) e Aoyagi et al. (1998).



**Figura 3.** Bainhas de grama Esmeralda preparadas para isolamento de *Rhizoctonia solani*

As placas foram mantidas a 25°C, no escuro, e observadas em microscópio estereoscópico 24 a 48h após a incubação. Quando o micélio característico de *R. solani* foi observado, este foi repicado, em câmara de fluxo laminar, sob microscópio estereoscópico, para outra placa contendo o mesmo meio, seguindo metodologia adaptada de Obasa (2012). Foram realizadas várias repicagens até a obtenção de colônias puras, constituindo os isolados, que foram preservados.

Foi realizado também o isolamento direto do fungo a partir de folhas, de porções do colchão da grama e de raízes, seguindo-se a metodologia acima descrita.

Para o método de iscas, utilizou-se a terra coletada juntamente com as amostras. Hastes de feijão não muito lenhosas foram lavadas em água corrente e cortadas em segmentos de aproximadamente 1cm. Vinte segmentos foram colocados em placas de Petri de 15cm contendo a terra umedecida com água destilada esterilizada até 80% da capacidade de campo, observando-se que ficassem levemente enterradas sobre a superfície da terra (Fig. 4).



**Figura 4.** Isca de haste de feijão para captura de *Rhizoctonia solani* presente no solo

Em uma das placas foi colocada terra esterilizada, que foi infestada espalhando-se alguns grãos de trigo infectados com o isolado AM07, proveniente de Cotia. Esta placa serviu de controle positivo para verificar se as iscas capturavam o fungo.

Após incubação por três dias a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, as hastes foram lavadas em água corrente e desinfestadas por imersão em hipoclorito de sódio por trinta segundos, secas em papel filtro e então colocados em placas com meio ¼ BDA, em câmara de fluxo laminar. As placas foram incubadas por um a dois dias a 25°C e observadas em microscópio estereoscópio para ver o crescimento do fungo (PAPAVIZAS; DAVEY, 1962). Das placas cujo resultado foi positivo, foi feita a repicagem para meio ¼ BDA em câmara de fluxo laminar, para obtenção dos isolados. Foi feita também, uma desinfestação modificada, deixando-se os pedaços de haste de feijão por 16h em água estéril com penta biótico a 5°C antes do plaqueamento (PAPAVIZAS; DAVEY, 1959). Outro procedimento de isca foi feito com sementes de rabanete, que foram lavadas em água corrente para a retirada dos produtos usados em tratamento de sementes. Após serem secas ao ar livre, foram colocadas em placas contendo a terra coletada com as amostras umedecida com água estéril. O mesmo procedimento realizado para captura com hastes de feijão, acima descrito, foi executado com plântulas recém-emergidas de rabanete.

Foram incluídos o isolado AM07S proveniente de um setor do isolado AM07, que sempre apresentava esta conformação, pois setores podem estar relacionados a ocorrência ou ausência de vírus, uma vez que já foram relatados diferentes tipos de dsRNAs entre isolados e seus setores (TAVANTZIS *et al.*, 2002) e um isolado de *R. solani* AG-2-2 IV pertencente à coleção de fungos fitopatogênicos do Instituto Biológico "Micoteca Mario Barreto" (nome do isolado na coleção - MMBF 42/11), proveniente de Ibaraki/Japão, coletado

por Dr. Ogoshi, em 1960 (nome do isolado no Japão - RH21), que foi escolhido por este grupo de anastomose também possuir patógeno de gramados. Ambos foram cultivados nas mesmas condições, para efeito de comparação.

### **3.1.1.2 Preservação dos isolados de *Rhizoctonia solani***

Os isolados obtidos foram preservados em sementes de trigo (ALFENAS, 2007; OBASA, 2012) e em tiras de papel-filtro (ALFENAS, 2007).

Para a preservação em grãos de trigo, cerca de 200 ml de sementes de trigo foram colocadas em sacos de polipropileno e hidratadas com 140 ml água por duas horas. Os sacos foram então autoclavados por 1 h em dois dias consecutivos. Aos grãos de trigo autoclavados, foram misturados vinte discos de 1cm do micélio de cada isolado, retirados das bordas de colônias dos isolados já crescidas por três dias em meio ¼ BDA. Os recipientes contendo os grãos foram mantidos por sete dias em BODs a 25°C e fotoperíodo 12 h para que o patógeno crescesse sobre o trigo. Uma parte do trigo assim obtido foi colocada em placas de Petri de 9cm, e estas foram levadas para dessecador com sílica, onde permaneceram por aproximadamente 15 dias, para secagem. Após este período, alguns grãos do trigo seco foram colocados em placas de Petri com meio ¼ BDA para recuperação da colônia e confirmação de que não houve contaminação no processo de secagem. Com o resultado confirmado, o trigo seco foi colocado em frascos de vidro (20ml) previamente esterilizados, identificados e fechados. Os frascos foram armazenados em freezer a -18°C no Laboratório de Fitopatologia, no Centro Experimental Central do Instituto Biológico, em Campinas, SP. Os isolados foram incluídos na coleção de fungos fitopatogênicos do laboratório. A outra parte do trigo infestado que restou nos sacos de polipropileno foi usada nos testes de crescimento micelial e patogenicidade.

O armazenamento do fungo em papel foi feito em tiras de papel filtro (30 x 5 mm), previamente esterilizadas em estufa. Nas placas contendo meio ¼ BDA foram colocadas as tiras e, sobre e entre estas, foram depositados discos de micélio de cada um dos isolado, coletados das bordas de colônias com três dias de idade. As placas permaneceram em BODs a 25°C e fotoperíodo de 12 h por dez dias, até o crescimento robusto do patógeno sobre as tiras de papel filtro. As tiras foram retiradas e deixadas em placas de Petri esterilizadas, a 28°C, até secarem, sendo transferidas para tubos criogênicos de 2 ml, previamente esterilizados, que foram então armazenados a -80°C no Ultrafreezer do Laboratório de Bacteriologia Vegetal no Centro Experimental Central do Instituto Biológico, em Campinas, SP.

### 3.1.2 Caracterização dos isolados de *Rhizoctonia solani*

A caracterização dos isolados foi feita observando-se a presença de zonação, formação de escleródios, cor da colônia, número de núcleos por célula, crescimento micelial em diferentes temperaturas e patogenicidade.

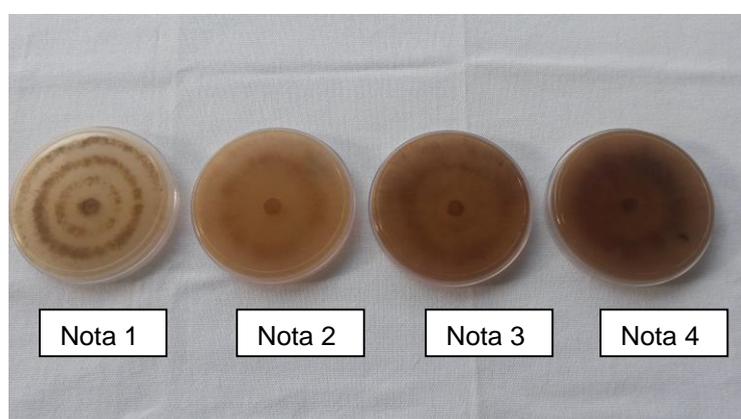
Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa SASM (CANTERI *et al.*, 2001).

#### 3.1.2.1 Formação de escleródios e zonação

Foram feitas observações visuais dos isolados cultivados por 14 dias a 25°C com fotoperíodo de 12 horas em meio ¼ BDA, para constatação da presença ou ausência de zonação (círculos concêntricos de crescimento do micélio) e de escleródios (OBASA,2012).

#### 3.1.2.2 Cor do micélio

Foram feitas observações visuais dos isolados cultivados por 14 dias a 25°C com fotoperíodo de 12 h em meio ¼ BDA, para avaliação da cor da colônia. Foram atribuídas notas de um a quatro para as tonalidades de coloração encontradas, sendo nota 1 - muito clara, nota 2 - clara, nota 3 - média, e nota 4 - escura (Fig. 5). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição representada por uma placa. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste Scot-Knott a 5% de probabilidade.



**Figura 5:** Notas atribuídas a cor do micélio dos isolados de *Rhizoctonia solani*

### 3.1.2.3 Condição nuclear:

A avaliação da quantidade de núcleos por célula foi feita pela técnica de coloração por safranina O, segundo Alfenas (2007), com modificações. Foram retirados discos de 0,5 cm de micélio da margem de colônias incubadas por três dias a 25°C, em fotoperíodo de 12 h, foram colocados sobre lâminas de microscópio previamente esterilizadas e recobertas com fina camada de meio ágar-água, e foram incubados por 24 horas a 25°C. Após este período, o disco de micélio foi retirado e uma gota de solução de safranina foi colocada sobre o crescimento de hifas. Após a sobreposição da lamínula, sob microscópio de luz Modelo Axioskop 2 Plus Zeiss (X400), as pontas de dez hifas aleatórias foram observadas, quantificando-se os núcleos e classificando as células em binucleadas ou multinucleadas.

### 3.1.2.4 Crescimento micelial dos isolados em diferentes temperaturas

Trigo infestado com os isolados coletados de gramados foi usado para iniciar as colônias utilizadas para avaliação de taxa de crescimento micelial, segundo Obasa (2012). Colocou-se um grão de trigo infestado com cada um dos isolados em placa de Petri contendo meio ¼ BDA. As placas foram fechadas e mantidas a 25°C em fotoperíodo de 12 h por três dias. Após este período retiraram-se, com vazador, discos de 1cm de micélio da borda da colônia para montagem das placas do experimento de taxa de crescimento micelial.

Utilizando-se placas de Petri com 9cm de diâmetro contendo 10 ml de meio ¼ BDA, um disco de cada isolado foi colocado no centro de uma placa, fechada, e encubadas em BODs com fotoperíodo de 12 h em seis diferentes temperaturas: 10°, 15°, 20°, 25°, 30° e 35°C.

O experimento foi feito com quatro repetições por isolado em cada uma das seis temperaturas. Foram feitas duas medições perpendiculares dos diâmetros das colônias a cada 24 h até que pelo menos o crescimento de um dos isolado alcançasse a borda da placa, quando o experimento foi finalizado.

Para tabulação dos dados usou-se a média dos diâmetros por placa. Foram elaborados gráficos de crescimento micelial (mm/dia) de cada isolado em cada uma das temperaturas.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Scot-Knott a 5% de probabilidade.

Foi feita réplica do experimento.

### **3.1.2.5 Patogenicidade dos isolados de *R. solani***

A patogenicidade dos isolados obtidos foi avaliada por meio de dois experimentos, com segmentos de bainha da grama em placas de Petri e com vasos contendo grama Esmeralda.

Foi feita réplica do experimento em vasos com grama Esmeralda.

#### **3.1.2.5.1 Patogenicidade dos isolados em segmentos de bainhas de grama Esmeralda**

Foram preparadas placas de Petri de 9cm de diâmetro contendo meio ágar-água, nas quais foram colocados dez pedaços (1cm) de bainhas retiradas de folhas de grama Esmeralda sadia. Os pedaços de bainha foram desinfestados, conforme já descrito no item 3.1.1.1 e secos em papel filtro esterilizado antes de serem colocados nas placas. No centro de cada placa foram colocados dois grãos de trigo infestado com cada um dos isolados. No tratamento controle negativo não foi colocado o patógeno.

As placas foram mantidas em BOD por dez dias a 25°C em fotoperíodo de 12 h, sendo observadas diariamente. Foram feitas duas avaliações, com intervalo de seis dias, nas quais foi avaliado o número de bainhas que tinham sua cor alterada para o castanho claro, apresentavam lesões ou estavam apodrecidas.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição representada por uma placa. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

#### **3.1.2.5.2 Patogenicidade dos isolados em vasos de grama Esmeralda**

Este experimento foi realizado em vasos de 13 cm de diâmetro por 10 cm de altura, preenchidos com substrato comercial para plantio de grama, e plantados com grama Esmeralda sadia utilizando metodologia adaptada de Hyakumachui *et al.* (1998). A grama sadia foi obtida em gramado residencial sem sintoma de *R. solani*, ou de outras doenças que incidem em gramados ou de tapetes de produção de grama.

A grama de cada vaso foi infestada com 15 grãos de trigo colonizados com cada um dos isolados testados, dispostos em cinco pontos equidistantes nas bordas e centro dos vasos, com exceção dos vasos de controle negativo, que não receberam o patógeno.

Os vasos foram umedecidos até a capacidade de campo e colocados dentro de bandejas com cerca de 2 cm de água. Cada bandeja foi colocada em um saco plástico transparente, que foi fechado para a manutenção da umidade. Os vasos foram mantidos por

18 dias em BODs a 18°C, com fotoperíodo de 12 h, para a manifestação dos sintomas (Fig. 6).



**Figura 6.** Vasos do experimento de patogenicidade dos isolados de *Rhizoctonia solani* em amostras de grama Esmeralda

Após este período, os vasos foram fotografados e a extensão das lesões foi avaliada por meio de análise digital das imagens. Os vasos foram fotografados individualmente com uma câmara digital Canon Power Shot SX40HS a uma distância de 1 m acima da superfície do vaso, para avaliar a área verde afetada pela doença e a uma distância de 50 cm do perfil do vaso, para avaliar redução no crescimento em altura da grama (Fig. 7). Os vasos também foram fotografados nas mesmas condições antes de o experimento ser montado.

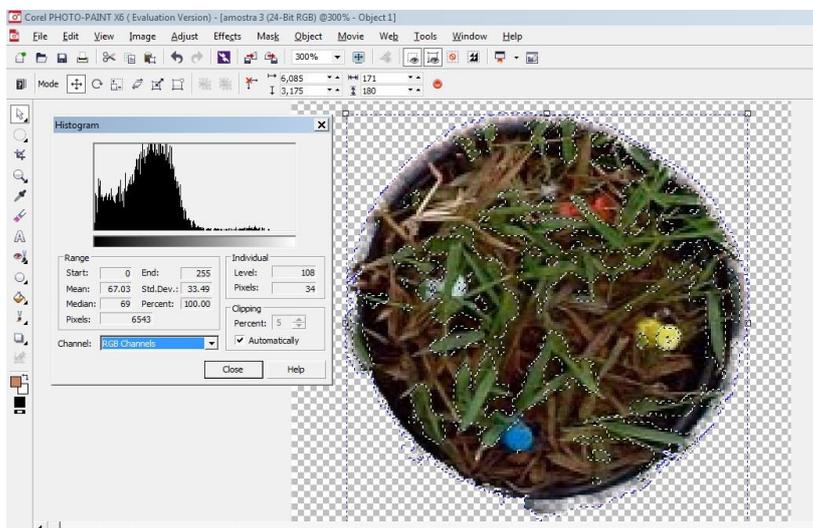


**Figura 7.** Imagem da área e perfil do vaso no experimento de patogenicidade de *Rhizoctonia solani* em grama Esmeralda (isolado AM18)

Para calcular a área lesionada, as imagens obtidas foram analisadas com o programa Corel Photo Paint X7 (Corel Corporation, 2014). Este programa transforma a imagem em pixels e seleciona-os por cores (Fig. 13). A seleção de cores é transformada em porcentagem. A porcentagem de cor verde infere a porcentagem de tecido sadio, conforme metodologias semelhantes utilizadas por Obasa (2012) e Godoy (2005).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição representada por um vaso. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste Tuckey a 5% de probabilidade.

