



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Avaliação de iniciadores específicos para detecção de
grupos de anastomose de *Rhizoctonia solani***

Lucas Correia Santana Amâncio

**Recife – PE
2018**

LUCAS CORREIA SANTANA AMÂNCIO

**AVALIAÇÃO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA
DETECÇÃO DE GRUPOS DE ANASTOMOSE DE
*RHIZOCTONIA SOLANI***

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFCA) – Orientador

Prof^a. Dr^a. Kamila Câmara Correia (UFCA) – Co-orientadora

Prof. Dr. Alexandre Reis Machado (UFPE) – Co-orientador

**RECIFE – PE
JULHO – 2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

A484a Amâncio, Lucas Correia Santana

Avaliação de iniciadores específicos para detecção de grupos de anastomose de
Rhizoctonia solani / Lucas Correia Santana Amâncio. – 2018.

61 f. : il.

Orientador(a): Sami Jorge Michereff.

Coorientadores: Kamila Câmara Correia; Alexandre Reis Machado.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, BR-PE, 2018.

Inclui referências e apêndice(s).

1. Fungos 2. Thanatephorus cucumeris 3. Anastomose 4. biologia molecular
5. Reação em cadeia da polimerase I. Michereff, Sami Jorge, orient. II. Correia,
Kamila Câmara, coorient. III. Machado, Alexandre Reis, coorient. IV. Título

CDD 632

**AVALIAÇÃO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA
DETECÇÃO DE GRUPOS DE ANASTOMOSE DE
*RHIZOCTONIA SOLANI***

LUCAS CORREIA SANTANA AMÂNCIO

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 31/07/2018

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFCA)

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr. Alice Maria Gonçalves Santos

Prof. Dr. Delson Laranjeira

**RECIFE – PE
JUNHO – 2018**

Meus pais Geraldo Amâncio e Cleide Correia

Minha irmã Maryana Correia

Minha madrinha Vera Correia

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, inicialmente, pelo dom da vida, por minha saúde e por ter colocado ótimas pessoas em minha vida.

Aos meus pais Geraldo Santana Amâncio e Cleide Correia Santana, pelo incentivo, pelo amor, pelos ensinamentos, pelas palavras de apoio e motivação e por nunca terem desistido de mim.

Agradeço a minha Irmã Maryana Correia e madrinha Vera Correia, pelos ensinamentos e palavras de incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sami Jorge Michereff, pelo esforço que constantemente teve para com seus alunos e integrantes da equipe do Laboratório de Epidemiologia de Doenças de Plantas da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela amizade, pela contribuição em me fazer uma pessoa melhor, pelos ensinamentos.

Aos meus co-orientadores, Prof. Dr. Alexandre Reis Machado e Prof^a. Dr^a. Kamila Câmara Correia pela grande ajuda e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos e integrantes do laboratório, Fabio Júnior, Kledson Mendes, Grazielle Lima, Ana Paula Barros, Tamiris Joana e Gleiciellen Silva.

Aos meus amigos e colegas de turma, Mariana, Carmem, Alba, Claudeane, Gabriele, Carol, Roberto, Emanuel, Jeferson, Leandro, Risoneíde, Rezanio e todos os demais alunos do Mestrado e Doutorado em Fitopatologia da UFRPE pelos momentos compartilhados.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFRPE pelos ensinamentos transmitidos.

A Universidade federal do Pernambuco (UFPE).

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

Finalmente, a todos que de uma forma ou de outra fizeram parte desta conquista.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO GERAL	viii
GENERAL ABSTRACT	ix
CAPÍTULO I – Introdução Geral	10
Referências Bibliográficas	21
CAPÍTULO II – Polymerase chain reaction with specific primers for detection of anastomosis groups of <i>Rhizoctonia solani</i> reveal nonspecificity	28
Abstract	30
Introduction	30
Materials and methods	32
Results and discussion	34
Acknowledgments	37
Compliance with ethical standards	37
References	37
CONCLUSÕES GERAIS	56
NORMAS DO PERIÓDICO	58

RESUMO GERAL

O gênero *Rhizoctonia* é formado por grupos de indivíduos relacionados, mas geneticamente distintos agrupados com base em características moleculares e um método clássico de compatibilidade vegetativa, denominados grupos de anastomose (AGs). Nesse contexto, vários iniciadores específicos baseados na região do espaçador interno transcrito (ITS) já foram desenvolvidos para discriminar AGs e seus subgrupos no complexo de espécies de *Rhizoctonia*, mas inexistem estudos da eficácia desses iniciadores considerando um grande número de AGs conhecidos. Portanto, o objetivo deste trabalho, foi avaliar a eficácia de iniciadores específicos para detecção dos quatro predominantes AGs de *Rhizoctonia solani* predominantes em nível mundial (AG-1 IA, AG-1 IB, AG-2-1, AG-3 PT, AG-3 TB, AG-4 HGI e AG-4 HGII). Inicialmente o DNA genômico de treze isolados de *R. solani* e sete de *Rhizoctonia* binucleado pertencentes a diferentes AGs foram extraídos e quantificados. A região ITS do DNA ribossômico destes isolados foi sequenciada utilizando iniciadores universais (ITS1 e ITS4) para confirmar a identidade dos AGs. As relações filogenéticas foram analisadas pelo método de máxima verossimilhança individualmente. Os isolados de *R. solani* e *Rhizoctonia* binucleada juntamente com espécies fúngicas não relacionadas utilizadas como controle negativo (*Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotium rolfsii*) foram testados simultaneamente com cada conjunto de iniciadores descrito acima. A identidade de todos os AGs de *R. solani* e *Rhizoctonia* binucleadas foram confirmados através de análises filogenéticas das sequências da região ITS. Os resultados das análises de PCR mostraram que todos os conjuntos de iniciadores amplificaram outros AGs sob as condições indicadas e muitos destes iniciadores produziram amplificações para espécies fúngicas não relacionadas com *R. solani*. Concluímos que o exclusivo uso destes iniciadores não é indicado para detecção de AGs, visto a grande diversidade intra e interespecífica das espécies de *Rhizoctonia*. Portanto é de grande importância o desenvolvimento de novos iniciadores baseado em regiões gênicas mais variáveis considerando o número de AGs atualmente conhecidos.

Palavras-chave: AGs, detecção molecular, reação PCR, teste de iniciadores específicos, *Thanatephorus cucumeris*.

GENERAL ABSTRACT

The genus *Rhizoctonia* is composed of groups of related but genetically distinct individuals grouped on the basis of molecular characteristics and a classical method of vegetative compatibility, called anastomosis groups (AGs). In this context, several specific primers based on the transcribed internal spacer (ITS) region have already been developed to discriminate AGs and their subgroups in the *Rhizoctonia* species complex, but there are no studies of the efficacy of these primers considering a large number of known AGs. Therefore, the objective of this work was to evaluate the efficacy of specific primers for the detection of the four predominant *Rhizoctonia solani* AGs worldwide (AG-1 IA, AG-1 IB, AG-2-1, AG-3 PT, AG-3 TB, AG-4 HGI e AG-4 HGII). Initially the genomic DNA of thirteen isolates of *R. solani* and seven of binucleated *Rhizoctonia* belonging to different AGs were extracted and quantified. The ITS region of the ribosomal DNA of these isolates was sequenced using universal primers (ITS1 and ITS4) to confirm the identity of the AGs. Phylogenetic relationships were analyzed by the maximum likelihood method individually. The isolates of *R. solani* and binucleate *Rhizoctonia* together with unrelated fungal species used as negative control (*Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotium rolfsii*) were tested simultaneously with each set of primers described above. The identity of all AGs from *R. solani* and binucleated *Rhizoctonia* were confirmed by phylogenetic analysis of the sequences ITS region. The results of the PCR analyzes showed that all primer sets used amplified other AGs under the conditions indicated and most these primers produced amplifications for unrelated fungal species with *R. solani*. We conclude that the exclusive use of these primers is not indicated for the detection of AGs, since the great intra and interspecific diversity of *Rhizoctonia* species. Therefore, is very important to develop new specific primers based in gene regions more variables for AGs detection considering the number of AGs currently known.

Key-words: AGs, molecular detection, PCR reaction, specific primers test, *Thanatephorus cucumeris*.

Capítulo I

Introdução Geral

AVALIAÇÃO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA DETECÇÃO DE GRUPOS DE ANASTOMOSE DE *RHIZOCTONIA SOLANI*

INTRODUÇÃO GERAL

1. Gênero *Rhizoctonia*

O gênero *Rhizoctonia* DC. pertence ao domínio Eukarya, reino Fungi, subreino Dikarya, filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, classe Agaricomycetes, ordem Ceratobasidiaceae e família Cantharellales (AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2018). Esse gênero foi proposto por De Candolle, em 1815, designando *R. crocorum* (Pers.) DC. como espécie-tipo. Posteriormente, em 1858, Julius Kühn descreveu *R. solani* [teleomorfo = *Thanatephorus cucumeris* Frank (Donk)] como espécie-tipo (ANDERSON, 1982; OGOSHI, 1987). Em 1970 foi efetuada uma revisão de *Rhizoctonia*, sendo que as características de *R. solani* passaram a definir esse gênero (PARMETER JR.; WHITNEY, 1970; OGOSHI, 1975). Com base nessa nova revisão, o gênero possui como características: ramificação em ângulo reto próxima ao septo distal em hifas jovens; presença de um septo na ramificação da hifa próximo do seu ponto de origem; presença de septos do tipo doliporo; ramificações de hifas que são concêntricas em sua extremidade basal; ausência de grampos de conexão; ausência de conídios; tecido esclerocial não diferenciado em membrana, córtex e medula; ausência de rizomorfas (CARLING; SUMNER, 1992; OGOSHI, 1987; PARMETER JR.; WHITNEY, 1970; SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991).

Além da grande diversidade existente neste grupo, com aproximadamente 120 espécies já identificadas desde a constatação do gênero, a taxonomia convencional de *Rhizoctonia*, que utiliza características como o tamanho, forma, coloração e septação das estruturas de reprodução assexual e sexual, tem limitações para ser aplicada em todas as situações (OGOSHI, 1996).

Diversos critérios podem ser utilizados para diferenciar espécies de *Rhizoctonia*, entre estes, inclui a contagem do número de núcleos por célula, grupo de anastomose, morfologia do teleomorfo e por meio de características bioquímicas e moleculares (AGARWAL, 2010; GONZÁLEZ-GARCÍA; ONCO; SUSAN, 2006; KUNINAGA, 2002; OGOSHI, 1996; SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991; YANG; LI, 2012).

A quantificação do número de núcleos nas células das hifas tem fundamental importância na identificação de *Rhizoctonia*, haja vista a separação das espécies em dois

principais grupos: *Rhizoctonia* multinucleada (MNR) e *Rhizoctonia* binucleada (BNR) (AGARWAL, 2010; AIELLO et al., 2017; GONZÁLEZ-GARCÍA; ONCO; SUSAN, 2006; KUNINAGA, 2002; PARMETER JR.; WHITNEY, 1970; SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991). As espécies multinucleadas incluem *R. solani*, *Rhizoctonia zeae* Voorhees e *Rhizoctonia oryzae* Ryker, sendo a primeira considerada a espécie mais importante como patógeno de planta. O segundo grupo compreende as espécies binucleadas, que incluem *Rhizoctonia callae* E. Castell, *Rhizoctonia cerealis* Van Der Hoeven, *Rhizoctonia endophytica* Saksena & Vaartaja, *Rhizoctonia fragariae* S. Husain & W.E. McKeen, *Rhizoctonia fumigata* S. Gunnell & R.K. Webster, *Rhizoctonia ramicola* W.A. Weber & D.A. Roberts, *Rhizoctonia oryzae-sativae* (Sawada) Mordue, *Rhizoctonia repens* Bernard e *Rhizoctonia anaticula* Currah, (SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991).

Os teleomorfos de *Rhizoctonia* pertencem ao filo Basidiomycota, classe Agaricomycetes e os principais teleomorfos são *Thanatephorus* Donk., *Ceratobasidium* Rogers, *Waitea* Warcup & Talbot e *Tulasnella* Schröter. Entre as espécies multinucleadas, *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk. (teleomorfo de *R. solani*), *Waitea circinata* Warcup & Talbot (teleomorfo de *R. zeae* e *R. oryzae*). Entre as espécies binucleadas, *R. repens* e *R. oryzae-sativae*, associam-se a várias espécies de *Ceratobasidium*, como *Ceratobasidium cornigerum* (Bourdot) D.P. Rogers, *Ceratobasidium gramineum* (Ikata & T. Matsuura) e *Ceratobasidium oryzae-sativae* P.S. Gunnell & R.K. Webster, ou ainda, a *Tulasnella* (CARLING; SUMNER, 1992; GONZÁLEZ-GARCÍA; ONCO; SUSAN, 2006; OGOSHI, 1987; SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991).

2. Biologia e controle de *Rhizoctonia*

Considerado um fungo cosmopolita, espécies de *Rhizoctonia* encontram-se distribuídas em grande parte dos solos agrícolas do mundo (MORDUE, 1974). Espécies de *Rhizoctonia* causam importantes doenças radiculares e foliares em uma ampla variedade de plantas cultivadas, incluindo fruteiras, pastagens, espécies florestais e plantas ornamentais, e possuem uma elevada capacidade saprofítica, que viabiliza sua sobrevivência na matéria orgânica morta no solo (AGARWAL, 2010; FARR; ROSSMAN, 2018; OGOSHI, 1996; PATIL; SOLANKI, 2016; SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991; YANG; LI, 2012).

Na ausência de plantas hospedeiras, os propágulos de *Rhizoctonia* viabilizam sua sobrevivência no solo por longos períodos. Isso ocorre na forma de hifas com paredes espessas, junto a restos culturais e outros detritos orgânicos, bem como na forma de estruturas

de sobrevivência, denominadas esclerócios, especialmente nas partes superficiais do solo (SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991; VAN BRUGGEN; ARNESON, 1986).

Na presença de exsudatos radiculares, liberados pelas raízes das plantas, ricas em substâncias atrativas, tais como aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, substâncias proteicas e fenóis, o micélio germina a partir do esclerócio e cresce em direção ao hospedeiro. Após o primeiro contato, ocorre o crescimento direcional sobre as células da rizoderme. As hifas se ramificam formando almofadas de infecção, auxiliando na fixação do fungo ao tecido do hospedeiro antes da penetração ativa (KEIJER, 1996). Além da penetração ativa, *Rhizoctonia* também pode penetrar passivamente no hospedeiro. Porém, isso dificilmente ocorre, ficando limitada às infecções foliares (KEIJER, 1996; WEINHOLD; SINCLAIR, 1996). Enzimas líticas, tais como cutinases, pectinases e xilases facilitam o processo de penetração do patógeno nos tecidos do hospedeiro (WEINHOLD; SINCLAIR, 1996). No entanto, a pressão hidrostática também contribui de forma importante nessa etapa (DEMIRCI; DÖKEN, 1998). Após a penetração, o fungo coloniza os tecidos inter e intracelulares, resultando nos sintomas, tais como lesões necróticas nas partes aéreas da planta, raízes, estolões e, principalmente, no tombamento de plantas jovens (AGARWAL, 2010; BAKER, 1970; OGOSHI, 1987; PATIL; SOLANKI, 2016).

