

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE  
POPULAÇÕES DE *Rhizoctonia solani* AG-1 IA NO BRASIL

Maisa Boff Ciampi  
Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Abril de 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE  
*Rhizoctonia solani* AG-1 IA NO BRASIL

Maisa Boff Ciampi

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini

Co-orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Abril de 2008

Ciampi, Maisa Boff  
C565d Diversidade genética e estrutura de populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA no Brasil / Maisa Boff Ciampi. -- Jaboticabal, 2008  
xii, 68 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008  
Orientador: Paulo C. Ceresini  
Banca examinadora: Lilian Amorin, Anete Pereira de Souza, Ester Wickert, João Ademir de Oliveira  
Bibliografia

1. Soja. 2. Fluxo gênico. 3. Polimorfismos. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:632.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CÂMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE  
RHIZOCTONIA SOLANI AG-1 IA NO BRASIL

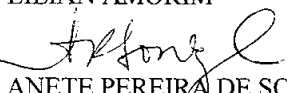
**AUTOR:** MAISA BOFF CIAMPI

**ORIENTADOR:** Dr. PAULO CEZAR CERESINI  
Dra. ELIANA GERTRUDES MACEDO LEMOS


Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em AGRONOMIA  
(GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS) pela Comissão Examinadora:

  
p/ Dr. PAULO CEZAR CERESINI

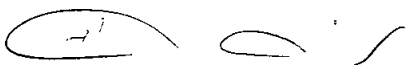
  
Dra. LILIAN AMORIM

  
Dra. ANETE PEREIRA DE SOUZA

  
Dra. ESTER WICKERT

  
Dr. JOÃO ADEMIR DE OLIVEIRA

Data da realização: 30 de abril de 2008.



Presidente indicado pela Comissão Examinadora  
Dr. JOÃO ADEMIR DE OLIVEIRA

**Obs:** O Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini, orientador da pós-graduanda, participou através de videoconferências de acordo com o § 5º do Artigo 47 da Resolução UNESP 49, de 11/07/2006 que altera a resolução UNESP 88/2002, que dispõe sobre o Regimento Geral de Pós-Graduação da Unesp e consulta efetuada a Pró-Reitoria em 16/04/2008.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MAISA BOFF CIAMPI** - nascida em 26 de julho de 1978, em Itu, SP. Licenciada (2000) e bacharel (2001) em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), câmpus de Botucatu e mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela Faculdade de Ciências Agrônômicas e Veterinárias (FCAV) da UNESP, câmpus de Jaboticabal. Desde agosto de 2004 é aluna de doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) na FCAV-UNESP. De novembro de 2006 a novembro de 2007, realizou estágio sanduíche pelo Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDEE), junto ao Plant Pathology Group, Institute of Integrative Biology, Instituto Federal Suíço de Tecnologia (Eidgenössische Technische Hochschule Zürich – ETH), em Zurique, na Suíça.

*"Nenhuma mente que se abre para uma nova  
idéia voltará a ter o tamanho original"*

(Albert Einstein)

Ao meu namorado Victor,

Pelas doses diárias de amor, incentivo  
e sensibilidade dispendidos para que  
um sonho fosse realizado

*Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Paulo C. Ceresini pela orientação e oportunidade oferecida.

À Profa. Eliana G. de Macedo Lemos pela confiança, assistência e hospedagem em seu laboratório.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas de estudo no país e durante o estágio sanduíche realizado na Suíça, em particular à Marta Elias Ribeiro de Oliveira, responsável pelo meu processo.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), em especial ao Profs. Drs. Rinaldo César de Paula e Dilermando Perecin pelo incentivo e assistência indispensáveis à condução do presente trabalho.

Aos membros do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), do Departamento de Tecnologia, FCAV-UNESP pela colaboração na execução dos experimentos, pelo convívio e pelos momentos alegres durante o curso, em especial à Profa. Dra. Lúcia M. Carareto Alves e aos amigos João, Luciano, Cândida, Érico, Silvana, Rodrigo, Ester, Rosinha, Eliamar, Maurício Cantão, Tehuni, Tereza, Fernanda, Maurício Dimitrov, Douglas e Renato.

Ao Prof. Dr. Bruce McDonald (Institute of Plant Sciences, Swiss Federal Institute of Technology - ETH - Zurique, Suíça) pela oportunidade de realização de estágio sanduíche e pelas valiosas contribuições às análises e à redação do trabalho.

Aos membros do “ETH Plant Pathology Group” em especial a Marcello Zala e à Ulrike Rosenberger pela assistência dispendida durante o estágio na Suíça.



Ao Dr. Mauro Jr Natalino da Costa (Fundação Rio Verde, Lucas do Rio Verde, MT) pelo auxílio na condução da amostragem no Mato Grosso.

Ao Dr. Maurício Conrado Meyer (Embrapa Soja) pela cessão dos isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA do Tocantins e do Maranhão.

À Msc. Elaine Costa Souza, principalmente pelo auxílio no isolamento do patógeno.

Às funcionárias da Seção de Pós-graduação da FCAV-UNESP.

À minha família, em especial a meus pais José Carlos e Cidinha, pelo incentivo e exemplo de otimismo, compreendendo as minhas constantes ausências, em nome de um ideal.

Aos amigos Cláudia, Maria Teresa (Tetê), Amanda, Aguida, Juliano, Luana e Mariana (Miss) pelo apoio, companheirismo e amizade ao longo da execução desse trabalho.

Aos amigos Elena, Alice, Vasudha, Alex e especialmente à Justyna, que deram um novo sentido para minha estadia em Zurique.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE ANEXOS.....	X
RESUMO.....	XI
SUMMARY.....	XII
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
CAPÍTULO 2 - ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE <i>RHIZOCTONIA SOLANI</i> AG-1 IA DE SOJA NO BRASIL.....	05
Resumo.....	05
Introdução.....	06
Material e Métodos.....	08
Resultados.....	16
Discussão.....	27
Conclusões.....	32
CAPÍTULO 3 - DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MARCADORES MOLECULARES E CARACTERIZAÇÃO DE SNPS EM <i>RHIZOCTONIA SOLANI</i> AG-1 IA NO BRASIL.....	35
Resumo.....	35
Introdução.....	36
Material e Métodos.....	37
Resultados.....	42
Discussão.....	51
Conclusões.....	54
REFERÊNCIAS.....	60

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1. Alterações em tamanho de microssatélites durante o processo de replicação do DNA, por deslizamento da DNA polimerase (*slippage*), levando à formação de novos alelos por adição ou remoção de uma unidade repetitiva.....03

### CAPÍTULO 2

- Figura 1. Localização das populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA amostradas no Brasil.....09
- Figura 2. Distribuição da frequência de alelos de dez loci de microssatélites nas populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA da soja no Brasil.....17
- Figura 3. Coeficientes de parentesco ( $Q$ ), inferidos pelo programa STRUCTURE, para genótipos multilocos de microssatélites de populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA de soja no Brasil.....25
- Figura 4. Estimativas de parâmetros demográficos para populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA de soja no Brasil, baseadas na variação de dez loci de microssatélites.....26

### CAPÍTULO 3

- Figura 1. Polimorfismos em região amplificada do marcador R44L de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.....47
- Figura 2. Polimorfismo em região amplificada do marcador R68L de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. ....48
- Figura 3. Espectro de polimorfismo dos loci R44L, R61R, R68L, R116L, R148L e R148R, exibido como uma janela deslizante de 5 pares de bases (pb), com passos de 2 pb. ....50

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 1. Populações de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA de soja usadas nesse estudo.....	10
Tabela 2. Descrição do conteúdo associado a dez locos de microssatélites usados para genotipagem de populações de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA de soja no Brasil.....	18
Tabela 3. Medidas de diversidade genotípica e gênica em populações de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA de soja no Brasil .....	19
Tabela 4. Distribuição hierarquizada da diversidade genética entre populações de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA de soja no Brasil.....	20
Tabela 5. Medidas de diferenciação entre populações de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA de soja no Brasil, baseadas em $R_{ST}$ .....	20
Tabela 6. Testes para associação aleatória de alelos em cada loco e entre pares de locos nas populações de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA da soja no Brasil.....	22
Tabela 7. Resultados de testes para alterações em tamanho de populações de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA de soja no Brasil, sob o modelo evolutivo de passos mutacionais (SMM).....	24

### CAPÍTULO 3

Tabela 1. Isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA empregados nesse estudo.....	38
Tabela 2. Características dos dez marcadores moleculares polimórficos de seqüenciamento, desenvolvidos para <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA.....	40
Tabela 3. Análise descritiva da variação molecular de seis marcadores nucleares em seqüências de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA.....	45

## LISTA DE ANEXOS

### CAPÍTULO 2

Anexo 1. Genótipos multilocos de microsatélites (MLMG) identificados em populações de *R. solani* AG-1 IA no Brasil.....33

### CAPÍTULO 3

Anexo 1. Consensos das seqüências parciais das sete sondas de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA do arroz, utilizados como sondas para genotipagem por RFLP e o resultado da comparação por BLASTX dessas seqüências com as disponíveis no banco de dados NCBI GenBank.....55

Anexo 2. Análise descritiva da variação molecular de seis marcadores nucleares em amostras de isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.....57

## **DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE *Rhizoctonia solani* AG-1 IA NO BRASIL**

**RESUMO** - O basidiomiceto *Rhizoctonia solani* AG-1 IA é um dos principais patógenos da soja no Brasil, onde as perdas estimadas com a doença podem atingir 30 a 60%. 232 isolados de *R. solani* AG-1 IA foram coletados de campos comerciais de soja nas principais regiões produtoras do país e genotipados usando dez locos polimórficos de microsatélites. As baixas diversidades genotípicas, os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), o desequilíbrio gamético e o elevado grau de subdivisão populacional encontrados nessas populações são consistentes com predominância de reprodução assexuada e dispersão de propágulos vegetativos a curtas distâncias. Os níveis de subdivisão observados poderiam ser explicados pela migração histórica assimétrica entre as populações, indicando a população do Tocantins como a provável fundadora. As evidências de fluxo gênico restrito e modo reprodutivo misto enquadrariam o fungo na categoria de médio risco para potencial evolutivo de patógenos, sugerindo precaução quanto à aplicação de fungicidas ou melhoramento para genes de resistência. Também foi desenvolvido um método para detecção de SNPs em múltiplos locos por PCR, através da conversão de sondas de RFLP em seis marcadores co-dominantes de seqüenciamento, altamente informativos e polimórficos. Detectou-se de um a múltiplos alelos em cada isolado, para cada região analisada, indicando a condição heterocariótica do fungo. O maior número de polimorfismos SNPs foi detectado para o marcador R68L, com 18 mutações em 303 pares de bases. O conjunto de novos marcadores desenvolvido mostrou-se um sistema de genotipagem viável, possibilitando discriminação alélica precisa, com potencial de complementar os métodos existentes para estudo da biologia populacional de *R. solani* AG-1 IA e viabilizar estudos de caráter evolutivo.

**Palavras-Chave:** soja, queima foliar, polimorfismos, padrões migratórios, fluxo gênico, clonalidade.

## GENETIC DIVERSITY AND POPULATION STRUCTURE OF *Rhizoctonia solani* AG-1 IA FROM BRAZIL

**SUMMARY** - The Basidiomycete fungus *Rhizoctonia solani* AG-1 IA is a major pathogen of soybean in Brazil, where the average yield losses have reached 30 to 60%. 232 isolates of *R. solani* AG1 IA were collected from soybean fields in the most important soybean production areas in the country. These isolates were genotyped using ten microsatellite loci. Low genotypic diversity, departures from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), gametic disequilibrium and high degree of population subdivision found in these populations are consistent with predominantly asexual reproduction, short-distance dispersal of vegetative propagules, and limited long-distance dispersal. The observed levels of subdivision could be explained by asymmetric historical migration among the soybean-infecting populations, denoting TO06 as the founder population. Evidences of restricted gene flow and a mixed reproductive mode would fit the fungus into the medium-high risk category for pathogen evolutionary potential, suggesting the need for caution when applying fungicides or breeding for major-gene resistance. We also developed a method to detect SNPs in multiple loci by PCR, converting RFLP probes in six highly informative and polymorphic co-dominants sequencing markers. We have identified single and multiple alleles per isolate in each analyzed region, indicating the fungus heterokaryotic condition. The highest number of SNPs was detected at the R68L marker, with 18 mutations along 303 base pairs. The developed set of new markers proved to be a viable genotyping system, allowing precise allelic discrimination, with the potential to complement the methods already described to study the *R. solani* AG-1 IA population biology and making evolutionary studies feasible.

**Key words:** soybean, foliar blight, polymorphisms, migration patterns, gene flow, clonality.

## CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

*Rhizoctonia solani* Kühn é uma espécie complexa, composta por grupos de fungos geneticamente distintos, com diversas histórias de vida. A atual classificação dentro de *R. solani* é baseada no agrupamento de isolados em grupos de anastomose (AG), baseado nas interações entre suas hifas. O pareamento de isolados pertencentes ao mesmo AG pode resultar em reconhecimento e fusão de hifas (anastomose), ou rejeição, gerando incompatibilidade somática. Pareamentos entre AGs que não resultam em fusão de hifas sugerem acentuadas diferenças genéticas entre os isolados pareados (Cubeta & Vilgalys, 1997). No mínimo 14 AGs estão descritos dentro do complexo *R. solani* (Carling, 1996). Muitos AGs são divididos em subgrupos, que diferem por uma ou mais características bioquímicas, genéticas, fenotípicas ou patogênicas (Ogoshi, 1987). Informações atuais sugerem que AG e seus subgrupos representam unidades evolutivas independentes dentro de *R. solani* (Gonzalez et al., 2001; Vilgalys & Cubeta, 1994).

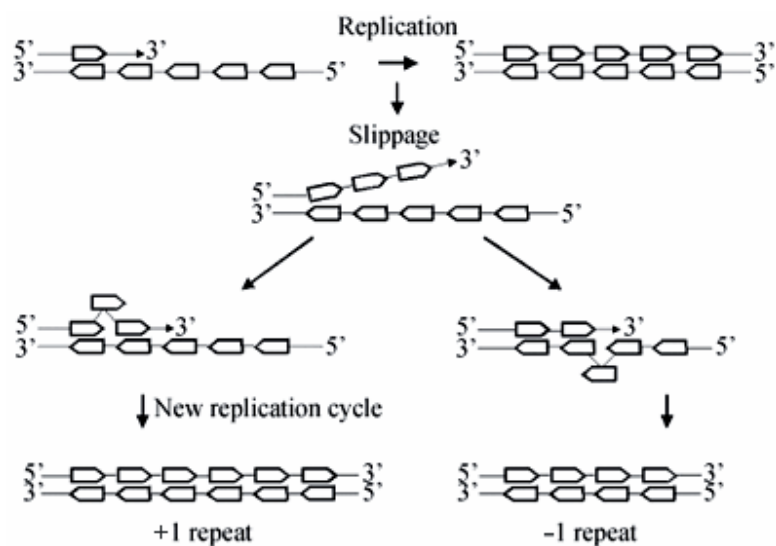
Complementando o conhecimento prático necessário para um controle de doenças de plantas bem-sucedido, estudos de genética de populações de fitopatógenos podem oferecer excelentes oportunidades para examinar os processos evolutivos envolvidos em patossistemas agroecológicos (McDonald & Linde, 2002a). O foco principal da genética de populações é a compreensão dos processos evolutivos moldando e mantendo a variação genética dentro e entre populações. A extensão e os padrões de diversidade genotípica dentro de populações podem ser usados para inferir se essas populações são clonais ou recombinantes. Inferências sobre migrações restritas e/ou seleção podem ser realizadas através da detecção de diferenças nas frequências alélicas entre sub-populações já que, na ausência de migrações recorrentes, as populações eventualmente divergem devido a alterações aleatórias nas frequências de alelos (mutações e deriva genética) (Milgroom & Peever, 2003). Também pode oferecer informações quanto ao futuro potencial evolutivo de fitopatógenos, extremamente úteis no manejo da cultura, visando a durabilidade de genes de resistência e evitando a seleção contra resistência a fungicidas (McDonald & Linde, 2002a; McDonald & Linde, 2002b).

Populações de fungos patogênicos podem apresentar estruturas genéticas variando de estritamente clonais a completamente panmíticas. A determinação da estrutura populacional torna-se uma ferramenta importante por possibilitar inferências sobre o modo



reprodutivo predominante nesses fungos. Em uma população recombinante, qualquer associação entre marcadores moleculares neutros e outras características decairia com o tempo, pois se espera que fungos exibindo trocas genéticas regulares e recombinação evoluam mais rapidamente que aqueles exibindo clonalidade estrita, uma vez que mutações raras associadas à resistência a fungicidas ou novas habilidades patogênicas podem ser trazidas juntas por meio de recombinação em genótipos novos e mais virulentos. Em uma população estritamente clonal, genótipos novos poderiam somente ser originados por acumulação seqüencial de mutações raras dentro de uma linhagem (Anderson & Kohn, 1998).

Dentre os tipos de marcadores moleculares utilizados em estudos populacionais e ecológicos, os microssatélites estão entre os mais populares e variáveis, compreendendo seqüências de nucleotídeos curtas (1 a 6 pares de bases), repetidas em *tandem* freqüentemente encontrados e aleatoriamente dispersos no genomas de eucariotos. A variação genética de muitos microssatélites é caracterizada pela elevada heterozigosidade e pela presença de múltiplos alelos. Assume-se que microssatélites são marcadores moleculares neutros, portanto, sua freqüência e distribuição devem refletir os processos mutacionais que ocorrem na população, livres de efeito de seleção, quando se encontram localizados em regiões não-codificantes do genoma (Ellegren, 2004). A dinâmica evolutiva dos microssatélites é apresentada pelo modelo de passos mutacionais (*Stepwise Mutation Model, SMM*) (Kimura & Ohta, 1975), o qual postula que mutações dentro de microssatélites promovem alterações em seu tamanho total, por inserção ou deleção de unidades repetitivas (modelo de *slippage*), a uma taxa da ordem de  $10^{-4}$  (Xu et al., 2000), como representado na figura abaixo:



**Figura 1.** Alterações em tamanho de microssatélites durante o processo de replicação do DNA, por deslizamento da DNA polimerase (*slippage*), levando à formação de novos alelos por adição ou remoção de uma unidade repetitiva (Oliveira et al., 2006).

Outra classe de marcadores moleculares populares em estudos ecológicos e evolutivos, os polimorfismos de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism = SNPs*) podem complementar as informações obtidas com marcadores microssatélites, promovendo uma melhor elucidação de processos demográficos históricos e de especiação. Existe um número maior de testes para detectar desvios da neutralidade, alterações de tamanho populacional e recombinação para dados de SNPs que para dados de microssatélites (Brumfield et al., 2003). SNPs nucleares exibem o mesmo sistema de variação que o DNA mitocondrial (mtDNA), facilitando comparações entre ambos os marcadores. Além disso, posições polimórficas são facilmente detectáveis em indivíduos heterozigotos analisando SNPs (como para alguns fungos, que se comportam como um dicário funcional), através das ambigüidades de bases (representando alelos distintos em cada cromossomo) características desses indivíduos.

O emprego de marcadores moleculares apropriado pode auxiliar significativamente a elucidação da biologia populacional do complexo *Rhizoctonia* (Cubeta & Vilgalys, 1997). Seriam especialmente informativos marcadores nucleares loco-específicos, para um acesso preciso e não-ambíguo de genótipos de isolados do fungo. Esses marcadores seriam idealmente representados por marcadores co-dominantes (isozimas, RFLP e microssatélites,

por exemplo), permitindo a identificação de clones resultantes de reprodução assexual, padrões migratórios e de fluxo gênico entre populações, além de marcadores moleculares multilocos, que exibam elevados níveis de variação, oferecendo o acesso a informações sobre sua origem evolutiva.

Dentro desse contexto, os objetivos específicos do presente estudo foram: a) mensurar a diversidade genética e genotípica em populações de *R. solani* AG-1 IA infectando soja no Brasil; b) descrever hierarquicamente a estrutura genética dentro e entre populações de *R. solani* AG-1 IA; c) inferir o modo reprodutivo predominante nessas populações; d) detectar migrantes e as prováveis rotas migratórias do patógeno no país; e) desenvolver um sistema de genotipagem através de seqüenciamento de múltiplos locos, para detecção de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs), visando identificar e diferenciar genótipos de *R. solani* AG-1 IA associado à soja e ao arroz no Brasil.

Neste estudo as seguintes hipóteses foram testadas: (i) populações de *R. solani* AG-1 IA de soja são geneticamente homogêneas (portanto não-subdivididas ou diferenciadas); (ii) populações de *R. solani* AG-1 IA de soja são sexualmente recombinantes em estrutura; (iii) o método de genotipagem de múltiplos locos é apropriado para estudos da biologia populacional de *R. solani* AG-1 IA, permitindo a diferenciação entre os estados homocariótico e heterocariótico do fungo, por polimorfismo bialélico simples, em cada loco analisado. Para investigar essas hipóteses, empregou-se uma estratégia de genotipagem por seqüenciamento de múltiplos locos, usando marcadores moleculares nucleares (seqüências de DNA) e microssatélites, visando identificar SNPs e diferenciar genótipos de *R. solani* AG-1 IA no Brasil. A informação gerada com esta pesquisa pode oferecer subsídios importantes para o manejo da mela da soja, oferecendo aos melhoristas informações essenciais sobre a composição de genótipos em cada uma das populações do patógeno. Assim, programas de melhoramento visando resistência a essa doença poderão testar as variedades melhoradas expondo-as à diversidade genética existente do patógeno, contribuindo para diminuir o risco de insucesso.