Foi feita réplica do experimento.



**Figura 8.** Interface do programa Corel Photo X7 mostrando a seleção de pixels verdes na fotografia da área do vaso no teste de patogenicidade em isolados de *Rhizoctonia solani* de grama Esmeralda

### 3.1.3 Identificação molecular de *Rhizoctonia solani*

A identificação molecular dos isolados foi feita no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, no Centro de P&D de Sanidade Vegetal do Instituto Biológico, São Paulo.

#### 3.1.3.1 Extração de DNA total

O DNA foi extraído de acordo com o método de Dellaporta *et al.* (1983), modificado. Para cada amostra, uma pequena porção do micélio proveniente das colônias dos 13 isolados, cultivadas em meio ¼ BDA por quinze dias a 25°C em fotoperíodo de 12 h, foi depositada em tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml. No tubo, adicionaram-se 100µl de tampão de extração CTAB para homogeneização do micélio com micro-pistilo. Acrescentaram-se mais 500µl de tampão de extração CTAB, encubou-se sob agitação por 30 min a 65°C e adicionaram-se 600 µl de clorofórmio: álcool-isoamílico (24:1). Agitou-se em vórtex por alguns segundos e centrifugou-se a 12000 rpm por 10 min. Foram transferidos 500 µl da fase aquosa para novo microtubo, acrescentaram-se 300 µl de isopropanol, agitou-se por inversão e centrifugou-se a 12000 rpm por 10min. O sobrenadante de cada tubo foi descartado com cuidado para não perder o pélete de DNA, lavou-se o pélete com 500 µl de etanol 70%, misturou-se por inversão e centrifugou-se a 12000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pélete foi seco à temperatura ambiente, seguido por centrifugação à vácuo por 5 a 10min. Os péletes dos tubos foram ressuspensos em 50µl de água destilada deionizada estéril, agitando-se para misturar o DNA à água e os tubos foram armazenados a -20°C. Realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 0,8% para verificação da presença de DNA.

#### 3.1.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

##### 3.1.3.2.1 Utilização de iniciadores específicos para detecção de *R. solani* AG-2-2 LP

Os isolados foram submetidos a uma PCR com uso de iniciadores específicos para AG-2-2 LP, desenvolvidos por Toda *et al.*, 2004 e sintetizados pela Invitrogen.

A091 senso                    5' TCGTATCAGTCGGCACTGTA 3'

A091 anti-senso            5' GATGGTGAGAATGGATGCCT 3'

Para 50 µl de reação, foram utilizados 3 µl do DNA de cada isolado, 25 µl de Go Taq Hot Star Green Master Mix (Promega), 21 µl de água, 50 pmol de cada iniciador. As condições de amplificação foram 3 min a 94°C, 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min na temperatura de anelamento, 2 min a 72°C com extensão final de 7 min a 72°C.

Para avaliar a melhor temperatura de anelamento, foi feito um gradiente de temperatura entre 63° e 69°C com os isolados AM07 e TEE16 já identificados como AG-2-2 LP.

### 3.1.3.2 Amplificação da região ITS

Para a identificação dos isolados de *R. solani* foi feita amplificação da região universal “Internal Transcribed Spacer” (ITS) do DNA extraído de cada isolado, utilizando-se os iniciadores ITS1 e ITS4, segundo White *et al.*(1990):

ITS1 5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3'

ITS4 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'

Como o sequenciamento é feito num volume de solução de 50 µl por amostra, a PCR foi feita para este volume. Para cada isolado foi feita uma solução contendo 35,8 µl de água Milli-Q, 10 µl de tampão da enzima, 1 µl de iniciador senso, 1 µl de iniciador anti-senso, 1 µl de dNTPs, 0,2 µl da enzima Taq DNA polimerase, totalizando um volume de 49 µl por amostra, agitando-se em vórtex e transferindo-se para eppendorfs, onde foi acrescentado 1 µl do DNA extraído dos isolados, agitando-se novamente em vórtex. Os eppendorfs foram levados ao termociclador PTC100, que foi ajustado para as condições de amplificação da região ITS. As condições de amplificação foram um ciclo inicial de desnaturação de dois minutos a 94°C, seguidos por 40 ciclos de dez segundos a 94°C, trinta segundos a 54°C e sessenta segundos a 72°C, e um ciclo de extensão final de quatro minutos a 72°C. Terminada a amplificação, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TAE, com brometo de etídeo. Foram aplicados 4µl dos produtos da PCR de cada amostra. A eletroforese ocorreu em 90V durante trinta minutos e o gel foi visualizado em transiluminador.

### 3.1.3.3 Purificação dos produtos da PCR

Os produtos da PCR foram purificados seguindo método descrito por Schmitz e Riesner (2006). Como a região ITS tem entre 400 e 900 pb, foi utilizada uma solução de purificação com 21 µl de polietilenoglicol 6000 50%, 1,6 µl de EDTA 0,5 M, e 8,1 µl de NaCl 5 M, por amostra a ser purificada. Portanto, 30,7 µl desta solução foram transferidos para cada um dos tubos de PCR que continham 50 µl de produtos de PCR. Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 12000 rpm por 10 min, sendo todo o sobrenadante descartado com o uso pipeta. A cada tubo foi então acrescentado 150 µl de etanol 70%, novamente centrifugado a 12000 rpm por 5 min e o conteúdo foi novamente descartado como acima. Os

tubos foram então centrifugados à vácuo por cinco a dez minutos para que os péletes secassem totalmente e estes foram ressuspensos em 30 µl de água Milli-Q.

Os produtos de PCR purificados foram armazenados em freezer a -20°C ou encaminhados para o sequenciamento.

#### **3.1.3.4 Sequenciamento**

O sequenciamento dos fragmentos de DNA foi feito pelo método de terminação de cadeia de Sanger (SANGER; NICKEN; COULSON, 1977) com reagente BigDye 3.1 (Applied Biosystems) em sequenciador capilar 3500XL (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no GenBank para confirmar a identidade da espécie e grupo de anastomose, usando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do National Center for Biotechnology Information (NCBI), disponível na internet. Isolados cujas sequências apresentaram sobreposição de picos no eletroferograma foram clonados.

#### **3.1.3.5 Clonagem**

Os produtos da amplificação dos isolados cujas sequências apresentaram sobreposição de picos no eletroferograma foram clonados. O produto de DNA amplificado e purificado, o inserto, foi inserido no vetor pGEM®-T Easy (PROMEGA), conforme método do fabricante: foram misturados 5 µl de 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase, 1 µl pGEM®-T Easy (50ng), 3 µl produto da PCR, 1 µl T4 DNA Ligase e a reação foi incubada por 24 h a 0°C. Na transformação, o vetor contendo o inserto foi inserido em células competentes de *Escherichia coli* DH10B por meio de choque térmico, as células foram misturadas ao vetor permanecendo por 1 min a 42°C, seguido de 2 min em gelo. Foi adicionado 1 ml de meio de cultura Luria Broth (LB) e as bactérias foram incubadas sob agitação por 1 h a 37 °C. O meio LB contendo as bactérias foi centrifugado a 10.000 g e aproximadamente 850 µl do sobrenadante foi descartado. As bactérias foram suspensas e plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg/ml) e Xgal (4 µl de solução 20 mg/ml) e incubadas a 37°C por 16 hs. Após o crescimento, as colônias recombinantes com o fragmento de DNA inserido no sítio de clonagem exibiram a cor branca, enquanto as colônias não recombinantes ficaram azuis, produzindo β-galactosidase funcional. As colônias brancas foram cultivadas em meio LB na presença de ampicilina. As extrações dos plasmídeos para posterior sequenciamento foram feitas com o uso de um sistema de purificação da Invitrogen, PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit, seguindo método do fabricante. Os produtos purificados foram sequenciados

pelo método de terminação de cadeia, descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977). As reações para sequenciamento foram efetuadas com o kit Big Dye (Applied Biosystems) e processadas no sequenciador capilar 3500XL (Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante. As sequências obtidas foram comparadas entre si e com sequências de *R. solani* presentes na base de dados do NCBI, através do programa BioEdit.

### 3.1.3.6 Uso de iniciadores específicos para identificação de *Rhizoctonia solani* AG-2-2 LP

Foi utilizado o método desenvolvido por Toda *et al.*, 2004. A extração de DNA foi feita com DNAzol, seguindo o fabricante: 50 mg de micélio foram pulverizados em N líquido e misturados a 1ml de reagente DNAzol, transferidos para microtubos, agitados e centrifugados por 10 min a 10000rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde se acrescentou 0,5ml de etanol absoluto. Agitou-se o tubo por inversão e encubou-se em temperatura ambiente por 3 minutos. Centrifugou-se por 2 min a 4000rpm para obtenção do pélete. O pélete foi lavado por duas vezes com 1ml de etanol 75%, deixando-se secar em temperatura ambiente até a remoção do etanol. O DNA foi ressuspendido em 1 ml de solução 8mM de NaOH, e armazenado a -20°C.

Os iniciadores foram sintetizados pela Invitrogen, a partir do trabalho de Toda *et al.*, 2004.

P 091 F      5' - TCGTATCAGTCGGCACTGTA

P 091 R      5' - GATGGTGAGAATGGATGCCT

Para a reação em cadeia de polimerase utilizou-se o kit GoTaq Hot Start Green Master Mix (Promega), seguindo as instruções do fabricante: para um volume de reação de 50 µl, foram utilizados 25 µl de Go Taq Hot Start Green Master Mix, 0,5 µl de iniciador P091F, 0,5 µl de iniciador P091 R, 21 µl de água RNase free, e 3 µl de DNA. As condições de amplificação foram: 94°C por tres minutos; 40 ciclos de 94°C por um minuto, 65°C por um minuto, 72°C por dois minutos; e por fim 72°C por sete minutos.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TAE, contendo brometo de etídeo (1 µl/l). Ao gel foram aplicados 15 µl dos produtos de PCR, e o marcador de peso molecular Righ Ranger 1 Kb (Norgen). As condições de eletroforese foram de 100 V por aproximadamente 1 h. A visualização dos produtos foi feita em fotodocumentador Alphamager TM 1220 sob luz violeta. O tamanho do fragmento esperado, para os iniciadores utilizados, é de 1 kb.

Foi feito também um gradiente de temperatura de anelamento, entre 63 e 69°C com os isolados 07 e TEE16 que já foram sequenciados e identificados com 99,9% de semelhança com AG-2-2 LP.

### 3.2 Detecção de micovírus em *Rhizoctonia solani*

Os procedimentos de detecção de micovírus em *R. solani* foram feitos no Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia, Centro de P&D de Sanidade Vegetal do Instituto Biológico, São Paulo.

A detecção de micovírus nos isolados foi feita por extração de RNA total, purificação de dsRNA por cromatografia em celulose seguida por tratamento com endonuclease S1.

Foi feita purificação de vírus para todos os isolados.

Para a detecção do dsRNA M2 foi feita a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase utilizando-se iniciadores específicos.

Para visualização de partículas virais em todos os isolados, foi utilizada a técnica de contraste negativa no Departamento de Fitopatologia e Nematologia, Laboratório de Microscopia Eletrônica, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, SP.

#### 3.2.1 Extração de RNA total

O material utilizado nas extrações de RNA foi obtido coletando-se, com espátula, o micélio de culturas crescidas em ¼ BDA a 25°C por aproximadamente 15 dias. O micélio foi pesado e armazenado em freezer a -20°C.

As extrações de RNA das amostras de *R. solani* foram realizadas por três diferentes métodos: Trizol (Invitrogen Life Technologies), de acordo com o fabricante, Núcleo Spin RNA (Macherey-Nagel), de acordo com o fabricante, e com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (WYLIE *et al.*, 1993)

Na extração com Trizol foram utilizados 0,2 g de micélio congelado por amostra, triturado com nitrogênio líquido em almofariz esterilizado por auto-clavagem, para obtenção de pó fino. A extração foi feita segundo método do fabricante. O micélio pulverizado recebeu 1 ml de reagente Trizol. Após 5 minutos de encubação, a solução do almofariz foi cuidadosamente transferida para tubos Eppendorf de 1,5 ml aos quais foram adicionados 200 µl de clorofórmio. Os microtubos foram agitados em vórtex, encubados por dois minutos à temperatura ambiente e centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase líquida superior foi transferida para novos tubos, pois nela estava contido o RNA. A esta fase líquida, foram adicionados 500 µl de isopropanol, para precipitação do RNA. Os tubos foram agitados por inversão, encubados por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos, obtendo-se um pélete gelatinoso de RNA. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e ao pélete formado foi acrescentado 1 ml de etanol 70%, para

lavá-lo. Foi então agitado em vórtex e em seguida centrifugado a 7500 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o pélete foi deixado para secar ao ar livre. Depois de seco, o RNA foi ressuscitado em 40 µl água Milli-Q e armazenados a -80°C.

Na extração por coluna Nucleo Spin RNA (Macherey-Nagel) foram utilizados 0,2 g de micélio congelado por amostra, triturado com nitrogênio líquido em almofariz estéril para obtenção de pó fino, homogeneizando o tecido. A extração foi feita segundo método do fabricante: as amostras de tecido pulverizado foram transferidas para tubos Eppendorf de 1,5 ml onde foram acrescentados 350 µl do tampão RNA1 e 3,5 µl de β-mercaptoetanol, para lisar as células do tecido. Os tubos foram agitados em vórtex e o conteúdo transferido para os conjuntos colunas (lilás) mais coletores, sendo então centrifugados a 12000 rpm por um minuto. As colunas foram descartadas e aos filtrados contidos nos coletores foram acrescentados 350 µl de etanol 70%, sendo agitados em vórtex e seus conteúdos transferidos para os novos conjuntos colunas (azuis) com seus coletores. Os conjuntos foram centrifugados a 12000 rpm por trinta segundos, os coletores com os precipitados foram descartados e as colunas foram preservadas. Estas colunas foram colocadas em novos tubos coletores e no centro delas foram adicionados 350 µl de tampão MDB, para remoção de sais, pois estes dificultam a digestão pela rDNAse subsequente. Os conjuntos colunas e coletores foram centrifugados por um minuto a 12000 rpm e os precipitados foram descartados. Em novos microtubos, foram rapidamente preparadas, soluções com 10 µl de rDNAse e 90 µl de tampão RB. Os 95 µL destas soluções foram transferidos para o centro das colunas e encubados por 15 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados às colunas 200 µL de tampão RAW2, que inativa a rDNAse. Os conjuntos colunas e coletores foram centrifugados a 12000 rpm por trinta segundos e os precipitados e coletores foram descartados. As colunas foram colocadas em novos tubos coletores, no centro das quais foram acrescentados 600 µL de tampão RA3 para lavar a membrana. Os conjuntos foram centrifugados a 12000 rpm por trinta segundos, os precipitados foram descartados, mantendo-se os coletores e as colunas. Foram acrescentados 250 µl de tampão RA3 novamente no centro das colunas, sendo os conjuntos centrifugados a 12000 rpm por dois minutos para secar as membranas completamente, descartando-se os coletores. As colunas foram colocadas em microtubos nuclease “free” e no centro delas foram acrescentados 60 µL de água RNAse “free” para eluir o RNA, deixando-se por um minuto em temperatura ambiente. As colunas foram descartadas e os microtubos com os filtrados de RNA foram armazenados a -80°C.