Rhizoctonia é um típico habitante do solo, provocando comumente doenças radiculares. Contudo, sob determinadas circunstâncias, como elevada umidade relativa do ar, pode atacar as partes aéreas de plantas. Os hospedeiros ou órgãos infectados por *Rhizoctonia* podem manifestar diferentes sintomas, tais como podridões e cancos de caules e raízes, tombamento de pré e pós-emergência, queima e morte de plantas, podridões em tubérculos, degeneração de frutos e grãos, além de manchas e queima das folhas e brotos, na parte aérea (AGARWAL, 2010; AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2018; BAKER, 1970; OGOSHI, 1987; PATIL; SOLANKI, 2016).

Doenças causadas por *Rhizoctonia* são de difícil controle, haja vista sua elevada agressividade, associada a sua eficiente habilidade de competição saprofítica, possibilidade de sobrevivência no solo sem a presença de um hospedeiro potencial, facilidade de transmissão via sementes e ampla gama de hospedeiros (AGARWAL, 2010; CUBETA; VILGALYS, 2000; LEACH; GARBER, 1970; OGOSHI, 1987). Sabe-se que cultivares/variedades comerciais com grau de resistências aceitável a rizoctoniose não são disponíveis, a rotação de cultura é pouco eficiente e o controle químico é ineficiente, economicamente inviável e de elevado impactos ambientais (AGARWAL, 2010). Resistência do hospedeiro em função da reação contra fitopatógenos necrotróficos, tal como *Rhizoctonia*, não tem sido tarefa fácil.

Isso ocorre devido às múltiplas formas pelos quais eles desempenham o processo patogênico, através da rápida indução de enzimas, anulação dos mecanismos de defesas do hospedeiro, síntese de toxinas e outros efetores (OKUBARA; PAULITZ, 2005).

O uso de agentes biocontroladores é uma alternativa para o controle de *Rhizoctonia* (DAVID et al., 2018; COELHO et al., 2018), destacando-se bactérias do gênero de *Bacillus* (HUANG et al., 2012; GUO et al., 2014; KHEDHER et al., 2015; MARTINS et al., 2018) e *Pseudomonas* (especialmente as fluorescentes) (NAGARAJKUMAR et al. 2004), bem como espécies de fungos do gênero *Trichoderma* (REITHNER et al. 2007; OLIVEIRA et al., 2012).

3. Grupos de anastomose de *Rhizoctonia*

O gênero *Rhizoctonia* é constituído por indivíduos agrupados com base em características morfológicas, patológicas, fisiológicas, moleculares e em uma reação de compatibilidade vegetativa, baseada na anastomose de hifas entre representantes de mesmo grupo ou incompatibilidade somática entre indivíduos de grupos distintos (AGARWAL, 2010; GONZÁLEZ-GARCÍA; ONCO; SUSAN, 2006; KUNINAGA, 2002; OGOSHI, 1987; OGOSHI, 1996).

A compreensão de grupo de anastomose (AG) tem grande importância para o gênero *Rhizoctonia*, pois constitui um grupo de isolados relacionados capazes de auto-reconhecimento por meio da fusão entre hifas (reação de anastomose). Isto é, hifas de isolados pertencentes ao mesmo AG são conectadas por meio da fusão umas às outras, ao passo que isolados de diferentes AGs não manifestam esse comportamento (OGOSHI, 1987). O pareamento das hifas para a anastomose tem sido aplicada para caracterizar isolados de *R. solani*, *R. zae*, *R. oryzae* e *R. repens*, espécies binucleadas de *Rhizoctonia* e isolados de *Rhizoctonia* com o teleomorfo pertencente ao gênero *Waitea* (AGARWAL, 2010; CARLING, 1996; GONZÁLEZ-GARCÍA; ONCO; SUSAN, 2006; SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991; PATIL; SOLANKI, 2016; YANG; LI, 2012). A importância da determinação dos AGs é devido ao fato de que cada grupo pode ser considerado uma unidade evolucionária, pois representam populações geneticamente isoladas e não intercruzáveis (ANDERSON, 1982; CARLING, 1996).

Determinados AGs têm sido divididos em subgrupos, chamados grupos intra-específicos (ISGs) (OGOSHI, 1987). O conceito de ISGs é fundamentado em evidências de reações de anastomose, patogenicidade, morfologia, requerimento de vitaminas, taxa de

crescimento micelial, temperatura ótima de crescimento, tipo de esclerócios produzidos e gama de hospedeiros (OGOSHI, 1987, 1996; SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991). No entanto, a distinção clara entre ISGs não é fácil, quando se baseia apenas na reação de anastomose (GONZÁLEZ-GARCÍA; ONCO; SUSAN, 2006; YANG; LI, 2012).

Pesquisas atuais indicam um grande complexo de espécies existente nos AGs e subgrupos de *Ceratobasidium* e de *Thanatephorus* com anamorfos de *Rhizoctonia*, composta de diversas linhagens geneticamente diferentes, mas morfológicamente inseparáveis (CERESINI, 2014). Os subgrupos possivelmente representam as unidades evolutivas mais recentes, onde provavelmente indicam populações dentro de um AG. *Ceratobasidium* e *Thanatephorus* filogeneticamente constituem gêneros próximos, embora ainda exista necessidade de resolver esta relação filogenética existente (GÓNZALEZ et al., 2016; DAVID et al., 2018).

Por muito tempo, a classificação dos AGs de *Rhizoctonia* foi baseada simplesmente pelo pareamento de hifas utilizando isolados testadores (CARLING, 1996; KUNINAGA, 2002; SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991). Contudo, diversos problemas já foram identificados com a utilização desse método. Dessa forma, com o advento da biologia molecular, variadas ferramentas vem sendo utilizadas para determinação precisa e alocação dos isolados de *R. solani* e *Rhizoctonia* binucleada nos AGs, incluindo reação da cadeia polimerase (PCR) da região espaçadora transcrita interna (ITS) do DNA ribossômico (rDNA), hibridização DNA/DNA, gel de eletroforese em campo pulsado, polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD), polimorfismo do comprimento dos fragmentos restringidos (RFLP) e polimorfismo do comprimento dos fragmentos amplificados (AFLP) região amplificada de sequência caracterizada (SCAR), Sequências simples repetidas (SSR) e isoenzimas (AGARWAL, 2010; GONZÁLEZ-GARCÍA; ONCO; SUSAN, 2006; LAKSHMAN et al., 2016).

Dentre essas técnicas, o estudo da região ITS é a mais utilizada por oferecer suporte filogenético molecular aceitável para maioria dos AGs e subgrupos de *Rhizoctonia* (AGARWAL, 2010; ARAKAWA; INAGAKI, 2014; CERESINI, 2014; CUBETA; VILGALYS, 2000; DAS et al., 2014; GONZÁLEZ-GARCÍA; ONCO; SUSAN, 2006; KUNINAGA, 2002; LÜBECK, 2004; MUZHINJI et al., 2015; PATIL; SOLANKI, 2016; SHARON et al., 2006, 2008). Nesse sentido, sabe-se que a região ITS possui um grande número de cópias de rDNA presentes por genoma, tal como relativa alta variação interespecífica (espécies diferentes) e baixa variação intraespecífica (mesma espécie) (KUNINAGA, 2002; KUNINAGA et al., 2000; MUZHINJI et al., 2015). Além disso, quando

comparado ao método de agrupamento baseado no pareamento de hifas, as técnicas moleculares são mais precisas e menos desafiadoras tecnicamente (KUNINAGA, 2002; KUNINAGA et al., 2000; MUZHINJI et al., 2015). O estudo da região ITS tem sido uma ferramenta útil para classificação de *R. solani* e *Rhizoctonia* binucleada, haja visto alguns estudos comprovarem sua utilidade na alocação de isolados em determinados AGs (SHARON et al., 2006, 2008). Além destes, a análise da subunidade grande (LSU) do DNA ribossômico e dos genes β -tubulina (BT) e segunda maior subunidade do RNA polimerase II (RPB2) também têm fornecido suporte filogenético para maioria desses grupos (CUBETA et al. 1996; KUNINAGA et al. 1997; GONZÁLEZ-GARCÍA; ONCO; SUSAN, 2006; GÓNZALEZ et al., 2016; SHARON et al. 2006, 2008).

Até o momento, existem 13 AGs em *R. solani* somaticamente incompatíveis já identificados, denominados AG-1 a AG-13 (AGARWAL, 2010; ARAKAWA; INAGAKI, 2014; CARLING, 1996; CERESINI, 2014; GONZÁLEZ-GARCÍA; ONCO; SUSAN, 2006; GÓNZALEZ et al., 2016; INOKUT et al., 2018; PATIL; SOLANKI, 2016; SHARON et al., 2006, 2008; TSROR, 2010; YANG; LI, 2012). Atualmente, já foram relatados cinco ISGs dentro do AG-1 (AG-1-IA, AG-1-IB, AG-1-IC, AG-1-ID e AG-1-IF), oito dentro do AG-2 (AG-2-1, AG-2-2-IIIB, AG-2-2-IV, AG-2-2-HB, AG-2-2-LP, AG-2-3, AG-2-4 e AG-2-BI), dois dentro de AG-3 (PT e TB), três dentro do AG-4 (HG-I, HG-II e HG-III), dois dentro do AG-6 (HG-I e GV) e dois dentro do AG-9 (TP e TX) (CERESINI, 2014; GODOY-LUTZ et al., 2008; GÓNZALEZ et al., 2016; SHARON et al., 2006, 2008; YANG; LI, 2012, DAVID et al., 2018). Quanto à distribuição, existem indícios que somente os quatro primeiros grupos (AG-1, AG-2, AG-3 e AG-4) têm predominância mundial, sendo identificados na maioria dos agroecossistemas do mundo (CARLING, 1996; CERESINI, 2014; GONZÁLEZ-GARCÍA; ONCO; SUSAN, 2006).

Dentre os complexos de espécies existentes, certamente *R. solani*, juntamente com as demais espécies multinucleadas, são as mais estudadas em nível mundial, justificado pela capacidade de causarem impactos econômicos em uma ampla gama de plantas cultivadas. Na Tabela 1 são apresentados os AGs, ISGs e plantas hospedeiras de *R. solani* relatados em nível mundial.

No que se refere à *Rhizoctonia* binucleada, já foram identificados 18 AGs, com teleomorfo em *Ceratobasidium*, denominados AG-A a AG-W (AIELLO et al., 2017; YANG et al., 2015). Porém, sabe-se que AG-J, AG-M e AG-N foram excluídos de *Rhizoctonia*, isolados representativos de AG-M foram perdidos, AG-T e AG-U foram reclassificados subsequentemente como AG-A e AG-P (SHARON et al., 2008), enquanto AG-V e AG-W

foram recentemente reportados (AIELLO et al., 2017; DONG et al., 2017; YANG et al., 2015). São relatados três ISGs dentro do AG-B (AG-Ba, AG-Bb e AG-B(o)) e três dentro do AG-D (I, II e III) (YANG; LI, 2012; YANG et al., 2015). Na Tabela 2 são apresentados os AGs, ISGs e plantas hospedeiras de *Rhizoctonia* binucleada relatados em nível mundial.

Tabela 1. Grupos de anastomose de *Rhizoctonia solani* e plantas hospedeiras (adaptado de CERESINI, 2014; INOKUTI, 2016; YANG; LI, 2012).

AGs	ISGs	Plantas hospedeiras
AG-1	IA	feijão-caupi, soja, arroz, milho, sorgo, braquiária, gramados, cânfora
	IB	alface, batata, repolho, feijão-comum, soja, arroz, café, hortênci
	IC	eucalipto
	ID	cenoura, soja, trigo, eucalipto, pinheiro
	IF	feijão-comum, pimenta-do-reino, maracujá, café
		IF
AG-2	1	alho-porro, batata, couve-flor, nabo, morango, café, íris, lírio, tulipa, pinheiro
	2-IIIB	beterraba açucareira, feijão-comum, gengibre, taro, soja, arroz, milho, gramados, crisântemo, gradíolo, junco,
	2-IV	berinjela, beterraba açucareira, cenoura, pimentão, feijão comum, gramados
	2-HB	seringueira, maracujá
	2-LP	arroz, gramados
	3	soja
	4	cenoura, milho
	BI	não patogênico
		BI
AG-3	PT	batata, berinjela, tomate
	TB	fumo
AG-4	HG-I	abóbora, batata, beterraba, beterraba açucareira, brócolis
AG-4	HG-II	cebola, ervilha, espinafre, melão, tomate, taro, mamona,
AG-4	HG-III	amendoim, ervilha, feijão-comum, feijão-caupi, soja, algodão canola, trigo, fumo, alfafa, tremoço, braquiária, crisântemo, gerânio, eucalipto, pinheiro, jambú, urucum, caruru, beldroega, juá-de-capote, maria-pretinha
AG-5		batata, beterraba, beterraba açucareira, morango, feijão comum soja, trigo, centeio, tremoço, grão-de-bico, macieira, gramados
AG-6	HG-I	cenoura, trigo, macieira, cravo
	GV	Não patogênico
AG-7		batata, melancia, rabanete, algodão, soja, cravo
AG-8		batata, pimentão, trigo, centeio
AG-9	TP	batata
	TX	repolho, couve-flor, trigo, centeio
AG-10		Não patogênico
AG-11		soja, trigo, centeio, tremoço
AG-12		couve-flor, rabanete
AG-13		Não patogênico

Tabela 2. Grupos de anastomose para o complexo de espécies binucleada de *Rhizoctonia* (adaptado de INOKUTI, 2016; YANG; LI, 2012; YANG et al., 2015).

AG	ISGs	Hospedeiros
AG-A		alface, batata, beterraba, espinafre, morango, tomate, melão, pepino, ervilha, feijão-comum, girassol, macieira
AG-B	a	arroz, milheto, capim-arroz
	b	
	(o)	
AG-C		beterraba, trevo, trigo, orquídea (simbiose)
AG-D	I	batata, beterraba, cebola, ervilha, feijão-comum, soja, trigo,
	II	cevada, milheto, trevo
	III	
AG-E		alface, cebola, beterraba, amendoim, ervilha, feijão-caupi feijão-comum, soja, centeio, pinheiro, orquídea (simbiose)
AG-F		Alface, cebola, morango, rabanete, tomate, amendoim, feijão comum algodão, taro
AG-G		beterraba, ervilha, melão, morango, tomate, girassol, macieira
AG-H		orquídea (simbiose)
AG-I		beterraba, morango, trigo, macieira, orquídea (simbiose)
AG-K		alho, beterraba, cebola, cenoura, morango, rabanete, tomate, milho, trigo, pereira
AG-L		não patogênico
AG-O		macieira
AG-P		chá
AG-Q		gramados
AG-R		alface, batata, cebola, rabanete, tomate, amendoim, feijão-caupi, feijão comum, feijão-fava, soja, azálea
AG-S		trigo, cevada, azálea
AG-V		gingibre
AG-W		batata

O conhecimento dos AGs e ISGs tem grande relevância na compreensão da diversidade genética de *Rhizoctonia*, haja vista as possíveis interferências epidemiológicas dessa diversidade no manejo das doenças causadas por esse fitopatógeno (AGARWAL, 2010; ANDERSON, 1982; OGOSHI, 1987; GODOY-LUTZ et al., 2008; SHARMA-POUDYAL et al., 2015; TSROR, 2010). Representantes de diferentes AGs de *Rhizoctonia* podem responder de diferentes formas às medidas de controle (CAMPION et al., 2003; KATARIA; GISI, 1996, 1999; ÖZER; BAYRAKTAR, 2015), fortalecendo a necessidade de formas adequadas e

precisas para identificação dos AGs dos isolados (GÓNZALEZ et al., 2016; PATIL; SOLANKI, 2016; VAN BENEDEN et al., 2009).