## **CAPÍTULO 2 - ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Rhizoctonia solani* AG-1 IA DE SOJA NO BRASIL**

### **Resumo**

O basidiomiceto *Rhizoctonia solani* AG-1 IA é um dos principais patógenos da soja no Brasil, onde as perdas médias estimadas de produção com a doença podem atingir 30 a 60% em alguns Estados. Atualmente, não há informação sobre os níveis de diversidade genética e estrutura populacional desse patógeno no país. Um total de 250 isolados de *R. solani* AG-1 IA foram coletados de seis áreas de cultivo comercial de soja nas principais regiões produtoras nas regiões Centro-oeste, Norte e Nordeste do Brasil. Esses isolados foram genotipados usando dez locos polimórficos de microssatélites. A maioria dos genótipos multilocos encontrados foram sítio-específicos, com poucos genótipos compartilhados entre populações. Significativa subdivisão das populações foi evidente. Elevados níveis de mistura de genótipos foram observados para populações do Mato Grosso (MT98) e do Tocantins (TO06). Após a remoção dos genótipos misturados, em três das seis populações detectou-se equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), consistente com recombinação sexual. As constatações de baixa diversidade genotípica, desvios do EHW, desequilíbrio gamético e elevado grau de subdivisão populacional nessas populações de *R. solani* AG-1 IA do Brasil são consistentes com predominância de reprodução assexuada, dispersão de propágulos vegetativos (micélio ou escleródios) a curta distâncias, possivelmente via sementes contaminadas. Nenhuma das populações do patógeno exibiu redução em tamanho populacional (efeito de gargalo de garrafa). Detectou-se migração histórica assimétrica entre as populações analisadas, o que poderia explicar os níveis de subdivisão observados.

**Palavras-chave:** queima foliar, fluxo gênico, clonalidade, padrões migratórios.

## Introdução

O Basidiomiceto *Thanatephorus cucumeris* (anamorfo = *Rhizoctonia solani*) grupo de anastomose (AG) 1 IA é considerado o principal patógeno de importantes culturas em todo o mundo, incluindo soja, milho e arroz (Bolkan & Ribeiro, 1985; Jones & Belmar, 1989). Em soja, *R. solani* AG-1 IA causa queima foliar (ou mela), uma das mais devastadoras doenças da cultura. Nos Estados onde as condições ambientais são favoráveis ao patógeno, as perdas podem variar de 31 a 60%, como constatado no Maranhão, Mato Grosso, Pará e Tocantins (Wrather et al., 1997; Yorinori, 1998). Nos Estados Unidos, as perdas estimadas pelo patógeno podem atingir 30 a 45% na Louisiana (Yang et al., 1990).

As estratégias de controle para essa doença são limitadas. Aplicações de fungicidas constituem as principais medidas para o manejo da doença. Estrobirulinas têm sido largamente utilizadas para o controle da mela e da ferrugem asiática (associada ao fungo *Phakopsora pachyrhizi*) (Navarini et al., 2007), podendo levar à seleção de resistência ao fungicida pelos patógenos (Meyer, 2002; Meyer et al., 2006). Não existem variedades resistentes disponíveis comercialmente. Melhoramento de soja, visando resistência à mela é difícil, uma vez que a resistência é expressa quantitativamente e o mecanismo de herança envolvido ainda não é claro (Marchetti & Bollich, 1991; Meyer et al., 2006; Yorinori, 1998).

Conhecendo a estrutura genética de populações de patógenos, podem-se realizar inferências sobre a história de vida e sobre os processos evolutivos que moldam as populações de patógenos em sistemas agroecológicos (McDonald & Linde, 2002a). A análise da distribuição da diversidade genética dentro e entre populações pode ser usada para identificar padrões de migração (Beerli & Felsenstein, 2001) e para revelar recombinação crítica (Liu et al., 1996). Um elevado grau de similaridade ou a detecção de alelos raros compartilhados entre populações separadas geograficamente oferece evidência de fluxo gênico entre elas, com possíveis implicações para a efetividade das estratégias de controle (McDonald & Linde, 2002a). O conhecimento sobre a estrutura genética de populações de um patógeno pode oferecer uma compreensão mais clara do seu futuro potencial evolutivo, podendo ser útil no aperfeiçoamento do manejo de genes de resistência e de fungicidas na agricultura (McDonald & Linde, 2002a; McDonald & Linde, 2002b).

A análise genética de populações também pode ser empregada para realizar inferências com relação ao modo reprodutivo, por exemplo, acessando a contribuição relativa

da reprodução assexuada e/ou sexuada em populações de um patógeno (Liu et al., 1996). Através da reprodução sexuada, genótipos recombinantes são produzidos, mantendo uma maior diversidade genotípica em populações sexuais quando comparadas às populações assexuais, com diversidades genéticas similares. Outro efeito da freqüente recombinação na estrutura de uma população é a associação aleatória de alelos em diferentes locos, tal que a freqüência dos genótipos nos gametas é aproximadamente igual ao produto das freqüências dos alelos que definem cada genótipo. Desvios das freqüências esperadas conduzem ao desequilíbrio gamético (ou desequilíbrio de ligação), que pode ser detectado com testes estatísticos (Liu et al., 1996).

*R. solani* é considerado um fungo assexual, disseminando e sobrevivendo por meio de micélio vegetativo e escleródios (Adams Jr, 1996). *R. solani* AG-1 IA em soja é único por ter um ciclo sexual ativo. Himênios e basidiósporos são freqüentemente observados em campos de soja, desempenhando um importante papel epidemiológico nessa doença (Jones & Belmar, 1989). Entretanto, atualmente não se sabe se a recombinação ocorre em isolados de campo e se AG-1 IA é homotático ou heterotático (Rosewich et al., 1999). Embora basidiósporos meióticos sejam observados em alguns casos, a detecção das reações de cruzamento e seus efeitos na estrutura das populações do patógeno não são simples de determinar *in vitro* para a maioria dos AGs de *R. solani* (Cubeta & Vilgalys, 1997). Homocários de *R. solani* não podem ser distinguidos dos heterocários devido à condição multinucleada de suas hifas e à ausência de grampos de conexão.

Atualmente, não existem informações disponíveis sobre a estrutura da população de *R. solani* AG-1 IA associada à soja no Brasil. Estudos prévios de variação genética do patógeno em soja têm enfatizado principalmente a diferenciação genética entre isolados obtidos de áreas distintas. Usando marcadores moleculares RAPD e seqüências ITS-rDNA, estes estudos evidenciaram alta diversidade genética nas populações de AG-1 IA em soja (Fenille et al., 2003; Fenille et al., 2002). Baseando-se em variação no operon ITS-5.8S rDNA, elevada diversidade de haplótipos foi detectada entre isolados brasileiros do patógeno em soja. Enquanto 16 haplótipos ITS foram encontrados entre 32 isolados de soja, apenas um único haplótipo ITS foi detectado entre 20 isolados de arroz, oriundos de diversos continentes (Ciampi et al., 2005). O haplótipo ancestral mais provável pode ter originado tanto do Mato Grosso ou do Maranhão (Ciampi et al., 2005).

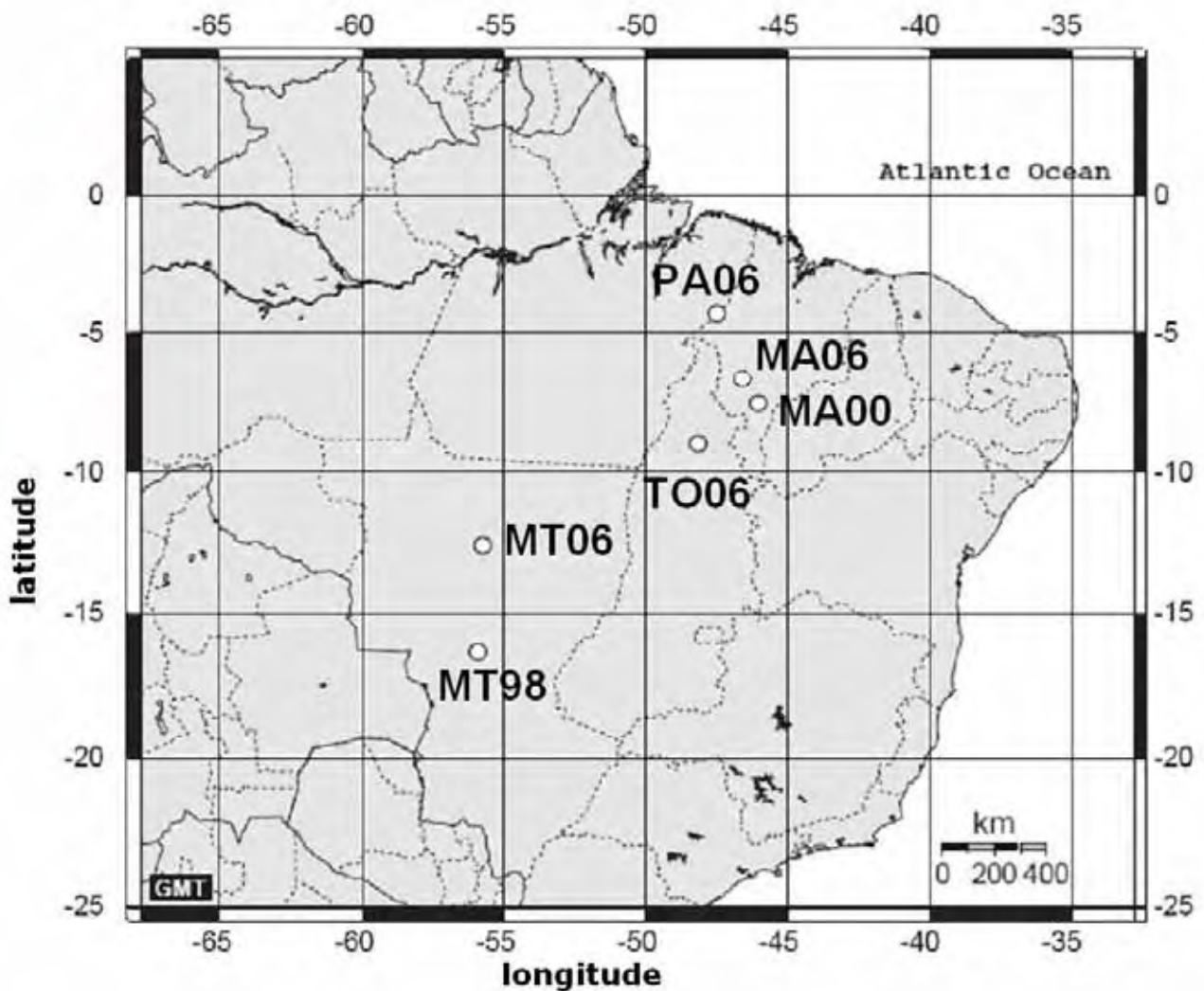
## Objetivos

Os objetivos desse estudo foram: a) mensurar a diversidade genética e genotípica em populações de *R. solani* AG-1 IA infectando soja no Brasil; b) descrever hierarquicamente a estrutura genética dentro e entre populações de *R. solani* AG-1 IA; c) inferir o modo reprodutivo predominante nessas populações; d) detectar migrantes de *R. solani* AG-1 IA e as prováveis rotas migratórias do patógeno no país. Neste estudo duas hipóteses foram testadas: (i) populações de *R. solani* AG-1 IA de soja são geneticamente homogêneas (portanto não-subdivididas ou diferenciadas); (ii) populações de *R. solani* AG-1 IA de soja são sexualmente recombinantes em estrutura. Para investigar essas hipóteses, foi empregada uma estratégia de genotipagem usando marcadores microssatélites, visando diferenciar genótipos de *R. solani* AG-1 IA de soja no Brasil.

## Material e Métodos

**Amostragem e isolamento de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.** Uma amostra composta por cinco populações, compreendendo um total de 232 isolados de *R. solani* AG-1 IA, foi coletada de campos comerciais de cultivo de soja naturalmente infectados em três Estados, nas regiões Centro-Oeste (Mato Grosso, MT), Nordeste (Maranhão, MA) e Norte (Tocantins, TO) do Brasil. Essas localidades representam as mais importantes áreas produtoras de soja no país, como descrito na Tabela 1 e ilustrado na Figura 1. As primeiras populações (MT98, MA00) foram coletadas em 1998 e 2000, de locais distantes 1500 km aproximadamente. Em 2006, três populações adicionais foram amostradas, duas delas de locais diferentes (MT06, TO06) e uma delas (MA06) da mesma área de uma das populações amostradas previamente (MA00). Amostras de plantas infectadas, exibindo sintomas característicos de mela foram coletadas de cada campo, de três a seis focos de infestação (com pelo menos 10 m de distância entre eles) em cada linha, com um total de 10 a 15 linhas por campo. O isolamento do fungo foi realizado transferindo-se fragmentos de folhas infectadas para placas de Petri contendo meio seletivo (Ko & Hora, 1971) e incubadas a 25°C, no escuro. Culturas puras de *R. solani* foram estabelecidas por transferência de hifas (após crescimento em meio seletivo por 24 a 48 horas) para meio batata-dextrose-ágar (BDA). Após dez dias de cultivo, escleródios de cada isolado foram transferidos para criotubos de 1,8 mL, contendo sílica gel

anidra e mantidos a 4°C, visando armazenamento a longo prazo. O grupo de anastomose dos isolados foi determinado através de amplificação seletiva de parte da região 28S-rDNA, usando um par de iniciadores específicos para *R. solani* (Matsumoto, 2002): AG-comum (F) 5'-CTCAAACAGGCATGCTC-3' e AG-1 IA específico (R) 5'-CAGCAATAGTTGGTGA-3'.



**Figura 1.** Localização das populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA amostradas no Brasil. Os valores de latitude (N-S) e longitude (L-O) são indicados no mapa.



**TABELA 1. Populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA de soja usadas nesse estudo.**

Estado	Origem	Isolados	População	Coordenadas geográficas	Hospedeiro	Cultivar	Ano de coleta	Fonte
Mato Grosso	Lucas do Rio Verde	54	MT98	-55.93 L -16.33 S	soja	FT-108	1998	R.C. Fenille
	Sorriso	55	MT06	-55.75 L -12.60 S	soja	Perdiz	2006	M.B. Ciampi
Maranhão	Balsas	10	MA00	-46.05 L -7.52 S	soja	Sambaíba	2000	M.C. Meyer
	Balsas	91	MA06	-47.05 L -6.52 S	soja	Msoy 8925	2006	M.C. Meyer
Tocantins	Tupirama	22	TO06	-48.17 L -8.97 S	soja	Candeia	2006	M.C. Meyer

**Extração de DNA e genotipagem por microssatélites.** O DNA genômico de cada isolado foi extraído como descrito previamente (Linde et al., 2005). Dez marcadores co-dominantes do tipo microssatélite (SSR), representando dez locos de polimorfismo conhecido (Zala et al., 2007), foram usados para genotipagem de cada isolado usando iniciadores marcados com fluorescência. Reações da polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas separadamente para cada loco SSR em volume de 20  $\mu$ L, contendo 5  $\mu$ L de DNA genômico (a uma concentração final de 5 a 15 ng), 2  $\mu$ L de tampão 10x, 0,4 mM de dNTPs, 0,3  $\mu$ M de cada iniciador e 1 unidade de *Taq* polimerase. As PCRs incluíram uma denaturação inicial de 2 min a 96°C, seguida por 35 ciclos de denaturação por 30 seg a 96°C, pareamento por 30 seg a 50°C e alongação por 30 seg a 72°C, além de uma extensão final de 5 min a 72°C. Sendo que não foi possível obter amplicons de todos os isolados de soja, usando o conjunto de iniciadores descrito previamente (Zala et al., 2007) para o loco Tc10, um novo par de iniciadores foi projetado para esse loco, como se segue: Tc10newF2 (5'-GGTTCTTCGAAAAGATCAAGTAAGC-3'), marcado com o corante fluorescente 6-FAM, e Tc10newR2 (5'-TTGCTGGGGTTGTTGAGGTT-3'), não marcado. Os produtos de PCR amplificados foram separados em seqüenciador ABI 3700 usando GeneScan 500 Liz como marcador de tamanho (ambos fornecidos por Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. As análises dos fragmentos e a identificação dos alelos foram efetuadas pelos programas GENESCAN e GENOTYPER versão 3.7, fornecidos pelo mesmo fabricante. A classificação dos alelos em categorias de tamanho de fragmento, consistentes com um incremento das respectivas unidades repetitivas descritas em Zala et al. (2007), foi implementada usando o programa FLEXIBIN (Amos et al., 2007).

## **Análise de dados**

**Informações sobre microssatélites e riqueza alélica das populações.** Em todas as análises, por se desconhecer a fase haplóide do organismo, assumiu-se *R. solani* AG-1 IA como um dicário ou um diplóide funcional. Todos os dados gerados foram consistentes com essa suposição. Devido à complexidade envolvendo a definição de população em fungos, considerou-se como uma população um grupo de indivíduos coletados de uma mesma localidade, ao mesmo tempo, como geralmente definido para populações de fungos (Anderson & Kohn, 1998). Variações em tamanho de alelos e número de repetições, número total e médio de alelos por loco e a identificação de alelos únicos (presentes apenas em uma das populações) foram determinados usando informação de frequência de alelos com o programa CONVERT versão 1.31 (Glaubitz, 2004).

**Diversidade genotípica.** Um genótipo multilocos SSR para cada isolado foi determinado usando o programa GENOTYPE (Meirmans & Van Tienderen, 2004), na forma de um código numérico de 20 dígitos, representando o conjunto dos alelos para cada um dos dez locos, como descrito no Anexo 1. Isolados exibindo o mesmo genótipo multilocos SSR foram considerados membros da mesma linhagem clonal. Vários índices de diversidade genotípica foram determinados: (a) número de genótipos por população; (b) genótipos população-específicos; (c) a fração clonal (ou porcentagem de isolados originados por reprodução assexuada) calculada por  $1 - [(\text{número de genótipos distintos})/(\text{número total de isolados})]$  (Zhan et al., 2003); (d) diversidade genotípica de Stoddart (Stoddart & Taylor, 1988) medida por  $G_o = 1/\sum p_i^2$ , onde  $p_i$  é a frequência de um genótipo multilocos particular, e a respectiva *evenness* ( $G_o$  escalada pelo número máximo de genótipos esperados para aquele tamanho amostral), que indica como os genótipos são distribuídos uniformemente na população. Um valor de *evenness* igual a 1 indica que todos os genótipos da população têm frequências idênticas). Essas medidas foram calculadas pelo programa GENODIVE (Meirmans & Van Tienderen, 2004). Testou-se a significância estatística das diferenças em diversidade genotípica entre pares de populações usando *bootstrap* (re-amostragem com substituição), onde indivíduos de cada população foram re-amostrados e os índices de diversidade foram recalculados e comparados após cada rodada (Manly, 1991), em 1000 permutações, com sub-amostragens para equiparar ao tamanho da menor população (Grunwald et al., 2003).

**Diversidade genética e diferenciação entre populações.** A diversidade genética de Nei foi estimada como  $n/(n-1) \cdot (1 - \sum_i p_i^2)$ , onde  $p$  representa a frequência observada do  $i^{\text{ésimo}}$  alelo (Nei, 1987). A riqueza alélica foi estimada, para cada população de *R. solani* AG-1 IA, como o número médio de alelos por loco (El Mousadik & Petit, 1996) por rarefação, abordagem que utiliza a frequência de alelos em um loco particular para estimar o número de alelos que poderiam ocorrer nesse loco em amostras menores de indivíduos, padronizando a medida pela população de menor tamanho e definido após a eliminação dos clones, mantendo apenas os genótipos únicos (correção de clones). Medidas de riqueza alélica e diferenças significativas quanto ao conteúdo alélico entre pares de populações de *R. solani* AG-1 IA foram calculadas pelo programa FSTAT versão 2.9.3 (Goudet, 1995).

Análise espacial de variância molecular (SAMOVA) foi usada para definir grupos de populações que são geograficamente homogêneas e maximamente diferenciadas umas das outras. Essa abordagem pode ser aplicada para dados genotípicos e haplotípicos e não assume equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações nem equilíbrio de ligação entre locos (Dupanloup et al., 2002). O método usa um procedimento simulado de anelamento para dividir as  $n$  populações amostradas em  $K$  grupos (assume-se  $K$  como conhecido), visando encontrar a composição dos  $K$  grupos e maximizar a proporção da variância genética global devido à diferenças entre grupos de populações (Excoffier et al., 1992). Essa análise foi executada com o programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup et al., 2002).