### 3.2.2 Purificação de dsRNA por cromatografia em celulose

A purificação de dsRNA por cromatografia, utilizando celulose CF11(Whatman), foi feita por quatro adaptações do método de Morris e Dodds (1979) que se baseia na afinidade da celulose por ácidos nucleicos e especificamente à sua capacidade de adsorver dsRNAs quando em concentrações adequadas de etanol. Foram utilizadas metodologias de extração de dsRNA em *R.solani*, patógeno de batata (DAS *et al.*,2013) e de feijão e amendoim (KURAMAE *et al.*, 2002), de extração de dsRNA de *Metharizium anisopliae* (SANTOS,2013) e extração de viroides (FLORES *et al.*,1985; GOBATTO, *et al.*, 2013). Os resultados foram comparados para a escolha do procedimento mais adequado para este trabalho.

No procedimento adaptado de Das *et al.* (2013), foram utilizados cerca de 3 g de micélio congelado e triturado com nitrogênio líquido, em almofariz esterilizado até obtenção de pó fino. O material foi transferido para tubos de 30 ml onde foram acrescentados 10 ml de tampão GPS, 1 ml de SDS 10%, 0,1 ml de 2- mercaptoetanol e 10 ml de Tris fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). Os tubos foram encubados por agitação por 45 minutos à temperatura ambiente, e depois foram centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para novos tubos e foi ajustada a 15% de etanol sob agitação, adicionando-se, para cada 10 ml da fase aquosa, 1,76 ml de etanol absoluto, muito lentamente. Acrescentou-se 1 g de celulose CF-11 Whatman em cada tubo, que foram encubados por 5 minutos sob agitação em temperatura ambiente. A pasta de celulose foi transferida para coluna para cromatografia com filtro estéril, onde a fase líquida foi filtrada por gravidade, sob refrigeração. A coluna foi então lavada com 100 ml de STE1X 15% álcool, à temperatura ambiente. Procedeu-se a eluição do dsRNA da coluna pela adição de 6 ml de STE1X sem álcool e, à fase líquida coletada em tubos, foram acrescentados 2,5 volumes de etanol e 0,1 volume de Acetato de Sódio 3 M, para a precipitação, encubando-se a -20°C por 12 horas. Os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos e os péletes foram secos a temperatura ambiente, para depois serem ressuspensos em 100 µl de água Milli-Q e armazenados a -20°C.

No procedimento adaptado de Kuramae *et al.* (2002), em microtubos de 2 ml, 80 µl de RNA total da extração por Trizol, foram ajustadas a 16% de álcool pela adição de 15,25 µl de etanol absoluto. Acrescentaram-se 1000 µl de STE1X a 16% etanol e 0,1 g de celulose CF-11 Whatman. Os tubos foram mantidos sob agitação por dez minutos e depois, centrifugados a 8000 rpm por três minutos. O sobrenadante foi descartado mantendo-se a celulose, à qual foram adicionados, novamente, 1000 µl de STE1X a 16% etanol e centrifugados na mesma condição anterior, repetindo-se esta operação mais duas vezes. Foram então acrescentados à celulose 550 µl de STE1X sem álcool, seguindo-se uma centrifugação a 8000 rpm por oito minutos. Cerca de 400 µl de sobrenadante foram coletados em novo tubo, e a ele foram

adicionados 1000 µl de etanol absoluto e 40 µl de acetato do sódio 3 M, para precipitação. Após encubar por 12 horas a -20°C, centrifugou-se a 13000 rpm por dez minutos, descartou-se o sobrenadante secando-se o pélete ao ar livre por 15 minutos. O pélete foi ressuspenso em 25 µl de água Mille-Q e armazenado a -20°C.

No método adaptado para extração de dsRNA em *Metharizium anisopliae*, foi utilizado cerca de 0,5 g de micélio congelado por amostra, triturado com nitrogênio líquido em almofariz esterilizado até a obtenção de pó fino, sendo transferidos para microtubos de 2ml, onde foram adicionados 700 µl de STE 1X e 80 µl de SDS 10%. Os tubos com a mistura foram aquecidos em banho-maria a 37°C por trinta minutos e então 400 µl de fenol saturado foram adicionados a cada tubo. Os tubos foram submetidos à agitação vigorosa em vortex Mixer BV1000 por um minuto e posteriormente centrifugados a 12000 rpm por sete minutos. Cerca de 400 µl do sobrenadante de cada tubo foi coletado e transferido para novo tubo, onde foram acrescentados 200 µL de clorofórmio e 200 µl de fenol, centrifugando-se então os tubos a 12000 rpm por sete minutos. Foram transferidos 400 µl do sobrenadante de cada tubo para novos tubos, onde foram acrescentados 200 µl de clorofórmio puro. Após centrifugação a 12000 rpm por sete minutos, transferiram-se 400 µl do sobrenadante para novos tubos, onde a solução foi ajustada para 16% de álcool pela adição 76 µl de etanol absoluto. Em seguida foram acrescentados 0,25 g de celulose CF-11 Whatman e 1000 µl de STE1X 16% de etanol aos tubos os quais foram agitados levemente por 10 minutos e centrifugados a 8000 rpm por oito minutos, logo após descartando-se o sobrenadante, mantendo-se a celulose no tubo. Foram acrescentados aos tubos 1000 µl de STE1X 16% de etanol, e estes foram centrifugados a 8000 rpm por três minutos. Esta operação foi repetida duas vezes, quando após o descarte do sobrenadante, foi acrescentado 550 µl de STE1X sem álcool à celulose. Os tubos foram centrifugados a 8000 rpm por oito minutos e 400 µl do sobrenadante foram transferidos para novos tubos, onde foram acrescentados 1000 µl de etanol absoluto e 40 µl de Na-acetato 3 M, para a precipitação dos ácidos nucleicos. Os tubos foram agitados por inversão e após encubação a -20°C por 12 horas, foram centrifugados a 13000 rpm por dez minutos, descartando-se o sobrenadante e secando-se completamente os péletes ao ar livre por cerca de 15 minutos. Os péletes de dsRNA foram ressuspendidos em 25 µl de água Milli-Q e armazenados a -20°C. Todas as centrifugações deste procedimento foram feitas a -4°C.

Na adaptação do procedimento para extração de viroides, foram utilizados aproximadamente 3 g de micélio congelado por amostra, triturado com nitrogênio líquido em almofariz até a obtenção de pó fino. Em seguida, foram adicionados às amostras 5 ml de Tris HCl 0.2 M (pH 8,9), 1,25 ml de SDS 5%, 1,25 ml de EDTA 0,1 M (pH 7,0), 20 ml de fenol e 0,625 mL de 2-mercaptoetanol. As amostras foram submetidas à agitação vigorosa em vortex por um minuto e posteriormente centrifugadas, sob refrigeração, por 15 minutos a 8000 rpm. Para a separação dos sedimentos vegetais da fase aquosa, foram transferidos,

cuidadosamente, 10 ml da fase aquosa para tubos esterilizados, e adicionados 5 ml de fenol equilibrado (pH 8,0). Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 8000 rpm por 15 minutos. Os ácidos nucleicos, presentes na fase aquosa, foram transferidos para tubos Falcon, sendo adicionado um volume de água estéril suficiente para igualar as amostras em volume final de 20 ml. O conteúdo dos tubos foi transferido para becker e, sob agitação, foram adicionados 3,7 ml de STE (10X) e, lentamente, 13,5 ml de etanol 96%. Transferiu-se o conteúdo do becker para tubos Falcon, adicionou-se 1,25 g de celulose não-iônica (CF-11, Whatman) e selou-se com parafilme, submetendo-os à agitação por 3 horas em Fine PCR Rotator-AG, à temperatura ambiente. Após este período, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por cinco minutos, o sobrenadante foi descartado, obtendo-se celulose com RNA adsorvido a ela. A celulose foi então lavada por 3 vezes com 30 ml de solução STE 1X 35% etanol e submetida à centrifugação (Sorval RC2-B) a 3000 rpm por cinco minutos. A cada centrifugação, descartou-se o sobrenadante, e preservou-se a celulose. No final da terceira lavagem, foram acrescentados 3,33 ml de STE1X sem álcool à celulose para eluição do RNA. Desta forma, após a centrifugação a 3000 rpm por cinco minutos, o sobrenadante foi coletado em novos tubos e a celulose novamente lavada com solução STE1X sem álcool. Este processo de lavagem da celulose, conservando-se o sobrenadante, foi repetido 3 vezes. O sobrenadante total coletado foi submetido a centrifugação a 6000 rpm por 5 minutos, descartando-se, finalmente, a celulose. Este sobrenadante foi transferido para tubo córex onde adicionou-se metade do volume de isopropanol, e após agitação por inversão, foi encubado por 12 horas a -20°C e centrifugado a 8000 rpm por trinta minutos, para precipitar os ácidos nucleicos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado para não perder o pélete de RNA e os tubos foram deixados a temperatura ambiente até que o péletes estivessem secos. O RNA foi ressuscitado em 250 µl de água Milli-Q, armazenado em micro tubos RNase free e mantido a -20°C.

### **3.2.3 Tratamento com endonuclease S1**

As alíquotas de RNA obtidos pelos diferentes métodos de extração e purificação foram tratadas com a enzima Endonuclease S1 (Promega) para eliminação de RNA fitas simples e DNA (Kuramae *et al.* 2002), de acordo com o procedimento indicado pelo fabricante.

Utilizaram-se 25 µl de RNA de cada amostra aos quais foram adicionados 5 µl de tampão da enzima, 1 µl de enzima (89u/ µl) e 19 µl de água destilada deionizada estéril, completando-se um volume de 50 µl e encubando-se a 37°C por trinta minutos. Decorrido este tempo, um volume igual de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico 25: 24: 1 foi adicionado à solução, misturando-se e centrifugando-se a 10000 rpm por sete minutos. Cerca de 40 µl de

sobrenadante foram coletados e transferidos para novos tubos onde foram acrescentados 2,5 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, encubando-se a -20°C por 12 horas para a precipitação. Centrifugou-se a 13000 rpm por 15 minutos, descartou-se o sobrenadante e obteve-se um pélete de dsRNA, que foi seco ao ar livre por 15 minutos e ressuspenso em 10µl de água Milli-Q.

#### 3.2.4 Eletroforese

O RNA extraído das amostras de fungo foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE 5% não desnaturante) e gel de agarose (1%), com brometo de etídeo. Foram utilizados um marcador de peso molecular 1 kb High Ranger (Norgen) e uma amostra de produtos amplificados de *Potyvirus* de *Hyppeastrum* como padrão de comparação. Os tampões utilizados foram TBE1X e TAE 1X. A visualização foi feita em foto-documentador Alphamager TM 1220 sob luz violeta.

Os géis de agarose 1% foram feitos em tampão TBE 1X ou TAE1X. Os RNAs das amostras foram misturados a tampão de carga, na proporção de 3:1 em volume, antes de serem aplicados no gel. Os volumes de solução das amostras colocados em cada canaleta variaram de 30 a 40 µl de acordo com o pente utilizado. O volume do marcador de peso molecular sempre foi de 10 µl. Os géis de TBE e de TAE foram submetidos a 80 mA e 100 V por 1 hora e 30 min e 2 horas e 30 min, respectivamente.

O gel de poliacrilamida 5% foi feito com tampão TBE1X. No gel foram aplicados o marcador de peso molecular High Ranger 1 Kb (Norgen) e a solução das amostras com tampão de carga. A eletroforese foi feita em equipamento para eletroforese vertical e o gel foi submetido a 75 mA, 150 V por 1 h e 30 min. Após a corrida, o gel foi submetido a solução de brometo de etídeo e visualizado em foto-documentador Alphamager TM 1220 sob luz violeta. Os géis foram corados com nitrato de prata.

#### 3.2.5 Purificação do vírus

Discos de micélio da borda de colônias crescidas em ¼ BDA por sete dias foram colocados em erlenmeyers contendo 500 ml de meio BD, mantidos sob agitação constante, por vinte dias. O micélio foi coletado e pressionado entre folhas de papel filtro para que secasse bem, obtendo-se 30 g de micélio seco, ao qual foram adicionados 200 ml de tampão de extração, composto por 0,25 M de K-Fosfato pH7, 10 mM EDTA e 0,5% de ácido tioglicólico. Homogeneizou-se com triturador, sob refrigeração, em seguida centrifugou-se

por dez minutos a 3000 rpm. O pélete foi descartado, coletando-se cerca de 250 ml de sobrenadante ao qual foram acrescentados 1% de TRITON, 10% de polietilenoglicol 8000 e 1% de NaCl, agitando-se por 60 min a 4°C. Centrifugou-se por 30 min a 10000 rpm, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pélete em 30 ml do tampão de extração. Ajustou-se a um volume final de 60 ml, que foram colocados sobre colchão de sacarose 20% em tampão de extração, centrifugando-se por duas horas a 30000 rpm. Ressuspendeu-se o pélete em tampão de extração, e novamente centrifugou-se por 1 min a 14000 rpm. Coletou-se o sobrenadante, descartando-se o pélete, assim obtendo o vírus purificado, que foi encaminhado à microscopia eletrônica.

### 3.2.6 Observação de partículas virais

Para a observação de partículas virais no micélio de todos os isolados foi feita microscopia eletrônica pela técnica de contraste negativo, “leaf dip”, descrita por Kitajima (1965). O micélio de duas placas de cada isolado contendo colônias crescidas em BDA por cinco dias foi cuidadosamente retirado com lâmina de vidro, macerado em tampão cacodilato 0,1M pH7,2. Uma gota do macerado foi colocada sobre placa de petri coberta com parafilme, e sobre esta foram depositadas, de maneira que flutuassem, três telas de cobre, 300 mesh, previamente cobertas por uma película fina de Formvar e tratada com carbono. Após 15 minutos, as telas foram secas em papel filtro, e lavadas por duas vezes consecutivas em água deionizada, depositando-se as telas sobre a gota de água, secando-se em papel filtro a cada lavagem, e finalmente colocando-se as telas sobre gota de acetato de uranila 3% para serem contrastadas, onde permaneceram por 20 minutos. Foram novamente secas em papel filtros e depositadas em caixa de armazenamento de telas, onde secaram por duas horas antes de serem observadas ao microscópio eletrônico Zeiss EM 900. Utilizou-se o mesmo processo para o vírus purificado. As imagens foram gravadas.

### 3.2.7 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Foi feita RT-PCR para verificação da presença de dsRNA M2 em todos os isolados, uma vez que ele está associado à redução da capacidade de o fungo causar doença em batata e, por isso, sua ocorrência em outros hospedeiros tem sido pesquisada (CHARLTON *et al.*, 2008).