4. Iniciadores específicos para detecção de grupos de anastomose (AG) de *Rhizoctonia*

Ferramentas moleculares para o diagnóstico de doenças causadas por *Rhizoctonia* estão avançando rapidamente pela integração de análises fenotípicas e moleculares. Análises bem apuradas da região ITS do rDNA fornecem diferenças genéticas de AGs e ISGs (SHARON et al. 2008), e essas distinções são aplicadas ao desenho de marcadores moleculares para diferenciar grupos e subgrupos de *Rhizoctonia* (ARAKAWA; INAGAKI, 2014).

Entretanto, no que diz respeito à região ITS em *Rhizoctonia*, heterogeneidades presente na sequência ITS em um único isolado tem sido evidenciada como característica comum (AHVENNIEMI et al., 2009; ARAKAWA; INAGAKI, 2014; BOYSEN et al., 1996; JUSTESEN et al., 2003; PANNECOUCQUE; HOFTE, 2009). Isso tem gerado redução na qualidade do sequenciamento direto, pois produtos de PCR obtidos a partir dessas inserções heterogêneas, em função de substituições ou deleções de alguns nucleotídeos de regiões variáveis de ITS1 e ITS2, acabam causando trocas nos pontos de leitura da fita molde de DNA durante as reações de sequenciamento. Dessa forma, uma alternativa para evitar o problema da heterogeneidade na sequência de ITS em um único isolado, seria a clonagem de genes (ARAKAWA; INAGAKI, 2014). No entanto, devido ao elevado custo, em muitas situações o uso da clonagem torna-se restritivo, havendo a necessidade do desenvolvimento de outras ferramentas de detecção molecular, dentre as quais os iniciadores específicos.

Iniciadores são sequências responsáveis pelo processo de síntese e correspondem a curtas cadeias complementares à região inicial (primer forward) e região final (primer reverse) da sequência que se deseja copiar, denominada sequência-alvo. Em uma mesma reação de PCR, iniciadores e sequência-alvo, à qual deve estar na forma desnaturada, ou seja, fita simples, se ligam por complementaridade entre suas bases. Para que a nova molécula seja sintetizada, a enzima DNA polimerase utiliza a sequência-alvo como molde e, segundo o princípio da complementaridade entre as bases, adiciona novos nucleotídeos aos iniciadores. No final da reação, a sequência específica será acumulada em bilhões de cópias (LORENZ, 2012). Um iniciador é específico se ele amplifica apenas o DNA alvo para a qual ele foi projetado (GARG et al. 2008). Iniciadores inespecíficos acarretam na amplificação de fragmentos de DNA não correspondentes à região-alvo (MAED et al., 2014).

Vários iniciadores específicos baseados nas regiões ITS ou separadoras intergenéricas foram desenvolvidos para discriminar AGs e seus subgrupos no complexo de espécies de *Rhizoctonia*, incluindo teleomorfos em *Thanatephorus*, *Ceratobasidium* e *Waitea* (ARAKAWA; INAGAKI, 2014; CARLING; KUNINAGA; BRAINARD, 2002; GODOY-LUTZ et al., 2008; GROSCH et al., 2007; JAAFAR et al., 2016; JOHANSON et al., 1998; JUSTESEN et al., 2003; KUNINAGA, 2003; LEES et al., 2002; MATSUMOTO, 2002; OKUBARA; SCHROEDER; PAULITZ, 2008; SALAZAR; JULIAN; RUBIO, 2000; SAYLER; YANG, 2007; TODA et al., 2004; WOODHALL et al., 2013; ZHAO et al., 2014). Estes iniciadores são úteis não só para a genotipagem de AGs e subgrupos, mas também para diagnosticar doenças causadas por *Rhizoctonia* e para detectar esses patógenos em materiais vegetais e no solo (ARAKAWA; INAGAKI, 2014).

Nos últimos anos, em diversas situações os iniciadores específicos têm sido efetivos na caracterização dos AGs e seus subgrupos no complexo *Rhizoctonia* (FERRUCHO et al., 2012; KHODAYARI; SAFAIE; SHAMSBAKHSH, 2009; MISAWA et al., 2015; MISAWA; KUROSE; KUNINAGA, 2017; MORA-UMAHÑA et al., 2013; YANG et al., 2017). A combinação de conjuntos de primers pode ser utilizada para a detecção e identificação específica de AGs. No entanto, para alocação precisa de AGs conhecidos e desconhecidos em isolados recém-coletados de *Rhizoctonia* é necessária a determinação de suas reações de anastomose com isolados testadores para confirmação das informações da sequência de nucleotídeos. Desenvolvimento de iniciadores específicos e sondas para AGs e subgrupos de *Rhizoctonia* spp. para o uso em métodos de PCR convencional e PCR em tempo real (Q-PCR) facilita a identificação e quantificação desses patógenos em amostras agrícolas (LEES et al., 2002; OKUBARA; SCHROEDER; PAULITZ, 2008; SAYLER; YANG 2007).

Embora os iniciadores específicos para discriminar AGs e seus subgrupos no complexo de espécies de *Rhizoctonia* tenham sido desenvolvidos, inexitem estudos de eficácia desses iniciadores considerando um grande número de isolados com AGs conhecidos. Evidências em alguns estudos mostram que iniciadores específicos podem não ser totalmente eficazes para detecção de AGs e ISGs (MATSUMOTO, 2002; SALAZAR; JULIAN; RUBIO, 2000), tendo em vista a quantidade de grupos e subgrupos descobertos nos últimos anos (ALAEI et al., 2017; DONG et al., 2017; GAINO et al., 2010; YANG et al., 2015). Dessa forma, o objetivo dessa dissertação foi avaliar a eficácia de iniciadores específicos para detecção dos quatro AGs de *R. solani* predominantes em nível mundial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, D. K. *Rhizoctonia* D.C.: taxonomy, ecology and management. In: MUKERJI, K. G.; MANOHARACHARY, C. (Eds.). **Taxonomy and ecology of Indian fungi**. New Delhi: I. K. International Publishing House, 2010. p. 19-50.
- AHVENNIEMI, P.; WOLF, M.; LEHTONEN, M. J.; WILSON, P.; GERMAN-KINNARI, M.; VALKONEN, J. P. Evolutionary diversification indicated by compensatory base changes in ITS2 secondary structures in a complex fungal species, *Rhizoctonia solani*. **Journal of Molecular Evolution**, London, v. 69. n. 2, p. 150-163, 2009.
- AIELLO, D.; GUARNACCIA, V.; FORMICA, P. T.; HYAKUMACHI, M.; POLIZZI, G. Occurrence and characterisation of *Rhizoctonia* species causing diseases of ornamental plants in Italy. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 148, n. 4, p. 967-982, 2017.
- AJAYI-OYETUNDE, O. O. ; BRADLEY, C. A. *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of *Rhizoctonia* seedling disease of soybean. **Plant Pathology**, London, v. 67, n. 1, p. 3-17, 2018.
- ALAEI, H.; MOLAEI, S.; MAHMOODI, S. B.; RISEH, R. S. New anastomosis group F (AG-F) of binucleate *Rhizoctonia* causing root and stem rot of *Pistacia vera*. **Journal of Crop Protection**, Tehran, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2017.
- ANDERSON, N. A. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 20, p. 329-347, 1982.
- ARAKAWA, M.; INAGAKI, K. Molecular markers for genotyping anastomosis groups and understanding the population biology of *Rhizoctonia* species. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 80, n. 5, p. 401-407, 2014.
- BAKER, K. F. Types of *Rhizoctonia* disease and their occurrence. In: PARAMETER JR., J. R. (Eds.). ***Rhizoctonia solani*: biology and pathology**. Berkeley: University of California Press, 1970. p. 125-148.
- BOYSEN, M.; BORJA, M.; DEL MORAL, C.; SALAZAR, O.; RUBIO, V. Identification at strain level of *Rhizoctonia solani* AG4 isolates by direct sequence of asymmetric PCR products of the ITS regions. **Current Genetics**, Berlin, v. 29, n. 2, p. 174-181, 1996.
- CAMPION, C.; CHATOT, C.; PERRATON, B.; ANDRIVON, D. Anastomosis groups, pathogenicity and sensitivity to fungicides of *Rhizoctonia solani* isolates collected on potato crops in France. **European Journal Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 9, p. 983-992, 2003.
- CARLING, D. E. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (Eds.). ***Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. Dordrecht: Kluwer, 1996. p. 37-47.
- CARLING, D. E.; KUNINAGA, S.; BRAINARD, K. A. Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 1, p. 43-50, 2002.

CARLING, D. R.; SUMNER, D. R. *Rhizoctonia*. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Eds.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: APS Press, 1992. p. 157-165.

CERESINI, P. C. *Rhizoctonia* como fitopatógeno: biologia e diversidade de *Rhizoctonia solani* em agroecossistemas tropicais e perspectivas do manejo da rizoctoniose usando resistência de plantas. In: NÚCLEO DE ESTUDOS DE FITOPATOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. (Ed.). **Sanidade de raízes**. São Carlos: Suprema, 2014. p. 177-190.

COELHO, I. L.; DA CONCEIÇÃO, C. S.; SANTOS, T. S.; OLIVEIRA, M. G.; DE MORAES, A. J. G.; DA CRUZ, B. L. S.; GAMA, M. A. S.; LARANJEIRA, D. Biocontrole de doenças radiculares: uma realidade prática ou apenas utopia?. In: LOPES, U. P.; MICHEREFF, S. J. (Eds.). **Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos**. Recife: Editora Universitária da UFRPE, 2018. p. 145-160.

CUBETA, M. A.; VILGALYS, R. *Rhizoctonia*. In: LEDERBERG J. J. (Ed.). **Encyclopedia of microbiology**. San Diego: Academic Press, 2000. v. 4, p. 109-116.

CUBETA, M. A.; VILGALYS, R.; GONZÁLEZ, D. Molecular analysis of ribosomal RNA genes in *Rhizoctonia* fungi. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (Eds.). ***Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1996. p. 81-86.

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**, London, v. 63, n. 3, p. 651-666, 2014.

DAVID, G. Q.; CHAVARRO-MESA, E.; SCHURT, D. A.; CERESINI, P. C. *Rhizoctonia* como fitopatógeno no agroecossistema brasileiro. In: LOPES, U. P.; MICHEREFF, S. J. (Eds.). **Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos**. Recife: Editora Universitária da UFRPE, 2018. p. 35-55.

DEMIRCI, E.; DÖKEN, M. T. Host penetration and infection by the anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn isolated from potatoes. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 22, n. 6, p. 609-613, 1998.

DONG, W.; LI, Y.; DUAN, C.; LI, X.; NAITO, S.; CONNER, R. L.; YANG, G.; LI, C. Identification of AG-V, a new anastomosis group of binucleate *Rhizoctonia* spp. from taro and ginger in Yunnan province. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 148, n. 4, p. 895-906, 2017.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. Fungal databases. Beltsville: U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA, 2018. Disponível em: <<https://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

FERRUCHO, R. L.; CIFUENTES, J. M.; CERESINI, P. C.; GARCÍA-DOMÍNGUEZ, C. *Rhizoctonia solani* AG-3PT is the major pathogen associated with potato stem canker and black scurf in Colombia. **Agronomía Colombiana**, Bogotá, v. 30, n. 2, p. 204-213, 2012.

- GAINO, A. P. D. S. D. C.; BASSETO, M. A.; GASPAROTTO, L.; POLTRONIERI, L. S.; CERESINI, P. C. Phylogenetic inference reveals the complex etiology of the target and leaf spot diseases on rubber tree and other species cultivated in the Amazon. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, p. 385-395, 2010.
- GARG, N.; PUNDIR, S.; PRAKASH, A.; KUMAR, A. Primer designing for DREB1A, a cold induced gene. **Journal of Proteomics and Bioinformatics**, New York, v.1, n. 1, p. 37-40, 2008.
- GODOY-LUTZ, G.; KUNINAGA, S.; STEADMAN, J.R.; POWERS, K. Phylogenetic analysis of *Rhizoctonia solani* subgroups associated with web blight symptoms on common bean based on ITS-5.8S rDNA. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 74, n. 1, p. 32-40, 2008.
- GÓNZALEZ, D.; CARRES, M. R.; BOEKHOUT, T.; STALPERS, J.; KURAMAE, E. E.; NAKATANI, A, K.; VILGALYS, R.; CUBETA, M. Phylogenetic relationships of *Rhizoctonia* fungi within the Cantharellales. **Fungal biology**, Oxford, v. 120, n. 4, p. 603-619, 2016.
- GONZÁLEZ-GARCÍA, V. G.; ONCO, M. A. P.; SUSAN, V. B. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 4, n. 1, p. 55-79, 2006.
- GROSCH, R.; SCHNEIDER, J. H. M.; PETH, A.; WASCHKE, A.; KOFOET, A.; FRANKEN, P.; JABAJI-HARE, S. H. Development of a specific PCR assay for the detection of *Rhizoctonia solani* AG 1-IB using SCAR primers. **Journal of Applied Microbiology**, London, v. 102, n. 3, p. 806-819, 2007.
- GUO, Q.; DONG, W.; LI, S.; LU, X.; WANG, P.; ZHANG, X.; MA, P. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. **Microbiological Research**, Jena, v. 169, p. 533-540, 2014.
- HUANG, X.; ZHANG, M.; YONG, X.; YANG, X.; SHEN, Q. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. **Microbiological Research**, Jena, v. 167, n. 3, p. 135-143, 2012.
- INOKUTI, E. M. **Diversidade genética e agressividade de *Rhizoctonia* em batata e beterraba açucareira**. 2016. 101 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- INOKUTI, E. M.; REIS, R.; CERESINI, P. C.; CÂMARA, M. P. S.; MICHEREFF, S. J. Diversity and pathogenicity of anastomosis groups of *Rhizoctonia* associated with potato stem canker and black scurf diseases in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, 2018. Accepted.
- JAAFFAR, A. K. M.; PAULITZ, T. V.; SCHROEDER, K. L.; THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M. Molecular characterization, morphological characteristics, virulence, and geographic distribution of *Rhizoctonia* spp. in Washington State. **Plant Disease**, St. Paul, v. 106, n. 5, p. 459-473, 2016.
- JOHANSON, A.; TURNER, H. C.; MCKAY, G. J.; BROWN, A. E. A PCR-based method to distinguish fungi of the rice sheath-blight complex, *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae* and *R. oryzae-sativae*. **FEMS Microbiology Letters**, Dordrecht, v. 162, n. 2, p. 289-294, 1998.