Após definir os  $K$  grupos, a distribuição da diversidade genética foi avaliada com base em análise hierarquizada de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992; Weir, 1996; Weir & Cockerman, 1984). Com o objetivo de quantificar a diferenciação entre pares de populações e acessar o grau de subdivisão nessas populações, foram calculados índices de fixação (Estatística  $F$  de Wright) baseado na soma do quadrado das diferenças de tamanho para locos microssatélites ( $R_{ST}$ ) (Slatkin, 1995). A distribuição nula da estatística  $F$  para pares de populações, sob a hipótese de não-diferenciação entre elas, foi obtida permutando haplótipos entre as populações do par. A diferenciação genética entre pares de populações foi considerada significativa quando a probabilidade ( $P$ ) foi inferior a 5 % ao nível nominal. Uma análise hierárquica da variância foi conduzida, decompondo os componentes da co-variância devido ao efeito entre grupos de populações, ao efeito interpopulacional dentro de cada grupo e ao efeito intrapopulacional. A significância dos índices de fixação foi testada usando abordagem não-paramétrica (Excoffier et al., 1992), com 1023 permutações, com o programa ARLEQUIN versão 3.11 (Excoffier et al., 2005).

**Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio gamético.** Visando acessar a contribuição relativa da recombinação para a estrutura genética das populações de *R. solani* AG-1 IA, foram investigadas associações dentro e entre os locos através dos testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e associação multilocos, respectivamente. Para o teste de EHW, que examina a associação aleatória de alelos dentro de cada loco, testando o ajuste das frequências esperadas sob EHW (Hartl & Clark, 1997) para cada população, foi empregado um teste análogo ao teste exato de Fisher (Guo & Thompson, 1992). Valores de  $P$  foram obtidos usando o método de cadeias Markov Monte Carlo (MCMC), gerando uma exata distribuição de probabilidade não enviesada por alelos raros ou tamanho amostral reduzido (Raymond & Rousset, 1995), implementado em ARLEQUIN versão 3.11. Calculou-se o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) através dos locos segundo Weir & Cockerman (1984), para verificar se houve um déficit ou excesso significativo de heterozigotos (em relação às expectativas no EHW), baseado em 1000 permutações e implementado em ARLEQUIN 3.11.

As associações entre locos foram examinadas usando, como teste de desequilíbrio gamético, o teste exato de Fisher (Garnier-Gere & Dillmann, 1992), baseado em algoritmo MCMC, com 1000 aleatorizações usando o programa GENEPOP versão 3.4 (Raymond & Rousset, 1995). Dois locos foram considerados em desequilíbrio gamético (ou desequilíbrio de ligação) quando valores de  $P$  foram iguais ou inferiores a 0,05. Também foram calculados o Índice de Associação ( $I_A$ ) para cada população (Maynard Smith et al., 1993), uma medida tradicional de desequilíbrio de ligação de multilocos, onde é calculada a distância entre todos os pares de indivíduos da população (número de locos em que eles diferem), comparando a variância dessas distâncias com àquelas esperadas se não houvesse desequilíbrio gamético entre os pares de loci, além da medida alternativa  $\bar{r}_D$ , que é menos sensível à variação no número de locos. Ambas as medidas foram testadas para significância com 1000 aleatorizações e fixando dados perdidos, pelo programa MULTILOCUS versão 1.3 (Agapow & Burt, 2001), testando-se a hipótese nula de completa panmixia (ou seja, de nenhuma ligação entre pares de loci), com base em 1000 randomizações. Para dados de organismos diplóides, ambos os alelos de cada loco são embaralhados/misturados juntos, desse modo as associações entre alelos em cada loco são mantidas nos conjuntos de dados randomizados, testando apenas para associações entre locos.

**Teste para mistura populacional ou estrutura oculta de populações.** Desvios do EHW e equilíbrio gamético observados em algumas populações de *R. solani* AG-1 IA poderiam ser causados pelo efeito Wahlund, por exemplo, quando há mistura de genótipos nas populações. Para determinar se algum indivíduo na amostra representa um imigrante em relação à sua população geográfica de referência, foi utilizado o programa STRUCTURE v.2.2 (Pritchard et al., 2000). O algoritmo contido no programa constrói *clusters* genéticos a partir de uma coleção de genótipos multilocos individuais, estimando para cada indivíduo as frações do seu genoma que pertencem a cada *cluster*. Em contraste aos métodos que usam distâncias genéticas, informações fenotípicas, locais de amostragem e a origem suposta dos indivíduos não necessitam ser especificadas para o algoritmo ser aplicado (Rosenberg et al., 2001). Esse programa realiza uma análise Bayesiana para acessar indivíduos a um pré-definido número de populações, com base em uma análise probabilística dos genótipos multilocos, calculando o coeficiente de parentesco ( $Q$ ) para cada uma das populações de cada genótipo amostrado (que aqui foram previamente designados às suas populações de referência). Foram realizadas dez corridas com um período de aquecimento de 10000 gerações e simulações de MCMC de 100000 iterações a cada corrida.

**Parâmetros demográficos.** A ocorrência de efeitos do fundador recentes ou gargalos genéticos foram avaliadas através do teste desenvolvido por (Cornuet & Luikart, 1996) e implementado no programa BOTTLENECK versão 1.2 (Piry et al., 1999). Esse teste usa uma abordagem coalescente para detectar excesso ou déficit de heterozigiosidade, baseado na heterozigiosidade esperada e no número observado de alelos em cada loco individualmente, assumindo estritamente o modelo de passos mutacionais (SMM) (Kimura & Ohta, 1975). Uma significativa deficiência de heterozigiosidade pode ser interpretada como uma recente expansão da população, já um excesso de heterozigiosidade é esperado quando a população foi submetida a um gargalo genético recente. Um modelo de equilíbrio neutro prevê um mesmo número de locos com excesso e deficiência de heterozigiosidade em uma população em que o tamanho efetivo tem permanecido constante. Desvios do equilíbrio entre mutação e deriva genética para todos os locos e populações foram detectados usando o teste de sinais e o teste de Wilcoxon, indicados quando são usados menos de 20 locos polimórficos (Luikart & Cornuet, 1998).

**Migração histórica e flutuações no tamanho das populações.** Para as estimativas das taxas de migração histórica entre as populações de *R. solani* AG-1 IA, foi empregado o método da máxima verossimilhança, baseado na teoria coalescente, como proposto por Beerli & Felsenstein (2001). Este método permite estimar o tamanho efetivo das populações ou teta ( $\theta$ ), que para diplóides é igual a  $4N_e\mu$ , onde  $N_e$  = tamanho efetivo da população e  $\mu$  = taxa de mutação de cada loco), além das taxas de migração histórica assimétrica ( $M$ ) entre pares de populações, podendo indicar a provável rota migratória do patógeno no Brasil. Estimativas de fluxo gênico entre populações foram obtidas com o programa MIGRATE 2.3 (Beerli & Felsenstein, 2001), usando cinco réplicas de dez cadeias iniciais e cinco cadeias longas finais, além de um esquema de aquecimento estático com quatro temperaturas (1.0, 1.3, 2.6 e 3.9). Foi escolhido o tipo de dado microssatélite com simulação browniana, assumindo o modelo de passos mutacionais (SMM). As cadeias iniciais foram executadas com 1000 amostras e um intervalo de amostragem de 20 (20000 passos), com 1000 árvores registradas por amostra. As cadeias longas finais foram conduzidas com 5000 amostras e um intervalo de amostragem de 200 (200000 passos), descartando 10000 e registrando 10000 árvores por cadeia longa. O intervalo de confiança aproximado para os parâmetros  $teta$  e  $M$  foram calculados usando a abordagem de percentis.

Flutuações em tamanho populacional foram testadas para cada população usando o método de MCMC (Kuhner, 2006; Kuhner & Smith, 2007), implementado no programa LAMARC 2.1 (Kuhner, 2006), usando duas réplicas de dez cadeias iniciais e duas cadeias longas finais. As cadeias iniciais foram executadas com 2500 amostras e um intervalo de amostragem de 20 (50000 passos), descartando 1000 amostras para cada cadeia e registrando 2500 genealogias por cadeia. As cadeias longas finais foram conduzidas com 25000 amostras, intervalo de amostragem de 20 (500000 passos), descartando 10000 e registrando 25000 árvores para cada cadeia. O intervalo de confiança aproximado para a taxa de crescimento exponencial ( $g$ ) foi calculado usando a abordagem de percentis. O ancestral  $N_e$  no tempo passado  $t$  foi calculado usando a seguinte equação de crescimento populacional:  $\theta_t = \theta_{atual} e^{-gt}$ , onde  $\theta$  equivale a  $4N_e\mu$ ,  $t$  é o tempo em unidades mutacionais e  $g$  é o parâmetro de crescimento exponencial.

## Resultados

**Diversidade genética e genotípica.** Os dez locos de microssatélites apresentaram de 4 a 10 alelos por loco (média de 6,7 alelos) (Tabela 2). Alelos privados estiveram presentes em todas as populações (Figura 2). Medidas de diversidade genética e genotípica para as cinco populações encontram-se na Tabela 3. As diversidades genotípicas de Nei foram relativamente elevadas (0,92 em média entre todas as populações), atingindo o valor máximo de 1,0 para a população MA00 do Estado do Maranhão. Setenta e seis genótipos multilocos distintos foram encontrados entre os 232 isolados analisados. A fração clonal variou de zero na população MA00 (onde nenhum clone foi encontrado) a 0,84 na população MA06. O valor médio da diversidade genotípica, estimada segundo a medida de Stoodart e Taylor, foi de 5,76. Apenas três haplótipos foram compartilhados entre populações, um entre MT98 e MA06 e dois entre MT06 e TO06 (Tabela 3, Anexo 1). Um teste de *bootstrap* foi executado para comparar estatisticamente as diferenças em diversidade genotípica entre populações. As populações MA00 e TO06 apresentaram as maiores diversidades genotípicas e MA06 e PA06, as menores (Tabela 3). A riqueza alélica média entre todas as populações foi 2,89. Todos os 76 genótipos de *R. solani* AG-1 IA foram heterozigotos para ao menos um loco. A heterozigosidade esperada ( $H_E$ , diversidade genética de Nei) variou de 0,43 a 0,60 entre populações (Tabela 3). As populações do Mato Grosso (MT98 e MT06) tiveram significativamente as maiores  $H_E$ , enquanto MA00 e MA06 tiveram as menores  $H_E$ . As populações MT98 e MT06 exibiram também os maiores níveis de riqueza alélica (3,3 e 3,4, respectivamente), enquanto MA00 exibiu o menor nível (2,23).

**Distribuição hierárquica da diversidade genética total.** Utilizou-se SAMOVA para determinar o melhor agrupamento de populações usando variação na frequência de alelos e informação geográfica, assumindo de dois a quatro grupos ( $K$ ) e empregando como método de distância a soma do quadrado das diferenças em tamanho ( $R_{ST}$ ), indicado para dados de microssatélites. O melhor agrupamento SAMOVA (aquele com o maior valor de  $R_{ST}$  e a menor variação entre populações dentro de grupos) foi alcançado com  $K = 3$ . Baseado nos valores de  $R_{ST}$  e no agrupamento  $K = 3$ , 82,6 % da diversidade genética total foi encontrada entre indivíduos dentro de populações, 5,1 % entre populações dentro de grupos e 12,3 % entre grupos de populações (Tabela 4). Esse agrupamento  $K = 3$  foi então escolhido para as análises subseqüentes de diferenciação entre populações.

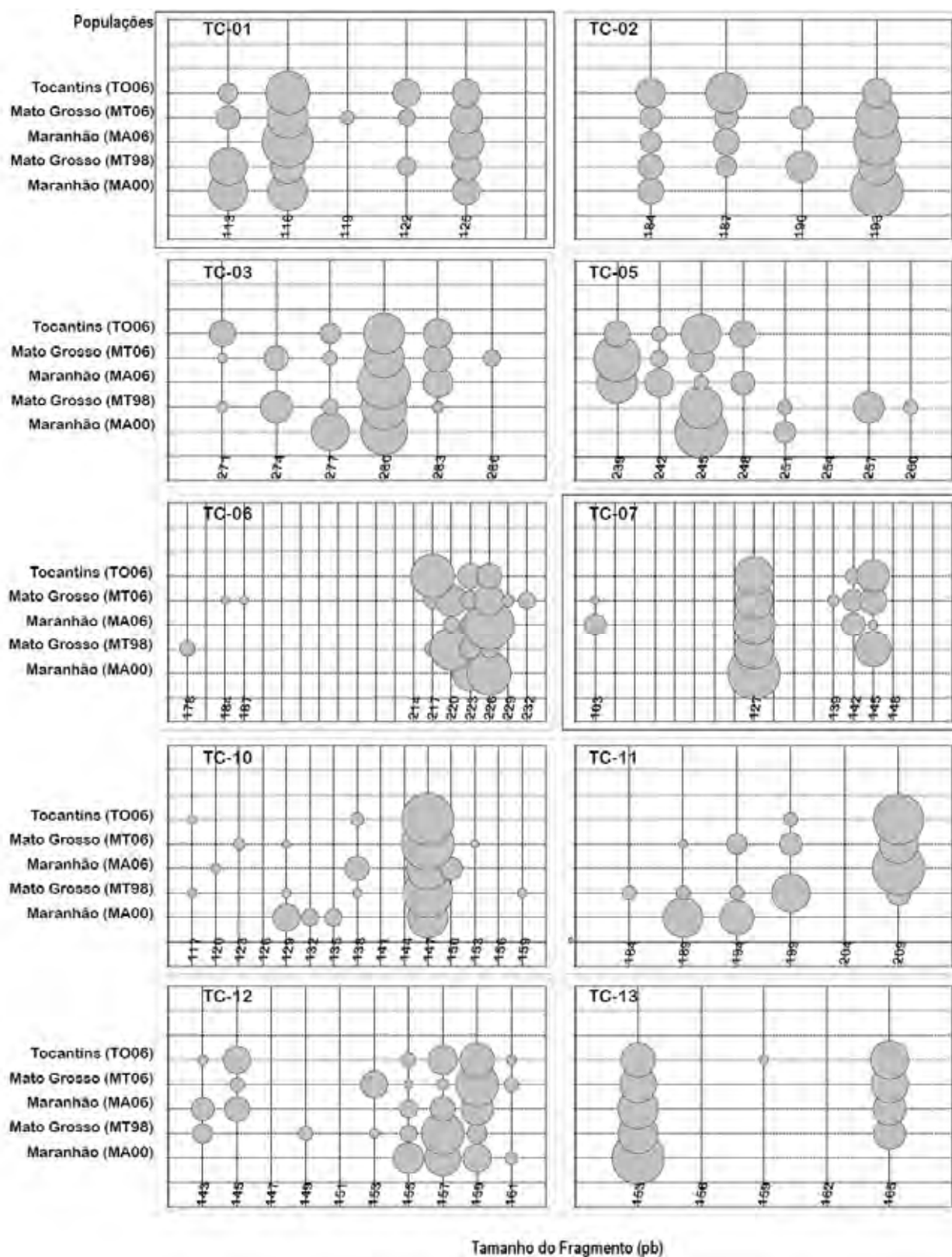


Figura 2. Distribuição da frequência de alelos de dez locos de microssatélites nas populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA da soja no Brasil.



**TABELA 2. Descrição do conteúdo associado a dez locos de microssatélites usados para genotipagem de populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA de soja no Brasil.**

Loco	Tipo	Informação genética	Variação de tamanho (pb)	Região flaqueadora (pb)	Variação em número de repetições	Número de alelos / população				Número total de alelos	
						MT98 (N <sup>a</sup> = 54)	MT06 (N = 55)	MA00 (N = 10)	MA06 (N = 91)		TO06 (N = 22)
Tc01	3-nucleotídeo	Não-codificante	113 - 125	83	10-14	4	5	3	2	4	5
Tc02	3-nucleotídeo	Não-codificante	184 - 193	151	11-14	4	4	2	3	3	4
Tc03	3-nucleotídeo	Não-codificante	271 - 286	157	38-43	5	6	2	2	4	6
Tc05	3-nucleotídeo	Não-codificante	239 - 260	221	06-13	4	3	2	4	4	7
Tc06	3-nucleotídeo	Não-codificante	178 - 238	145	11-31	6	8	2	3	3	10
Tc07	3-nucleotídeo	Não-codificante	103 - 154	61	14-31	2	5	2	4	3	6
Tc10	3-nucleotídeo	Não-codificante	117 - 171	90	09-27	6	4	4	4	3	11
Tc11	3-nucleotídeo	Não-codificante	174 - 209	129	09-16	5	5	2	1	2	6
Tc12	3-nucleotídeo	Não-codificante	143 - 161	107	18-27	6	6	4	5	6	8
Tc17	3-nucleotídeo	Não-codificante	153 - 177	135	06-14	3	2	1	2	3	4

<sup>a</sup> N, tamanho amostral (número de isolados) de cada população

**TABELA 3. Medidas de diversidade genotípica e gênica em populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA de soja no Brasil.**

População	Tamanho amostral (N)	Número de genótipos	Genótipos sítio-específicos <sup>a</sup>	Fração clonal	Diversidade genotípica ( $G_0$ ) <sup>b, c</sup>	Eveness <sup>c, d</sup>	$H_E$ <sup>e, f</sup>	Riqueza alélica <sup>f, g</sup>
MA00	10	10	10 (0)	0,00	10,00 a	1,00 a	0,43 b	2,23 b
TO06	22	16	14 (2)	0,27	10,52 a	0,66 b	0,56 ab	2,93 ab
MT06	55	22	20 (2)	0,65	3,54 b	0,19 c	0,60 a	3,38 a
MT98	54	16	15 (1)	0,70	3,05 bc	0,19 c	0,60 a	3,30 a
MA06	91	15	14 (1)	0,84	1,87 c	0,13 c	0,49 b	2,62 ab
Total	232	79	76	0,69	5,76	0,43	0,54	2,89

<sup>a</sup> Número de genótipos compartilhados com outras populações são exibidos entre parênteses

<sup>b</sup> Diversidade genotípica de Stodart, calculada segundo Stodart & Taylor (1988).

<sup>c</sup> Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ( $P \geq 0,05$ ), segundo teste de *bootstrap* entre pares de populações, para diferenças em índices de diversidade clonal, com 1000 permutações, usando sub-amostragens para equiparar ao tamanho da menor população.

<sup>d</sup>  $G_0$  escalado pelo número máximo de genótipos esperados; um valor de *eveness* igual a 1,0 indica que todos os genótipos tiveram freqüências idênticas na população.

<sup>e</sup> Diversidade genética de Nei (ou heterozigosidade) calculada como média entre todos os locos e corrigida pelo tamanho amostral (Nei, 1978)

<sup>f</sup> Calculado de acordo com El Mousadik & Petit (1996)

**Diferenciação de populações.** A análise da diferenciação entre pares de populações foi baseada na Estatística F de Wright, usando a soma do quadrado das diferenças em número de repetições ( $R_{ST}$ ), sob o modelo de passos mutacionais (SMM) (Tabela 5). O valor total de  $R_{ST}$  foi 0,17 ( $P \leq 0,001$ ), indicando um nível intermediário de diferenciação entre populações geograficamente distintas de *R. solani* AG-1 IA de soja (Tabela 4). Foram detectados dois casos de não-diferenciação entre pares de populações: entre TO06 e MT98 ( $R_{ST} = 0,013$ ,  $P = 0,38$ ) e entre TO06 e MT06 ( $R_{ST} = 0,004$ ,  $P = 0,42$ ). O maior valor de  $R_{ST}$  foi encontrado entre as populações MA00 e TO06 ( $R_{ST} = 0,37$ ,  $P \leq 0,01$ ).

**TABELA 4. Distribuição hierarquizada da diversidade genética entre populações de *Rhizoctonia solani* de soja no Brasil.**

Fontes de variação	gl <sup>b</sup>	Soma dos quadrados <sup>c</sup>	Componentes da variância	Porcentagem de variação		<i>P</i>
Entre grupos <sup>a</sup>	2	602.8	5.4019	12.3	$R_{CT} = 0.1230$	0.09
Interpopulacional dentro de grupos	2	232.1	2.2439	5.1	$R_{ST} = 0.1740$	$\leq 0,001$
Intrapopulacional	153	5551.6	36.2849	82.6		
Total	157	6386.5	43.9307			

<sup>a</sup> Agrupamento proposto por SAMOVA (Dupanloup et al., 2002), baseado em  $R_{ST}$  ( $K = 3$ ): [MA00, (MT98, MT06 e TO06) e MA06]

<sup>b</sup> Graus de liberdade

<sup>c</sup> Método de distância usado: soma do quadrado das diferenças em tamanho ( $R_{ST}$ ) (Slatkin, 1995)

**TABELA 5. Medidas de diferenciação entre populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA de soja no Brasil, baseadas em  $R_{ST}$ <sup>a</sup>.**

População	MA00	MT98	MA06	MT06	TO06
MA00	-				
MT98	0.2414	-			
MA06	0.1979	0.1495	-		
MT06	0.2399	0.1092	0.0806	-	
TO06	0.3692	0.0131 <sup>b</sup>	0.1282	0.0041 <sup>b</sup>	-

<sup>a</sup> Distâncias medidas como a soma do quadrado das diferenças em tamanho entre dois haplótipos, de acordo com Slatkin (Slatkin, 1995)

<sup>b</sup> Valores não-significativos ( $P \geq 0,05$ ), testado usando abordagem não-paramétrica (Excoffier et al., 1992), com base em 1023 permutações

**Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e desequilíbrio gamético.** Os dados após correção de clones foram testados para EHW e para desequilíbrio gamético entre pares de locos e os resultados são apresentados na Tabela 6. Apenas a população MA00 estava em EHW para cada um dos nove locos polimórficos examinados. Detectou-se um significativo desvio do EHW em três de nove locos polimórficos para a população MA06, em cinco de dez locos polimórficos para MT06 e TO06 e seis de dez locos polimórficos para MT98. O coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) global foi igual a 0,15 ( $P \leq 0,01$ ). Valores positivos e significativos de  $F_{IS}$  (variando de 0,22 a 0,33,  $P \leq 0,02$ ) foram observados para ambas as populações do Mato Grosso, já para as populações MA00 e TO06, valores negativos de  $F_{IS}$  foram observados (Tabela 6).