Os iniciadores sintetizados pela Invitrogen foram aqueles descritos por Liu *et al.* (2003):

P36 anti-senso	5'- GGGGCTTCTGGCGGAAAGAA - 3'
P35 senso	5'- GTCATTACATGCAGCTTACG - 3'

Para a obtenção do DNA complementar, alíquota de 4 µl do RNA de cada amostra, extraídos por Trizol (Charlton *et al.*, 2008) foi colocada em micro tubos com 5 µL de água Milli-Q, e 1 µl de iniciador anti-senso P36, submetida a 95°C por 3 minutos e rapidamente resfriados. Foi então acrescentado a cada microtubo, 7 µl de água RNase free, 4 µl o tampão da enzima transcriptase reversa GoScript (Promega), 2 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de dNTPs e 1 µl da enzima transcriptase reversa, obtendo-se um volume de 25 µL de solução de cDNA. Os microtubos foram incubados a 37°C por 1 h no termociclador PTC 100 (MJ Research).

Para a reação em cadeia de polimerase utilizou-se o kit GoTaq Hot Start Green Master Mix (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Para um volume de reação de 50 µl, foram utilizados 25 µl de Go Taq Hot Start Green Master Mix, 1 µl de iniciador P35, 1 µl de iniciador P36, 20 µl de água RNase free, e 3 µl de cDNA. As condições de amplificação foram: 94°C por um min; 35 ciclos de 94°C por um minuto, 55°C por 45 segundos, 72°C por um minuto; e por fim 72°C por sete minutos.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TAE, contendo brometo de etídeo (1 µl/l). Ao gel foram aplicados 15 µl dos produtos de PCR misturados a 10 µl de tampão de carga, e o marcador de peso molecular Righ Ranger 1 Kb (Norgen). As condições de eletroforese foram de 100 V por aproximadamente 1 h. A visualização dos produtos foi feita em fotodocumentador Alphamager TM 1220 sob luz violeta. O tamanho do fragmento esperado, para os iniciadores utilizados, é de 1 kb.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolados de *Rhizoctonia solani*

#### 4.1.1 Obtenção dos isolados de *R. solani*

Das 25 amostras coletadas, foram obtidos 11 isolados de *R. solani*, dos quais 7 foram obtidos da coleta em jardins residenciais, AM04(São Paulo - SP), AM07, AM15, AM16, AM19, AM20 (Cotia - SP), AM11 (Ilhabela-SP); três obtidos em campos de golfe, TEE15, TEE16 (São Paulo - SP) e AM18 (Bragança - SP) e um obtido em tapete de grama AM21 (Itapetininga - SP).

Das 15 coletas feitas em 2013, *R. solani* foi isolada só em 4 amostras. Isto pode ter ocorrido devido ao desconhecimento da sintomatologia da doença, pois como era consenso, atribuía-se à *R. solani*, todas as manchas de inverno em gramados. Em 2014, a coleta realizada em manchas com bordas alaranjadas (Fig. 9) das quais era possível retirar, facilmente, folhas com bainhas, *R. solani* foi isolada em 7 das 10 amostras coletadas.



**Figura 9.** Sintoma de *Rhizoctonia solani* em grama Esmeralda, com manchas de coloração palha, com leve rebrota no centro, e bordas com coloração alaranjadas.

Os resultados obtidos indicaram a necessidade de se conhecer os verdadeiros sintomas da doença, respeitando a época de manifestação de *R. solani*. Os gramados são afetados por muitos patógenos, pragas e desordens fisiológicas. Os sintomas são quase que indistinguíveis, tornando a diagnose visual difícil (TODA *et al.*, 2004). Smiley *et al.* (2007) citam 45 doenças fúngicas em vários tipos de gramíneas. No Brasil, onde existem poucos

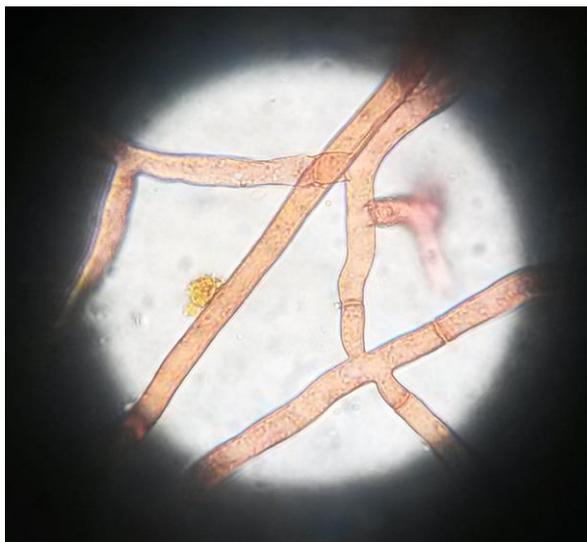
estudos, outros patógenos podem estar associados ao sintoma de manchas nos gramados, portanto há necessidade urgente de mais estudos na cultura.

#### 4.1.2 Caracterização dos isolados de *Rhizoctonia solani*

Para obtenção dos isolados do fungo, o isolamento direto de bainhas infectadas foi o mais efetivo (Fig. 10 e 11). Foi necessário o acompanhamento frequente das placas com as bainhas de grama, a cada 24 horas, para fazer o repique assim que o micélio de *R. solani* começasse a surgir (Fig.12), para evitar contaminações com outros fungos que vivem no ambiente de onde a bainha foi retirada.



**Figura 10.** Micélio castanho de *Rhizoctonia solani* presente em bainha de grama Esmeralda utilizada no isolamento direto, observada ao microscópio estereoscópico (40x)



**Figura 11.** Micélio de *Rhizoctonia solani* corado com safranina, isolados de grama Esmeralda e observado ao microscópio de luz (400x)

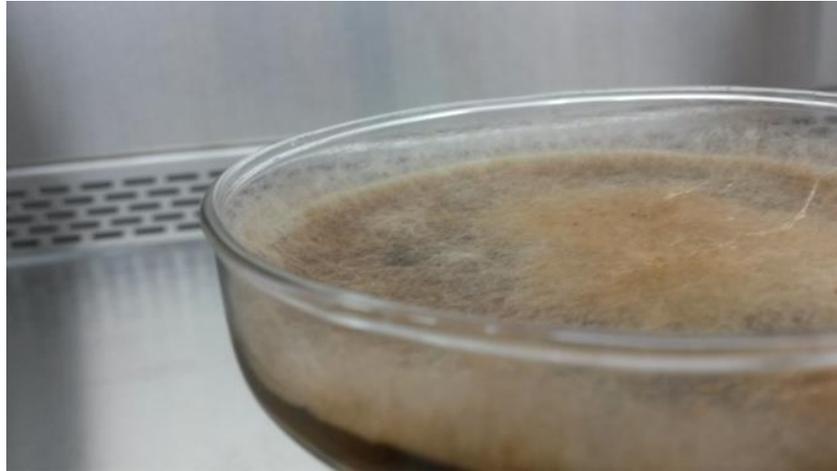


**Figura 12.** Micélio de *Rhizoctonia solani* isolado de grama Esmeralda visto em microscópio estereoscópico (40x)

O método de isolamento com iscas de feijão e rabanete não foi eficiente para a captura do fungo, devido a presença de bactérias e nematoides de vida livre, impedindo a obtenção de culturas puras do patógeno, por esta razão, o método não foi utilizado neste estudo.

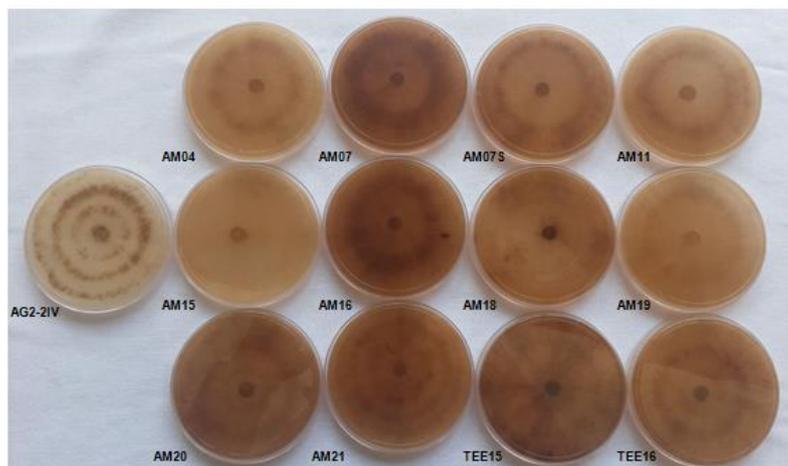
Resultado semelhante foi obtido por Aoyagi *et al.*(1998), em experimento realizado no Japão por um período de seis anos, em que obtiveram 1706 isolados, 61% provenientes de bainha da grama, 16,9% do colchão e 22,1% de iscas de hastes de linho.

Todos os isolados avaliados desenvolveram hifas aéreas (Fig. 13) e colônias circulares.



**Figura 13.** Micélio aéreo do isolado AM11 de *Rhizoctonia solani* coletado em grama Esmeralda

A coloração, no início da colônia, se apresentou esbranquiçada, escurecendo após incubação a 25°C, tornando-se marrom escura após 30 dias (Fig. 14).



**Figura 14.** Cor do micélio de todos os isolados de *Rhizoctonia solani* coletados em grama Esmeralda e do isolado de *R. solani* AG-2-2 IV da coleção Mario Barreto, após 15 dias de incubação a 25°C

O isolado de *R. solani* AG2-2 IV da coleção Mario Barreto apresentou coloração mais clara que os isolados de *R. solani* testados (Tab. 3), comportamento semelhante foi relatado

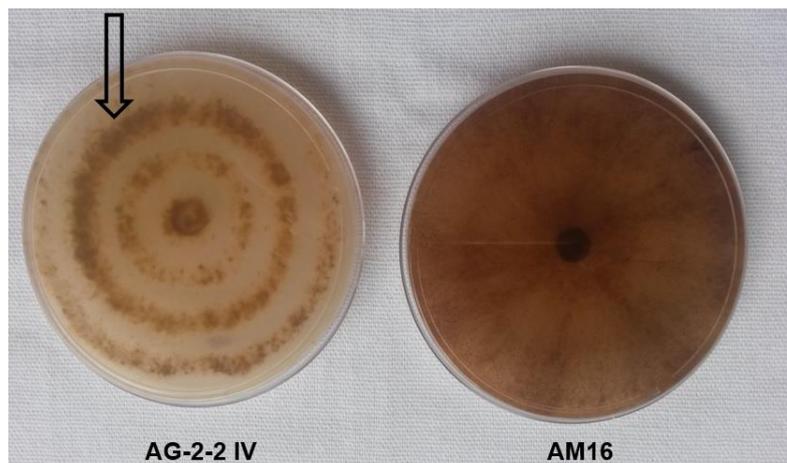
por Hyakumachi *et al.* (1998), Aoyagi *et al.* (1998) e Obasa (2012) quando compararam isolados de AG-2-2 LP e AG-2-2 IV, que relataram cor mais clara para isolados pertencentes a AG-2-2 IV.

**Tabela 3.** Coloração do micélio dos isolados de *Rhizoctonia solani* após 15 dias de incubação a 25°C

Isolados	Notas p/cor do micélio
AM04	2,25 a <sup>1</sup>
AM07	4,00 a
AM07S	3,50 a
AM11	3,50 a
AM15	2,00 b
AM16	4,00 a
AM18	2,75 a
AM19	2,00 b
AM20	3,00 a
AM21	3,50 a
TEE15	4,00 a
TEE16	3,50 a
AG 2-2 IV	1,00 c
C.V.%	19,6

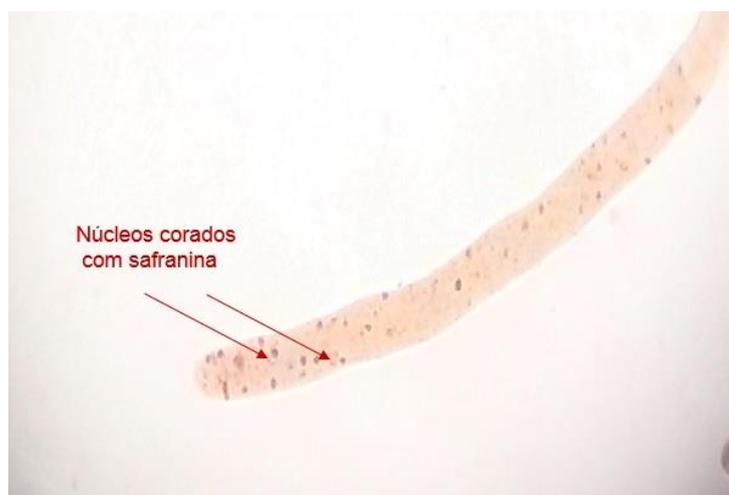
<sup>1</sup>Médias das colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade Scott-Knott

Houve crescimento aéreo das hifas sem a formação de escleródios ou de zonação, características que ocorrem em outros grupos de anastomose. Este padrão de crescimento aéreo sem a formação de escleródios e sem zonação foi constatado em isolados de *R. solani* AG-2-2 LP por Hyakumachi *et al.* (1998), Aoyagi *et al.* (1998) e Obasa (2012). No isolado de *R. solani* AG-2-2 IV houve crescimento menor de hifas aéreas, coloração mais clara, formação de escleródios e de zonação (Fig. 15), padrão que, com exceção do tipo de crescimento das hifas, também foi observado por Hyakumachi *et al.* (1998).



**Figura 15.** Comparação do isolado de *Rhizoctonia solani* AG2-2 IV da coleção Mario Barreto (colônia clara, com zonação e escleródios) com o isolado AM16 de *R. solani* de grama Esmeralda (colônia castanha, sem zonação e escleródios)

Na avaliação da condição nuclear, todos os isolados apresentaram-se com mais de dois núcleos, sendo considerados multinucleados (Fig. 16).