- JUSTESEN, A. F.; YOHALEN, D.; BAY, A.; NICOLAISEN, M. Genetic diversity in potato field population of *Thanatephorus cucumeris* AG-3, revealed by ITS polymorphism and RAPD markers. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, n. 11, p. 1323-1331, 2003.
- KATARIA, H. R.; GISI, U. Chemical control of *Rhizoctonia* species. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S. H.; NEATE, S.; DIJST, G. (Eds.). **Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. Dordrecht: Kluwer, 1996. p. 149-162.
- KEIJER, J. The initial steps of the infection process in *Rhizoctonia solani* In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (Eds.). **Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. Dordrecht: Kluwer, 1996. p. 149-162.
- KHEDHER, S. B.; KILANI-FEKI, O.; DAMMAK, M.; JABNOUN-KHIAREDDINE, H.; DAAMI-REMADI, M.; TOUNSI, S. Efficacy of Bacillus subtilis V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 338, p. 784-792, 2015.
- KHODAYARI, M.; SAFAIE, N.; SHAMSBAKHSH, M. Genetic diversity of Iranian AG1-IA isolates of *Rhizoctonia solani*, the cause of rice sheath blight, using morphological and molecular markers. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 11-12, p. 708-714, 2009.
- KUNINAGA, S. Current situation of the taxonomy of *Rhizoctonia solani*. **Plant Protection**, Tokyo, v. 57, n. 5, p. 219-222, 2003.
- KUNINAGA, S. Current situation of the taxonomy of the genus *Rhizoctonia* and the *Rhizoctonia* species complex. **Japan Journal of Phytopathology**, Tokyo, v. 68, n. 1, p. 3-20, 2002.
- KUNINAGA, S.; CARLING, D. E.; TAKEUCHI, T.; YOKOSAWA, R. Comparison of rDNA-ITS sequences between potato and tobacco strains in *Rhizoctonia solani* AG-3. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 66, n. 1, p. 2-11, 2000.
- KUNINAGA, S.; NATSUAKI, T.; TAKEUCHI, T.; YOKOSAWA, R. Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**, New York, v. 32, n. 3, p. 237-243, 1997.
- LAKSHMAN, G.; JAMBHULKAR, P. P.; SINGH, V.; SHARMA, P. Molecular identification, genetic diversity, population genetics and genomics of *Rhizoctonia solani*. In: Chowdappa, P.; Sharma, P.; Singh, D.; Misra, A. K. (Eds.). **Perspectives of plant pathology in genomic era**. New Delhi: Today & Tomorrow's, 2016. p. 55-89.
- LEACH, L. D.; GARBER, R. H. Control of *Rhizoctonia*. In: PARMETER JR., J. R. (Ed.). **Rhizoctonia solani: biology and pathology**. Berkeley: The University of California Press, 1970. p. 189-199.
- LEES, A. K.; CULLEN, D. W.; SULLIVAN, L.; NICOLSON, M. J. Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. **Plant Pathology**, London, v. 51, n. 3, p. 293-302, 2002.
- LORENZ, T. C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. **Journal of Visualized Experiments**, Cambridge, n. 63, e3998, 2012.

- LÜBECK, M. Molecular characterization of *Rhizoctonia solani*. In: ARORA, D. K.; KHACHATOURIANS, G. G. (Eds.). **Applied mycology and biotechnology**. Amsterdam: Elsevier, 2004. p. 205-224.
- MAEDA, E.; MURAKAMI, K.; OKAMOTO, F.; ETOH, Y. Nonspecificity of primers for *Escherichia albertii* detection. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Tokyo, v. 67, n. 6, p. 503-505, 2014.
- MARTINS, S. A.; SCHURT, D. A.; SEABRA, S. S.; MARTINS, S. J.; RAMALHO, M. A. P.; MOREIRA, F. M. S.; SILVA, J. C. P.; SILVA, J. A. G.; MEDEIROS, F. H. V. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth promotion and biocontrol by rhizobacteria under *Rhizoctonia solani* suppressive and conducive soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 127, p. 129-135, 2018.
- MATSUMOTO, M. Trials of direct detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG 1 and AG 2 subgroups using specifically primed PCR analysis. **Mycoscience**, Tokyo, v. 43, n. 2, p. 185-189, 2002.
- MISAWA, T.; KUBOTA, M.; SASAKI, J. KUNINAGA, S. First report of broccoli foot rot caused by *Rhizoctonia solani* AG-2-2 IV and pathogenicity comparison of the pathogen with related pathogens. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 81, n. 1, p. 15-23, 2015.
- MISAWA, T.; KUROSE, D.; KUNINAGA, S. First report of leaf sheath rot of Welsh onion caused by nine taxa of *Rhizoctonia* spp. and characteristics of the pathogens. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 83, n. 2, p. 121-130, 2017.
- MORA-UMAÑA, F.; BARBOZA, N.; ALVARADO, R.; VÁSQUEZ, M.; GODOY-LUTZ, G.; STEADMAN, J. R.; RAMÍREZ, P. Virulence and molecular characterization of Costa Rican isolates of *Rhizoctonia solani* from common bean. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 6, p. 461-471, 2013.
- MORDUE, J. E. M. *Thanatephorus cucumeris*. Eghan: Commonwealth Mycological Institute, 1974. 2 p. (CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 406).
- MUZHINJI, M.; TRUTER, M.; WOODHALL, J. W.; WALLS, J. E. V. D. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* from potato in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v. 99, n. 12, p. 1790-1802, 2015.
- NAGARAJKUMAR, M.; BHASKARAN, R.; VELAZHAHAN, R. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. **Microbiological Research**, Jena, v. 159, n. 1, p. 73-81, 2004.
- OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p. 125-143, 1987.
- OGOSHI, A. Grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn and their perfect stages. **Review of Plant Protection Research**, Tokyo, v. 8, p. 93-103, 1975.
- OGOSHI, A. Introduction - The genus *Rhizoctonia*. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (Eds.). **Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. Dordrecht: Kluwer, 1996. p. 1-9.

OKUBARA, P. A.; PAULITZ, T. C. Root defense responses to fungal pathogens: a molecular perspective. **Plant and Soil**, The Hague, v. 274, p. 215-226, 2005.

OKUBARA, P. A.; SCHROEDER, K. L.; PAULITZ, T. C. Identification and quantification of *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* using real-time polymerase chain reaction. **Phytopathology**, St. Paul, v. 98, n. 7, p. 837-847, 2008.

OLIVEIRA, A. G.; CHAGAS, A.; SANTOS, G.; MILLER, L. O.; CHAGAS, L. F. B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 7, p. 149-155, 2012.

ÖZER, G.; BAYRAKTAR, H. Characterization and sensitivity to fungicides of *Rhizoctonia* spp. recovered from potato plants in Bolu, Turkey. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 163, n. 1, p. 11-18, 2015.

PANNECOUQUE, J.; HOFTE, M. Detection of rDNA ITS polymorphism in *Rhizoctonia solani* AG-2-1 isolates. **Mycologia**, New York, v. 101, n. 1, p. 26-33, 2009.

PARMETER JR., J. R.; WHITNEY, H. S. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. In: PARMETER JR., J. R. (Ed.). ***Rhizoctonia solani*: biology and pathology**. Berkeley: University of California Press, 1970. p. 8-19.

PATIL, H. J.; SOLANKI, M. K. Molecular prospecting: advancement in diagnosis and control of *Rhizoctonia solani* diseases in plants. In: KUMAR, P.; GUPTA, V. K.; TIWARI, A. J.; KAMLE, M (Eds.). **Current trends in plant disease diagnostics and management practices**. Berna: Springer International, 2016. p. 165-185.

REITHNER, B.; SCHUHMACHER, R.; STOPPACHER, N.; PUCHER, M.; BRUNNER, K.; ZEILINGER, S. Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen-activated protein kinase Tmk1 differentially affects mycoparasitism and plant protection. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, n. 11, p. 1123-1133, 2007.

SALAZAR, O.; JULIAN, M. C.; RUBIO, V. Primers based on specific rDNA-ITS sequences for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG-2 subgroups and ecological types and binucleate *Rhizoctonia*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 3, p. 281-285, 2000.

SAYLER, R. J.; YANG, Y. Detection and quantification of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, the rice sheath blight pathogen, in rice using real-time PCR. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, n. 12, p. 1663-1668, 2007.

SHARMA-POUDYAL, D.; PAULITZ, T. C.; PORTER, L. D.; DU TOIT, L. J. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* and *Rhizoctonia*-like spp. from pea crops in the Columbia Basin of Oregon and Washington. **Plant Disease**, St. Paul, v. 99, n. 5, p. 604-613, 2015.

SHARON, M.; KUNINAGA, S.; HYAKUMACHI, M.; NAITO, S.; SNEH, B. Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. **Mycoscience**, Tokyo, v. 49, n. 1, p. 93-114, 2008.

SHARON, M.; KUNINAGA, S.; HYAKUMACHI, M.; SNEH, B. The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp. using molecular and biotechnological methods compared with the classical anastomosis grouping. **Mycoscience**, Tokyo, v. 47, n. 6, p. 299-316, 2006.

- SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. **Identification of *Rhizoctonia* species**. St. Paul: APS Press, 1991. 133 p.
- TODA, T.; MGHALU, J. M.; HAYAKAWA, 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**, Dordrecht, v. 232, n. 1, p. 67-74, 2004.
- TSROR, L. Biology, epidemiology and management of *Rhizoctonia solani* on potato. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 10, p. 649-658, 2010.
- VAN BENEDEN, S.; PANNECOUCQUE, J.; DEBODE, J.; DE BACKER, G.; HOFTE, M. Characterisation of fungal pathogens causing basal rot of lettuce in Belgian greenhouses. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 124, n. 1, p. 9-19, 2009.
- VAN BRUGGEN, A. H. C.; ARNESON, P. A. Quantitative recovery of *Rhizoctonia solani* from soil. **Plant Pathology**, London, v. 70, n. 4, p. 320-323, 1986.
- WANG, C.; PI, L.; JIANG, S.; YANG, M.; SHU, C.; ZHOU, E. ROS and trehalose regulate sclerotial development in *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. **Fungal Biology**, Oxford, v. 122, p. 322-33, 2018.
- WEINHOLD, A. R.; SINCLAIR, J. B. *Rhizoctonia solani*: penetration, colonization and host response. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (Eds.). ***Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. Dordrecht: Kluwer, 1996. p. 163-174.
- WOODHALL, J. W.; ADAMS, I. P.; PETERS, J. C.; HARPER, G.; BOONHAM, N. A new quantitative real-time PCR assay for *Rhizoctonia solani* AG-3PT and the detection of AGs of *Rhizoctonia solani* associated with potato in soil and tuber samples in Great Britain. **European Journal Plant Pathology**, Dordrecht, v. 136, n. 2, p. 273-280, 2013.
- YANG, G.; LI, C. General description of *Rhizoctonia* species complex. In: CUMAGUN, C. J. R. (Ed.). **Plant pathology**. Rijeka: Intech, 2012. p. 41-52.
- YANG, S.; MIN, F.; WANG, W.; WEI, Q.; GUO, G.; GAO, Y.; DONG, X.; LU, D. Anastomosis group and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* associated with stem canker and black scurf of potato in Heilongjiang Province of China. **American Journal of Potato Research**, Washington, v. 94, n. 1, p. 95-104, 2017.
- YANG, Y. G.; ZHAO, C.; GUO, Z. J.; WU, X. H. Characterization of a new anastomosis group (AG-W) of binucleate *Rhizoctonia*, causal agent for potato stem canker. **Plant Disease**, St. Paul, v. 99, n. 12, p. 1757-1763, 2015.
- ZHAO, Y. Q.; WU, Y. H.; ZHAO, X. X.; AN, M. N.; CHEN, J. G. Study on the taqman real-time PCR to the detection and quantification of *Rhizoctonia solani* AG-3 of tobacco target spot. **Advanced Materials Research**, Berna, v. 1010-2012, p. 80-83, 2014.

Capítulo II

Polymerase chain reaction with specific primers for detection of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* reveal nonspecificity

Submissão: **European Journal of Phytopathology**
Short Communication
Dordrech, Holanda
JCR = 1,48

1 **Polymerase chain reaction with specific primers for detection of anastomosis**
2 **groups of *Rhizoctonia solani* reveal nonspecificity**

3
4 **Lucas C. S. Amâncio • Alexandre R. Machado • Cristina M • Kamila C. Correia • Sami J.**
5 **Michereff**

6
7 L. C. S. Amâncio
8 Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
9 52171-900 Recife, Brazil

10
11 A. R. Machado • C. Motta
12 Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-600 Recife, Brazil

13
14 K. C. Correia • S. J. Michereff
15 Centro de Ciências Agrárias e da Biodiversidade, Universidade Federal do Cariri, 63130-025
16 Crato, Brasil

17
18 S. J. Michereff (✉)
19 Corresponding author: S. J. Michereff - e-mail: sami.michereff@ufca.edu.br

20 Telephone number: +55 8832219500

21
22 **ORCID**

23 Sami J. Michereff - <http://orcid.org/0000-0002-2156-3502>

24

25 **Abstract** Several specific PCR primers based on ITS region have been used to discriminate
26 anastomosis groups (AGs) and subgroups in *Rhizoctonia solani*, but the efficacy of these primers
27 was not evaluated considering a large number of known AGs. This study was performed to
28 evaluate the efficacy of seven PCR specific primers in the detection of the four predominant AGs
29 of *R. solani* worldwide, including some subgroups (AG-1 IA, AG-1 IB, AG-2-1, AG-3 PT, AG-3
30 TB, AG-4 HGI and AG-4 HGII). Thirteen isolates of *R. solani* and seven isolates of binucleate
31 *Rhizoctonia* belonging to different AGs and subgroups were sequenced using ITS1 and ITS4
32 primers and the phylogenetic analysis confirm the previous identification of 20 AGs and
33 subgroups. This isolates and three isolates of unrelated fungal species (*Fusarium oxysporum*,
34 *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotium rolfsii*) were tested simultaneously with each primer
35 set above. All primer used nonspecifically amplified other AGs and the most of the primers
36 produced bands for unrelated fungal species. Therefore, the exclusive use these primers under the
37 PCR conditions used in this study should be avoided due to lack of accuracy in the results.