O teste exato de Fisher para desequilíbrio gamético foi significativo para a maioria dos pares de locos em todas as populações, exceto para TO06, na qual somente 13 % dos locos desviaram significativamente do equilíbrio. Todas as populações exibiram índices de associação significativos,  $I_A$  ou  $\bar{r}_D$  (Tabela 6). Observou-se que um par de locos (Tc01 e Tc02) estava constantemente associado na maioria das populações. Contando com a possibilidade de ligação entre esses dois locos, que poderia ter influenciado as estimativas de desequilíbrio, os mesmos foram removidos e os dados foram re-analisados. Desse modo, o desequilíbrio gamético foi expressivamente reduzido na população MA00 (de 55,6 para 5,0 % dos pares de locos) e de modo menos acentuado na população TO06 (de 13,3 para 3,6 %), porém os valores de  $I_A$  e  $\bar{r}_D$  permaneceram significativos ( $P \leq 0,05$ ).

**TABELA 6. Testes para associação aleatória de alelos em cada loco e entre pares de locos nas populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA da soja no Brasil.**

Origem	População	Genótipos misturados <sup>a</sup>	Número de locos em EHW <sup>b</sup>	Estimativas de equilíbrio genético						
				$F_{IS}$ <sup>c</sup>	$P$	$I_A$ <sup>d</sup>	$\bar{r}_D$	$P$	Pares de locos em significativo de equilíbrio	% <sup>f</sup>
Maranhão	MA00	nenhum	9 em 9 <sup>f</sup>	-0.28	0.91	0.9676	0.0551	0.001	20 em 36	55.6
	MA06	nenhum	6 em 9 <sup>f</sup>	0.27	0.06	1.6051	0.1567	< 0.001	18 em 36	50.0
	MT98	6/16 (37,5%)	4 em 10	0.33	0.003	1.1200	0.1168	< 0.001	23 em 45	48.9
Mato Grosso	MT98	removidos	6 em 10	0.17	0.11	0.4560f	0.0600f	0.144	02 em 36	5.6
	MT06	nenhum	5 em 10	0.22	0.02	0.6622	0.0461	< 0.001	23 em 36	51.1
	TO06	4/16 (25%)	5 em 10	-0.33	0.99	0.3771	-0.0111	0.457	06 em 45	13.3
Tocantins	TO06	removidos	6 em 10	-0.38	0.99	0.1278NS	0.0152NS	0.032	02 em 45	4.4

<sup>a</sup> Mistura de genótipos determinada por teste implementado pelo programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000)

<sup>b</sup> Teste de EHW executado de acordo com um teste exato análogo ao teste exato de Fisher (Guo & Thompson, 1992)

<sup>c</sup> Índice de endogamia ( $F_{IS}$ ) ao longo dos locos

<sup>d</sup>  $I_A$  e  $\bar{r}_D$  são índices de equilíbrio genético multilocos (Maynard Smith et al., 1993).

<sup>e</sup>  $\bar{r}_D$  é uma modificação do  $I_A$ , em que a dependência do número de locos é removida (Agapow & Burt, 2001)

<sup>f</sup> Um loco monomórfico

<sup>NS</sup> Valores não-significativos ( $P \geq 0,05$ )

**Teste de mistura populacional.** Para avaliar se os desvios em relação às expectativas no EHW e no equilíbrio gamético refletiram uma estrutura oculta em alguma das populações de *R. solani* AG-1 IA, conduziu-se um teste para identificar mistura de genótipos, implementado no programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). Foram identificados dez prováveis genótipos misturados nas populações analisadas: seis em MT98 (37,5 % do total de genótipos dessa população) e quatro em TO06 (25 % do total), os quais são exibidos na Figura 3. Na população MT98, os genótipos 26 (do isolado BRS131), 27 (do BRS134) e 28 (do BRS136) exibiram coeficientes de parentesco ( $Q$ ) significativamente não-relacionados às suas populações geográficas de origem, sugerindo que esses indivíduos poderiam ser imigrantes da população TO06, enquanto que os genótipos 30 (do BRS14), 31 (do BRS15) e 35 (do BRS29) foram provavelmente imigrantes da população MA00 (Figura 3). Na população TO06 foram identificados dois prováveis genótipos imigrantes (64, do BRZTO006 e 66, do BRZTO003), os quais poderiam ter sido originados da população MA06, um (67, do BRZTO022) da população MA00 e um (65 do BRZTO136) que poderia ter origem tanto da população MA06 quanto da MT06. Com a remoção dos genótipos misturados das populações MT98 e TO06, elevou-se a proporção de locos em EHW em ambas as populações, como mostrado na Tabela 6. Índices de equilíbrio gamético ( $I_A$  ou  $\bar{r}_D$ ) para populações individualmente também decresceram para valores não-significativos e houve uma redução na proporção de pares de locos em desequilíbrio (Tabela 6).

**Migração histórica e estimativas de flutuação em tamanho populacional.** O parâmetro populacional teta ( $\theta$ ) foi usado como uma medida relativa do tamanho efetivo das populações, como ilustrado na Figura 4. As estimativas de tamanho populacional foram muito similares, com  $\theta$  variando de 0,82 a 1,06. Estimativas de fluxo gênico direcional indicaram migração histórica entre populações diversas. A população que doou o maior número de migrantes à maioria das outras populações (com exceção de MA00) foi TO06, cujas taxas de migração foram  $4Nm_{TO06 \rightarrow MT06} = 1,71$  migrantes/geração (de TO06 para MT06),  $4Nm_{TO06 \rightarrow MA06} = 1,65$  migrantes/geração (de TO06 para MA06) e  $4Nm_{TO06 \rightarrow MT98} = 0,97$  migrantes/geração (de TO06 para MT98). Um movimento histórico muito menor de migrantes foi indicado na direção oposta, rumo à TO06. Uma outra elevada estimativa de migração assimétrica foi observada entre MT98 e MT06 ( $4Nm_{MT98 \rightarrow MT06} = 1,49$  migrantes/geração e  $4Nm_{MT06 \rightarrow MT98} =$

1,09 migrantes/geração). No geral, as duas populações do Mato Grosso (MT98 e MT06) contribuíram com o menor número de migrantes para as outras populações. Não houve evidência de expansão de população, com todas as populações apresentando taxas de crescimento iguais a zero (MA00) ou ligeiramente negativas, como exibido na Figura 4.

**Parâmetros demográficos.** Empregou-se o teste de (Cornuet & Luikart, 1996) para detectar deficiência ou excesso de heteroziguidade e determinar se a distribuição dos alelos nas populações tem sido perturbado por alterações no tamanho populacional. Sob as expectativas do modelo de passos mutacionais (SMM), nenhuma indicação de recentes gargalos genéticos foi detectada em nenhuma das populações analisadas (Tabela 7).

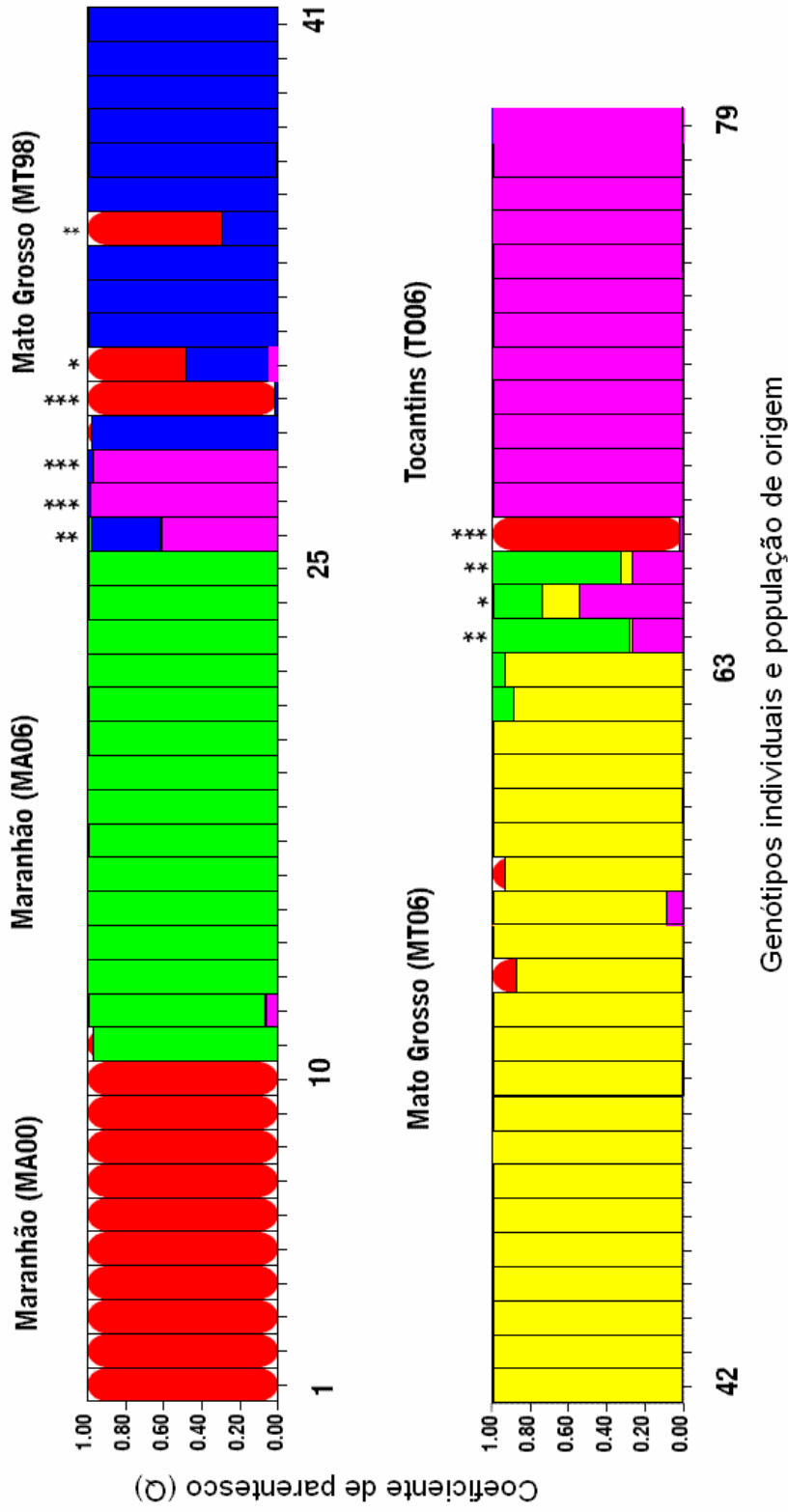
**TABELA 7. Resultados de testes para alterações em tamanho de populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA de soja no Brasil, sob o modelo evolutivo de passos mutacionais (SMM).**

População	HD/HE <sup>a</sup>	exc.HE <sup>b</sup>	Probabilidade		Interpretação
			teste dos sinais	teste de Wilcoxon	
MA00	3 / 6	5,02	0,38	0,36	sem desvio
MA06	3 / 6	5,13	0,41	0,25	sem desvio
MT98	6 / 4	5,85	0,19	0,28	sem desvio
MT06	7 / 3	5,86	0,07	0,23	sem desvio
TO06	3 / 7	5,93	0,37	0,43	sem desvio

<sup>a</sup> Número observado de locos com deficiência de heteroziguidade (HD) e com excesso de heteroziguidade (HE)

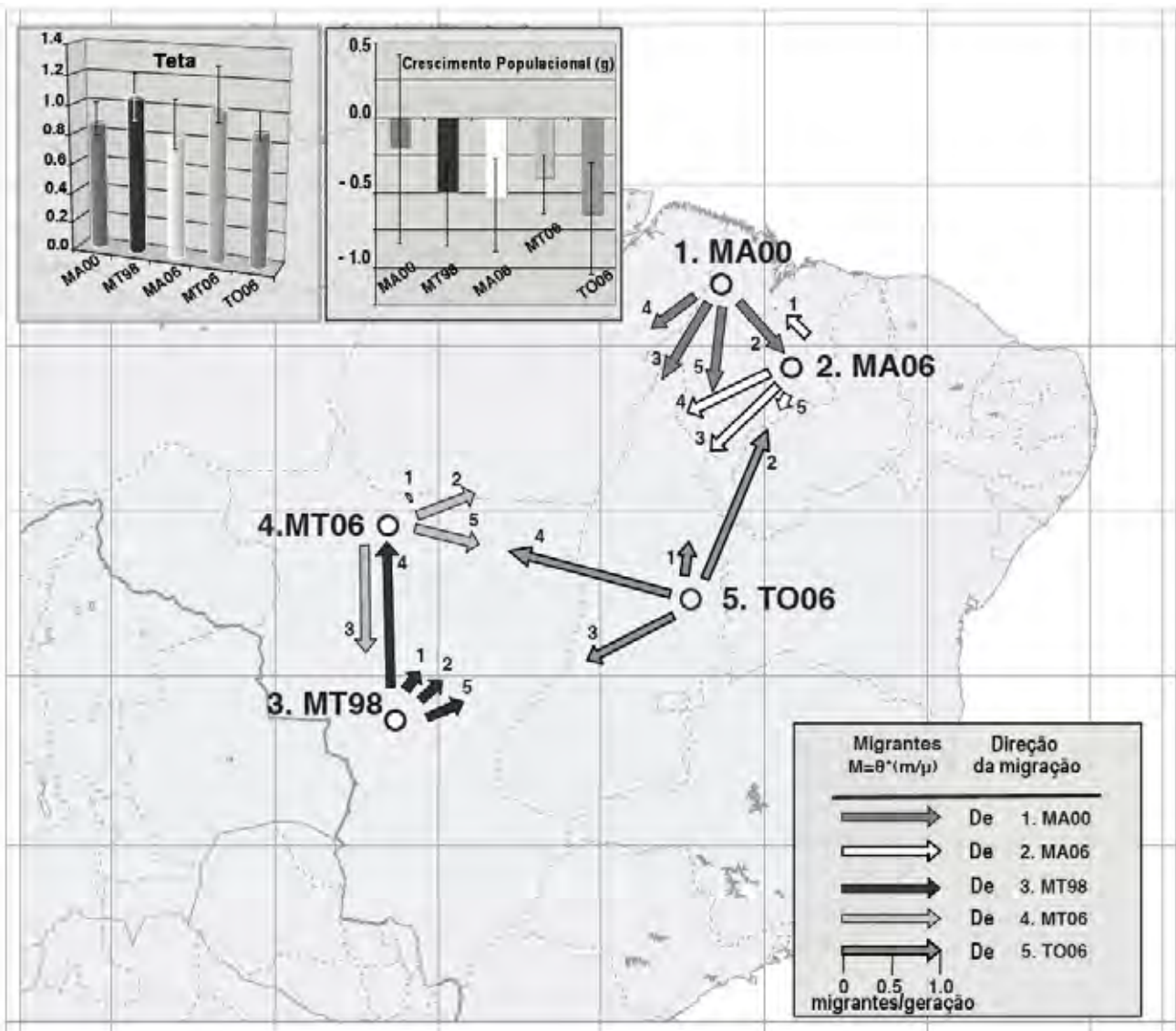
<sup>b</sup> Número esperado de locos com excesso de heteroziguidade, que depende do número de cromossomos amostrados, do número de alelos encontrados e da heteroziguidade esperada para as frequências alélicas observadas, assumindo que as populações estão em equilíbrio entre mutação e deriva genética e que as mutações em todos os locos seguem o modelo especificado.

<sup>c</sup> As probabilidades dos testes (teste dos sinais e teste de Wilcoxon) foram calculadas com o programa BOTTLENECK (Cornuet & Luikart, 1996; Luikart & Cornuet, 1998; Piry et al., 1999)



**Figura 3.** Coeficientes de parentesco (Q), inferidos pelo programa STRUCTURE, para genótipos multilocos de microssatélites de populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA de soja no Brasil. Grupos de indivíduos baseados em populações pré-definidas são representados por cores diferentes. Cada barra vertical representa um genótipo multilocus. Cada cor representa o ancestral mais provável do grupo do qual o genótipo (ou parte dele) foi derivado. O comprimento da barra indica o Q do genótipo com relação às populações (coloridas distintamente). Mistura estatisticamente significativa para um genótipo é destacada com um asterisco no topo.





**Figura 4.** Estimativas de parâmetros demográficos para populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA de soja no Brasil, baseadas na variação de dez locos de microssatélites. Valores de teta ( $\theta$ ) representam a medida do tamanho efetivo das populações (para diplóides  $\theta = 4Ne\mu$ , onde  $Ne$  = tamanho efetivo da população e  $\mu$  = taxa de mutação de cada loco). Migração entre áreas geográficas foi estimada usando um modelo de isolamento com migração. Valores de teta e taxas de migração foram estimados com o programa MIGRATE 2.3 (Beerli & Felsenstein, 2001). As direções de migração entre populações doadoras e receptoras são indicadas pelas setas. As estimativas mais prováveis das taxas de crescimento populacional ( $g$ ) foram calculadas através de análises bayesianas, com o programa LAMARC 2.0 (Kuhner, 2006; Kuhner & Smith, 2007). As estimativas de crescimento populacional, teta e taxas de migração incluíram intervalos de confiança de 95%.

## Discussão

Este estudo representa a primeira análise detalhada de genética de populações do patógeno da queima foliar em soja, *R. solani* AG-1 IA, no Brasil. A estratégia de amostragem selecionada abrangeu as mais importantes áreas de cultivo da soja do país. Foram testadas as hipóteses de que populações geográficas de *R. solani* AG-1 IA de soja são geneticamente homogêneas (portanto não-subdivididas ou diferenciadas) e de que essas populações exibem uma estrutura genética recombinante.

A maioria da variação na frequência de alelos foi observada dentro de populações de *R. solani* AG-1 IA da soja (82,6 %), enquanto 12,3 % da variação total foi atribuída à diferenças entre populações (Tabela 4). Valores de  $R_{ST}$  foram significativamente diferentes de zero, com variação de 0,08 a 0,37, indicando um nível moderado a elevado de diferenciação entre populações. Fluxo gênico foi apenas detectado entre as populações TO06 e MT06 e entre TO06 e MT98 (Tabela 5). A presença de alelos únicos em todas as populações e poucos genótipos compartilhados entre elas (três em 76) forneceu evidências de dispersão limitada do patógeno entre regiões geograficamente distantes, sustentando a hipótese alternativa de fluxo gênico restrito entre as populações analisadas. Isolamento geográfico parece ser a causa mais provável dessa diferenciação genética, uma vez que a distância entre os pontos de amostragem foi de mais de 1000 km, na maioria dos casos.

Genótipos multilocos foram principalmente sítio-específicos. Em apenas três casos o mesmo genótipo foi compartilhado entre campos de soja distantes. Os genótipos 61 e 62 foram compartilhados entre MT06 e TO06 (distantes cerca de 1000 km) e o genótipo 20, encontrado em MT98 e MA00 (distantes aproximadamente 1400 km) (Anexo 1). Baseado na frequência alélica de cada loco, foi calculada a probabilidade de isolados não relacionados compartilharem o mesmo genótipo multilocos (Weir, 1996). Sendo que essas probabilidades foram muito baixas, entre  $10^{-7}$  to  $10^{-4}$ , acredita-se que esses genótipos não foram compartilhados por acaso, e sim, devido ao movimento de sementes contaminadas a longas distâncias (Linde et al., 2005; MacNish et al., 1993). De fato, apesar dos produtores de soja no Centro-Oeste e Nordeste poderem produzir suas próprias sementes localmente, muitos deles as obtêm de poucos distribuidores centralizados de sementes (Embrapa, 2006; Sato & Moori, 2003). Isso poderia facilitar a dispersão de patógenos associados a sementes tais como *R. solani* AG-1 IA, propagando genótipos do fungo ao longo de áreas geográficas distantes. Se o inóculo associado a sementes tem uma função significativa na dispersão a

longas distâncias, melhores testes de sanidade das sementes poderiam ser exigidos e medidas de controle (como tratamento das sementes com fungicidas erradicantes) poderiam ser especificamente direcionadas às sementes. Compartilhamento de equipamentos de plantio e colheita entre regiões produtoras de soja distantes não é comum no Brasil (Embrapa, 2006), limitando assim seu papel na dispersão do patógeno.