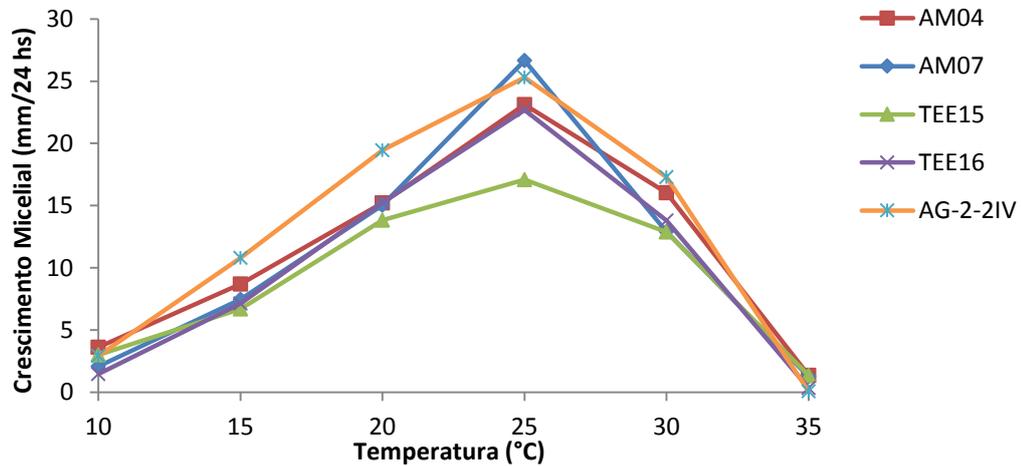


**Figura 16.** Núcleos corados com safraninaO contados nas pontas das hifas aleatórias dos isolados de *Rhizoctonia solani* (1000x)

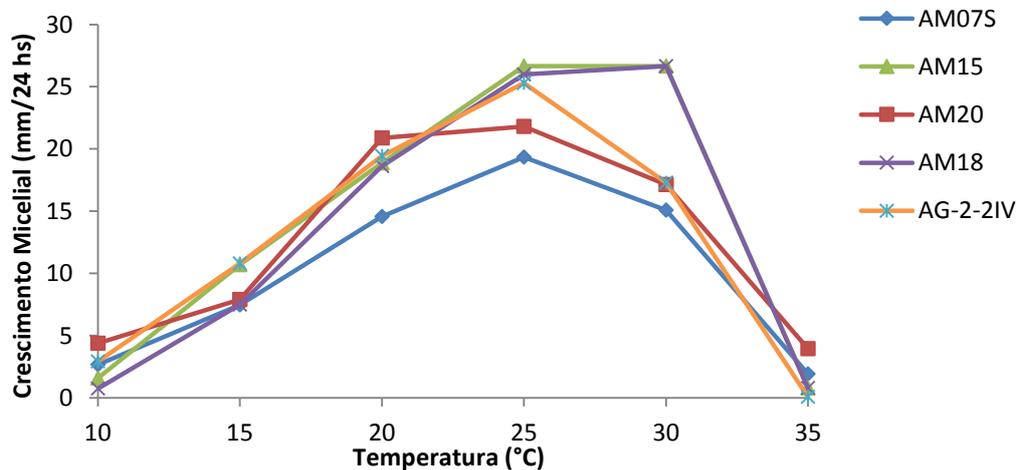
#### 4.1.2.1 Crescimento micelial dos isolados

Verificou-se que todos os isolados tiveram crescimento nas temperaturas entre 10° e 30°C, com uma redução abrupta em temperaturas acima de 30°C, não havendo crescimento em temperaturas próximas a 35°C e crescimento muito pequeno em temperaturas iguais ou menores que 10°C. A temperatura em que todos os isolados de *R. solani* coletados em grama Esmeralda atingiram o máximo crescimento médio diário foi de 25°C (Fig. 18, 19 e 20), com valores que variaram entre 17mm/dia para TEE15 e 26,7mm/dia para AM07, exceto os

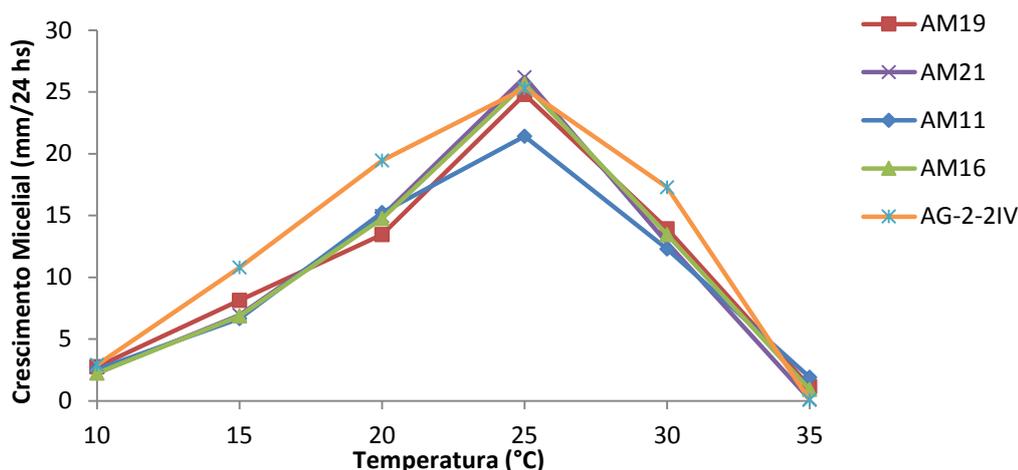
isolados AM15 e AM18 que atingiram este valor em 30°C (Fig.18). O isolado AG-2-2 IV da coleção Mario Barreto atingiu o máximo crescimento micelial diário de 25,3mm/dia também a 25°C.



**Figura 17.** Crescimento micelial (mm/dia) dos isolados de *Rhizoctonia solani* AM04, AM07, TEE15 e TEE16 obtidos em grama Esmeralda e do isolado de *R. solani* AG-2-2 IV da Micoteca Mario Barreto nas temperaturas 10°, 15°, 20°, 25°, 30°, 35°C



**Figura 18.** Crescimento micelial (mm/dia) dos isolados de *Rhizoctonia solani* AM07S, AM15, AM18 e AM20 obtidos em grama Esmeraldem e do isolado de *R. solani* AG-2-2 IV da Micoteca Mario Barreto nas temperaturas 10°, 15°, 20°, 25°, 30° e 35°C.



**Figura 19.** Crescimento micelial (mm/dia) dos isolados de *Rhizoctonia solani* AM11, AM16, AM19, AM21, obtidos em grama Esmeralda e do isolado de *R. solani* AG-2-2 IV da Micoteca Mario Barreto nas temperaturas 10°, 15°, 20°, 25°, 30°, 35°C

Hyakumachi *et al.* (1998) obtiveram crescimento médio diário próximo a 16mm/dia para isolados de *R. solani* AG 2-2 IIIB e AG2-2IV, e próximos a 14mm/dia para isolados de AG2-2 LP na temperatura de 25°C. Nestes três grupos intra-específicos de *R. solani* encontram-se os principais patógenos causadores de rizoctoniose em gramados, que podem ser separados pela patogenicidade a diferentes hospedeiros e pelas diferenças características da colônia, sendo que o principal critério para os diferenciar é o crescimento em altas temperaturas, pois AG2-2 IIIB cresce em temperaturas superiores a 35°C e os outros dois não crescem acima desta temperatura (HYAKUMACHI *et al.*, 1997; AOYAGI *et al.*, 1998). Os isolados de *R. solani* coletados em gramados paulistanos e o isolado da Micoteca Mario Barreto não cresceram em temperaturas acima de 35°C e tiveram crescimentos médios diários maiores que os obtidos por Hyakumachi *et al.* (1998).

#### 4.1.2.2 Patogenicidade dos isolados de *Rhizoctonia solani*

Na avaliação da patogenicidade em segmentos de bainhas de grama Esmeralda feita com os isolados AM07S, AM11, AM16, AM18, AM19 e AM20 de *R. solani*, isolada de grama Esmeralda, não foram observadas diferenças significativas entre os isolados, porém houve diferença significativa entre os isolados de *R. solani* e o controle negativo. Este resultado pode indicar que os isolados são patogênicos, mas não indica diferenças de virulência entre os isolados (Tab. 5, Fig.20). Este experimento foi realizado para verificar a possibilidade de outro método de avaliação da patogenicidade de *R. solani* em grama Esmeralda (Fig.21), porém os sintomas da doença nas bainhas desinfestadas demoraram muito para se manifestar,

prolongando sua duração e favorecendo o crescimento de fungos contaminantes, fatores que prejudicaram a avaliação, por isso não foi mais utilizado nos demais isolados.

**Tabela 4.** Patogenicidade dos isolados de *Rhizoctonia solani* em hastes de grama Esmeralda

Isolado	Nº de bainhas infectadas
AM07S	9,25 a
AM19	9,00 a
AM18	9,00 a
AM11	9,00 a
AM20	8,75 a
AM16	8,50 a
CONTROLE NEGATIVO	1,00 b
C.V.%	14,43

<sup>1</sup>Médias das colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade Tukey



**Figura 20.** Efeito patogênico do isolado AM11 de *Rhizoctonia solani* em hastes de grama Esmeralda

No experimento que avaliou a patogenicidade em vasos, verificou-se que os isolados AG-2-2 IV, AM15, AM20 não reduziram a área verde em comparação com o controle sadio, indicando que, neste experimento, estes isolados não foram patogênicos para a grama Esmeralda, enquanto os demais isolados reduziram significativamente a área foliar, sendo considerados patogênicos a grama Esmeralda, mas não diferiram entre si. Na avaliação da patogenicidade pela altura da grama os resultados foram semelhantes, mas apenas o isolado AM15 não foi patogênico à grama Esmeralda, os isolados AM20, AG-2-2 LP e AM16 foram

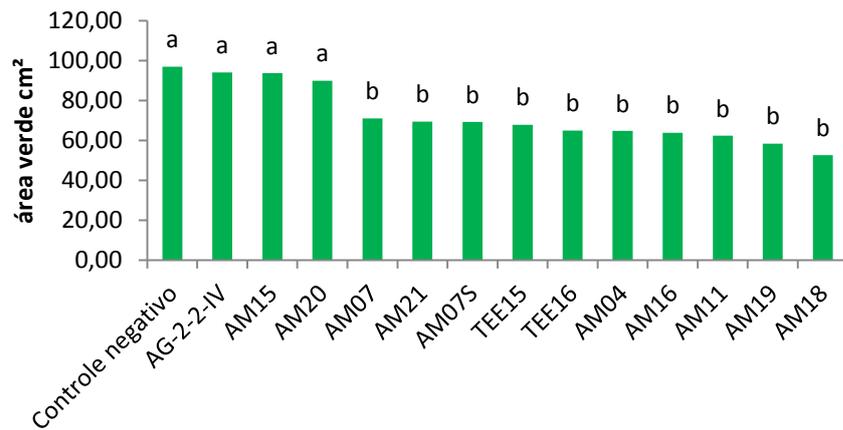
patogênicos, mas diferiram significativamente dos demais isolados, que foram os mais virulentos e não diferiram entre si (Tab. 5; Fig. 21 a 24).

Todos os isolados foram re-isolados das amostras inoculadas e causaram os mesmos sintomas de rizoctoniose.

**Tabela 5.** Avaliação da severidade dos sintomas causados pelos isolados de *Rhizoctonia solani* em grama Esmeralda, pelo programa Corel Photo Paint X7

Superfície do vaso			Altura da grama		
Tratamento	% pixels verde	área verde cm <sup>2</sup>	Tratamento	% pixels verde	área verde cm <sup>2</sup>
Controle negativo	73,09	97,02 a	Controle negativo	5,632	6,34 a
AG-2-2 IV	70,84	94,03 a	AM15	4,886	5,50 a
AM15	70,61	93,72 a	AM20	4,174	4,70 b
AM20	67,73	89,90 a	AG-2-2 IV	3,904	4,39 b
AM07	53,5	71,01 b	AM16	3,836	4,32 b
AM21	52,36	69,50 b	AM21	3,452	3,88 c
AM07S	52,22	69,32 b	AM07	3,354	3,77 c
TEE15	51,17	67,92 b	AM19	3,15	3,54 c
TEE16	48,91	64,92 b	AM07S	2,982	3,35 c
AM04	48,86	64,85 b	AM11	2,958	3,33 c
AM16	48,14	63,90 b	AM04	2,822	3,17 c
AM11	46,97	62,35 b	TEE16	2,792	3,14 c
AM19	44	58,40 b	TEE15	2,49	2,80 c
AM18	39,63	52,60 b	AM18	2,14	2,41 c
C.V.%	16,99		C.V.%	26,91	

<sup>1</sup>Médias das colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade Tukey



**Figura 21.** Patogenicidade dos isolados de *Rhizoctonia solani* coletados em grama Esmeralda e isolado de *R. solani* AG-2-2 IV da Micoteca Mario Barreto, avaliados pela cobertura da superfície do vaso



**Figura 22.** Patogenicidade dos isolados de *Rhizoctonia solani* coletados em grama Esmeralda e isolado de *R. solani* AG-2-2 IV da Micoteca Mario Barreto, avaliados pela altura da grama



**Figura 23.** Patogenicidade avaliada pela cobertura da superfície do vaso e altura da grama nos isolados AM15 (não patogênico em ambos experimentos), AM19 (maior virulência em ambos experimentos) de *Rhizoctonia solani* coletados em grama Esmeralda, isolado de *R. solani* AG-2-2 IV da Micoteca Mario Barreto (não patogênico no experimento cobertura da superfície e patogênico com pouca virulência no experimento altura da grama) e controle negativo

Considera-se a avaliação da severidade da doença pela porcentagem de área verde, medida pelo programa Corel Photo Paint X7 adequada, pois não é um critério subjetivo como o sistema de avaliação por escala de notas, utilizado por Aoyagi *et al.* (1998) e Hyakumachi *et al.* (1998), podendo ser facilmente reproduzida em estudos futuros. Programas semelhantes ao Corel Photo Paint X7 foram utilizados por Godoy (2005) na avaliação da taxa de cobertura do solo na produção de gramas Esmeralda e Santo Agostinho submetidas a diferentes doses de Nitrogênio (Corel Photo Paint v.10.410, Corel Corporation 2000) e por Obasa (2012) que utilizou o programa Sigma Scan Pro version 5.0 (SPSS, Chicago, IL) na avaliação do desenvolvimento de “large patch” sob efeitos de diferentes manejos e diferentes épocas de aplicação de Nitrogênio.

Neste estudo os isolados coletados em grama Esmeralda apresentaram comportamento semelhante ao dos isolados pertencentes ao grupo AG-2-2 LP relatados por Aoyagi *et al.*(1998), que observaram severidade variável de rizoctoniose em espécies de *Zoysia*. O isolado AG-2-2 IV da coleção Mario Barreto não foi patogênico à grama Esmeralda sendo que, resultado semelhante foi observado por Aoyagi *et al.*(1998) com isolados deste mesmo grupo.

#### **4.1.3 Identificação molecular dos isolados de *Rhizoctonia solani* em grama Esmeralda**

O sequenciamento direto dos produtos de PCR obtidos para a região ITS dos isolados AM07 e TEE16 mostrou sobreposição de picos nos eletroferogramas, a partir das posições 160-170, aproximadamente, com ambos os iniciadores, indicando heterogeneidade de sequências (polimorfismos), provavelmente por inserções/ deleções.

O sequenciamento de quatro clones da região ITS de cada isolado revelou a existência de pelo menos dois tipos de sequências, que diferem entre si na região onde foi detectado o início do polimorfismo no sequenciamento direto do produto de PCR. As oito sequências obtidas, quatro para cada isolado, foram idênticas entre si em toda sua extensão com exceção das duas regiões onde foram observadas diferenças devido a inserções /deleções.

A comparação das sequências, obtidas a partir dos clones, com sequências depositadas no NCBI mostrou similaridade de 99,9% com sequências de isolados de *R. solani* do grupo de anastomose AG-2-2 LP.

A heterogeneidade de sequências, dada por diversidade de bases num mesmo sítio do sequenciamento, que é observado por sobreposição de picos no eletroferograma, é bastante comum *R. solani* (KAZUMINI,2006), onde já foi relatada em diversos grupos de anastomose, e também em outros fungos como *Sclerotium rolfsii*, *Ascochyta* spp (DAS, 2013) e *Pythium* spp (BELBAHRI *et al.*,2008).