38

39 **Keywords** *Rhizoctonia solani* • AG groups • PCR reaction • molecular detection • ITS primers

40

41 **Introduction**

42

43 The soil-borne fungi *Rhizoctonia* occurs worldwide in agricultural and non-agricultural fields,
44 living as plant pathogens, symbionts or saprophytes (Ogoshi 1987; González et al. 2006;
45 Gónzalez et al. 2016). The study of *Rhizoctonia* is largely associated with their economic
46 importance as pathogen on more than 600 species of plants (Farr et al. 2018), causing diseases
47 symptoms such as damping off, root rot, stem cankers, crown rot and blights (Ogoshi 1996).
48 Control of diseases resulting from *Rhizoctonia* infection is a major concern for farmers and plant

49 pathologists (Arakawa and Inagaki 2014), due to the high pathogen aggressiveness, associated to
50 its efficient competitive saprophytic ability, capacity for soil survival without the presence of a
51 potential host, and a wide host range (Leach and Garber 1970; Cubeta and Vilgalys 2000;
52 Agarwal 2010; Ajayi-Oyetunde and Bradley 2018).

53 The genus *Rhizoctonia* comprises a complex of genetically distinct species, and the
54 classification is based on the cell's nuclear condition (multi-, bi-, or uninucleate) and the ability
55 of hyphae to anastomose with tester isolates of designated anastomosis groups (AGs) (Sneh et al.
56 1991). In addition to hyphal interaction, other characteristics have been used to differentiate
57 subgroups within several AGs (Sharon et al. 2006).

58 *Rhizoctonia solani* (teleomorf *Thanatephorus cucumeris*) is multinucleate and the most
59 important species within the genus *Rhizoctonia*. Considerable diversity in colony morphology,
60 host range, aggressiveness, nutritional requirement and other characteristics exist among
61 members of this species (Sneh et al. 1991; Cubeta and Vilgalys 2000; Agarwal 2010; Ajayi-
62 Oyetunde and Bradley 2018). Currently, there are 13 AGs in *R. solani* (AG-1 to AG-13) and
63 numerous subgroups (Sharon et al. 2006; Arakawa and Inagaki 2014; González et al. 2016;
64 Inokuti et al. 2018). To date, there is evidence that only first four (AG-1 to AG-4) among the
65 AGs that make up the complex of species *R. solani* has global distribution, occurring in most
66 agro-ecosystems in the world (Ogoshi 1987; González et al. 2006; David et al. 2018).

67 The knowledge of AGs and subgroups has great relevance in understanding the genetic
68 diversity of *R. solani*, considering the possible epidemiological interferences of this diversity in
69 the management of diseases caused by this pathogen (Ogoshi 1987; Agarwal 2010; Tsrer 2010;
70 Ajayi-Oyetunde and Bradley 2018).

71 The classical methodology for AG-grouping based on hyphal interaction has proven to be a
72 questionable and unreliable criterion, especially for subgroups. On the other hand, the

73 introduction of polymerase chain reaction (PCR)-based tools provided the accurate identification
74 of isolates for AGs and their subgroups (Sharon et al. 2006).

75 Sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA (rDNA)
76 seems to be an appropriate method for genetic differentiation of AGs and their subgroups (Sharon
77 et al. 2008), and these differences are applied to the design of molecular markers for
78 distinguishing those groups (Arakawa and Inagaki 2014). Several specific PCR primers based on
79 ITS region have been designed to discriminate AGs and their subgroups in the *R. solani*
80 (Arakawa and Inagaki 2014). This specific primers has been used in several research works
81 (Matsumoto 2002; Okubara et al. 2008; Budge et al. 2009; Mora-Umaña et al. 2013; Hannukkala
82 et al. 2016; Misawa et al. 2017), but the efficacy of these primers was not evaluated considering a
83 large number of known AGs.

84 The present study was undertaken to evaluate the efficacy of seven PCR specific primers in
85 the detection of the four predominant AGs of *R. solani* worldwide, including some subgroups
86 (AG-1 IA, AG-1 IB, AG-2-1, AG-3 PT, AG-3 TB, AG-4 HGI and AG-4 HGII).

87

88 **Materials and methods**

89

90 **Fungal isolates**

91

92 Thirteen isolates of *R. solani* and seven isolates of binucleate *Rhizoctonia* belonging to different
93 AGs e subgroups were used in this study are listed in Table 1. Isolates of *Fusarium oxysporum*,
94 *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotium rolfsii* (Supplementary Table 1), characterized by
95 DNA sequencing, were used as negative control in the evaluation of specific primers experiment.

96

97 **DNA isolation, sequencing and phylogenetic analyzes to confirm the AGs**

98
99 The isolates of *Rhizoctonia* were grown on a cellophane disc placed on potato-dextrose-agar
100 (PDA) (Acumedia, Lansing, USA) in a Petri dish at 25 °C. After 4 days, the mycelium was
101 scraped from the surface of culture with sterile toothpick. The genomic DNA of each *Rhizoctonia*
102 isolate was obtained using the Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher
103 Scientific, Waltham, USA) following the manufacturer's instructions. The ITS-rDNA region was
104 amplified using the primers ITS1 and ITS4 (White et al. 1990). For each 12.5 µL PCR reaction, a
105 mixture was made containing 6.25 µL GoTaq[®] Green Master Mix (2X) (Promega Corporation,
106 Madison, USA), 0.5 µL each of forward and reverse primer, 4.25 µL of nuclease-free water and 1
107 µL of DNA template. Amplifications were performed using the following program: initial
108 denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturing at 94 °C for 1 min,
109 annealing at 57 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min; one cycle of extension at 72 °C
110 for 10 min and final incubation at 4 °C. PCR products were purified and sequenced in both
111 directions with the same primers used for amplification.

112 The consensus sequences were assembled using the SeqMan Pro version 8.1.2 software
113 (DNASTAR Inc., Madison, USA). Reference ITS sequences available in GenBank for each AG
114 were retrieved for construction of phylogenetic tree (Supplementary Table 2). Sequences were
115 aligned using ClustalW algorithm (Thompson et al., 1997), and phylogenetic analyses were done
116 separately for multinucleate and binucleate *Rhizoctonia* datasets using MEGA 7.0.14 (Kumar et
117 al. 2016). Maximum Likelihood with Kimura 2-parameter nucleotide substitution model was
118 used to construct the phylogenetic trees. All positions containing gaps and missing data were
119 eliminated. Bootstrapping was performed with 1,000 replications of data. The ITS sequence of

120 *Athelia rolfsii* (FSR-052) (GenBank Accession N° AY684917) was used as outgroup. Sequences
121 generated in this study were deposited in GenBank (Table 1) and the alignments in TreeBASE
122 (under deposit).

123

124 **Evaluation of specific primers for AGs detection**

125

126 Isolates of *Rhizoctonia* and unrelated fungal species (*F. oxysporum*, *M. phaseolina* and *S. rolfsii*)
127 were grown on a cellophane disc placed on PDA (Acumedia) and the mycelium was scraped with
128 sterile toothpick. The genomic DNA of the isolates was extracted as described above. The
129 isolates were tested with AG-1 IA, AG-1 IB, AG-2-1, AG-3 PT, AG-3 TB, AG-4 HGI and AG-4
130 HGII, using seven primer pairs shown in Table 2. Amplification reactions using primer pairs
131 were carried out using 25 ng/μl of genomic DNA and the same procedures mentioned above,
132 with annealing temperatures indicated in Table 2. Control with 1 μL of nuclease-free water was
133 performed for all sets of primers during PCR reactions. The PCR amplification products were
134 separated by electrophoresis in 1% agarose gels in 1.0× Tris-acetate acid EDTA (TAE) buffer,
135 stained with GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, USA) in a 1× TAE buffer and visualized under
136 UV light and photographed. The tests were repeated twice.

137

138 **Results and discussion**

139

140 The phylogenetic analysis of the ITS region of *Rhizoctonia* isolates allowed the identification of
141 20 AGs, being 13 of *R. solani* and seven of binucleate *Rhizoctonia* (Table 1; Fig. 1 and Fig. 2;),
142 and confirmed the AGs classification previously performed for some isolates (Kuninaga et al.
143 1997; Carling et al. 2002; Matsumoto 2002; Strausbaugh et al. 2011).

144 The primers sets AG-1 IA and AG-1 IB produced the expected product for the
145 representative isolates from these groups, with evident band of 540 pb and 324 pb, respectively.
146 However, nonspecific annealing was visualized in other AGs for this primers set, suggesting
147 nonspecific annealing (Table 3; Supplementary Fig. 1). For primer set AG-2-1, although we do
148 not have isolates belonging to this subgroup, PCR products of the expected size were visualized
149 in the AG-9, AG-Fa and AG-P isolates, as well as the presence of amplicon for AG-4 HGI isolate
150 (Table 3; Supplementary Fig. 2).

151 The AG-3 PT primer set amplified DNA from AG-3 PT isolate, but with amplicon above
152 500 bp, different of the indicated by Kuninaga et al. (2000). In addition, it was observed the
153 presence of multiple nonspecific bands, with different sizes for all subgroups, except for AG-1 IA
154 subgroup. In the AG 3-TB primer set, PCR products of the expected size (470 pb) were not
155 visualized, since we do not have isolates from this AG. However, amplicons were evident for
156 AG-4 HGI, AG-Fa and AG-G isolates (Table 3; Supplementary Fig. 3). In the case of the AG-4
157 HGI primer set, a band fragment of expected size (420 pb) was produced for the AG-4 HGI
158 isolate, but multiple bands of different sizes were detected for other subgroups. The AG-4 HGII
159 primer set produced a single band of expected size (420 pb) for the representative isolate these
160 group, but band of expected size also were visualized for isolates of AG-2-2 IIIB and AG-2-2 IV,
161 as well as multiple bands for other subgroups (Table 3; Supplementary Fig. 4). The pair primers
162 AG-1 IA, AG-3 PT, AG-3 TB, AG-4 HGI and AG-4 HGII produced bands for fungal species (*F.*
163 *oxysporum*, *M. phaseolina* and *S. rolfsii*) used in the negative control during the PCR reactions.
164 No PCR product was observed in the control with water during the reactions (Table 3;
165 Supplementary Figs. 1-4).

166 Considering the presence of nonspecific amplifications, the specific primers used for
167 detection of AG-1 IA, AG-1 IB, AG-2-1, AG-3 PT, AG-3 TB, AG-4 HGI and AG-4 HGII were

168 nonspecific. Although primers has already been used to detect *Rhizoctonia* AGs and subgroups
169 (Matsumoto 2002; Okubara et al. 2008; Budge et al. 2009; Hannukkala et al. 2016; Misawa et al.
170 2017), it was seen that the specificity was not evaluated or evaluation were based on a small
171 amount of different AGs (Kuninaga et al. 2000; Salazar et al. 2000; Carling et al. 2002). In the
172 present study, the efficacy of specific primers was evaluated using isolates of *R. solani* and
173 binucleate *Rhizoctonia* distributed in 20 different AGs. Nonspecific detection and identification
174 of *Rhizoctonia* AGs using primers designed from their specific regions of ribosomal DNA for
175 PCR amplification have already been demonstrated by Matsumoto (2002). The nonspecificity of
176 some primers may be due to the great intraspecific and interspecific diversity of *Rhizoctonia*
177 species (Sneh et al. 1991; Cubeta and Vilgalys 2000; Agarwal 2010; Misawa et al. 2017; Ajayi-
178 Oyetunde and Bradley 2018). Moreover, the possibility of emergency of new AGs in *Rhizoctonia*
179 should be considered (Gaino et al. 2010; Yang et al. 2015; Alaei et al. 2017; Dong et al. 2017),
180 mainly due to the occurrence of heterokaryosis and sexual recombination of genotypes in field
181 isolates (Misawa et al. 2017).

182 In conclusion, the present study revealed that other AGs could be nonspecifically amplified
183 using the primer pairs AG-1 IA, AG-1 IB, AG-2-1, AG-3 PT, AG-3 TB AG-4 HGI and AG-4
184 HGII. This finding indicated that the exclusive use these primers under the PCR conditions used
185 in this study should be avoided due to lack of accuracy in the results. Molecular markers such as
186 large subunit of ribosomal DNA (LSU), β -tubulin (BT) and the second largest subunit of RNA
187 polymerase II (RPB2) genes provided phylogenetic support and are very useful for discrimination
188 of *Rhizoctonia* AGs (González et al. 2001; González et al. 2006; Sharon et al. 2006; Gónzalez et
189 al. 2016). Therefore, is very important to develop new specific primers based in gene regions
190 more variables for AGs detection, considering the number of AGs currently known.

191

192 **Acknowledgments** This work was financed by Conselho Nacional de Desenvolvimento
193 Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
194 Nível Superior (CAPES, Brazil). S. J. Michereff acknowledge support from the CNPq as research
195 fellow.

196

197 **Compliance with ethical standards**

198

199 Disclosure of potential conflict of interest - The authors do not have any conflict of interest.

200 Informed consent - All authors have reviewed the manuscript and approved its submission to
201 European Journal of Plant Pathology.

202

203 **References**

204

205 Agarwal, D. K. (2010). *Rhizoctonia* D.C.: taxonomy, ecology and management. In K. G.
206 Mukerji, & C. Manoharachary. (Eds.), *Taxonomy and ecology of Indian fungi* (pp. 19–50).
207 New Delhi: I. K. International Publishing House.

208 Ajayi-Oyetunde, O. O., & Bradley, C. A. (2018). *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population
209 biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. *Plant Pathology*, 67,
210 3–17.

211 Alaei, H., Molaei, S., Mahmoodi, S. B., & Riseh, R. S. (2017). New Anastomosis Group F (AG-
212 F) of binucleate *Rhizoctonia* causing root and stem rot of *Pistacia vera*. *Journal of Crop*
213 *Protection*, 6, 1–13.