As análises com o programa MIGRATE indicaram migração histórica assimétrica para a maioria das comparações entre pares de populações do patógeno, fato que poderia explicar os atuais níveis de subdivisão populacional encontrados. A única exceção ocorreu entre a população TO06 e ambas as populações do Mato Grosso (MT98 e MT06), as quais exibiram elevado fluxo gênico atual apesar da migração histórica assimétrica. A evidência de elevada migração histórica assimétrica a partir da população TO06 sugere que essa poderia ser a população fundadora, que contribuiu com a maioria dos imigrantes para as outras populações do patógeno no Brasil. Historicamente, a expansão da cultura da soja tem se caracterizado pela migração de produtores de áreas tradicionais na região Sul, nos Estados do Rio Grande do Sul e Paraná, com movimento de seus equipamentos agrícolas em direção ao Cerrado, na região Centro-Oeste do país. Assim, a cultura da soja alcançou primeiramente o Estado de Mato Grosso (no final dos anos 80) e somente depois os Estados de Tocantins e Maranhão (no meio da década de 90), substituindo áreas de cultivo de arroz (Fearnside, 2001). Entretanto, arroz, um outro importante hospedeiro para *R. solani* AG-1 IA, tem sido tradicionalmente cultivado no Tocantins por mais de 50 anos (Igreja et al., 1995). É importante destacar que o primeiro relato de queima foliar em soja e queima da bainha em arroz ocorreu no Estado de Goiás, em 1985 (Bolkan & Ribeiro, 1985). Deve-se lembrar que a parte ao norte de Goiás é o atual Estado de Tocantins.

Em contraste com outros grupos de anastomose (AG), quase não há informação com relação à importância ecológica e epidemiológica do ciclo sexual de *R. solani* AG-1 IA (Naito, 1996). No complexo *R. solani*, AGs possuem sistema de cruzamento homotático ou heterotático (Cubeta & Vilgalys, 1997). Pelo menos dois AGs (AG-1 IC e AG-4) têm sistema de cruzamento heterotático bipolar, controlado por um único gene com múltiplos alelos (Adams Jr, 1996). Não há informação sobre o sistema de cruzamento ou grupo de compatibilidade sexual de *R. solani* AG-1 IA, por exemplo, se o fungo é homotático ou heterotático. Sabe-se que *R. solani* AG-1 IA exibe um sistema predominantemente sexual em soja, pois estruturas sexuais de frutificação (himênios e basidiósporos) têm sido observados em campos de soja (Jones & Belmar, 1989). Evidências, baseadas em genética de

populações, de dois estudos com populações do patógeno isoladas de arroz nos Estados Unidos (Rosewich et al., 1999) e na Índia (Linde et al., 2005; Taheri et al., 2007) indicaram a ocorrência de reprodução sexual e uma estrutura populacional recombinante para *R. solani* AG-1 IA em arroz. Era suposto que o patógeno infectando soja seria também sexualmente recombinante no Brasil. Os prognósticos para um organismo sexualmente recombinante são elevada diversidade genotípica, reduzida clonalidade, marcadores moleculares neutros seguindo as proporções esperadas no EHW e equilíbrio gamético (McDonald & Linde, 2002a; Milgroom, 1996).

A maioria das populações apresentou diversidades genéticas intermediárias a elevadas (Tabela 3). Entretanto, os níveis de diversidade genotípica foram baixos para algumas populações e a fração clonal associada, elevada. A maior fração clonal observada foi de 84 % na população MA06 (Tabela 3). O teste exato de Fisher para EHW revelou desvios significativos para a maioria das populações de *R. solani* AG-1 IA de soja, exceto para MA00. Nessa população, todos os locos seguiram as proporções esperadas no EHW, consistente com reprodução sexuada (Tabela 6). O desequilíbrio gamético foi acentuado em todas as populações, exceto para TO06 (Tabela 6). Desequilíbrio gamético pode ser gerado por vários processos, incluindo ligação entre locos, mistura populacional, deriva genética, expansão populacional, cruzamentos preferenciais e seleção (Milgroom, 1996).

Após remover o par de locos possivelmente ligado (Tc01 e Tc02), o desequilíbrio gamético foi expressivamente reduzido nas populações MA00 e TO06. As populações remanescentes continuaram a exibir desequilíbrio significativo. A remoção dos genótipos misturados de TO06 e MT98 elevou a proporção de locos sob as expectativas no EHW, restaurando o equilíbrio gamético (medido por  $I_A$  ou  $\bar{r}_D$ ). Acredita-se que a ligação entre esses locos poderia ter contribuído, embora não seria a única explicação, para o desequilíbrio observado.

Uma explicação alternativa para os desvios quanto ao EHW e para o desequilíbrio gamético encontrado seria a ocorrência de gargalos genéticos recentes. Uma redução na riqueza alélica é uma indicação que populações experimentaram uma recente redução no tamanho efetivo da população (Piry et al., 1999). Todavia, nenhum desvio significativo do equilíbrio entre mutação e deriva foi detectado nessas populações do patógeno. Os valores de riqueza alélica foram similares entre todas as populações do fungo (Tabela 3) e nenhum excesso de heterozigosidade, que seria esperado após um recente gargalo genético, foi observado (Tabela 7). Desse modo, acredita-se que gargalos de garrafa não teriam causado

o desequilíbrio observado.

Expansão populacional seria uma outra explicação alternativa para desequilíbrio gamético. De 1970 a 2001, a produção de soja no Brasil tem expandido em direção a áreas mais condutivas à queima foliar no bioma amazônico, a uma taxa de 27,5 km por ano (Simon & Garagorry, 2005). As temperaturas mais elevadas e condições de umidade predominantes no Nordeste brasileiro são favoráveis à formação abundante de himênios e germinação de basidiósporos de *R. solani* AG-1 IA (Almeida et al., 1997; Naito, 2006). Em resposta à enorme expansão das áreas de cultivo da soja, as quais atingiram cerca de 20,6 milhões de hectares em 2007 (Conab, 2007), o tamanho populacional efetivo desse fungo pode ter se tornado muito grande. Grandes populações podem manter a diversidade genética gerada previamente por ancestrais recombinantes, mesmo se a recombinação ocorrer apenas raramente, com a deriva atuando fracamente na redução da variação genética (Bennett et al., 2005; Hartl & Clark, 1997). Porém, não houve evidência de recente expansão populacional, conduzindo à interpretação de que um aumento no tamanho populacional não seria a causa do desequilíbrio observado. Ao contrário, todas as populações apresentaram estimativas de crescimento nulas ou levemente negativas (Figura 4).

A última causa possível para o desequilíbrio gamético observado seria excesso de cruzamentos aleatórios (homogamia negativa) e de endogamia (cruzamentos entre indivíduos aparentados, homogamia positiva). Encontrou-se evidência de cruzamento preferencial nas populações de *R. solani* AG-1 IA de soja no Brasil. A estimativa de  $F_{IS}$  foi significativa e positiva para MT98 e MT06, e bem próxima da significância em MA06, consistentes com um excesso de homozigotos esperado sob endogamia. Estudos prévios mostraram que alguns AGs de *R. solani* têm um sistema de cruzamento heterotático bipolar, tais como AG-1 IC (Julian et al., 1999), AG-2-2 IV (Toda & Hyakumachi, 2006), AG-4 (Cubeta et al., 1993) e AG-8 (Yang et al., 1992), enquanto AG-3 pode ser homotático em tabaco (Adams, 1988; Ceresini et al., 2007). Ainda que os dados desse estudo não sejam considerados conclusivos, são consistentes com um significativo grau de endogamia nas populações de AG-1 IA de soja no Brasil, podendo ser considerados, pelo menos parcialmente, para o significativo desequilíbrio observado nessas populações.

Em resumo, três das cinco populações apresentaram evidência de uma estrutura populacional recombinante. Embora se considere que *R. solani* AG-1 IA tenha um sistema reprodutivo predominantemente sexual em soja, já que estruturas sexuais de frutificação (himênios e basidiósporos) são reportadas como fontes primárias de inóculo em campos de

soja (Fenille et al., 2003; Fenille et al., 2002; Jones & Belmar, 1989; Meyer, 2002), recombinação não prevaleceu em todas as populações analisadas nesse estudo. Numa interpretação geral, populações de *R. solani* AG-1 IA de soja no Brasil exibiram um modo reprodutivo misto, que inclui a) um considerável componente assexual, evidenciado pelas elevadas frações clonais, talvez representando clones bem sucedidos (ou combinações de genes favoráveis) originados por reprodução sexuada (Xu, 2005); e b) um considerável grau de endogamia, ocorrendo durante o componente sexual da reprodução. Endogamia não reflete, necessariamente, um sistema de cruzamento homotático, mas poderia ser um primeiro sinal de homotalismo nesse fungo.

Com essas evidências, postula-se que novos genótipos do patógeno são produzidos por eventos de recombinação e que os genótipos favorecidos por seleção aumentam em frequência através de reprodução assexuada, dentro de cada campo de soja. Os genótipos selecionados, então, propagam-se clonalmente a curtas distâncias, via escleródios ou fragmentos de micélio, e raramente a longas distâncias, possivelmente através de sementes contaminadas.

A estrutura de modelo de risco proposta por McDonald e Linde (McDonald & Linde, 2002a; McDonald & Linde, 2002b), considerando o potencial evolutivo de fitopatógenos, prediz que patógenos com reduzido fluxo gênico e genotípico apresentam um risco menor que patógenos com elevado fluxo gênico e genotípico. Patógenos com propágulos que se movem apenas a curtas distâncias geralmente existem em pequenas zonas genéticas bem delimitadas, sendo esperado que exibam menor diversidade genética e menor tamanho efetivo de população. Esse modelo também sugere que patógenos que se cruzam aleatoriamente apresentam um risco maior que patógenos endogâmicos, pois novos genótipos podem ser criados durante o ciclo sexual. Entretanto, patógenos com um sistema reprodutivo misto podem exibir o maior risco evolutivo, uma vez que as combinações de alelos mais ajustadas, geradas por recombinação, poderiam ser mantidas unidas por reprodução assexuada, elevando rapidamente em frequência, em resposta à seleção imposta por novos genes de resistência ou fungicidas. As populações de *R. solani* AG-1 IA de soja no Brasil analisadas nesse estudo exibiram fluxo gênico restrito e um modo reprodutivo misto. Desse modo, o patógeno se enquadraria na categoria de médio risco para potencial evolutivo de patógenos, sugerindo a necessidade de precaução quanto à aplicação de fungicidas ou seleção para genes maiores ou principais de resistência (McDonald & Linde, 2002a; McDonald & Linde, 2002b).

## CONCLUSÕES

- A maioria dos genótipos multilocos encontrados foram sítio-específicos, com poucos genótipos compartilhados entre populações.
- A baixa diversidade genotípica, os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), o desequilíbrio gamético e a significativa subdivisão populacional exibidos por essas populações de *R. solani* AG-1 IA do Brasil são consistentes com predominância de reprodução assexuada, dispersão de propágulos vegetativos (micélio ou escleródios) a curta distâncias, possivelmente via sementes contaminadas.
- Os atuais níveis de subdivisão poderiam ser explicados pela migração histórica assimétrica detectada entre as populações, indicando a população do Tocantins como a provável fundadora.
- As evidências de fluxo gênico restrito e modo reprodutivo misto nas populações analisadas enquadrariam o fungo na categoria de médio risco para potencial evolutivo de patógenos, sugerindo precaução quanto à aplicação de fungicidas ou seleção para genes de resistência.

**Anexo 1. Genótipos multilocos de microssatélites (MLMG) identificados em populações de *R. solani* AG-1 IA no Brasil.**

MLMG	Genótipos em cada locus de microssatélite <sup>a</sup>										Contagem em cada população <sup>b</sup>					Total
	Tc01	Tc02	Tc03	Tc05	Tc06	Tc07	Tc10	Tc11	Tc12	Tc17	MT98	MT06	MA00	MA06	TO06	
1	1011	1414	4041	0808	2627	2222	1419	1212	2426	0606			1			1
2	1011	1414	4041	0808	2627	2222	1319	1212	2426	0606			1			1
3	1010	1414	4040	0808	2626	2222	1419	1213	2424	0606			1			1
4	1011	1414	4041	0808	2627	2222	1319	1313	2426	0606			1			1
5	1010	1414	4040	0810	2626	2122	1519	0000	2525	0606			1			1
6	1114	1114	4141	0810	2727	2222	1319	1213	2525	0606			1			1
7	1114	1114	4141	0810	2727	2222	1319	1313	2525	0606			1			1
8	1011	1414	4041	0808	2627	2222	1319	1212	2527	0606			1			1
9	1111	1414	4141	0808	2727	2222	1519	0000	2626	0606			1			1
10	1414	1111	4141	0808	2727	2222	1919	0000	2425	0606			1			1
11	1114	1214	4142	0808	0000	2228	1919	1616	2425	0610	3					3
12	1313	1212	4141	0808	0000	2828	1919	1616	1818	0610	1					1
13	1013	1214	4041	0808	2626	2228	1919	1616	1818	0610	1					1
14	1014	1414	0000	0808	2631	2222	0919	0000	2525	0610	1					1
15	1014	1114	4041	0808	2627	2222	2727	1113	2626	0606	1					1
16	1114	1111	3841	0810	2424	2222	1919	1112	2525	0606	1					1
17	1014	1113	3941	0812	2525	2228	1919	1414	2425	0610	5					5
18	1011	1314	3941	0812	2525	2228	1919	1414	2525	0610	29					29
19	1014	1113	3941	0812	2525	2228	1919	1414	2525	0610	1					1
20	1114	1114	4141	0810	2727	2222	1919	0000	2525	0606	1			3		4
21	1011	1314	3941	0812	2525	2228	1919	1414	2425	0610	1					1
22	1011	1314	0000	0000	1111	2828	1323	0000	2325	1014	2					2
23	1011	1314	3941	0812	2525	2228	1919	1213	2525	0606	1					1
24	1011	1314	3941	1313	2525	2228	1919	1414	2525	0610	2					2
25	1011	1314	3941	1212	2525	2228	1919	1414	2126	0610	2					2
26	1011	1314	3941	1212	2525	2228	1619	1414	2126	0610	2					2
27	1114	1214	4142	0808	2727	2228	1619	1616	2525	0610				2		2
28	1114	1214	4142	0707	2727	2227	1619	1616	1919	0610				2		2
29	1114	1214	4142	0606	2727	2227	1619	1616	1919	0610				1		1
30	1114	1214	4242	0707	2727	2227	1619	1616	1818	0610				1		1
31	1114	1114	4141	0909	2727	2222	1919	0000	2425	0606				5		5
32	0000	1214	4142	0707	0000	2727	1619	0000	1818	0610				1		1
33	1114	1214	4142	0606	0000	2227	1619	1616	1919	0610				1		1
34	1114	1114	4141	0909	2727	2222	1919	0000	1825	0606				1		1
35	1114	1114	4141	0709	2727	2222	1919	0000	2424	0606				2		2
36	1111	1414	4141	0606	2727	1422	1920	0000	2626	1010				1		1
37	1111	1414	4141	0606	2727	1422	1920	0000	2626	0610				64		64
38	1111	1414	4141	0606	2525	1422	1920	0000	2626	0610				3		3
39	1111	1414	4141	0606	2627	1422	1920	0000	2626	0610				3		3
40	1111	1414	0000	0606	2626	1422	1920	0000	2626	0610				1		1
41	1011	1314	3941	0606	2525	2228	1919	0000	2326	0610		11				11
42	1011	1314	3941	0606	2525	2228	1919	1414	2326	0610		11				11
43	1011	1314	3941	0606	2525	2228	1919	1213	2326	0610		4				4
44	1011	1314	3941	0606	2525	2228	1919	0000	2327	0610		4				4
45	1011	1314	3941	0606	2525	2228	1919	1416	2326	0610		2				2
46	1214	1114	4142	0606	2728	2226	1919	1616	2426	0610		1				1
47	1114	1114	0000	0707	2424	2727	1319	0000	2626	0610		1				1
48	0000	0000	0000	0606	2626	2828	1111	0909	2626	0610		1				1



MLMG	Genótipos em cada locus de microsatélite <sup>a</sup>										Contagem em cada população <sup>b</sup>					Total
	Tc01	Tc02	Tc03	Tc05	Tc06	Tc07	Tc10	Tc11	Tc12	Tc17	MT98	MT06	MA00	MA06	TO06	
49	1214	1114	0000	0606	2728	2226	1919	1416	2626	0610		1				1
50	1114	1112	3842	0606	2424	2227	1919	1616	2326	0610		1				1
51	1011	1314	3941	0606	2525	2228	1919	0000	2327	1010		1				1
52	0000	1314	0000	0707	2525	0000	1921	0000	2323	0610		1				1
53	1113	1114	4041	0808	2627	2222	1919	0000	2626	0606		1				1
54	1111	1414	4141	0808	1314	2228	1919	1414	2626	0606		1				1
55	1414	1112	4142	0808	2727	2228	1919	1616	2526	1010		1				1
56	1111	1414	4141	0808	2727	2222	1919	1313	2326	0606		1				1
57	1314	1214	4243	0606	2929	2227	1919	1616	1926	0610		6				6
58	1114	1214	4243	0808	2727	2228	1919	1616	2526	1010		1				1
59	1111	1414	4041	0606	2626	1422	1919	1313	2626	0610		1				1
60	1314	1214	4243	0606	2929	2227	1919	1616	2626	0610		1				1
61	1114	1214	4142	0606	2727	2227	1919	1616	1926	0610		1			2	3
62	1114	1214	4142	0606	2727	2227	1919	1616	1927	0610		2			1	3
63	1114	1214	4142	0707	0000	2227	1919	0000	2626	0000					1	1
64	1010	1414	4040	0808	2626	2222	1919	0000	2526	0606					1	1
65	1013	1214	4041	0808	2626	2228	1919	1616	1926	0810					1	1
66	1114	1112	3842	0606	2424	2222	1919	1416	1926	0610					1	1
67	1111	1112	0000	0000	2424	2228	1919	1416	2626	1010					1	1
68	1113	1214	4141	0808	2727	2228	1919	1616	2526	0610					2	2
69	1114	1112	3842	0808	2424	2228	1919	1616	1926	0610					5	5
70	1111	1112	0000	0909	2424	2228	1919	1616	1826	0610					1	1
71	1114	1112	3842	0000	0000	2228	0919	1616	1919	0610					1	1
72	1113	1214	4141	0909	0000	2228	1919	1616	2525	0610					1	1
73	1113	1112	3841	0808	2424	2228	1619	1616	2424	0610					1	1
74	1113	1112	3841	0808	2424	2228	1919	1616	2525	0610					1	1
75	1113	1112	0000	0909	0000	2228	1619	1616	0000	0610					1	1
76	0000	1212	4141	0808	0000	2828	1919	1616	2525	1010					1	1
Total											54	55	10	91	22	232

<sup>a</sup> Alelos em cada loco são representados pelo número de repetições, possibilitando a diferenciação entre homocigotos (com duas cópias de um mesmo alelo) e heterocigotos (com dois alelos distintos).

<sup>b</sup> Populações amostradas nos Estados de Mato Grosso (MT98 e MT06), Maranhão (MA00 e MA06) e Tocantins (TO06).

## **CAPÍTULO 3 - DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MARCADORES MOLECULARES E CARACTERIZAÇÃO DE SNPS EM *Rhizoctonia solani* AG-1 IA NO BRASIL**

### **Resumo**

Um método para detecção de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs), em múltiplos locos por PCR, foi desenvolvido para identificar e diferenciar genótipos do fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA associado à soja e ao arroz no Brasil. Esta estratégia baseou-se no seqüenciamento de fragmentos de DNA clonados do fungo (empregados como sondas para genotipagem via RFLP) e tipagem de isolados para detecção de polimorfismos. Dez pares de iniciadores foram projetados com base nas seqüências desses clones. Destes, oito resultaram em amplificação de produto de PCR entre 195 a 320 pares de bases, cujas respectivas seqüências indicaram polimorfismo em todas as regiões analisadas. Detectou-se tanto a presença de um único alelo em cada isolado como a ocorrência de múltiplos alelos para cada região analisada, indicando a condição heterocariótica do fungo, que foi eficientemente separada via clonagem de produto de PCR amplificado. O maior número de polimorfismos SNPs foi detectado para o marcador R68L, com 18 mutações em 303 pares de bases. Para os outros marcadores, observou-se entre 0,5 a 4,5 mutações por 100 pares de bases. Desse modo, as sete sondas co-dominantes de RFLP foram convertidas com êxito em seis marcadores co-dominantes de seqüenciamento, altamente informativos e polimórficos. Esse conjunto de novos marcadores co-dominantes mostrou-se viável como um sistema de genotipagem de múltiplos locos, possibilitando discriminação alélica precisa, com o potencial de complementar os métodos existentes para estudo da biologia populacional de *R. solani* AG-1 IA e viabilizar estudos de caráter evolutivo. Acredita-se, ainda, que o conjunto de marcadores nucleares permitiria discriminar genótipos do patógeno, com utilidade para detectar a origem de isolados dispersados em material propagativo, como sementes infectadas pelo patógeno.