Strausbaugh *et al.*, (2011) observaram heterogeneidade em 4% de isolados de *R. solani* AG-4 e em 70% dos isolados de AG-2-2 IIIB, sendo que neste foram obtidas trinta sequencias diferentes para heterogeneidades presentes entre seis e 16 posições em 57 clones de seis isolados, sem, contudo, impedir que estes isolados fossem classificados em AG-2-2 IIIB. Pannecouque e Höfte (2009) observaram variações em até 18 posições na região ITS1 e em até 12 posições em ITS2 posições em seis isolados de AG-2-1 obtendo 32 sequencias diferentes. Em AG-3, encontraram heterogeneidade em dez posições na região ITS1 e três posições na região ITS2, enquanto que Das (2014) encontrou heterogeneidade em 77% dos isolados AG-3 PT, com variações em nove posições na região ITS1, uma posição na região 5,8S e três posições na região ITS2, obtendo 15 diferentes sequencias. Observou variações em 100% de seus isolados de AG-2-1 com heterogeneidade em apenas uma posição da região ITS1, ou quatro posições na região ITS1 e uma posição na região ITS2. Em *R. cerealis*, uma espécie binucleada do gênero, Li *et al.*(2014) fizeram o primeiro relato de heterogeneidade de sequências neste fungo, em todos os 15 isolados que estudaram, alcançando 36 diferentes sequencias que variaram de dois a seis para cada um deles, com heterogeneidade em até 28 posições, 18 na região ITS1 e dez na região ITS2, porém sem alterar a identificação do grupo de anastomose.

A presença de sequências variadas, ou seja, polimorfismo, em um mesmo isolado pode ser devida a existência de diferentes unidades de DNA ribossomal dentro de um mesmo núcleo, ou a diferentes sequencias em núcleos diferentes (LI *et al.*, 2014). Deve-se considerar que *R. solani*, além de multinucleada, é heterocariótica, e a anastomose de hifas permite a fusão e recombinação de núcleos diferentes (PANNECOUCQUE; HÖFTE, 2009). No entanto, ainda não foi esclarecido o motivo da heterogeneidade de sequencias comumente encontrada em isolados de *R. solani*.

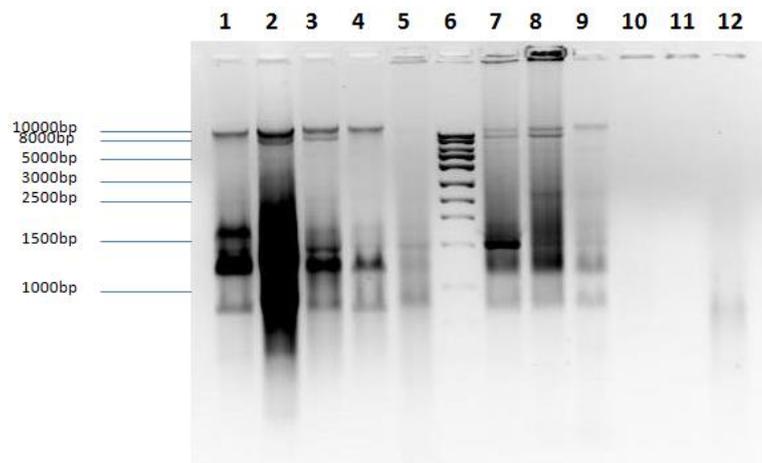
Os demais isolados estão sendo estudados até sua completa identificação.

A PCR utilizando os iniciadores específicos para identificação de *R. solani* AG-2-2 LP apresentou resultado negativo pois não houve amplificação de nenhum fragmento, tanto na temperatura de anelamento de 65°C proposta por Toda *et al.* (2004) quanto nas temperaturas do gradiente, inclusive para os isolados AM07 e TEE16 já sequenciados e identificados como pertencentes a AG-2-2 LP (99,9% de similaridade).

#### **4.2 Detecção molecular e por microscopia eletrônica de transmissão de micovírus**

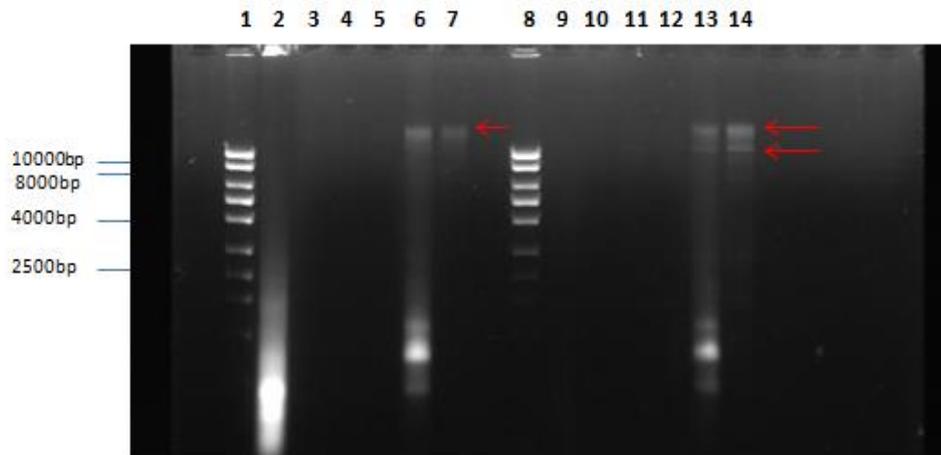
Dentre os diversos métodos de extração e purificação de RNA, o método adaptado de Das *et al.* (2013) foi descartado devido ao longo período necessário para a filtragem das amostras em coluna, sob refrigeração. Enquanto, os métodos adaptados de Kuramae *et al.*

(2002) e Santos (2013) foram preteridos devido a pequena quantidade inicial de micélio que utilizam, o que pode dificultar a obtenção do vírus, uma vez que a concentração de micovírus pode ser baixa. Na extração pela coluna Núcleo Spin RNA, as bandas de dsRNA ficaram pouco evidentes, por esta razão o procedimento foi descartado. Tanto na extração por Trizol quanto por cromatografia em coluna de celulose as bandas foram mais evidentes (Fig. 24), no entanto, como ambos os métodos utilizados foram para extração de RNA total, as bandas obtidas podem ser de RNAs de fita simples e não de dsRNAs, indicativos da presença de vírus em fungos (BHARATHAN; TAVANTZIS, 1990). A escolha da extração de RNA por cromatografia em coluna de celulose foi devido a maior facilidade no procedimento pela substituição da filtragem em coluna pelas centrifugações e também por possibilitar a obtenção de uma maior concentração de ácidos nucleicos.

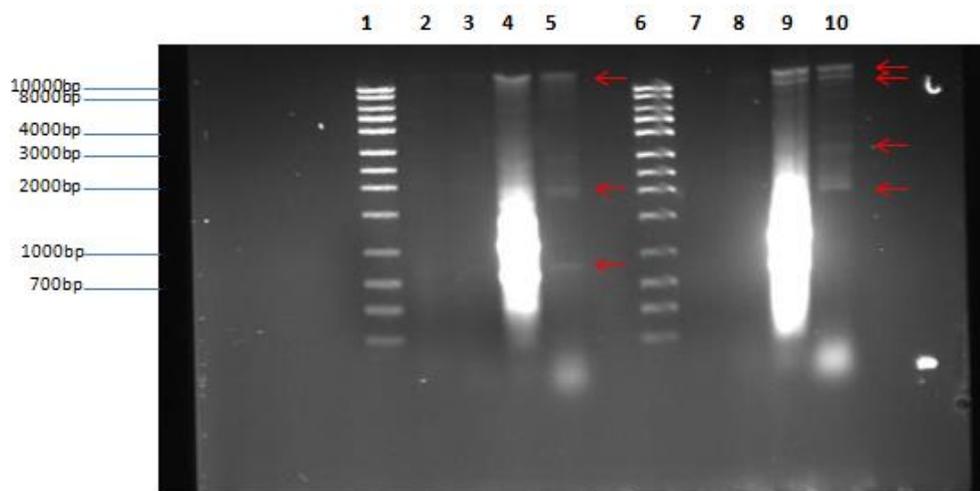


**Figura 24.** Eletroforese em gel de agarose 1%: C= Cromatografia; T= Trizol; NS- Nucleo Spin RNA; 1= AM04-C; 2= AM07-C; 3=TEE15-C; 4=TEE16-C; 5=AM04-T; 7=AM07-T; 8=TEE15-T; 9=TEE16-T; 10=TEE15-NS; 11=TEE16-NS; 12=Potyvirus de Hippeastrum; 6=Marcador Righ Ranger 1Kb

Após os produtos das extrações terem sido tratados com a endonuclease S1, que elimina RNAs e DNAs de fita simples (KURAMAE *et al.*, 2002), verificou-se que houve a eliminação das bandas menores que 2 kb, sem eliminar as bandas maiores que 10 kb (Fig. 25) e puderam ser evidenciadas as bandas maiores que 10 kb, e bandas entre 2 e 3 kb (Fig. 26).

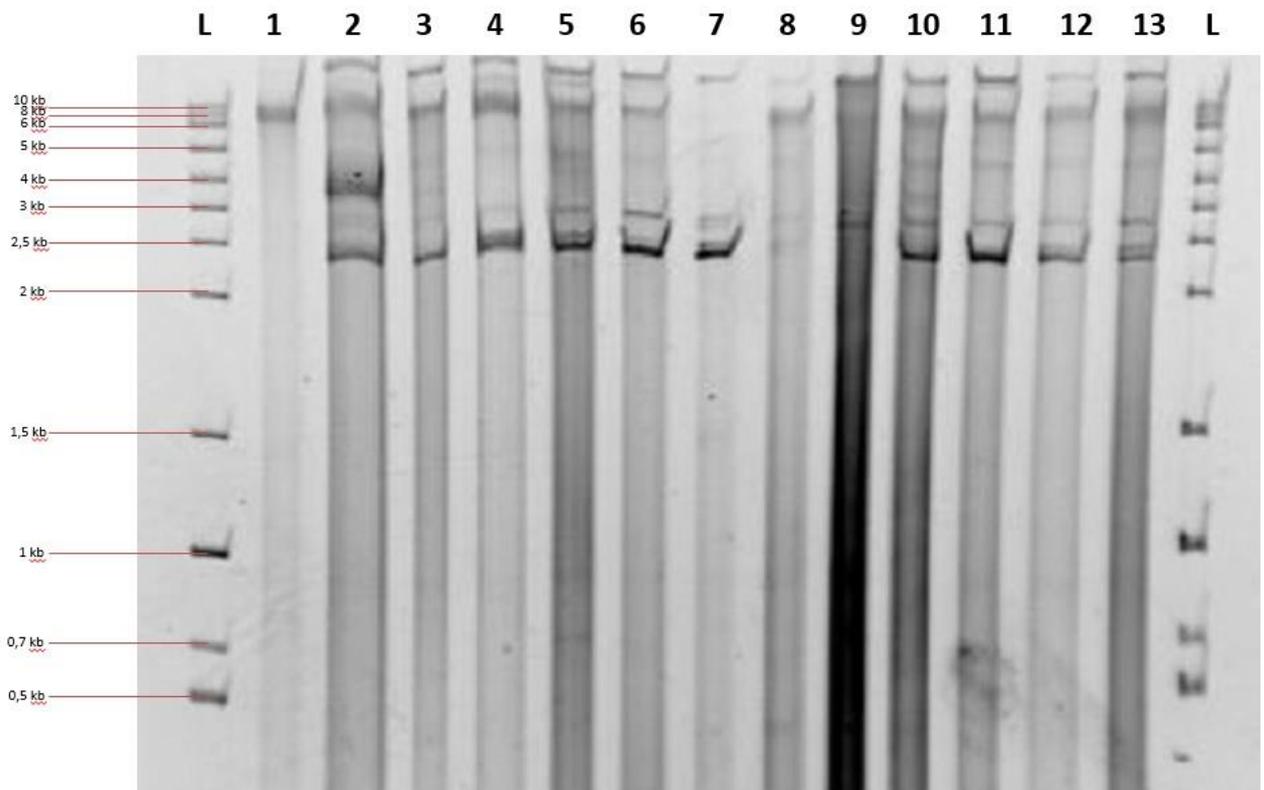


**Figura 25.** Eletroforese em gel de agarose 1%: 1 e 8= Marcador Righ Ranger 1kb; 2= AM04-T; 3= AM04-TE; 4= AM04-TC; 5= AM04-TCE; 6= AM04-C; 7= AM04-CE; 9= AM07-T; 10= AM07-TE; 11= AM07-TC; 12= AM07-TCE; 13=AM07-C; 14= AM07-CE



**Figura 26.** Eletroforese em gel de agarose 1%: 1 e 6= Marcador Righ Ranger 1kb; 2= AM04-TC; 3= AM04-TCE; 4= AM04-C; 5= AM04-CE; 7= AM07-TC; 8= AM07-TCE; 9= AM07-C; 10= AM07-CE

Em todos os isolados de *R. solani* avaliados neste trabalho verificou-se a ocorrência de dsRNAs, em quantidades variáveis e com tamanhos diferentes (Fig. 27). Os isolados coletados em grama Esmeralda apresentaram um padrão de bandas parecido, com número de bandas que variou entre três bandas, nos isolados AM15 e AM18 e seis bandas no isolado AM11. Em todos os isolados avaliados houve a formação de bandas maiores que 10 Kb e não houve a formação de bandas menores que 2Kb em nenhum destes isolados. No isolado AG-2-2 IV empregado como controle, houve a formação de bandas entre 6 Kb e 8 Kb (Fig. 27).

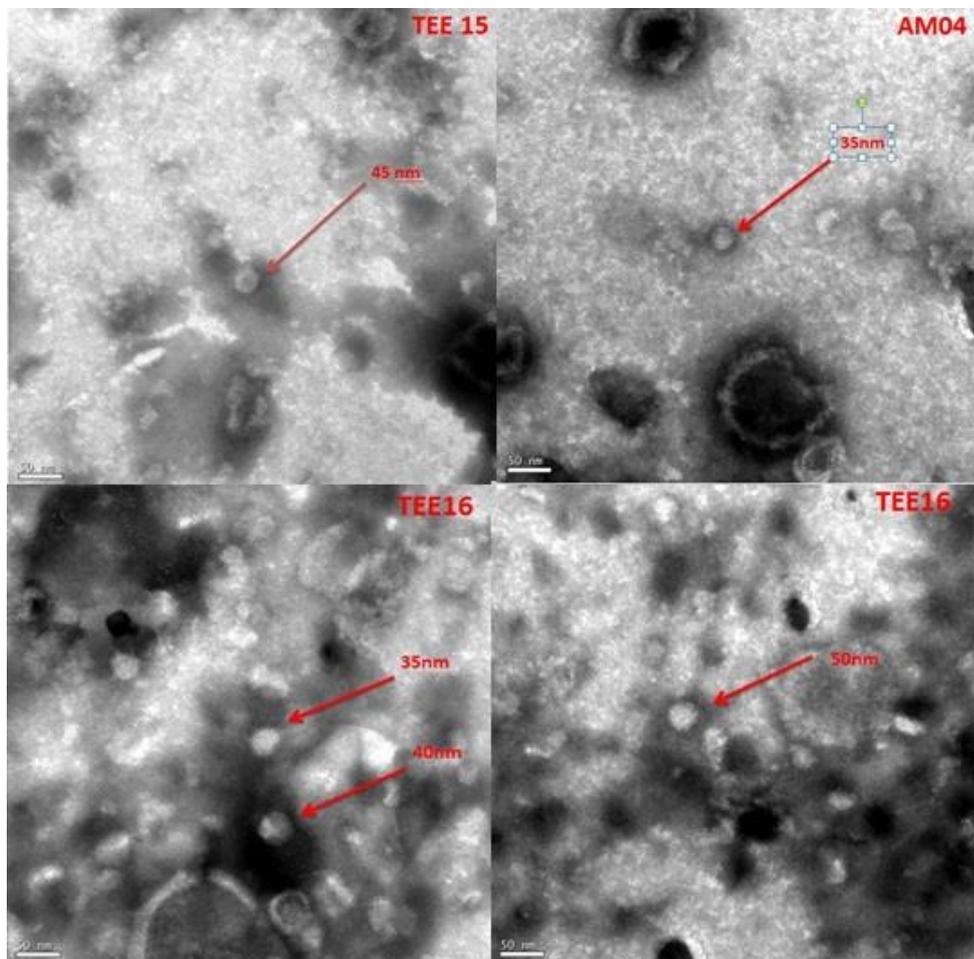


**Figura 27.** Eletroforese de todos os isolados de *Rhizoctonia solani* coletados em grama Esmeralda (2-13) e *R. solani* AG-2-2IV (1) da micoteca Mario Barreto L=Marcador Righ Ranger 1kb;1= AG-2-2 IV 2=TEE16; 3=TEE15; 4= AM21; 5= AM20; 6= AM19; 7= AM18; 8= AM16; 9= AM15; 10=AM11; 11= AM07S; 12= AM07; 13= AM04.