- 214 Arakawa, M., & Inagaki, K. (2014). Molecular markers for genotyping anastomosis groups and
215 understanding the population biology of *Rhizoctonia* species. *Journal of General Plant*
216 *Pathology*, 80, 401–407.
- 217 Budge, G. E., Shaw, M. W., Colyer, A., Pietravalle, S., & Boonham, N. (2009). Molecular tools
218 to investigate *Rhizoctonia solani* distribution in soil. *Plant Pathology*, 58, 1071–1080.
- 219 Carling, D.E., Kuninaga S., & Brainard, K. A. (2002). Hyphal anastomosis reactions, rDNA-
220 internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia*
221 *solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. *Phytopathology*, 92, 43–50.
- 222 Cubeta, M. A., & Vilgalys, R. *Rhizoctonia*. (2000). In J. J. Lederberg (Ed.), *Encyclopedia of*
223 *microbiology*, vol. 4 (pp. 109–116). San Diego: Academic Press.
- 224 David, G. Q., Chavarro-Mesa, E., Schurt, D. A. & Ceresini, P. C. (2018). *Rhizoctonia* como
225 fitopatógeno no agroecossistema brasileiro. In U. P. Lopes, & S. J. Michereff (Eds.),
226 *Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos* (pp. 35–55). Recife:
227 Editora Universitária da UFRPE.
- 228 Ogoshi, A. (1996). - The genus *Rhizoctonia*. In B. SNEH., S. Jabaji-hare., S. Neate., & G. Dijst
229 (Eds.), *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease*
230 *control* (pp. 1-9). Dordrecht: Kluwer.
- 231 Dong, W., Li, Y., Duan, C., Li, X., Naito, S., Conner, R.L., Yang, G., & Li, C. (2017).
232 Identification of AG-V, a new anastomosis group of binucleate *Rhizoctonia* spp. from taro
233 and ginger in Yunnan province. *European Journal of Plant Pathology*, 148, 895–906.
- 234 Farr, D. F., Rossman, A. Y. (2018). Fungal database: Fungus-host distributions. [http://nt.ars-](http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm)
235 [grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm](http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm). Accessed 20 Jul 2018.
- 236 Gaino, A. P. S., Basseto, M. A., Gasparotto, L., Poltronieri, L. S., & Ceresini, P. C. (2010).
237 Inferência filogenética revela a complexa etiologia das manchas areolada e foliar em

- 238 seringueira e em outras espécies cultivadas na Amazônia. *Acta Scientiarum. Agronomy*, *32*,
239 385–395.
- 240 González, D., Carling, D. E., Kuninaga, S., Vilgalys, R., & Cubeta, M. A. (2001). Ribosomal
241 DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs.
242 *Mycologia*, *93*, 1138–1150.
- 243 González, D., Cubeta, M. A., & Vilgalys, R. (2006). Phylogenetic utility of indels within
244 ribosomal DNA and β -tubulin sequences from fungi in the *Rhizoctonia solani* species
245 complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *40*, 459–470.
- 246 Gónzalez, D., Rodriguez-Carres, M., Boekhout, T., Stalpers, J., Kuramae, E. E., Nakatani, A. K.,
247 Vilgalys, R., & Cubeta, M. A. (2016). Phylogenetic relationships of *Rhizoctonia* fungi
248 within the Cantharellales. *Fungal Biology*, *120*, 603–619.
- 249 Grosch, R., Schneider, J. H. M., Peth, A., Waschke, A., Kofoet, A., Franken, P., & Jabaji-Hare,
250 S. H. (2007). Development of a specific PCR assay for the detection of *Rhizoctonia solani*
251 AG 1-IB using SCAR primers. *Journal of Applied Microbiology*, *102*, 806–819.
- 252 Hannukkala, A. O., Rastas, M., Laitinen, P., & Latvala, L. (2016). *Rhizoctonia solani* injuries in
253 oilseed crops in Finland and impacts of different crop management practices on disease
254 incidence and severity. *Annals of Applied Biology*, *169*, 257–273.
- 255 Inokuti, E. M., Reis, R., Ceresini, P. C., Câmara, M. P. S., & Michereff, S. J. (2018). Diversity
256 and pathogenicity of anastomosis groups of *Rhizoctonia* associated with potato stem canker
257 and black scurf diseases in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, accepted.
- 258 Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis
259 version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*, 1870–1874.

- 260 Kuninaga, S., Carling, D. E., Takeuchi, T., & Yokosawa, R. (2000). Comparison of rDNA-ITS
261 sequences between potato and tobacco strains in *Rhizoctonia solani* AG-3. *Journal of*
262 *General Plant Pathology*, 66, 2–11.
- 263 Kuninaga, S., Natsuaki, T., Takeuchi, T., & Yokozawa, R. (1997). Sequence variation of the
264 rDNA regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. *Current*
265 *Genetics*, 32, 237–243.
- 266 Leach, L. D., & Garber, R. H. (1970). Control of *Rhizoctonia*. In J. R. Parmeter Jr. (Ed.),
267 *Rhizoctonia solani: biology and pathology* (pp. 189–199). Berkeley: The University of
268 California Press.
- 269 Matsumoto, M. (2002). Trials of direct detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG 1
270 and AG 2 subgroups using specifically primed PCR analysis. *Mycoscience*, 43, 185–189.
- 271 Misawa, T., Kurose, D., & Kuninaga, K. (2017). First report of leaf sheath rot of Welsh onion
272 caused by nine taxa of *Rhizoctonia* spp. and characteristics of the pathogens. *Journal of*
273 *General Plant Pathology*, 83, 121–130.
- 274 Mora-Umaña, F., Barboza, N., Alvarado, R., Vásquez, M., Godoy-Lutz, G., Steadman, J. R., &
275 Ramírez, P. (2013). Virulence and molecular characterization of Costa Rican isolates of
276 *Rhizoctonia solani* from common bean. *Tropical Plant Pathology*, 38, 461–471.
- 277 Ogoshi, A. (1987). Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of
278 *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Annual Review of Phytopathology*, 25, 125–143.
- 279 Okubara, P. A., Schroeder, K. L., & Paulitz, T. C. (2008). Identification and quantification of
280 *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* using real-time polymerase chain reaction.
281 *Phytopathology*, 98, 837–847.

- 282 Salazar, O., Julian, M. C., & Rubio, V. (2000). Primers based on specific rDNA-ITS sequences
283 for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG-2 subgroups and ecological types
284 and binucleate *Rhizoctonia*. *Mycological Research*, *104*, 281–285.
- 285 Sharon, M., Kuninaga, S., Hyakumachi, M., Naito, S., & Sneh, B. (2008). Classification of
286 *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the
287 classical anastomosis grouping. *Mycoscience*, *49*, 93–114.
- 288 Sharon, M., Kuninaga, S., Hyakumachi, M., & Sneh, B. (2006). The advancing identification and
289 classification of *Rhizoctonia* spp. using molecular and biotechnological methods compared
290 with the classical anastomosis grouping. *Mycoscience*, *47*, 299–316.
- 291 Sneh, B., Burpee, L., & Ogoshi, A. (1991). *Identification of Rhizoctonia species*. St. Paul, The
292 APS Press.
- 293 Strausbaugh, C. A., Eujay, I. A., Panella, L.W., & Hanson, I. E. (2011). Virulence, distribution
294 and diversity of *Rhizoctonia solani* from sugar beet in Idaho and Oregon. *Canadian*
295 *Journal of Plant Pathology*, *33*, 210–226.
- 296 Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The
297 ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by
298 quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, *25*, 4876–4882.
- 299 Tsrer, L. (2010). Biology, epidemiology and management of *Rhizoctonia solani* on potato.
300 *Journal of Phytopathology*, *158*, 649–658.
- 301 White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of
302 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J.
303 Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications* (pp.
304 315–322). New York: Academic Press.

305 Yang, Y. G., Zhao, C., Guo, Z. J., & Wu, X. H. (2015). Characterization of a new anastomosis
306 group (AG-W) of binucleate *Rhizoctonia*, causal agent for potato stem canker. *Plant*
307 *Disease*, 99, 1757–1763.

1 **Table 1** *Rhizoctonia solani* (Rs) and binucleate *Rhizoctonia* (BNR) isolates used in evaluation
 2 of specific primers for detection of anastomosis groups (AG)

3

Isolate code	Reference	AG ^a	Host plant or substrate	Geographic origin	GenBank accession no.
CS-KA	Rs	1 IA	Rice	Japan	This study
SHIBA-2	Rs	1 IB	Potato	Japan	This study
C-96	Rs	2-2 IIIB	Mat rush	Japan	This study
RI-64	Rs	2-2 IV	Beet	Japan	This study
TE2-4	Rs	2 BI	Soil	Japan	This study
CMM-1806	Rs	3 PT	Potato	Brazil	This study
AH-1	Rs	4 HGI	Peanut	Japan	This study
MMBF45/11	Rs	4 HGII	Beet	United States	This study
CMM-2989	Rs	4 HGIII	Cowpea	Brazil	This study
CU-8904	Rs	5	Squash	China	This study
HO-1556	Rs	7	Soil	Japan	This study
Sq R1	Rs	9	Soil	United States	This study
RH-31	Rs	11	Soybean	United States	This study
CMM-2473	BNR	A	Potato	Brazil	This study
MMBF38/11	BNR	Ba	Soybean	Brazil	This study
MMBF25/11	BNR	Bb	Soybean	United States	This study
MMBF40/11	BNR	Fa	Soybean	Brazil	This study
MMBF39/11	BNR	G	Soybean	Brazil	This study
MMBF35/11	BNR	P	Soybean	Brazil	This study
CMM-1315	BNR	R	Potato	Brazil	This study

4

5 ^aAnastomosis group

1 **Table 2** Primer sets for detection of anastomosis groups (AG) of *Rhizoctonia solani* used in
 2 this study, with annealing temperature (AT) and amplicon size expected (AS)

3

4

AG	Primer sequence (Forward/Reverse)	AT (°C)	AS (bp)	Reference
AG-1 IA	CCTTAATTTGGCAGGAGGG GACTATTAGAAGCGGTTCA	58	540	Kuninaga (2003)
AG-1 IB	ACACTAGAGTAGGTGGTATCA AGCGTGCTAACATAGTCACTC	53	324	Grosch et al. (2007)
AG-2-1	CAAAGGCAAT(A/G)GGTTATTGGAC CCTGATTTGAGATCAGATCATAAAG	60	480	Carling et al. (2002)
AG-3 PT	GTTTGGTTGTAGCTGGTCT CTGAGATCCAGCTAATAC	65	470	Kuninaga et al. (2000)
AG-3 TB	GTTTGGTTGTAGCTGGCCC CTGAGATCCAGCTAATGT	65	470	Kuninaga et al. (2000)
AG-4 HGI	GGACCTACTCTC(C/T)TTGG ACAGGGTGTCCCTCAGCGA	55	420	Kuninaga (2003)
AG-4 HGII	GGACCTTCTACTCCCCCT ACAGGGTGTCCCTCAGCGA	55	420	Kuninaga (2003)

5

6 ^aAnnealing temperature7 ^bAmplicon size

Table 3 Amplification results of anastomosis groups (AG) of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* isolates and other fungi using specific primers

AG	Amplification results using specific primers ^a						
	AG-1 IA	AG-1 IB	AG-2-1	AG-3 PT	AG-3 TB	AG-4 HGI	AG-4 HGII
<i>Rhizoctonia solani</i>							
AG-1 IA	+	-	-	-	*	*	*
AG-1 IB	-	+	-	*	*	*	*
AG-2-2 IIIB	*	-	-	*	*	*	+
AG-2-2 IV	-	-	-	*	*	*	+
AG-2 BI	-	-	-	*	*	*	*
AG-3 PT	-	-	-	*	*	*	*
AG-4 HGI	-	-	*	*	*	+	*
AG-4 HGII	-	-	-	*	*	*	+
AG-4 HGIII	-	-	*	*	*	*	*
AG-5	-	-	-	*	*	*	*
AG-7	-	*	*	*	*	*	*
AG-9	-	-	+	*	*	*	*
AG-11	*	-	-	*	*	*	*
<i>Binucleate Rhizoctonia</i>							
AG-A	-	*	-	*	*	*	*
AG-Ba	-	-	-	*	*	*	*
AG-Bb	-	-	*	*	*	*	*
AG-Fa	-	*	+	*	*	*	*
AG-G	-	-	-	*	*	*	*
AG-P	-	-	+	*	*	*	*
AG-R	-	-	-	*	*	*	*
Negative control	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	*	-	-	*	*	*	*
<i>Sclerotium rolfsii</i>	*	-	-	*	*	*	*
<i>Macrophomina phaseolina</i>	*	-	-	*	*	*	*

^a According to Table 2. (+) Presence of a single evident band with expected size; (*) Presence of band with size not expected or nonspecific amplification; (-) Absence of band

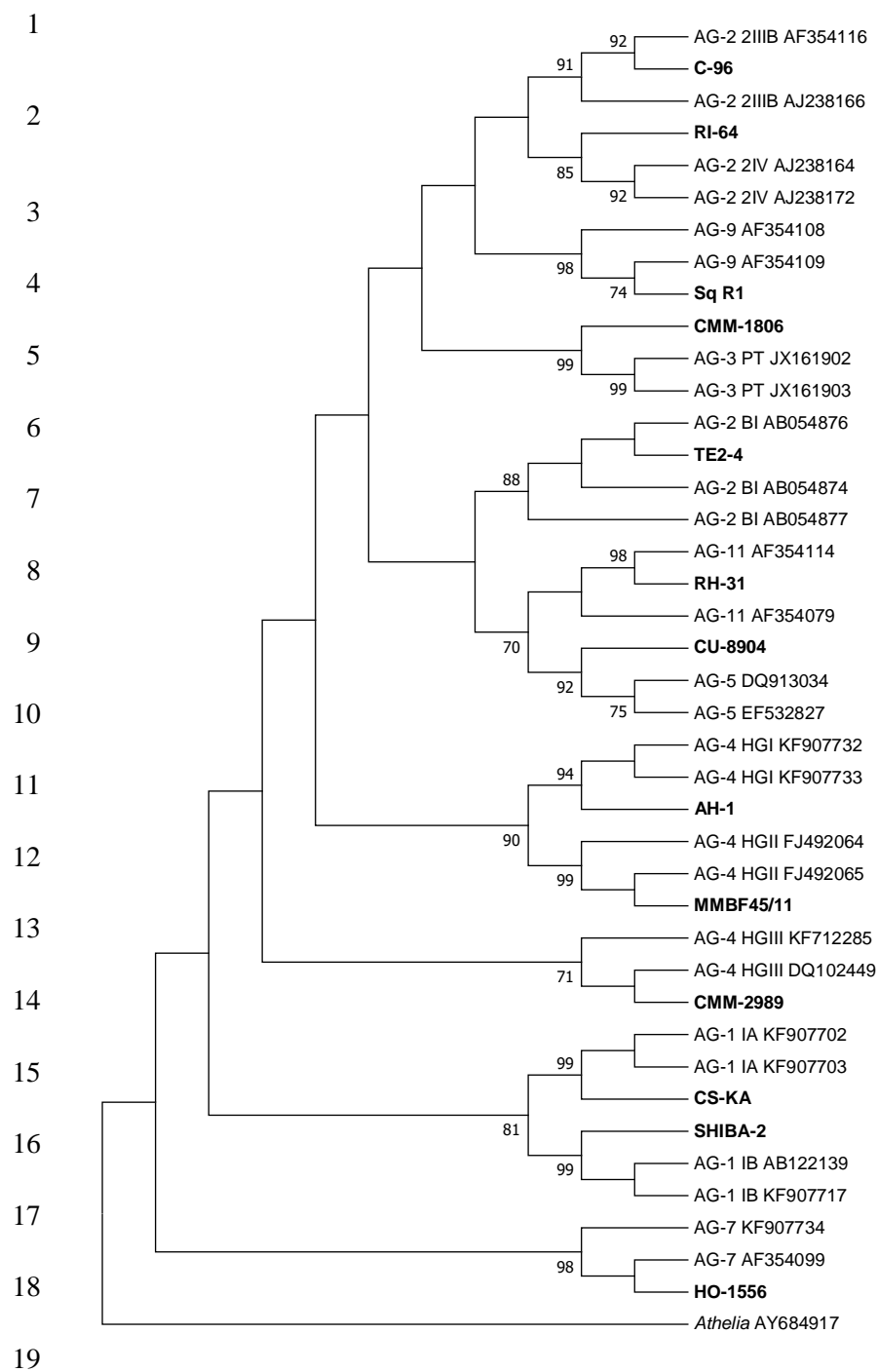


Fig. 1 Phylogenetic tree constructed by the maximum likelihood method obtained from the alignment of the sequences of the ITS-rDNA region of the *Rhizoctonia solani* isolates. The numbers on the branches are confidence values obtained from 1000 bootstrap replicates (only values over 70% are shown). AGs and subgroups of the *R. solani* isolates used in this study are highlighted in bold