**Palavras-chave:** polimorfismos, queima foliar, marcadores moleculares, genotipagem.

## Introdução

Estudos sobre a biologia populacional do fungo basidiomiceto fitopatogênico *Rhizoctonia solani* (AG) 1 IA tem sido desenvolvidos usando marcadores RFLP, RAPD, microssatélites e seqüências da região ITS-5.8S rDNA e do gene beta-tubulina (Ciampi et al., 2005; Ciampi et al., 2008; Fenille et al., 2003; Fenille et al., 2002; Gonzalez et al., 2001; Gonzalez et al., 2006; Guleria et al., 2007; Linde et al., 2005; Rosewich et al., 1999; Sharma et al., 2005). Esses estudos mostraram elevada diversidade genética e evidências de fluxo gênico e recombinação em populações de *R. solani* AG-1 IA em arroz e soja. Entretanto, ainda existe uma variedade limitada de marcadores moleculares informativos que permitam investigar questões ainda não esclarecidas a respeito da biologia do patógeno, a respeito da frequência em que a recombinação ocorre em isolados no campo do impacto causado na estrutura populacional do fungo. O melhor critério para detectar recombinação é a incongruência de genealogias de diferentes regiões do DNA genômico, considerada como uma assinatura de recombinação nas populações (Anderson & Kohn, 1998).

Polimorfismos de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism* = SNPs) são posições variáveis no DNA genômico, nas quais diferentes pares de bases (alelos alternativos) existem em indivíduos de certas populações (Brookes, 1999). Como múltiplas mutações em um único sítio são improváveis, a maioria dos SNPs são bialélicos, facilitando genotipagem em larga escala e minimizando substituições recorrentes em um sítio único, que poderiam confundir a história dos alelos na população. SNPs nucleares são medidas na mesma escala mutacional que DNA mitocondrial, permitindo a comparação entre esses marcadores. Existe uma maior variedade de testes para detecção de desvios da neutralidade, flutuações em tamanho populacional e recombinação para dados de SNPs, além de serem superiores aos microssatélites na elucidação do passado demográfico de uma população (Brumfield et al., 2003). Com a redução dos custos associados ao seqüenciamento, análises de seqüências de DNA para detecção de SNPs têm se tornando o marcador de escolha em genética de populações, filogenética e estudos de ecologia molecular (Hayashi et al., 2004; Zhang & Hewitt, 2003).

Uma estratégia de busca por SNPs pode envolver desenho de oligonucleotídeos a partir de seqüências conservadas de espécies próximas, as quais encontram-se disponíveis em bases de dados virtuais. Uma alternativa seria o seqüenciamento de locos nucleares anônimos, via clonagem ou técnicas envolvendo PCR, como AFLPs e descoberta de

microssatélites (Brumfield et al., 2003). Para a maioria dos organismos não-modelos, SNPs devem ser encontrados por triagem laboratorial (via seqüenciamento, por exemplo) de segmentos do genoma a partir de múltiplos indivíduos (Morin et al., 2004).

A fim de esclarecer questões sobre a estrutura genética predominante da população de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, verifica-se a necessidade de desenvolver marcadores genético-moleculares apropriados que permitam discriminação alélica precisa. Assim, pretende-se utilizar uma estratégia para detecção de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs), através de genotipagem de múltiplos locos baseada em reações em cadeia de polimerase (PCR) empregando-se pares de iniciadores específicos, para cada loco. Nossa hipótese é que o método de genotipagem de múltiplos locos é apropriado para estudos de genética de populações de *R. solani* AG-1 IA, permitindo a diferenciação entre os estados homocariótico e heterocariótico do fungo, por polimorfismo bialélico simples, em cada loco analisado.

## **Objetivo**

O objetivo desse estudo foi desenvolver um sistema de genotipagem através de seqüenciamento de múltiplos locos, para detecção de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP), visando identificar e diferenciar genótipos do fungo heterocariótico *Rhizoctonia solani* AG-1 IA associado à soja e ao arroz no Brasil.

## **Material e Métodos**

**Isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.** Uma amostra de 18 isolados de *R. solani* AG-1 IA, composta por quatro isolados de arroz e 14 isolados de soja, foram utilizados nesse estudo e são descritos na Tabela 1. O grupo de anastomose e a patogenicidade desses isolados foram determinados previamente por (Fenille, 2001), (Meyer, 2002) e (Costa-Souza et al., 2007). Esses isolados representam haplótipos ITS-5.8S rDNA distintos, caracterizados previamente (Ciampi et al., 2005).

**Tabela 1. Isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA empregados nesse estudo.**

isolado	hospedeiro	Fonte	origem	Haplótipo ITS <sup>1</sup>	nº de acesso no GenBank
3F1	arroz cv. Epagri 108	A.S. Prabhu	Lagoa da Confusão, TO	5	DQ173049.1
3F6	arroz cv. Rio Formoso	A.S. Prabhu	Lagoa da Confusão, TO	5	DQ173050.1
4F1	arroz cv. Epagri 108	A.S. Prabhu	Lagoa da Confusão, TO	5	DQ173051.1
9F1	arroz cv. Epagri 108	A.S. Prabhu	Lagoa da Confusão, TO	5	DQ173052.1
SJ13	soja cv. Garça Branca	R.C. Fenille	Lucas do Rio Verde, MT	22	DQ173053.1
SJ15	soja cv. Garça Branca	R.C. Fenille	Lucas do Rio Verde, MT	20	DQ173055.1
SJ16	soja cv. Garça Branca	R.C. Fenille	Lucas do Rio Verde, MT	14	AY270010.1
SJ19	soja cv. Garça Branca	R.C. Fenille	Lucas do Rio Verde, MT	12	AY270013.1
SJ28	soja cv. Xingu	R.C. Fenille	Lucas do Rio Verde, MT	23	AY270006.1
SJ31	soja cv. Xingu	R.C. Fenille	Lucas do Rio Verde, MT	1	DQ173058.1
SJ34	soja cv. FT-108	R.C. Fenille	Lucas do Rio Verde, MT	19	AY270007.1
SJ36	soja cv. FT-108	R.C. Fenille	Lucas do Rio Verde, MT	13	DQ173060.1
SJ40	soja cv. FT-108	R.C. Fenille	Lucas do Rio Verde, MT	10	DQ173061.1
SJ44	soja cv. FT-108	R.C. Fenille	Lucas do Rio Verde, MT	2	DQ173062.1
SJ47	soja cv. FT-108	R.C. Fenille	Lucas do Rio Verde, MT	9	DQ173063.1
SJ53	soja cv. FT-108	R.C. Fenille	Lucas do Rio Verde, MT	17	DQ173065.1
SJ93	soja	M.C. Meyer	Pedro Afonso, TO	18	DQ173068.1
SJ129	soja cv. Sambaiba	M.C. Meyer	Balsas, MA	16	DQ173071.1

<sup>1</sup>Haplótipos ITS-5.8S caracterizados em Ciampi et al. (2005)

**Desenvolvimento dos marcadores.** Sete clones de DNA genômico, contendo seqüências utilizadas como sondas para genotipagem de *R. solani* AG-1 IA por RFLP (Rosewich et al., 1999), foram empregados no desenvolvimento de sete marcadores nucleares, visando busca de sítios polimórficos e informativos. Por sua característica de marcador co-dominante, essas sondas de RFLP foram consideradas adequadas para genotipagem de uma população de isolados de *R. solani* AG-1 IA do arroz nos Estados Unidos, uma vez que permitiram a discriminação alélica, especialmente nos heterocáries, além de apresentarem grau de polimorfismo suficiente para discriminar indivíduos (Rosewich et al., 1999). Plasmídeos contendo as seqüências das sete sondas candidatas a marcadores nucleares foram seqüenciados usando iniciadores universal e reverso para um dos sítios de clonagem do vetor, usando BigDye Terminator system (Applied Biosystems) e analisadas em seqüenciador capilar ABI 3700 (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Os cromatogramas obtidos foram compilados e analisados pelo programa SEQUENCHER v. 4.6 (Gene Codes Corporation).

Com base no consenso das seqüências parciais dessas sete sondas, dez pares de iniciadores com 20 a 22 pares bases (pb) foram projetados para cada loco específico, visando seqüenciamento de múltiplos locos e busca de polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphisms* - *SNPs*) em cada loco. Desse modo, essas sete sondas de RFLP foram convertidas em marcadores de seqüência de DNA. O programa PRIMER3 RELEASE 1.0 (Rozen & Skaletsky, 2000) foi usado para o desenvolvimento dos iniciadores, os quais foram projetados para temperaturas de anelamento em torno de 60°C, gerando produtos de PCR com tamanho entre 200 e 320 pb, descritos na Tabela 2. Os iniciadores foram designados por “L” quando projetados para amplificar um fragmento correspondente ao início da seqüência (extremidade 5') do respectivo clone e por “R” para amplificar um fragmento ao final da seqüência (extremidade 3') do respectivo clone.

**Teste dos novos marcadores.** Um estudo inicial da eficácia dos novos iniciadores na amplificação de produtos de PCR, específicos para cada loco, foi realizada com uma sub-amostra de três isolados de *R. solani* AG-1 IA de soja (SJ13, SJ19 e SJ36) e um isolado de arroz (3F6) (Tabela 1). Cada par de novos iniciadores também foi testado com a respectiva sonda. Reações de PCR com as novas combinações de iniciadores foram realizadas separadamente para cada locus em volume de 20 µL, 5 µL de DNA genômico (de 5 a 15 ng), 2 µL de tampão 10x, 0,4 mM de dNTPs, 10 pmol de cada iniciador e 1 U de Taq polimerase. As reações incluíram uma denaturação inicial de 2 min a 96°C, seguido de 35 ciclos de denaturação por 1 min a 96°C, anelamento por 1 min a 60°C e alongação por 1 min a 72°C, com uma extensão final de 5 min a 72°C. As amostras foram seqüenciadas usando BigDye Terminator System (Applied Biosystems) e analisadas em seqüenciador capilar ABI 3700 (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante.

Os marcadores com eficácia comprovada na amplificação desta sub-amostra foram selecionados para tipagem da amostra total de 18 isolados do fungo listada na Tabela 1 (já caracterizados quanto à variação alélica na região ITS-5.8S do rDNA), de acordo com as condições descritas acima. Desse modo, foi estabelecido um conjunto de marcadores nucleares para genotipagem por seqüenciamento de múltiplos locos para *R. solani* AG-1 IA.

**Tabela 2. Características dos dez marcadores moleculares polimórficos de seqüenciamento, desenvolvidos para *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.**

marcador	tamanho do fragmento amplificado (pb)	par de iniciadores	seqüência dos iniciadores (5' - 3')	Tm	GC%
R44L	303	R44LL	AGACGTACTCTGTCCAGACCAA	58,87	50,0
		R44LR	GAATAGGTTTCTGCCCTCTTCG	61,41	50,0
R61L	281	R61LL	GGACCTTGGCTTAGGAAAGAAG	60,58	50,0
		R61LR	AGTGACGCTTGCTCAGACTAGG	61,13	54,6
R61R	300	R61RL	ATCGCAAGAAACCAGACTGC	60,41	50,0
		R61RR	CGAATATCGCCCATCGTACT	59,94	50,0
R68L	303	R68LL	AGACTGTTGACTGGTGTGATCG	60,22	50,0
		R68LR	CAGCGCTGCGTACTACAGCTA	61,78	57,1
R78L	195	R78LL	ATATGGCACCTGACCTCGAC	59,96	55,0
		R78LR	CGAGTTTGCCCACTTGGT	59,99	50,0
R111R	241	R111RL	GTGAGCGCCAGACAAGAGATA	60,55	52,4
		R111RR	ATTCCCAAGTCAGCAGCAGT	59,87	50,0
R116L	314	R116LL	CACAGATCCAGAGGTTGTGC	59,26	55,0
		R116LR	TGCTTCCAGCGTACATTCTG	60,01	50,0
R116R	223	R116RL	CGTTAGTATCGAGGTAGCCACA	59,31	50,0
		R116RR	GACCGTAGACAGGAGAAGATCG	60,27	54,6
R148L	320	R148LL	CCGTCCGTTATCCGACTTACTA	60,26	50,0
		R148LR	CCGTCCGTTATCCGACTTACTA	60,38	50,0
R148R	201	R148RL	AGCAGCATGCCGAGTTGATA	61,88	50,0
		R148RR	GTCGGTATGTCACAGACGAATG	60,44	50,0

**Separação de alelos nos heterocários.** Visando a resolução dos alelos que compõem os heterocários, produtos amplificados dos isolados heterocarióticos, exibindo picos duplos nas seqüências em ambos os sentidos (F e R) foram ligados em vetor plasmidial e clonados em *E. coli* dH5 $\alpha$ , usando kit de clonagem TOPO TA<sup>®</sup> (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Oito clones foram recuperados de cada isolado, para cada um dos marcadores desenvolvidos, usando palitos de dente estéreis na transferência para meio de cultivo líquido Circle Grow<sup>®</sup> (QBiogene, Bio 101 Systems) com glicerol 40%, visando armazenamento a longo prazo à -70°C. Para a extração do DNA plasmidial, os clones foram incubados em meio de cultivo líquido Circle Grow<sup>®</sup>, adicionado de ampicilina a 100  $\mu$ g/mL, a uma agitação constante de 200 rpm, por 22 horas, à 37°C. O DNA plasmidial dos clones foi extraído segundo protocolo padrão (Sambrook et al., 1989), seguido de amplificação por PCR e seqüenciamento (com as condições descritas acima) usando um par de iniciadores M13 universal (5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3') e reverso (5'-TTCACACAGGAAACAG-3').

**Análise de dados.** Os cromatogramas gerados foram compilados e analisados pelo programa SEQUENCHER v. 4.6 (Gene Codes Corporation), gerando seqüências consenso em formato fasta. O alinhamento dos consensos das seqüências dos isolados para cada loco foi realizado pelo programa CLUSTALX (Thompson et al., 1997). Buscou-se por seqüências homólogas no banco de dados internacional NCBI GenBank (Benson et al., 2007), a partir das seqüências obtidas, usando as ferramentas de comparação BLASTn e BLASTx (Altschul et al., 1997). A identificação de SNPs foi executada com o programa CLOURE (Kohli & Bachhawat, 2003), que salienta apenas os nucleotídeos distintos em relação à primeira seqüência do alinhamento. A identificação dos haplótipos (e dos isolados que os compartilharam), bem como do número e da posição dos sítios polimórficos foi realizada com o programa SNAP WORKBENCH (Price & Carbone, 2005), através do comando: *Collapse sequences with phenotypes into haplotypes, removing indels and infinite sites violations.*

Medidas de diversidade de haplótipos (Hd) foram calculadas pelas equações 8.4 e 8.12 de Nei (1987), com os respectivos desvios-padrão das amostras medidos como a raiz quadrada das variâncias, segundo a equação 10.7 de Nei (1987). Medidas de diversidade de nucleotídeos ou do número médio de substituições por posição entre duas seqüências homólogas ( $\pi$ ) foram calculadas de acordo com a equação 10.5 de Nei (1987). Os valores de



$\pi$  foram estimados como uma média entre todas as comparações realizadas, para cada marcador. Calculou-se também os números médios de diferenças de nucleotídeos entre as seqüências analisadas, de acordo com a equação A3 (Tajima, 1993). O espectro de polimorfismo ao longo de cada loco foi mensurado e representado por uma janela deslizante de 5 pares de bases (pb), com passos de 2 pb. O método da janela deslizante permite calcular parâmetros (por exemplo, diversidade de nucleotídeos) ao longo de uma região de DNA, através de uma janela (trecho da seqüência de DNA) que se move por passos ao longo da região analisada. O parâmetro é calculado em cada janela e o valor é atribuído ao nucleotídeo no ponto médio de cada janela. Todas essas medidas foram calculadas utilizando o programa DNASP versão 4.5 (Rozas et al., 2003).

## Resultados

**Seqüenciamento de DNA das sondas candidatas a marcadores.** Os consensos das seqüências parciais das sete sondas de *R. solani* AG-1 IA de Rosewich et al. (1999) apresentaram tamanho entre 543 e 1023 pb e são representadas no Anexo 1. Comparações entre as seqüências de nucleotídeos dessas sondas com nucleotídeos de outras seqüências do NCBI GenBank não resultou na detecção de seqüências similares, quando usada a ferramenta BLASTn (Altschul et al., 1997). Já comparações usando a ferramenta BLASTx (Altschul et al., 1997), entre as seqüências de nucleotídeos das sondas, traduzidas em seqüências de aminoácidos, com seqüências de aminoácidos do GenBank, resultaram na identidade parcial com seqüências codificadoras de proteínas de alguns basidiomicetos. A maioria das sondas (R61, R78, R111, R116 e R148) foi similar a trechos de proteínas hipotéticas de *Laccaria bicolor* e *Coprinopsis cinerea*. Detectou-se identidade de bases com diversas seqüências de proteínas de *Cryptococcus neoformans*, por exemplo, com parte de uma endopeptidase tipo cisteína (sonda R61), com parte de uma proteína relacionada à biossíntese de beta-1,3 glucana (sonda R78) e com parte de uma nuclease (sonda R111). A sonda R44 exibiu identidade de bases com parte de uma proteína contendo repetições de tetratricopeptídeos de *Laccaria bicolor* e a sonda R116 com trechos de proteínas hipotéticas de ascomicetos como *Pichia guilliermondii* e *Phaeosphaeria nodorum* (Anexo 1). Já a sonda R68 não foi similar a nenhuma seqüência do banco de dados, quando comparações foram

efetuadas usando ambas as ferramentas de busca (BLASTn e BLASTx, comparações realizadas em 18/02/2008).

**Determinação do nível de polimorfismo ao longo das seqüências dos novos marcadores.** Das dez novas combinações de iniciadores testadas preliminarmente em quatro isolados de *R. solani* AG-1 IA (3F6 do arroz, SJ13, SJ19 e SJ36 da soja), oito resultaram em amplificação positiva de produto de PCR, inclusive do respectivo clone. As duas demais combinações (R111R e R116R) não resultaram em amplificação por PCR nem da respectiva sondas. Os pares de iniciadores específicos para os locos R44L, R61L, R61R e R68L foram eficazes na amplificação de todos os isolados da sub-amostra testada. Não se obteve amplificação positiva do isolado 3F6 para o marcador R148L, do isolado SJ13 para os marcadores R116L e R148R e do isolado SJ19 para o marcador R78L; já o isolado SJ36 foi amplificado com todas as combinações de iniciadores testadas.

Foi possível identificar SNPs em seqüências de isolados para todos os marcadores, com níveis de polimorfismo variando de 1 a 18 bases polimórficas. O maior número de polimorfismos SNPs foi encontrado com o marcador R68L, com 18 mutações em 303 pares de bases. Para os outros marcadores, observou-se entre 0,5 a 4,5 mutações por 100 pares de bases (Tabela 3). Já o maior nível de diversidade de nucleotídeos nas posições polimórficas ( $\pi$ ) foi observado para o loco R116L ( $\pi = 0,25905$ ) (Figura 3). Detectou-se uma deleção nas seqüências dos marcadores R61L, R61R, R78L, R116L e R148R e três em R148L. Para a maioria dos marcadores desenvolvidos (exceto para R116L e R148R) foi possível identificar isolados exibindo polimorfismo bialélico, detectado através de ambigüidades de bases, representadas pelas letras Y (C ou T), R (A ou G), S (C ou G), K (G ou T) e M (A ou C), indicando a condição de heterocário dos mesmos (Figuras 1 e 2).

Com base na variação encontrada nos isolados dessa sub-amostra preliminar, seis marcadores foram selecionados para seqüenciamento da amostra total de isolados de *R. solani* AG-1 IA, listados na Tabela1. Uma descrição geral da variação desses marcadores é apresentada na Tabela 3 e informações adicionais, como a freqüência e a identificação dos isolados compartilhando cada haplótipo encontrado, além das posições polimórficas nas seqüências são apresentadas no Anexo 3.

A análise de seqüências de bases do DNA do marcador R44L indicou a presença de 10 polimorfismos SNPs ao longo de 303 pares de bases (3,3 %), em 16 isolados (Tabela 3). Não foi possível obter amplificação positiva dos isolados 3F1 e SJ44 para esse marcador. As posições variáveis foram 31, 37, 64, 74, 95, 100, 119, 161, 269 e 292. Nenhuma deleção foi detectada. Apenas os isolados SJ13 e SJ129 apresentaram-se como homocários, todos os outros isolados exibiram polimorfismo bialélico, detectado através da heterogeneidade de bases, representada pela letra Y (C ou T) e R (A ou G), indicando a condição de heterocário dos isolados. A representação gráfica destes polimorfismos numa região do marcador R44L pode ser observada na Figura 2.