Os dsRNAs são onipresentes em *R. solani* (BHARATHAN; TAVANTZIS, 1990). O número de dsRNA em fungos fitopatogênicos pode ser variável. Kuramae *et al.* (2002) relataram números e tamanhos de bandas variáveis em 45,8% dos isolados de *R. solani* coletados em feijão e amendoim no estado de São Paulo, obtendo, no grupo de anastomose AG-4 HGI, patógeno de feijão, a ocorrência de 5 bandas de dsRNAs, enquanto que Das *et al.* (2013) relataram a ocorrência de dsRNAs em 100% dos isolados de *R. solani* coletados em batata, na Nova Zelândia, pertencentes aos grupos de anastomose AG-3 e AG-2-1, obtendo neste último, a formação de até 13 bandas de dsRNAs. Em populações de *R. solani* podem ser obtidos dsRNA com tamanhos semelhantes (BHARATHAN; TAVANTZIZ, 1990) mesmo em isolados somaticamente incompatíveis (DAS, 2013).

Na microscopia eletrônica das amostras correspondentes aos isolados avaliados, foram visualizadas partículas virais isométricas com cerca de 35 a 50nm de diâmetro, nos isolados AM04, TEE15 e TEE16 (Fig. 28). Não foram visualizadas partículas nas amostras de vírus purificado, provavelmente por intercorrências na metodologia de purificação, que

deverá novamente ser repetida. Pelo tamanho das partículas pode-se sugerir que estas pertençam à família *Partitiviridae*, que possui gêneros cujas partículas têm o mesmo tamanho (KING *et al.*, 2012). Em isolados de *R. solani* foi relatada a ocorrência de vírus pertencentes aos gêneros *Alphapartitivirus*, com genomas de 1,8 e 2 Kb (ZHENG *et al.*, 2014) e *Betapartitivirus* com genomas de 2,1 Kb (TAVANTZIS & BANDY, 1988), cujas partículas tem a mesma morfologia e tamanho das partículas virais visualizadas nos isolados de *R. solani* coletados em grama Esmeralda, portanto pode ser que o vírus presente nestes isolados pertençam aos gêneros acima mencionados.



**Figura 28.** Imagem de microscopia eletrônica de transmissão dos isolados AM04, TEE15 e TEE16 de *Rhizoctonia solani* coletado em grama Esmeralda

De acordo com o número de segmentos, tamanho do genoma e morfologia das partículas dos vírus que infectam *R. solani*, estes podem ser classificados em diferentes famílias. As famílias de vírus que infectam *R. solani* são *Partitiviridae*, gênero *Betartitivirus* (site ICTV, 2014), que possui genoma de dsRNA bipartido, com segmentos de 1,4 e 2,4 kb (KING *et al.*, 2012) e as famílias *Endornaviridae* (gênero *Endornavírus*) que possui genoma

de dsRNA monopartido, e *Narnaviridae* (gênero *Mitovírus*), sendo que este último, embora tenha genoma de ssRNA monopartido, sempre ocorre na forma replicativa (dsRNA) em seus hospedeiros (DAS, 2013). O genoma de *Narnaviridae* é de 2,3 a 2,9 kb e *Endornaviridae* possui genoma que varia de 14 a 17,6 kb e (KING *et al.*, 2012).

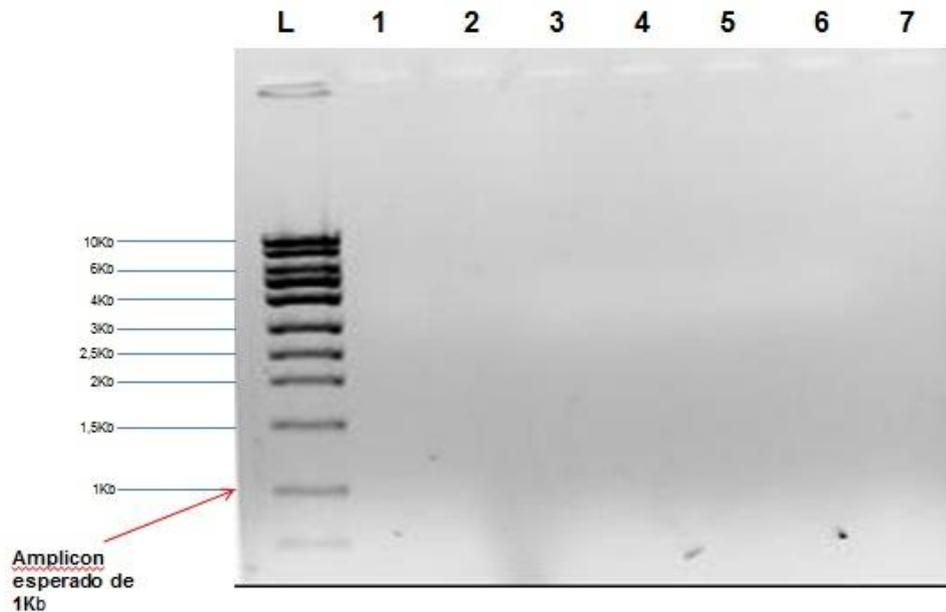
Pelos resultados obtidos do número e tamanho das bandas de dsRNA (Fig. 27) e morfologia das partículas (Fig. 28) pode-se sugerir a ocorrência de micovírus pertencentes as famílias *Totiviridae*, *Megabirnaviridae*, *Chrysoviridae*, *Partitiviridae*, *Endornaviridae*, *Hypoviridae*, e *Narnaviridae* nos isolados de grama avaliados neste estudo, com ressalvas para as famílias *Endornaviridae* e *Narnaviridae* que não podem ser visualizadas ao microscópio eletrônico por serem vírus que não possuem capa protéica. Embora existam relatos da ocorrência de vírus com partículas alongadas em fungos fitopatogênicos pertencentes às famílias *Alphaflexiviridae* e *Gamaflexiviridae*, nos isolados aqui estudados, não foram visualizadas ao microscópio eletrônico partículas com estas características, portanto os vírus associados a estes isolados, provavelmente não pertencem a estas famílias.

Nos isolados de *R. solani* de grama Esmeralda foram obtidos número e tamanho de dsRNA variáveis (Fig.27) o que pode ser atribuído a presença de uma infecção causada por diferentes espécies de micovírus, como ocorre em *Aspergillus foetidus*, *Chalara elegans* e *Ophiostoma novo-ulmi* (DAS, 2013), ou à presença de vírus de genoma segmentado como relatado para fungos fitopatogênicos inclusive em *R. solani* (STRAUSS *et al.*, 2000). Das (2013), citando o trabalho de Tartaglia *et al.*(1986) com *Criphonectria parasitica*, relata que eventos de deleção interna de grandes dsRNA podem ser responsáveis pelo número variável de segmentos presentes nos vírus que infectam fungos

O perfil eletroforético obtido neste trabalho evidencia a presença em todos os isolados coletados em grama Esmeralda de dsRNAs de tamanho aproximado de 10 kb, compatíveis com o tamanho dos dsRNAs dos gêneros *Hypovírus* e *Endornavírus*, sendo este último muito comum em *R. solani* e em outros fungos fitopatogênicos (GHABRIAL; SUZUKI, 2009). Embora a caracterização molecular dos dsRNAs seja necessária para a correta identificação da espécie de vírus, a presença de bandas maiores do que 10 Kb pode evidenciar a ocorrência do *Endornavírus* nos isolados de grama Esmeralda, considerando que recentemente relataram-se vírus pertencentes ao gênero *Endornavírus* em *R. solani* AG-1 IA e AG-3, com genoma de 16Kb (DAS *et al.*, 2014) e em *R. cerealis*, com genoma de 17,8Kb, sendo este o primeiro relato de vírus nesta espécie de *Rhizoctonia* (LI *et al.*, 2014). Este micovírus pode desempenhar alguma função no metabolismo de *R. solani*, uma vez que sua ocorrência é muito comum, inclusive modular virulência, embora isto ainda não esteja caracterizado (DAS, 2014). A presença de bandas com tamanhos semelhantes aos de *Endornaviridae* nos isolados de *R. solani* coletados em grama Esmeralda pode ser particularmente importante nos estudos sobre biocontrole, uma vez que Jian *et al.*(1997) relataram associação entre um

grande dsRNA e o dsRNA M1 relacionado a hipervirulência em isolados de *R. solani* AG-3 patógeno de batata.

A caracterização molecular dos dsRNA dos isolados AM04, AM07, AM11, AM19, AM20, TEE15 e TEE16 nos quais foi obtida uma banda entre 2,5 e 4 Kb suspeita da presença de vírus pertencentes ao gênero *Mitovirus* (M2) deram um resultado negativo (Fig. 29) excluindo a possibilidade da ocorrência do vírus M2, espécie reconhecida como causadora de hipovirulência em *R. solani* em batata (JIAN *et al.*, 1997) nos isolados de *R. solani* de grama Esmeralda.



**Figura 29.** Eletroforese em gel de agarose 1%: L= Marcador Righ Ranger 1kb; 1 a 7 Produtos de RT- PCR obtidos na detecção de “dsRNA” M2. 1= AM 04; 2= AM 07; 3= 11; 4= AM 19; 5= AM 20; 6= TEE15; 7= TEE16

## 5 Conclusões

- Nos isolados de grama Esmeralda foi identificado o grupo de anastomose AG-2-2 LP com características morfológicas de formação de hifas aéreas multinucleadas, com variação de coloração da colônia de marrom médio a marrom escuro, ausência de zonação e de escleródios e por não crescerem a 35°C e com 99,9% de similaridade com isolados de *R. solani* AG-2-2 LP depositados no NCBI, sendo o primeiro relato deste grupo de anastomose no Brasil
- Nos isolados de *R. solani* de grama Esmeralda foi detectada a presença de três a seis bandas de tamanhos variáveis, de 2000 a valores superiores a 10000pb, confirmando a presença de dsRNAs, provavelmente associados à presença de micovírus.
- Os isolados de *R. solani* foram patogênicos a grama Esmeralda, porém a hipovirulência na manifestação dos sintomas não pôde ser confirmada.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, I.P.; LEE, Y.H. A viral dsRNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicola*. **Mol. Plant Microbe Interact**, v. 14, p.496-507, 2001.

ALFENAS, A.C.; MAFIA, R. G. (Eds.) **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007.

AOYAGI, T.; KAGEYAMA, K.; HYAKUMACHI, M. Characterization and survival of *Rhizoctonia solani* AG-2-2 LP associated with Large Patch disease of Zoysia Grass. **Plant Disease**, v.83, n.8, p. 857-863, 1998.

BELBAHRI, L.; MCLEOD, A.; PAUL, B.; CALMIN, G.; MORALEJO, E.; SPIES, C. F. J.; BOTHA, W.J.; CLEMENTE, A.; DESCALS, E.; SNACHEZ-HERNANDEZ, E.; LEFOR, F. Intraespecific and within-isolate sequence variation in the ITSrRNA gene region of *Pythium mercurial* sp. nov. (Pythiaceae). **Fems. Microbiol. Lett.** v. 284, p. 17-27, 2008

BHARATHAN, N.; TAVANTZIZ, S. M. Genetic diversity of double strands RNA from *Rhizoctonia solani*, **Phytopathology**, v. 80, p 631-634, 1990.

BOINE, B. **A study of the interaction between the plant pathogenic *Botrytis cinerea* and the filamentous ssRNA mycoviruses *Botrytis vírus X* and *Botrytis vírus F***. Thesis of the requirements for the degree of doctor of philosophy in Biological Science, University of Auckland, New Zeland, 2012, 256 p.

BUCK, K.W. From interferon induction to fungal víruses. **European Journal of Epidemiology**, v.4, n.4, p395 – 399, 1988.

CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J.S., GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. SASM – Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, n.2, p. 18-24, 2001.

CASTANHO, B.; BUTLER, E. E.; SHEPARD, R. J. The association of double strain RNA with *Rhizoctonia* decline. **Phytopathology**, St. Paul, v. 68, p.1515-1519, 1978.

CERESINE, P. *Rhizoctonia solani*. Disponível em: <<http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Rhizoctonia/Rhizoctonia.html>>. Acesso em: 27 maio 2014.

CHARLTON, N.D.; CUBETA, M.A. Transmission of the M2 double-stranded RNA in *Rhizoctonia solani* Anastomosis Group 3 (AG-3). **Mycologia**, v. 99, p.859–867, 2007.

CHARLTON, N. D.; CARBONE, I.; TAVANTZIS, S. M.; CUBETA, M. A. Phylogenetic relatedness of the M2 double-stranded RNA in *Rhizoctonia* fungi. **Mycologia**, 100(4), p. 555–564, 2008.

CHIBA, S; SALAIPETH, L.; LIN, Y.; SASAKI, A. KANEMATSU, S.; SUZUKI, N. A novel bipartite dsRNA mycovirus from the white root rot fungus *Rosellinea necatrix*, molecular and

biological characterization, taxonomic considerations, and potential for biocontrol. **J. Virol.**, v. 83, p. 12801-12812, 2009.

CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 156-159, 1987.

DAS, S.; FALLOON, R. E.; STEWART, A.; PITMAN, A. R. Molecular characterization of an endornavírus from *Rhizoctonia solani* AG-3 PT infecting potato. **Fungal Biology**, v. 118, p. 924-934, 2014.

DAS, S.; SHAH, F. A.; BUTLER, R. C.; FALLOON, R. E.; STEWART, A.; RAIKAR, S.; PITMAN, A. R. Genetic variability and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* associated with black scurf of potato in New Zealand. **Plant Pathology**, v. 63, n. 3, p. 651 – 666, 2014.

DAS, S. ***Rhizoctonia solani* on potato in New Zeland: Pathogen characterization and identification of double-stranded RNA víruses that may affect their virulence.** Thesis of the requirements for the degree of doctor of philosophy, Lincoln University, Lincoln, New Zeland. 2013, 241p.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.1, p.19-21, 1983.