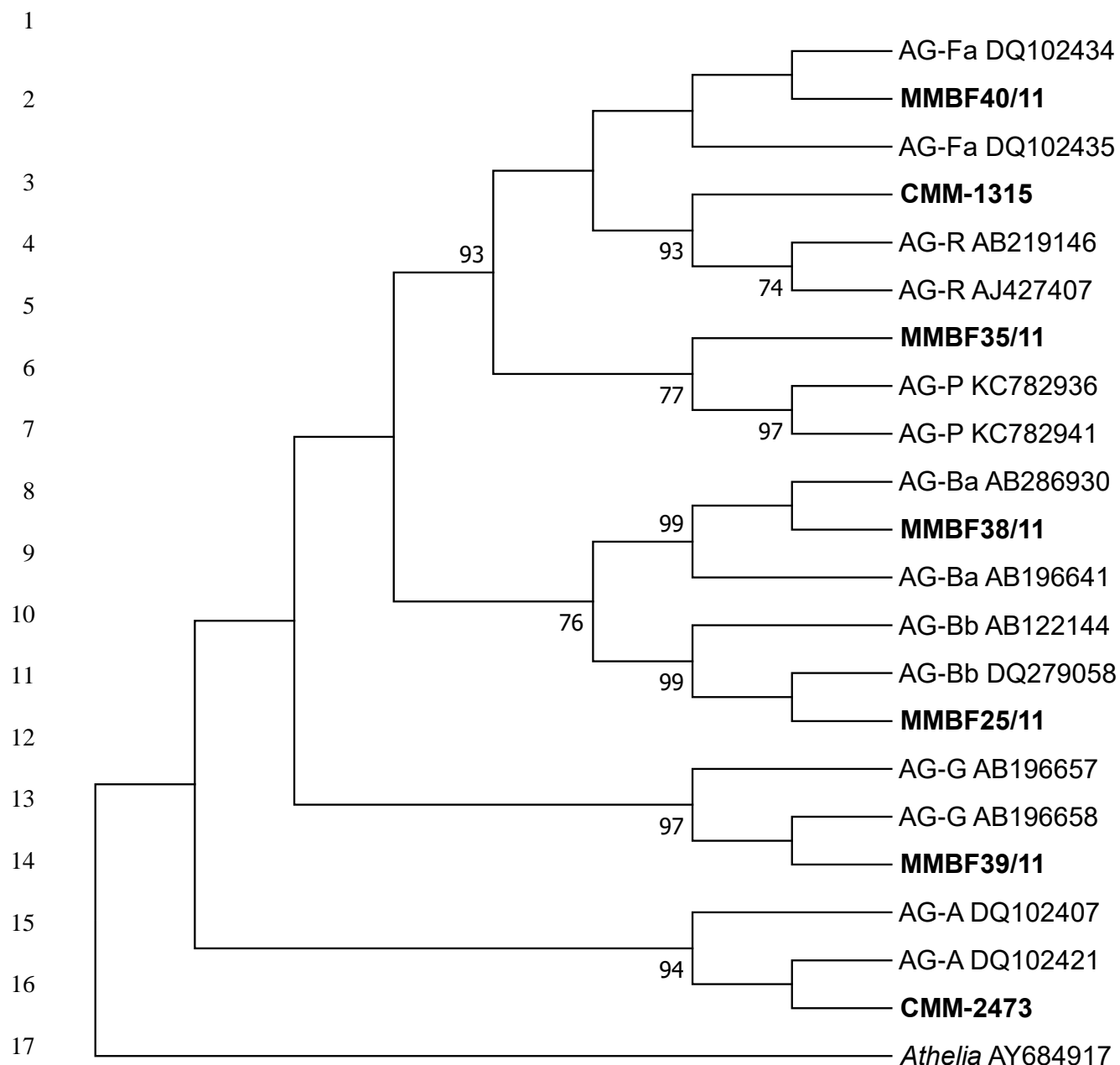


Fig. 2 Phylogenetic tree constructed by the maximum likelihood method obtained from the alignment of the sequences of the ITS-rDNA region of the binucleate *Rhizoctonia* isolates. The numbers on the branches are confidence values obtained from 1000 bootstrap replicates (only values over 70% are shown). AGs and subgroups of the binucleate *Rhizoctonia* isolates used in this study are highlighted in bold

1 **Supplementary Table 1** *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotium*
 2 *rolfsii* isolates used this study

3

Species	Isolate code	Host plant	Geographic origin	GenBank accession no.
<i>Fusarium oxysporum</i>	CMM-13	Cowpea	Brazil	ITS (under deposit) TEF (under deposit)
<i>Macrophomina phaseolina</i>	CMM-4047	Castor bean	Brazil	ITS (KU058929) TEF (KU058899)
<i>Sclerotium rolfii</i>	CMM-3065	Bean	Brazil	RPB2 (KM521797) TEF (KM521770)

4

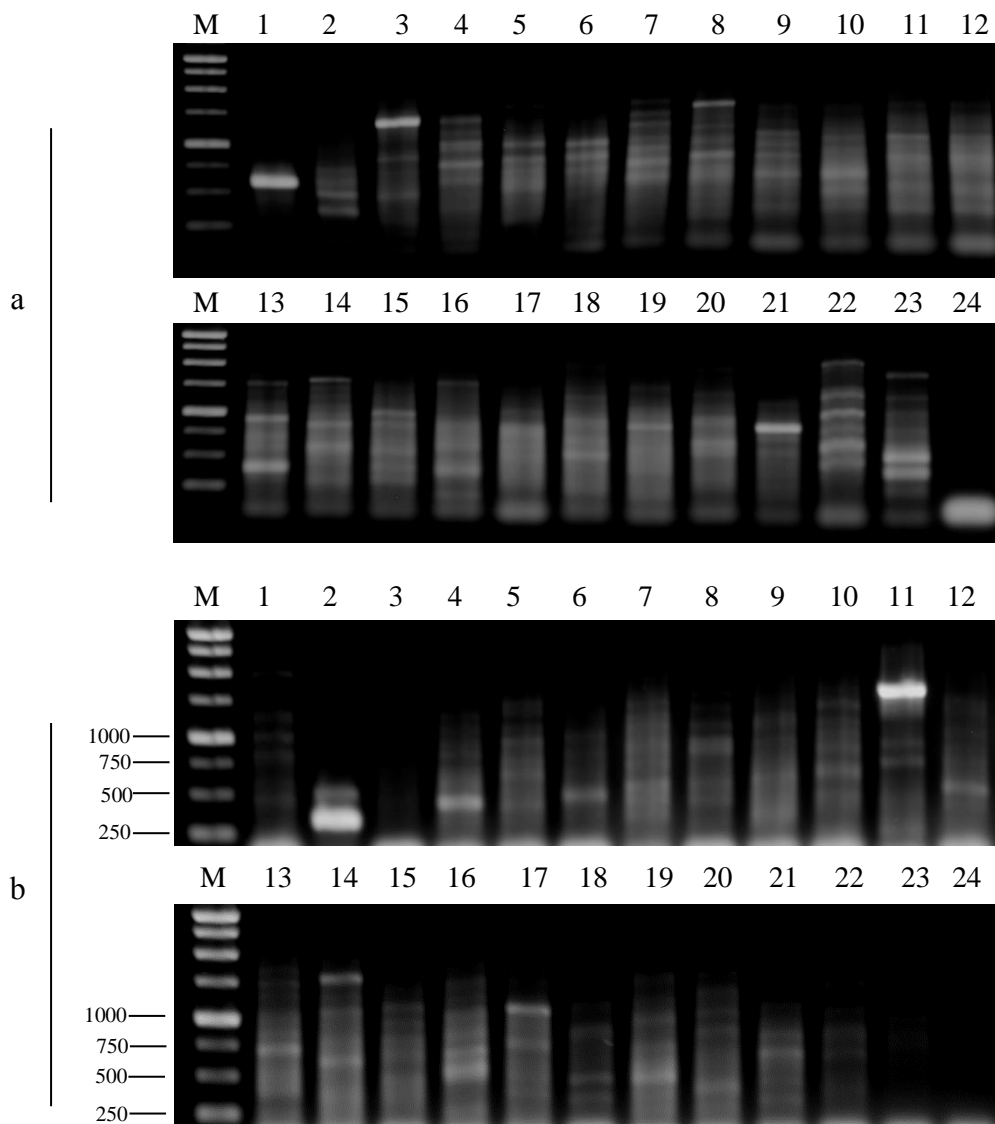
- 1 **Supplementary Table 2** *Rhizoctonia solani* (Rs) and binucleate *Rhizoctonia* (BNR) reference
 2 isolates used in phylogenetic analysis on ITS sequences
 3

GenBank accession no.	Isolate code	Reference	AG ^a	Host plant or substrate	Geographic origin
KF907702	STMX04-1	Rs	1 IA	Chinese flowering cabbage	Vietnam
KF907703	STMX04-2	Rs	1 IA	Chinese flowering cabbage	Vietnam
AB122139	R 147	Rs	1 IB	White clover	Japan
KF907717	LDDL04-1	Rs	1 IB	White cabbage	Vietnam
AJ238166	No-2	Rs	2 IIIB	Maize	Japan
AF354116	15 Rs	Rs	2 IIIB	<i>Lomandra longifolia</i>	Japan
AJ238164	K-1	Rs	2 IV	Sugarbeet	Japan
AJ238172	S-2	Rs	2 IV	Sugarbeet	Japan
AB054874	AI1-4	Rs	2 BI	Soil	Japan
AB054877	SHC81	Rs	2 BI	Soil	Japan
AB054876	SH1-3	Rs	2 BI	Soil	Japan
JX161902	RS 002	Rs	3 PT	Potato	New Zealand
JX161903	RS 004	Rs	3 PT	Potato	New Zealand
KF907732	STST03-2	Rs	4 HGI	Pak choi	Vietnam
KF907733	HNDD01-4	Rs	4 HGI	White cabbage	Vietnam
FJ492064	F5	Rs	4 HGII	Sugarbeet	United States
FJ492065	F6	Rs	4 HGII	Sugarbeet	United States
KF712285	Rh-81	Rs	4 HGIII	Potato	South Africa
DQ102449	Rs 20	Rs	4 HGIII	Strawberry	Israel
DQ913034	R 96	Rs	5	Potato	Finland
EF532827	Rh 184	Rs	5	Sugarbeet	Finland
KF907734	HNDA02-1	Rs	7	White cabbage	Vietnam
AF354099	63Rs	Rs	7	Soil	Japan
AF354108	111Rs	Rs	9	Potato	United States
AF354109	65Rs	Rs	9	Potato	United States
AF354114	Roth16	Rs	11	Soybean	United States
DQ102421	Str3	BNR	A	Strawberry	Israel
DQ102407	Str6	BNR	A	Strawberry	Israel
AB286930	Scl-2	BNR	Ba	Rice	Japan
AB196641	C-484	BNR	Ba	Rice	Japan

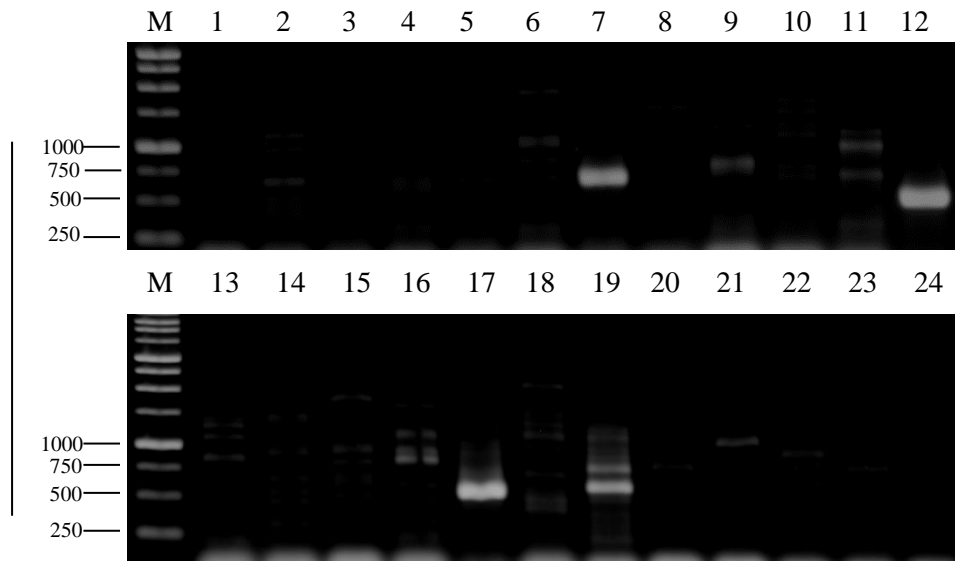
AB122144	C-350	BNR	Bb	Rice	Japan
DQ279058	-	BNR	Bb	Orchid	Netherlands
DQ102434	Str 10	BNR	Fa	Strawberry	Israel
DQ102435	Str 36	BNR	Fa	Strawberry	Israel
AB196657	1Shi-1299	BNR	G	<i>Rosa odorata</i>	Japan
AB196658	4Wak-600	BNR	G	<i>Rosa odorata</i>	Japan
KC782936	Rh 218	BNR	P	Apple rootstock	Austria
KC782941	Rh 225	BNR	P	Apple rootstock	Austria
AB219146	BN-37	BNR	R	<i>Cucumis</i>	United States
AJ427407	-	BNR	R	<i>Cucumis</i>	United States