Para o marcador R61R também foram identificados 10 polimorfismos SNPs (nas posições 85, 133, 136, 169, 232, 244, 292, 294, 295, 296) em um total de 300 pares de bases (3,3%), além de uma deleção na posição 128, para o isolado SJ13. Não foi possível obter ampliações positivas para os isolados 4F1 e SJ44 com esse marcador. Os isolados 9F1, SJ13, SJ15, SJ36 e SJ129 exibiram polimorfismo bialélico, na ambigüidade de bases Y e R, indicando a condição de heterocário para esses isolados.

O maior número de polimorfismos SNPs foi detectado para o marcador R68L, com 18 mutações em 303 pares de bases analisadas (5,9%) de 16 isolados positivamente amplificados. Foram polimórficas as posições 35, 53, 74, 96, 126, 132, 135, 160, 179, 186, 193, 206, 209, 216, 242, 264, 272, 276. Os isolados SJ15 e SJ93 não amplificaram com esse marcador. Nesta região em particular, apenas os isolados de arroz foram detectados na condição de heterocário (3F1, 3F6, 4F1 e 9F1), apresentando polimorfismo bialélico caracterizado por heterogeneidade de bases em até 12 pontos distintos na seqüência. Na Figura 3, polimorfismos são representados graficamente numa região do marcador R68L.

Para o marcador R116L, detectou-se a ocorrência de 14 SNPs e duas inserções em 313 pares de bases totais (4,5%). Quinze isolados foram amplificados, não sendo possível amplificar os isolados 9F1, SJ13 e SJ15 com esse marcador. Foram identificadas SNPs nas posições 36, 41, 46, 51, 62, 63, 68, 70, 106, 121, 125, 144, 157, 198. Os isolados 3F1, SJ93, SJ129 apresentaram polimorfismo bialélico Y, R, além de W (A ou T) e M (A ou C), sendo caracterizados como heterocários.

**Tabela 3. Análise descritiva da variação molecular de seis marcadores nucleares em seqüências de isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.**

locos	nº de isolados	nº de seqüências <sup>a</sup>	tamanho da região (pb)	nº de haplótipos	nº de sítios polimórficos	indels	nº de mutações/100 pb	Hd <sup>b</sup>	$\pi$ <sup>c</sup>	K <sup>d</sup>
R44L	16	30	303	17	10	0	3,3	0,938 ± 0,025	0,01078	3,267
R61R	16	21	300	10	10	1	3,3	0,900 ± 0,039	0,00952	2,848
R68L	16	21	303	11	18	0	5,9	0,857 ± 0,057	0,02537	7,686
R116L	15	18	313	12	13	2	4,5	0,922 ± 0,047	0,01334	4,176
R148L	4	7	320	5	8	2	2,5	0,857 ± 0,137	0,00836	2,667
R148R	11	11	200	2	1	2	0,5	0,545 ± 0,072	0,00274	0,545

<sup>a</sup> Número de seqüências analisadas, incluindo uma seqüência para os isolados homocarióticos e duas seqüências para isolados heterocarióticos (com os alelos devidamente separados)

<sup>b</sup> Diversidade de haplótipos (Hd) ± desvio padrão da amostra, calculado de acordo com as equações 8.4 e 8.12 de Nei (1987). Desvios-padrão medido como a raiz quadrada da variância, calculada segundo a equação 10.7 de Nei (1987).

<sup>c</sup> Diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ) ou número médio de substituições por base entre duas seqüências, calculado como as equações 10.5 de Nei (1987). Os valores de  $\pi$  foram estimados como um valor médio entre todas as comparações realizadas, para cada marcador.

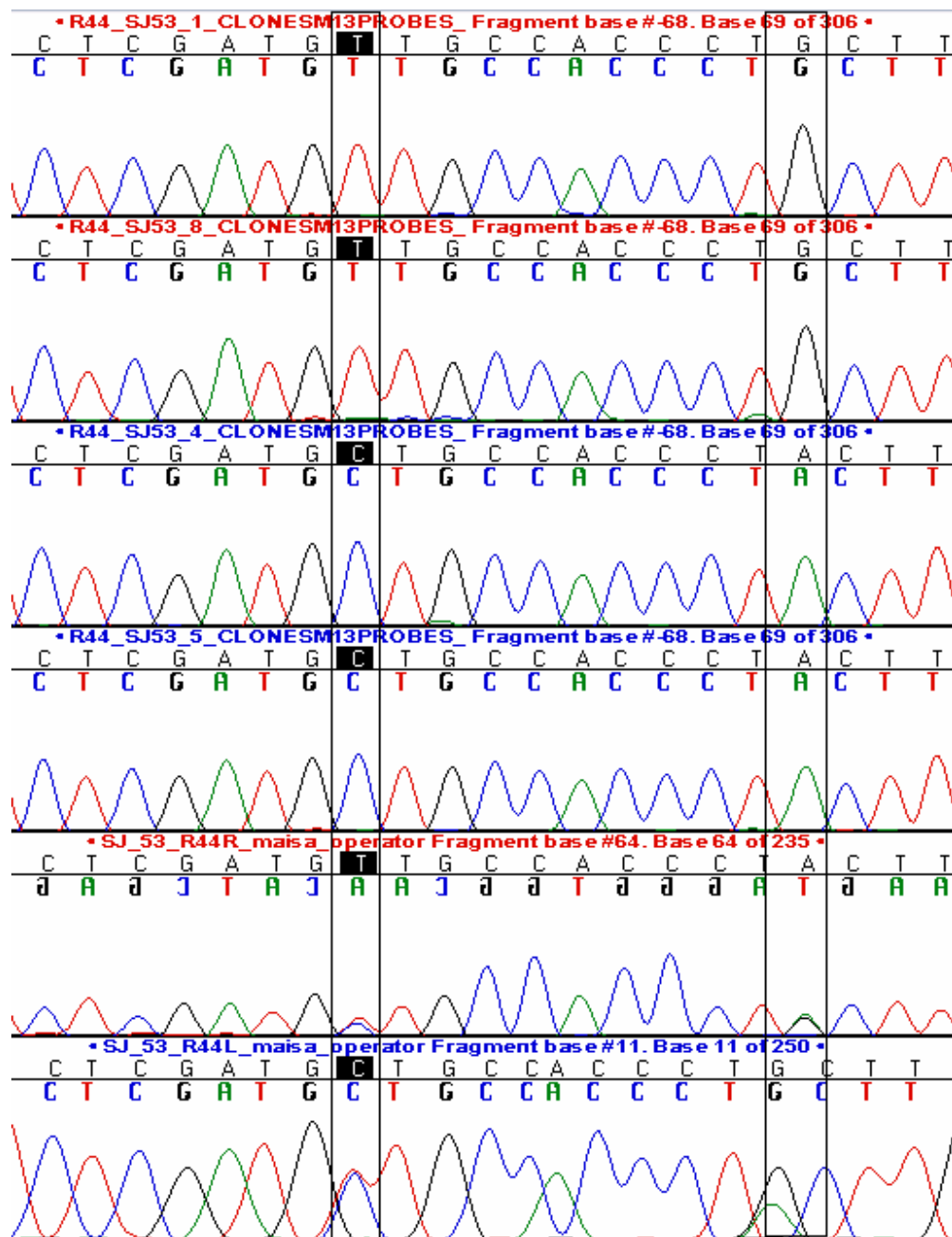
<sup>d</sup> Número médio de diferenças de nucleotídeos entre as seqüências analisadas, calculado segundo a equação A3 de Tajima (1983)

Para o marcador R148L, oito polimorfismos SNPs e duas deleções ao longo da seqüência de 321 pares de bases (2,5%), em apenas quatro isolados amplificados. Exibiram polimorfismos as posições 123, 126, 170, 200, 221, 223, 253 e 266. Os isolados SJ13, SJ93 e SJ129 apresentaram as ambigüidades Y, R, K (G ou T) e S (C ou G) ao longo da seqüência e são possivelmente heterocários, já o isolado SJ36 é um possível homocário.

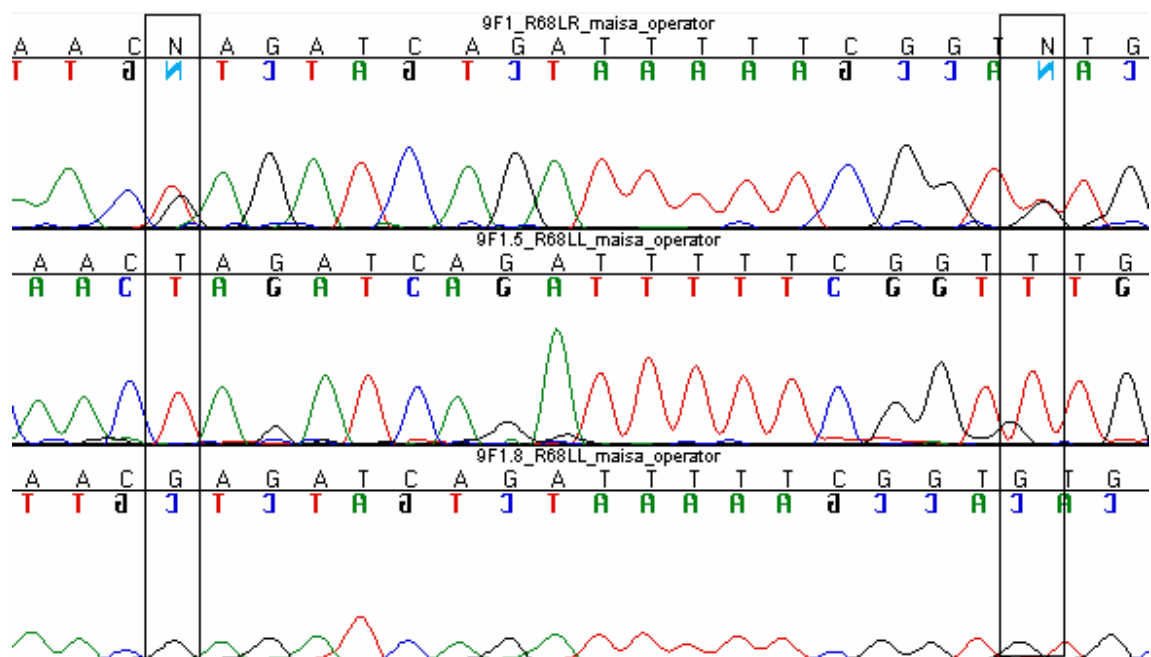
Para o outro marcador desenvolvido como complementar à respectiva sonda (R148R), detectou-se uma deleção e uma inserção em 200 pares de bases totais (0,5%). Apesar desse marcador ter sido eficiente na amplificação da maioria dos isolados (11 do total de 18 isolados), apenas um SNP foi identificada na posição 68. Não foram detectados prováveis heterocários. Houve falha na amplificação dos isolados SJ13, SJ34, SJ40, SJ44, SJ47, SJ93 e SJ129 para esse marcador.

**Resolução de alelos nos heterocários.** A clonagem dos produtos de PCR e seqüenciamento dos produtos clonados se mostrou eficiente na separação das bases ambíguas que compõem os heterocários. Foram recuperados oito clones de cada isolado, para cada marcador, estratégia que se mostrou suficiente para abranger a variedade de alelos existentes na amostra testada de isolados do fungo.

Representações gráficas de polimorfismos em trechos de seqüência dos marcadores R44L e R68L são exibidas nas Figuras 1 e 2. Polimorfismos bialélicos podem ser observados na região destacada do marcador R44L (Figura 1) para o isolado heterocariótico SJ53 de *R. solani* AG-1 IA da soja em duas posições distintas, identificadas por Y (C ou T) e R (A ou G). É possível verificar que as bases que compõem o heterocário foram eficientemente separadas na população de clones obtida, com os clones R44\_SJ53.1 e R44\_SJ53.8 exibindo a base T e os clones R44\_SJ53.4 e R44\_SJ53.5 exibindo a base C. Na Figura 2 são apresentados polimorfismos em seqüências de parte da região amplificada com o marcador R68 para o isolado heterocariótico 9F1 de *R. solani* AG-1 IA do arroz. Aqui, heterogeneidades de bases foram detectadas em duas posições distintas, onde também se obteve sucesso na separação das respectivas bases do heterocário (Y) nos clones 9F1.5\_R68R (T/T) e 9F1.8\_R68R (G/G).



**Figura 1.** Polimorfismos em região amplificada do marcador R44L de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. As duas últimas seqüências do alinhamento (SJ53\_R44L e SJ53\_R44R) indicam a condição de heterocáριο para o isolado SJ53 em duas posições distintas (ou SNPs), identificadas pela ambigüidade de bases Y (C ou T) e R (A ou G). Os clones R44\_SJ53.1, R44\_SJ53.8, R44\_SJ53.4 e R44\_SJ53.5 exibem, separadamente, os alelos distintos que compõem o heterocáριο.

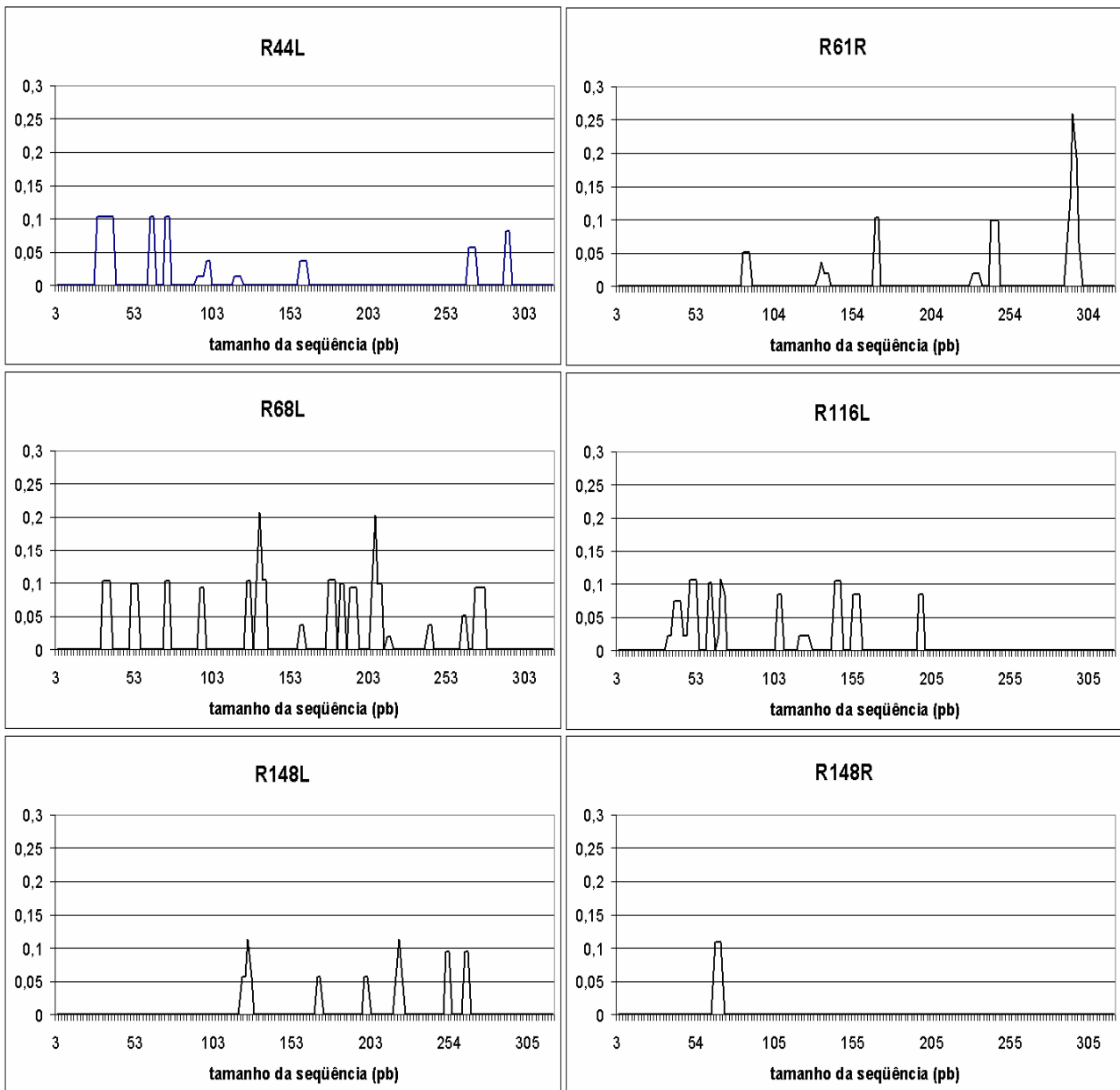


**Figura 2.** Polimorfismo em região amplificada do marcador R68L de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. A seqüência no topo (9F1\_R68R) indica a condição de heterocáριο para o isolado 9F1 em duas posições distintas (ou SNPs), identificadas pela ambigüidade de bases K (G ou T). Os clones 9F1.5\_R68R e 9F1.8\_R68R exibem, separadamente, os alelos que compõem o heterocáριο.

Diversas análises foram realizadas visando explorar melhor a variação molecular dos seis novos marcadores de seqüenciamento na amostra de isolados de *R. solani* AG-1 IA. Medidas de diversidade de haplótipos (Hd) se mostraram bem variáveis entre os marcadores analisados, variando de 0,545 (para o loco R148R) a 0,938 (para o loco R44L). Níveis de diversidade de nucleotídeos nas posições polimórficas ou do número médio de substituições por posição entre duas seqüências homólogas ( $\pi$ ) variaram de 0,00274 para R148R a 0,01334 para R116L. O número médio de diferenças de nucleotídeos (k) entre as seqüências analisadas também foi marcadamente distinto entre os marcadores, apresentando o menor valor de 0,545 para R148R e o maior valor de 7,686 para R68L, que foi o loco mais polimórfico entre os novos marcadores nucleares desenvolvidos.

O espectro de polimorfismo ao longo de cada loco foi mensurado e representado por uma janela deslizante de 5 pares de bases (pb), com passos de 2 pb, com os resultados apresentados na forma de gráficos na Figura 3, onde podem ser observados os números médios de substituições em posições particulares ( $\pi$ ) entre os haplótipos no eixo vertical e os valores atribuídos ao nucleotídeo no ponto médio de cada janela, ao longo da seqüência analisada. Todos os valores são exibidos na mesma escala, permitindo a visualização da posição dos polimorfismos, bem como do nível de diversidade de nucleotídeos entre os haplótipos nas referidas posições, permitindo comparações entre os diversos locos analisados. É possível observar não só a variedade de posições variáveis exibidas pelo loco R68L (18 no total), mas também o elevado valor de  $\pi$  detectado para o loco R116L (0,25905 no trecho entre 292-296 pb).





**Figura 3.** Espectro de polimorfismo dos locos R44L, R61R, R68L, R116L, R148L e R148R, exibido como uma janela deslizante de 5 pares de bases (pb), com passos de 2 pb. No eixo vertical são apresentados os números médios de substituições em posições particulares ( $\pi$ ) entre os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA e a abscissa representa o tamanho da região analisada.

## Discussão

As sete sondas co-dominantes de RFLP foram convertidas com êxito em seis marcadores co-dominantes de seqüenciamento, altamente informativos e polimórficos. Esses marcadores foram baseados em reações de PCR, usando iniciadores específicos em combinações especificadas na Tabela 2. Marcadores baseados em PCR são preferíveis a RFLPs por serem muito eficientes na discriminação de alelos, requerendo apenas uma pequena quantidade de DNA para genotipagem.

Embora comparações por BLASTx entre as seqüências de DNA dessas sete sondas com seqüências do NCBI GenBank tenham resultado na detecção de identidade parcial de bases com seqüências codificadoras de proteínas de outros basidiomicetos, as baixas porcentagens de identidade e os pequenos trechos das seqüências exibindo similaridade sugerem que as seqüências descritas nesse estudo constituem seqüências não caracterizadas previamente, possivelmente associadas a regiões não-codificadoras do genoma de *R. solani* AG-1 IA. As chances de encontrar SNPs são geralmente maiores em regiões não-codificantes e intergênicas do genoma, por estarem sob seleção menos severa que regiões codificantes (van Tienderen et al., 2002). Atualmente, existem apenas seis genomas completos de basidiomicetos disponibilizados pelo GenBank, de *Coprinopsis cinérea* (nº de acesso NW\_001885114, não publicado), *Schizosaccharomyces pombe* (Wood et al., 2002) *Phanerochaete chrysosporium* (Martinez et al., 2004), *Cryptococcus neoformans* (Loftus et al., 2005), *Ustilago maydis* (Kamper et al., 2006) e *Laccaria bicolor* (Martin et al., 2008). A escassa informação genômica sobre basidiomicetos em geral justificaria a pouca similaridade encontrada das seqüências das sondas com genes caracterizados até o momento.