FENILLE, R. C. **Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado à soja no Brasil.** Dissertação para obtenção de título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração em Proteção de Plantas, Faculdade de Ciências Agronômicas– UNESP, Botucatu, Brasil. 2001, 138p.

FINKLER, A.; KOLTIN, Y.; BARASH, I.; SNEH, B.; POZNIAK, D. Isolation of a vírus from virulent strain of *Rhizoctonia solani*. **Journal. General Virology**, v. 66, p.1221-1232, 1985.

FLORES, R.; DURAN-VILA, N.; PALLÁS, V.; SEMANCIK, J.S. Detection of viroid and viroid-like RNAs from grapevines. **Journal of General Virology**, v. 66, p. 2095-2102, 1985.

GHABRIAL, S. A.; SUZUKY, N. Víruses of Plant Pathogenic Fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 47, p. 353-384, 2009.

GOBATTO, D.; CHAVES, A. L. R.; HAKAKAVA, R.; MARQUE, J. M.; DARÒS, J. A.; EIRAS, M. *Crhysantemum Stunt Viroid* in Brazil: survey, identification, biological and molecular characterization and detection methods. **Journal of Plant Pathology**, v. 96, p.1-9, 2013.

GODOY, L. J. G. de. **Adubação nitrogenada para produção de tapete de grama Santo Agostinho e Esmeralda.** Dissertação para obtenção de título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração em Agricultura, Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP, Botucatu, Brasil. 2005, 106 p.

HERRERO, N.; SÁNCHEZ, S.; ZABALGOGEAZCOA, I. Mycovíruses are common among different species of fungal endophytes of grasses. **Archives of Virology**, v.154, p.327-330, 2009.

HU, Z.; WU, S.; CHENG, J.; JIANG, D.; XIE, J. Molecular characterization of two positive-strand RNA viruses co-infecting a hypovirulent strain of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Virology**, v.450, p.464-465, 2014.

HYAKUMACHI, M.; MUSHIKA, T.; OGISO, Y.; TODA, T.; KAGEYAMA, K.; TSUGE, T. Characterization of new cultural type (LP) of *Rhizoctonia solani* AG 2-2 isolated from warm-season turfgrasses, and its genetic differentiation from other cultural types. **Plant Pathology**, v. 47, p. 1-9, 1998.

ICTV. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em: 01 maio 2014.

JIAN, J.; LAKSHMAN D. K.; TAVANTZIS, S. M. Association of distinct double-stranded RNAs with enhanced or diminished virulence in *Rhizoctonia solani* infecting potato. **Mol. Plant-Microbe Interactions**, v. 10, p.1002, 1997.

JIAN, J.; LAKSHMAN, D. K.; TAVANTZIS, S. M. A virulence-associated, 6, 4 Kb, double-stranded RNA from *Rhizoctonia solani* is phylogenetically related to plant bromoviruses and electron transport enzymes. **Mol. Plant-Microbe interactions**, v. 11, p. 601-609, 1998.

KAZUMINI, A. **Diversidade genética de *Rhizoctonia spp.* e análise de seqüências multilocos.** Dissertação para obtenção de título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração em Proteção de Plantas, Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP, Botucatu, Brasil. 2006, 110p.

KIM, J-M.; YUN, S-H.; PARK, S-M.; KO, H-G; KIM, S-H. Occurrence of dsRNA mycovirus (LeV-FMRI0339) in the edible mushroom *Lentinula edodes* and meiotic stability of LeV-FMRI0339 among monocaryotic progeny. **Plant Pathol. Journal**, v.29, n.4, p.460-464, 2013.

KING, A. M. Q.; ADMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. **Virus Taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** London: Elsevier/Academic Press, 2012.

KITAJIMA, E. W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. **Journal of Electron Microscopy**, v. 14, p. 119-121, 1965.

KURAMAE, E. E.; NOZAKI, D. N.; FENILLE, R. C.; CERESINE, P. C.; SOUZA, N. L. Elemento extra-cromossomal dsRNA em *Rhizoctonia solani* AG4 HGI e AG2-2 IIB e *Rhizoctonia spp.* binucleada associados às culturas de feijão e amendoim. **Summa Phytopathologica**, v.28, p. 52-57, 2002.

LAKSHMAN, D. K.; JIAN, J.; TAVANTZIS, S. M. A double-stranded RNA element from a hypovirulent strain of *Rhizoctonia solani* occurs in DNA form and is genetically related to the pentafuncional AROM protein of the shikimate pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 95, p. 6425-6429, 1998.

LAKSHMAN, D. K.; TAVANTZIS, S. M. Spontaneous appearance of genetically distinct double-stranded RNA elements in *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v. 84, p. 633-639, 1994.

LATIN, R. **A practical guide to turfgrass fungicides**. St. Paul, US: APS Press, 2011.

LI, W.; ZHANG, T.; SUN, H.; DENG, Y.; ZHANG, A.; CHEN, H.; WANG, K. Complete genome sequence of a novel endornavírus in the wheat sharp eyespot pathogen *Rhizoctonia cerealis*. **Arch. Virol.** v.159, p. 1213-1216, 2014.

MARTIN, S. B.; LUCAS, L. T. Characterization and Pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. and Binucleate *Rhizoctonia*-like fungi from turfgrass in North Carolina. **Phytopathology**, v. 74, n.2, p. 170-175, 1983.

MILGROOM, M. G.; HILLMAN, B. I. **The ecology and evolution of fungal viruses**. In: HURST, D. J. (Ed.) Studies in viral ecology: microbial and botanical host systems, vol.1, ed.1. John Wiley & Sons, Inc. 2011, cap. 9, p. 217-253.

NUSS, D. L. Hypovirulence: Mycovirus at the fungal-plant interface. **Nature Reviews**, v. 3, p. 632-642, 2005.

OBASA, K. C. **Ecology and management of Large Patch of Zoysiagrass caused by Rhizoctonia solani AG2-2LP**. Dissertation for the degree of doctor of philosophy, Kansas State University, Manhattan, USA. 2012. 117p.

PANNECOUCQUE, J.; HÖFTE, M. Detection of rDNA ITS polymorphism in *Rhizoctonia solani* AG-2-1 isolates. **Mycologia**, v.101, n.1, p.26-33, 2008.

PAPAVIZAS, G. C.; DAVEY, C. B. Isolation of *Rhizoctonia solani* Kuehn from naturally infested and artificially inoculated soils. **Plant Disease Reporter**, vol. 43, nº 3, p. 404-410, 1959.

PAPAVIZAS, G. C.; DAVEY, C. B. Isolation and Pathogenicity of *Rhizoctonia* saprophytically existing in soil. **Phytopathology**, vol. 52, p. 834-843, 1962.

PEARSON, M.; BEEVER, R.; BOINE, B.; ARTHUR, K. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v.10, p. 115-128, 2009.

REFOS, J. M.; VONK, A. G.; EADIE, K.; LO-TEN-FOE, J.; VERBRUG, H. A.; DIEPENINGEN, A. D.; SANDE, W. W. J. Double-stranded RNA mycovirus infection of *Aspergillus fumigatus* is not dependent on the genetic make-up of the host. **Plosone**, Acesso em: 22 out 2013.

ROOSSINCK, M. The good viruses: viral mutualistic symbioses. **Nature Reviews Microbiology**, v.9, p.99-108, 2011.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; CPULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 74, p. 5463 – 5467, 1977.

SANTOS, V. **Riqueza e alterações morfofisiológicas associadas à infecção por vírus de RNA dupla fita no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*** Dissertação para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração Entomologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, Brasil. 2013, 105p.

SCHMITT, M. J.; BREINING, F. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 4, p. 212-221, 2006.

SCHMITZ A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Anal. Biochem.**, vol. 354, p311-313, 2006.

SMILEY, R. W.; DERNOEDEN, P. H.; CLARKE, B. B. (Eds). **Compendium of Turfgrass Diseases**, St. Paul, US: APS Press, 2007.

STRAUSBAUGH, C. A.; EUJAYL, I. A.; PANELLA, L. W.; HANSON, L.E. Virulence, distribution, and diversity of *Rhizoctonia solani* from sugar beet in Idaho and Oregon. **Can. J. Plant Pathol.** v. 33, p. 210 – 226, 2011.

STRAUSS, E. E.; LAKSHMAN, D. K.; TAVANTZIS, S. M. Molecular characterization of the genome of a partitivirus from the basidiomycete *Rhizoctonia solani*. **Journal of General Virology**, v.81, p.549–555, 2000.

TAVANTZIS, S. M.; BANDY, B. P. Properties of a mycovirus from *Rhizoctonia solani* and its virion-associated RNA polymerase. **J. Gen.Virology**, v. 69, p. 1465-1477, 1988.

TAVANTZIS, S. M.; LAKSHMAN, D. K.; LIU, C. **Double-Stranded RNA elements modulating virulence in *Rhizoctonia solani***. In: dsRNA Elements - Concepts and Applications in agriculture, forestry and medicine. Boca Raton, FL: CRC Press, 2002, p. 191-211.

TIAGO, P.V.; FUNGARO, M. H.; de FARIA, M.R.; FURLANETO, M.C. Effects of double-stranded RNA in *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Paecilomyces fumosoroseus* on protease activities, conidia production, and virulence. **Can J Microbiol**, v. 50, n.5, p. 335-339, 2004.

TODA, T.; MUSHIKA, T.; HYAKUMACHI, M. Development of specific PCR primers for the detection of *Rhizoctonia solani* AG-2-2 LP from the leaf sheaths exhibiting large-patch symptom on zoysia grass. **FEMS Microbiology Letters**, v.232, 0.67-74, 2004.

TURINA, M.; ROSTAGNO, L. Virus-induced hypovirulence in *Cryphonectria parasitica*: still an unresolved conundrum. **Journal of Plant Pathology**, v. 89, p. 165-178, 2007.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ eds. PCR protocols, a guide to methods and applications. San Diego, California: Academic Press, 1990, p. 315-322.

WYLIE, S.; WILSON, C.R.; JONES, R.A.C. & JONES, M.G.K. A polymerase chain reaction assay for cucumber mosaic virus in lupin seeds. **Australian Journal Agricultural Research**, v.44, p.41-51, 1993.

YU, X.; LI, B.; FU, Y.; XIE, J.; CHENG, J.; GHABRIAL, S. A.; LI, G.; YI, X.; JIANG, D. A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 107, n 18, p. 8387-8392, 2010.

YU, X.; LI, B.; FU, Y.; JIANG, D.; GHABRIAL, S. A.; LI, G.; PENG, Y.; XIE, J.; CHENG, J.; HUANG, J.; YI, X. Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 110, n 4, p. 1452-1457, 2012.

XIE, J.; JIANG, D. New insights into mycoviruses and exploration for the biological control of crop fungal diseases. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 53, p.45-68, 2014.

ZANON, M. E. Situação atual e perspectivas do mercado de grama no Brasil. In: **V SIGRA-** Simpósio sobre gramados, 2010, Botucatu, Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP.

ZANON, M. E. O Mercado de gramas no Brasil, cadeia produtiva, situação atual e perspectivas. **I SIGRA-** Simpósio sobre gramados, 2003, Botucatu, Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP.

ZANZIGER, D.H.; BANDY, B.P.; TAVANTZIZ, S.M. High frequency of finding Double-stranded RNA in naturally occurring isolates of *Rhizoctonia solani*. **J. Gen. Virology**, v. 65, p 1601-1605, 1984.

ZHENG, L.; MEILING, Z.; QIGUANG, C.; MINGHAI, Z.; ERXUN, Z. A novel mycovirus closely related to virus in the genus *Alphapartitivirus* confers hypovirulence in the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. **Virology**, v. 456-457, p. 220-226, 2014.

ZIJIN, H.; SONGSONG, W.; JIASSEN, C.; YANPING, F.; DAOHONG, J.; JIATAO, X. Molecular characterization of two positive-strand RNA viruses co-infecting hypovirulent strain of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Virology**, v. 464-465, p. 450-459, 2014.

## ANEXO

### REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADOS NESTE TRABALHO

#### **Álcool 70%**

- 730ml álcool
- 270ml água destilada

#### **Meio ¼ BDA - Batata Dextrose Agar ¼ da concentração**

- 1L água destilada
- 50g batata
- 15g dextrose
- 14 g ágar
- 0,4g antibiótico streptomina

#### **Meio AA – Agar-Água**

- 1L água destilada
- 20 g de ágar

#### **Tris HCl 0,2M pH 8,9**

- 0,7 g Tris HCl para 400ml água destilada
- Adicionar o TrisHCl em volume menor de água, ajustar o pH com HCl
- Completar o volume com água até 400ml

#### **SDS5% (Sódio Dodecil Sulfato)**

- Dissolver 5g de SDS em 90 ml de água destilada
- Completar o volume para 100ml com água destilada

#### **SDS10%(sódio dodecil sulfato)**

- Dissolver 10 g de SDS em 90 ml de água destilada
- Completar o volume para 100 ml com água destilada

#### **STE10X**

- 200 ml NaCl 5M
- 100 ml TrisHCl
- 20 ml EDTA 500mM pH8
- Completar com água destilada até 1l

**STE1X**

Para 40 ml de solução

- 4 ml de STE10X
- 36 ml de água destilada

**STE1X 35%etanol**

Para 50 ml de solução

- 17,5 ml de etanol absoluto
- 32,5 ml de STE1X

**STE1X 16%etanol**

Para 50 ml de solução

- 8 ml de etanol absoluto
- 42 ml de STE1X

**Na acetato 3M**

Para 10 ml de solução

- 2,4612 g Na acetato
- 10 ml de água destilada

**Tampão TBE 10X**

- 216 g Tris
- 15 g Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O
- 110 g ácido bórico
- água destilada até completar 2 l
- não precisa ajustar o pH

**Tampão TBE 1X**

- 100 ml TBE10X
- 900 ml água

**Tampão TAE 10X**

- 242 g de Tris
- 57,1 ml de ácido acético glacial
- 37,2 g de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O
- Água destilada até completar 1 l

**Tampão TAE 1X**

- 100 ml TAE10X
- 900 ml água destilada

**Solução A**

- 146,25 g acrilamida
- 3,75 g bisacrilamida
- 500 ml água destilada

**PSA10% - Persulfato de amônio**

- 1 g de persulfato de amônio  $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$
- Completar o volume para 10 ml com água destilada
- Armazenar em alíquotas de 1 ml a  $-20^\circ\text{C}$

**Tampão de extração CTAB (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide)**

- 2 % de CTAB- 4g
- 100 mM Tris.Cl, pH 8,0 – 10 ml de solução estoque 2M
- 20 mM EDTA, pH 8,0 – 8 ml de solução estoque 0,5M
- 1,4 M NaCl – 16,36g
- Adicionar 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol antes de utilizar, porém é opcional para extração de fungos

**Clorofórmio:álcool-isoamílico**

- 10 ml de álcool isoamílico
- 290 ml de clorofórmio.
- Armazenar a  $4^\circ\text{C}$

**PGE 6000 50%****EDTA 0,5M**

- Adicionar 19,1 g de EDTA em 70 ml de água destilada
- Ajustar o pH para 8,
- Ajustar o volume para 100 ml com água destilada.

**NaCl 5M**

-292 g de NaCl

-Completar com água destilada até 1L