4

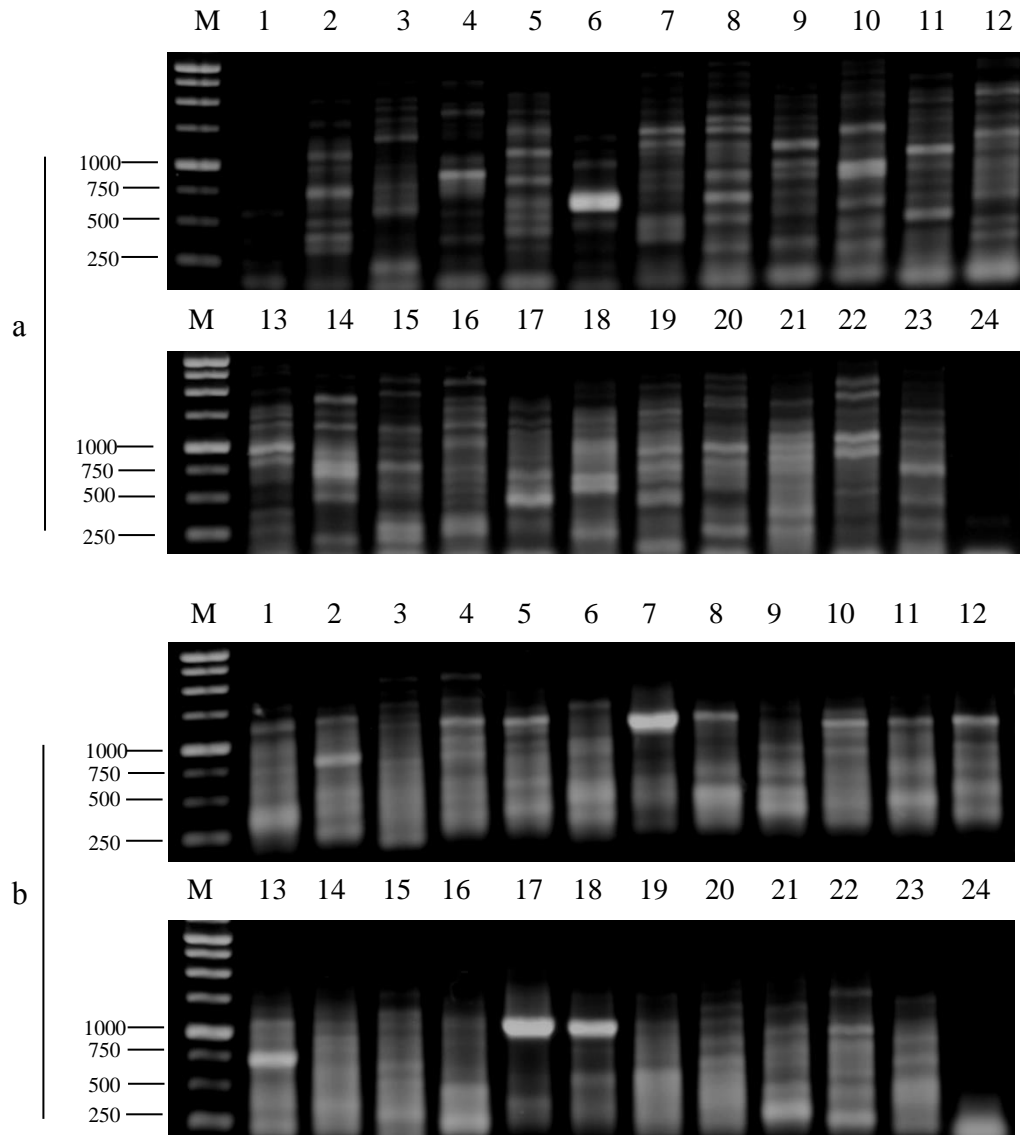
5 ^a Anastomosis group



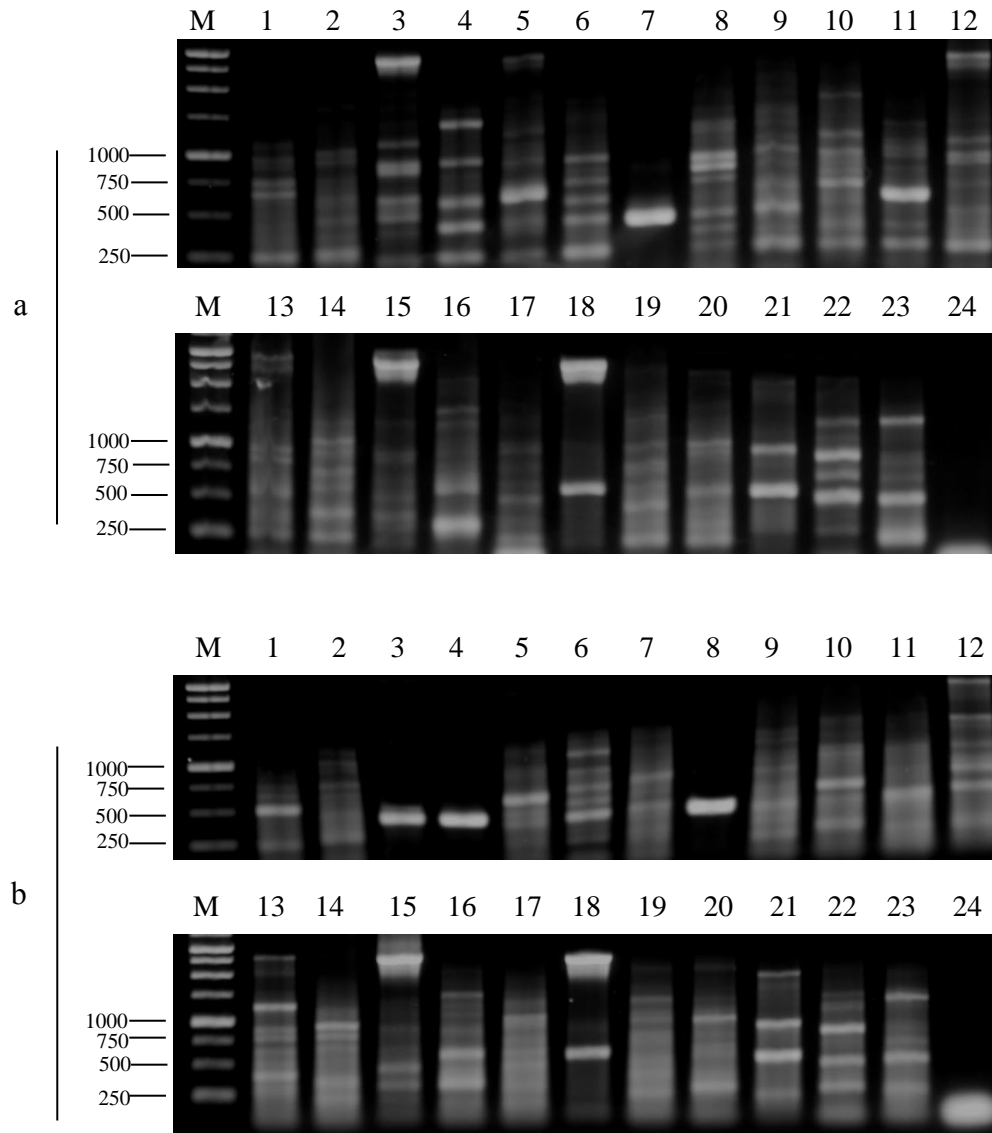
Supplementary Fig. 1 Amplification of genomic DNA using the primer sets of AG-1 IA (a) and AG-1 IB (b); M = Molecular marker (1-KB ladder marker); 1 = CS-KA (AG1-IA), 2 = SHIBA-2 (AG1-IB), 3 = C-96 (AG-2-2 IIIB), 4 = RI-64 (AG-2-2 IV), 5 = TE2-4 (AG-2 BI), 6 = CMM-1806 (AG-3 PT), 7 = AH-1 (AG-4 HGI), 8 = MMBF45/11 (AG-4 HGII), 9 = CMM-2989 (AG-4 HGIII), 10 = CU-8904 (AG-5), 11 = HO-1556 (AG-7), 12 = Sq R1 (AG-9), 13 = RH-31 (AG-11), 14, CMM-1806 (AG-A), 15 = AH-1 (AG-Ba), 16 = MMBF25/11 (AG-Bb), 17 = MMBF40/10 (AG-Fa), 18 = MMBF39/10 (AG-G), 19 = MMBF35/10 (AG-P), 20 = CMM-1315 (AG-R), 21 = CMM-13 (*Fusarium oxysporum*), 22 = CMM-3065 (*Sclerotium rolfsii*), 23 = CMM-4047 (*Macrophomina phaseolina*) and 24 = water (H₂O)



Supplementary Fig. 2. Amplification of genomic DNA using the primer set of AG-2-1; M = Molecular marker (1-KB ladder marker); 1 = CS-KA (AG1-IA), 2 = SHIBA-2 (AG1-IB), 3 = C-96 (AG-2-2 IIIB), 4 = RI-64 (AG-2-2 IV), 5 = TE2-4 (AG-2 BI), 6 = CMM-1806 (AG-3 PT), 7 = AH-1 (AG-4 HGI), 8 = MMBF45/11 (AG-4 HGII), 9 = CMM-2989 (AG-4 HGIII), 10 = CU-8904 (AG-5), 11 = HO-1556 (AG-7), 12 = Sq R1 (AG-9), 13 = RH-31 (AG-11), 14, CMM-1806 (AG-A), 15 = AH-1 (AG-Ba), 16 = MMBF25/11 (AG-Bb), 17 = MMBF40/10 (AG-Fa), 18 = MMBF39/10 (AG-G), 19 = MMBF35/10 (AG-P), 20 = CMM-1315 (AG-R), 21 = CMM-13 (*Fusarium oxysporum*), 22 = CMM-3065 (*Sclerotium rolfsii*), 23 = CMM-4047 (*Macrophomina phaseolina*) and 24 = water (H₂O)



Supplementary Fig. 3. Amplification of genomic DNA using the primer sets of AG-3 PT (a) and AG-3 TB (b); M = Molecular marker (1-KB ladder marker); 1 = CS-KA (AG1-IA), 2 = SHIBA-2 (AG1-IB), 3 = C-96 (AG-2-2 IIIB), 4 = RI-64 (AG-2-2 IV), 5 = TE2-4 (AG-2 BI), 6 = CMM-1806 (AG-3 PT), 7 = AH-1 (AG-4 HGI), 8 = MMBF45/11 (AG-4 HGII), 9 = CMM-2989 (AG-4 HGIII), 10 = CU-8904 (AG-5), 11 = HO-1556 (AG-7), 12 = Sq R1 (AG-9), 13 = RH-31 (AG-11), 14, CMM-1806 (AG-A), 15 = AH-1 (AG-Ba), 16 = MMBF25/11 (AG-Bb), 17 = MMBF40/10 (AG-Fa), 18 = MMBF39/10 (AG-G), 19 = MMBF35/10 (AG-P), 20 = CMM-1315 (AG-R), 21 = CMM-13 (*Fusarium oxysporum*), 22 = CMM-3065 (*Sclerotium rolfsii*), 23 = CMM-4047 (*Macrophomina phaseolina*) and 24 = water (H₂O)



Supplementary Fig. 4. Amplification of genomic DNA using the primer sets of AG-4 HGI (a) and AG-4 HGII (b); M = Molecular marker (1-KB ladder marker); 1 = CS-KA (AG1-IA), 2 = SHIBA-2 (AG1-IB), 3 = C-96 (AG-2-2 IIIB), 4 = RI-64 (AG-2-2 IV), 5 = TE2-4 (AG-2 BI), 6 = CMM-1806 (AG-3 PT), 7 = AH-1 (AG-4 HGI), 8 = MMBF45/11 (AG-4 HGII), 9 = CMM-2989 (AG-4 HGIII), 10 = CU-8904 (AG-5), 11 = HO-1556 (AG-7), 12 = Sq R1 (AG-9), 13 = RH-31 (AG-11), 14, CMM-1806 (AG-A), 15 = AH-1 (AG-Ba), 16 = MMBF25/11 (AG-Bb), 17 = MMBF40/10 (AG-Fa), 18 = MMBF39/10 (AG-G), 19 = MMBF35/10 (AG-P), 20 = CMM-1315 (AG-R), 21 = CMM-13 (*Fusarium oxysporum*), 22 = CMM-3065 (*Sclerotium rolfsii*), 23 = CMM-4047 (*Macrophomina phaseolina*) and 24 = water (H₂O)

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

1. Os conjuntos de iniciadores para AG-1 IA, AG-1 IB, AG-2-1, AG-3 PT, AG-3 TB, AG-4 HGI e AG-4 HGII não são eficazes para detecção dos respectivos grupos de anastomose (AGs) de *Rhizoctonia solani*.
2. Os conjuntos de iniciadores para AG-1 IA, AG-3 PT, AG-3 TB, AG-4 HGI e AG-4 HGII podem amplificar o DNA de espécies fúngicas não relacionadas com *R. solani*.
3. Há necessidade do desenvolvimento de novos iniciadores específicos para detecção dos AGs de *R. solani* baseados em regiões gênicas mais variáveis considerando o número de AGs atualmente conhecidos.

Normas do Periódico

European Journal of Plant Pathology

Instructions for Authors

Types of papers

All contributions should be submitted in English and are subject to peer reviewing. Research papers describing original research should address biological problems. They should contain a novel and well formulated hypothesis, a sound experimental approach, results that confirm or reject the hypothesis and they should offer novel insight into the existing body of knowledge. Research papers should not exceed twenty pages of printed text, including tables, figures and references (one page of printed text = approximately 600 words).

The Short communication format is intended for presentation of important observations that can be clearly described in an abbreviated format. For example, molecular data useful for typing pathogens or the first report of preliminary data would be suitable for this section.

Short descriptions of genes isolated from pathogens and pest organisms, and of plant genes with a putative function in plant– pathogen interactions can also be presented in the Short communication format. Short communications should contain firm data and will be refereed. A Short communication should have an abstract and should not exceed four printed pages in total. There are no subheadings and a description of Materials and methods should be integrated in the text.

Authors who wish to submit a Mini review should first contact the Editorial Office, since only Mini reviews on topical issues will be considered for publication. Mini reviews should not exceed 12 pages of printed text, including tables, figures, and references.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Important notes

- Upon submission, the **e-mail addresses of all authors** will be requested. At the end of the submission process, the corresponding author will receive an acknowledgement e-mail and all co-authors will be contacted automatically to confirm their affiliation to the submitted work.
- Please note that it is mandatory to use **line numbering** for the manuscript. If a manuscript does not have line numbers it is returned to the author.

Title page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article

Harris, M., Karper, E., Stacks, G., Hoffman, D., DeNiro, R., Cruz, P., et al. (2001). Writing labs and the Hollywood connection. *Journal of Film Writing*, 44(3), 213–245.

- Article by DOI

Slifka, M. K., & Whitton, J. L. (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Journal of Molecular Medicine*, <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

Calfee, R. C., & Valencia, R. R. (1991). *APA guide to preparing manuscripts for journal publication*. Washington, DC: American Psychological Association.

- Book chapter

O’Neil, J. M., & Egan, J. (1992). Men’s and women’s gender role journeys: Metaphor for healing, transition, and transformation. In B. R. Wainrib (Ed.), *Gender issues across the life cycle* (pp. 107–123). New York: Springer.

- Online document

Abou-Allaban, Y., Dell, M. L., Greenberg, W., Lomax, J., Peteet, J., Torres, M., & Cowell, V. (2006). Religious/spiritual commitments and psychiatric practice. Resource document. American Psychiatric Association. http://www.psych.org/edu/other_res/lib_archives/archives/200604.pdf. Accessed 25 June 2007.

Journal names and book titles should be italicized.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 3 kB)

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.