Examinou-se a freqüência de SNPs nas regiões amplificadas com os marcadores desenvolvidos, a fim de avaliar o nível de polimorfismo desses novos locos. As seqüências de DNA dos isolados de *R. solani* AG-1 IA analisados indicaram polimorfismo em todas as regiões examinadas, com níveis variáveis ao longo da seqüência de um loco para outro (Tabela 3). Detectou-se tanto a presença de um único alelo em cada isolado como a ocorrência de mais de um alelo para cada região amplificada, indicando a condição heterocariótica de parte desses isolados de *R. solani* AG-1 IA (Figuras 1 e 2). As

ambigüidades de bases, típicas dos heterocários, foram eficientemente separadas usando a estratégia de clonagem e seqüenciamento de fragmento amplificado por PCR, como pode ser verificado nas Figuras 1 e 2.

Apesar do sucesso na amplificação da amostra inicial dos quatro isolados selecionados, não foram obtidas amplificações positivas para os marcadores R61L, R78L, R111R e R116R, com os pares de iniciadores desenvolvidos, quando a amostra de isolados do fungo foi ampliada para 18 indivíduos. Para esses marcadores, novas combinações de iniciadores devem ser projetadas, a fim de obter sucesso na amplificação por PCR e seqüenciamento dos indivíduos incluídos.

Esse conjunto de novos marcadores de seqüenciamento revelou maior poder de discriminação de alelos quando comparados aos marcadores do tipo microssatélites desenvolvidos para *R. solani* AG-1 IA (Zala et al., 2007). A genotipagem por microssatélites indicou a ocorrência de 4 a 10 alelos por loco, em 232 isolados do patógeno infectando soja (Ciampi et al., 2008), enquanto que até 18 alelos foram identificados com a genotipagem por seqüenciamento de múltiplos locos, na amostra de isolados consideravelmente menor empregada nesse estudo, de apenas 16 isolados. Esses seis novos locos proporcionaram marcadores genéticos co-dominantes e polimórficos, que podem ser empregados em populações adicionais de maior tamanho para aprimorar o conhecimento a respeito da estrutura populacional desse importante fitopatógeno.

Locos altamente variáveis têm sido amplamente usados para estudos de genética de populações. Freqüentemente, locos são selecionados com base na maior quantidade de variação, em parte porque uma elevada variação pode oferecer um maior nível de informação aos parâmetros populacionais (Epperson, 2005). SNPs podem se tornar rapidamente o marcador de escolha para estudos em ecologia de populações, evolução e genética da conservação, devido ao potencial para elevada eficiência de genotipagem, qualidade dos dados, ampla cobertura do genoma e simplicidade analítica (por ex, modelando dinâmicas mutacionais) (Morin et al., 2004), além de evoluírem de uma maneira bem descrita por modelos mutacionais simples, como o modelo de sítios infinitos (Kimura & Crow, 1964).

O desenvolvimento de marcadores nucleares para *R. solani* AG-1 IA poderia contribuir para resolver algumas das questões ainda não bem esclarecidas com relação à genética desse grupo, permitindo a elucidação de processos como autocruzamento e alocrizamento,

estruturação geográfica e variação genética de populações. Com a conseqüente discriminação alélica permitida pelos marcadores de seqüenciamento desenvolvidos, seria possível determinar níveis de heterose, clonalidade e similaridade genética entre populações do fungo. Seria possível, também, analisar a distribuição dos genótipos dentro e entre as populações, além da escala espacial em que a população se estruturou, como conseqüência de fatores evolutivos como recombinação e migração. Acredita-se, ainda, que o conjunto de marcadores nucleares permitiria discriminar genótipos do patógeno, com utilidade para detectar a origem de isolados dispersados em material propagativo, como sementes infectadas pelo patógeno.

Ainda que tímida, a informação obtida com o seqüenciamento dos clones destas sete sondas e dos isolados de *R. solani* AG-1 IA, com os novos marcadores desenvolvidos, é inédita e pode ser considerada importante para estudos sobre variação genética em populações do fungo. Essas seqüências serão depositadas no GenBank quando esse capítulo for publicado como artigo científico. Até o momento, nenhuma iniciativa na área genômica foi desenvolvida para quaisquer dos grupos de anastomose de *R. solani*. Da mesma forma que para outros basidiomicetos, este fato resulta em quase completa ausência de informação genética que norteie o desenvolvimento de marcadores com potencial para estudos genético-populacionais e evolutivos. A única exceção à ausência de marcadores para *R. solani* são as seqüências relativas a genes do rDNA, utilizados em análises filogenéticas (Fenille et al., 2003; Gonzalez et al., 2001) e evolutivas (Ciampi et al., 2005) e, mais recentemente, as seqüências de beta-tubulina (Gonzalez et al., 2006) e de dois novos locos (pP42F e pP89) utilizados para estudo da filogeografia de *R. solani* AG-3 associado a solanáceas (Ceresini et al., 2007).

Estes marcadores desenvolvidos podem ser informativos na investigação da filogeografia do patógeno. Estudos filogeográficos combinam informação sobre genética e biologia de populações, filogenética, evolução molecular e biogeografia histórica para caracterizar a distribuição geográfica de linhagens genealógicas dos patógenos no espaço geográfico (referidos como padrões filogeográficos), inferindo os processos biogeográficos, demográficos e evolucionários que moldaram estes padrões atuais. Para se construir uma história filogeográfica robusta, usando-se dados genealógicos, são necessárias seqüências de DNA genômico de múltiplos e independentes locos (Avice, 2000), considerando que cada seqüência de DNA tem sua própria genealogia e que a história evolutiva de um organismo é

o resultado da soma de múltiplas genealogias, compondo um mosaico de padrões genealógicos em resposta ao ambiente (Emerson & Hewitt, 2005; Hare, 2001).

## **Conclusões**

- O método desenvolvido para detecção de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs), em múltiplos locos por PCR se mostrou eficiente para identificar e diferenciar genótipos do fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA associado à soja e ao arroz no Brasil, por possibilitar discriminação alélica precisa.
  
- As seqüências analisadas indicaram polimorfismo em todas as regiões amplificadas para os novos loci.
  
- Detectou-se tanto a presença de um único alelo em cada isolado como a ocorrência de múltiplos alelos para cada região analisada, indicando a condição heterocariótica do fungo.
  
- O maior número de polimorfismos SNPs foi detectado para o marcador R68L, com 18 mutações em 303 pares de bases.
  
- As sete sondas co-dominantes de RFLP foram convertidas com êxito em seis marcadores co-dominantes de seqüenciamento, altamente informativos e polimórficos.
  
- O conjunto de marcadores nucleares pode permitir a discriminação de genótipos de *R. solani* AG-1 IA o, com utilidade para detectar a origem de isolados dispersados em material propagativo, como sementes infectadas pelo patógeno, podendo também ser informativos na investigação da filogeografia do organismo.

**Anexo 1.** Consenso das seqüências parciais das sete sondas de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA do arroz, utilizados como sondas para genotipagem por RFLP e o resultado da comparação por BLASTX dessas seqüências com as disponíveis no banco de dados NCBI GenBank.

**R44: 543 pb**

CTGGTACCCGGGCCCCCCCTCNAGGTCGACGGTATCCGATAATGNTTGCTAAAGCCCCTTGAGGATCCGTTATAAATTATC  
 CAAGGAACGCTCGGACTTGGATGAATGTGTAGACGTACTCTGTCCAGACCAAGCCAAGCCTCAATTCGGACACTCAAAA  
 GTTTTTCTCGATGCTGCCACCCTACTTGTGAGGATTTGCCATGATTATAAATTGCATGAAATAGTGTGGAGGGATAACAAGC  
 GAGTCTTCGTAGCTCTACGAAAAATGATTCGGCTAGGGCTCTCATCGACTGAACGACAAGATGCTATTGTATACTCTGTTG  
 GATACGCCTGCGATGCTGCTGCTTCTGCTCTGGAACAAGGTCAAGTTAACGTTGCTGTAGAGCTACTCGAAGAGGGCAG  
 AAACCTATTCTTTTCTCAGTTGCTTCCATCCAAATGGATACTACCTCGATTAACCTCAAGATCCAGATTTAGCCTCATATCT  
 TGATGAGACGATAGATAAGATTAACAGTATTATCGAGCCACTGATGCTGCCAGCTA

**BLASTX em 18.02.2008 - identidade com parte de proteína contendo repetições de tetratripeptídeos de *Laccaria bicolor***

**R61: 973 pb**

GTGGCGGGCCGCTCTAGAATCAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTCAAGGCATAAGTAAGTATTC  
 AGCCCTTTTGTGTGTCAGGACCTTGGCTTAGGAAAGAAGATCCCGTATCCAAGCCACTGCAGATATCTGGTACCTGATAT  
 TCAAGGCTGTGATAATGCGAGAACAAGTATGCACCTATTTTCACTCACGGTATAGAGTAATTACTGATCAAAGTCTATTTAGT  
 CTGGCTGAGCCGAATTGGTGAGGTCCAGCCGAAGAGCAAAAAGCGTTTGAAGATCTCGAGAAGCTACCACAAACGCTT  
 AAGAGCAAGGTGAATGGATTTTGTGCAACTTTCTGGTCACTAACTAATCCCCCGCCCCCTAGTCTGAGCAAGCGTAC  
 TCCTTGGTGAATCGCATTGCATGAAGGTACAGCCAGTTAGATCTGATCTGTTCTGAGTTCTTTGACTGAGTCTGGTA  
 AGTCATAGATTATCAGNN  
 AGTATTTCTCGACCCCTCTCATCGCAAGAAACCCAGACTGCATTAGCAGTGCCAAACGTCCATAGTGCAGATACACTCTCT  
 TTGCTGCGGGGTCTTTGGATAAGGCCTTTAAGAGAAAATGGAATTGGCGGTGATAAGACGAGTGTCTCGCCCTAAACTTGA  
 CAAGAGTCTTCTCGATTGTTTCTCGTCGATCTCTCCAAATGTAGGGACGAAGAGCTGGAGGATCTAGCATATTTTATTCTT  
 GATCTTTACCAATTGCATGGAATATCTATTGCGTTGTCGACGTAGATATTGATACTGTGAGTACGATGGGCGATATTCGGC  
 CAATGCTTACCCTTCCGCCACCCGTGAACAATNATCGGATACGGGTGACCTNGAGGGNNGGGGCCCGGGTACCCAGC

**BLASTX em 18.02.2008 - identidade com parte de endopeptidase tipo cisteína de *Cryptococcus neoformans* e proteína hipotética de *Coprinopsis cinerea***

**R68: 817 pb**

GCTGGTACCCGGGCCCCCCCTCNAGGTCNACGGTATCGATAANCTTAGACTGTTGACTGGTGTGATCGCGTGAGACAAC  
 TAGATCAGATTTTTCGGTTTGCTGTTAAAAGGCATCAGGCTTAGCAGGACTCTAAGAGTAAATATAAGTACGTGCATCTGTA  
 CTAGTACAGCTATCTACAAGTCCAAGGTTACGGTACGTATCTCCCGTATGATTGCATAGATGGCTCGATACTTGGGCTCG  
 GATCAACAGTGTGATGGAATACATATCTATGGAAAGGTAGAAAGGTGCACGACCCGGGCCAGAGGACAGTAGAGGGAT  
 ATAGTACTGTAGTACGAGCGCTGGGGTGGCCGCCAAAGCCCGCTAGCGAGCGAGCTCGGGTGGCGCTTCC  
 CGGTTGTGTGTGCACGTTTATAAATAATGGCCAATGACTATACTATGCTANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 TGTACATTTCCACACTTTTGTGACTGACCAAGTACAATGCACCATACAATTTGTCAAGTTTCCGATTCAATAAGCGCACAAAG  
 AATAAAAATTGAAGCACAAAGTATTGATTTAAATTTGGTGCTGGTGTGCTCATAGTTATTGCAAAAACGGTTTTTGTAGG  
 GAGTGTAGGAGCGGCATAGTGCCTGCGGTTGCGGAGCCCACTGGTATTGACTCCTGTTTGGGATTAGATGTCA  
 GCTAACTAATTGTCCAATCGGGGCTTCAAAGCTTGATATTCGGAATCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGT

**BLASTX em 18.02.2008 - nenhuma identidade**

**R78: 954 pb**

ACAGGTACGTATTTTTCTTACATGGCGTGATAATTCCTCCAATNCACATGCTCCTAGGCGAGTACAAAGGGTGGAAACGTTT  
 TCGAGGCATTTGCAGACNAGAGTNACCGTCTGGCGCGAACGCAATATGGCACCTGACCTCGACGTATTACAAAATCCG  
 GTAATTACTTCCATAATGTATCGCTTGTGCGCCCGGGAGTCCGAACTGCGTCAAGTGTGCAAGTTCCCATCCCGGTCAT  
 GGTGGACCCAGCGTTCCGAATACGCCCTACAAAGTCCAGACTCCCTCCATCGCCTATCGCGCGAAACCCCGGACCCA  
 CCAAGTATGGGCAAACCTCGACCAACCCATCCACCCACCACTCAAGTCACTCGCGCCTCGATGGCCCAGCCTCTTCTACT  
 CCTACGCAATCCGATATCATCCCGGACACATCAGAGCGCGACGACCTTGAATCAGGTACGAATGCGCGTGAAGTTGTGC  
 CACTCCGGGNN  
 CTTTAACTCGAGATGCGTACGCTCTGTTGCGTTTGTGCACACTGAAAGATTGTAGTTAGTTATTTAATGATTCCCATTTGT  
 GTCTGCCATCAATACCTCTTTTACGTGACCTGGGGGGCTCTTGGGCAACGCTAACGATTTGGGGCTTTTGTGTTTTG  
 TTTGGTAACTTAACTCTAGTCTCTTTGCAGAGGCTTACTTTTGATTGCTTTTGTCCCTGGCTATAAGAAGACCTCAT  
 ACGTCCGGTACTTCCGCGCACTGCTCAGCCAAAGCGACTTTCCCTCAGAGCATACAACNTGGGCACACTCCTCATGCA  
 AGACGCGGTCTTACATAACCAACTACTTAAATGGTCTTTATCATCAATTAACCAGC

**BLASTX em 18.02.2008 - identidade com parte de proteína relacionada à biossíntese de beta-1,3 glucana de *Cryptococcus neoformans* e proteína hipotética de *Coprinopsis cinerea* e *Laccaria bicolor***

**R111: 1023 pb**

GCTTCCATCCAATACGGCGCTCGCCTCGCTTTTCGGTTATGCCCAAACCCGACCAGGACAACCTTGTGCGACTCCGCCGCCT  
GGGTTGAAGTTTCAGGTAATTTAAAAATTTAAATTAATTAATCGCCCTTTGGGTACTCATAGCTTGGACAGAGCGGTGATAT  
TAGCAGCATCAGCGGCGCGCTGGTCAAAAAGCGATTGCGCGAGAACAGCAAGGGTAGCGGTACCAAGCTTGAAACGGT  
AGAGACATACGACACGATACTTTCCGTCTGATCTTGTGGTAGGTAAAGTGGGACGGTAAAGACAAATACGTCCTGG  
AATGTATTAGTAAGTCGCCGGCACCAATCTTCGGTGTATGCCAGTCTATGTTGGATGAGTGCCGGATTCTTTATGTTAATA  
TGCATAAAGGGACATACAGTGCTGATTAACCCCTCTGCCTACTTGAGGTGCGATGTTAGATAAAAGGAATGTCTCATCCATT  
GCCTCCTATAGAATANNAGCATGTTTCCTTGACGCGACTCCTGCT  
GCGATTCCAGCACCCAATGCCGCACCAACCGAGAAGACAGCAATATGGGCAATCGCTGAAGACGGCATCGTTAATTGAG  
AAGAGAACAAGCTGCCGTGGTGAAGCGCCAGACAAGAGATATATAATAGGTAACCTATATGATGATCAGGATAAACAGATCTT  
TGATTACGCGACGAATCACGTGCGTGCCGGATGGATGGACGAGCGCATATGACGATTGCTTGTGCGCTACTATTCCCCAG  
CTAAATTTGCTAGCTATTCAACTCAGGCACCCCTTCGGTCCCATTAAATACGATACAAATATTTAAAATGGTTACTGCTGC  
TGACTTGGGAATAGTTGAAGCGGCGCATGCGGCAGACTCGGAATATGTCTCCGACAATACAGCACAAAGAGTTAGTACC  
AAATNTNATATTTACNAGCATAAAGCGTTGATATCGGAATT

**BLASTX 18.02.2008 - identidade com parte de nuclease de *Cryptococcus neoformans* e proteína hipotética de *Laccaria bicolor* e *Coprinopsis cinerea***

**R116: 919 pb**

GCTTTATTTACTCTTTTACAGATCCAGAGGTTGTGCGTGCCTGCGCTGGGCGCTCCTCAAGGGAGTGTGAGTCTCCAAGACATA  
TGATCAAAAACAAGTTCTTAAATGCTTGAAAAACACATCCAAACGGTATAAGCTGTGCCATTGGAACCTGTAATACTTCG  
GCGGATTCAAATAACGTACTTTATATTCTTGATAAGTTGCCTCGCTTCTCGATAAACTATCTTTATCAGTATAAATGCTCTC  
CACGTGATCCAGTTGGCATGGGTCAATAAGTAAGCTCAGGGGATCGTACAACCACGCCAACAGAATGTACGCTGGAA  
GCACGAAGCAGTCGGAACCCCTTGAGCTCTGTAGATGAGCGATCCAGTCACAAAAGATGCTTACATACGATTATCATTG  
GAGTGCTATTGCTCACTCCCGTAGCACTATATCAGTTCGCTGGCTCATTGTCAGGTTATCTATACGACGTATCTGGTTCTCG  
NNCGCTACCTGCAATAGGTGAGAAGGGTTATCTTGACGTTAGTAT  
CGAGGTAGCCACACCTGGTGGGCACTCTAGCGTACCGCCAGCGCATACAGTGAAGTACCCAGCACCCAGATTCAAGCAAA  
TTTCTATGCCAACCTGAAATTTGTAGACCATTGGTATACTTGCATACCTATAACCAAGATCGAATCTACACCTTATGTGCC  
ATCACTCGCGCATCTTCTCCTGTCTACGGTCTCCTTCAGTGTGTTTGGCCGCCGTGTCCCGTCTATCCCATCTTCGGTCC  
GCTCTTCTATTTTCAGGTCTATTTGCCCTGCCGAAGCTTGATATCGGAATTCNNCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTNNNN  
AGCGGCCGCCACC

**BLASTX 18.02.2008 - identidade com proteína hipotética de *Laccaria bicolor*, *Coprinopsis cinerea*, *Pichia guilliermondii* e *Phaeosphaeria nodorum***

**R148: 869 pb**

GAATCCGATATCAAGCTTATTTCTCGGGTGAAGGACGACTTCTGCCGATTTTCTGGAGTCGGTCTACGGCTATGAGCTCA  
AGTCAGCTCAAGATCCATTTTTCACTAATATCTCGAAAATGAATGCGATCCTATCGCACGCATCACTCCCTACAGGTAGGTA  
TTTATCTATCCATTAGGTTAGCACTGTATCTTACCGTGCCTTTCAGCCTTTCTGGTGAATGCGTTTTCCATGGATGGAGAACA  
TTCCTGACTGGGTACCGGGAACCTGGATGGAAGCAAAAGGCTTACGAGTGGCGGGATCAGAAGGACCGGGCTATGGGTG  
ATCCGTACAATTTGGCCAAACAACGCATAGTAAGTCGGATAACGGACGGGGTATAGTAATGGCATTAAACAGCATGGCCCTG  
TAGGTCAGCGGTGCCGACGACTGCTCGATTGTCTCTAACCCTACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
NNNNNGAGAACAGCTCGATTGCGTAAGTTATAATGCATCCATTACTGTTNTACATAATTGATAATGAGGTTTGTTCAGCTGT  
CCGGTGCCATTCAAGGTTAGGATCAGTCCCAGGTCGGAGCAGCATGCCGAGTTGATAGGTACTGCTATGTAAAAGAGAAC  
ATTATTCGTTTTCGTTCCTAGATTTACTTGTATTCTTTTCAACTTGATTATTTTCATAGGCAAATTTATGCAATTACATGCTCTT  
CGTTTTCGTCTTGAACGTTGAAATTTCCAAACAATTTGACATGCATTTCATTTCGCTGTGACATACCGACAGTGGGGGCT  
GATGAGCACGAAAAAGACTTGCTAACACCGCTCATAAATAAGC

**BLASTX 18.02.2008 - identidade com proteína hipotética de *Laccaria bicolor* e *Coprinopsis cinerea***

**Anexo 2. Análise descritiva da variação molecular de seis marcadores nucleares em amostras de isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.**

marcador	nº de haplótipos	freqüência do haplótipo <sup>a</sup>	posição do polimorfismo ao longo da seqüência de DNA	isolados compartilhando o haplótipo <sup>b</sup>
R44L	H1	1	T C T G T A A T T G	SJ13R44a
	H2	1	C C T G T A G T T G	SJ36R44b
	H3	1	C T C A T G G C T G	3F6R44b
	H4	5	C T C G T A G T T G	SJ16R44b, SJ34R44b, SJ40R44b, SJ47R44b, SJ53R44b
	H5	3	C T C G T A G T C G	SJ19R44b, SJ28R44b, SJ31R44b
	H6	1	C T C A T A G C T G	9F1R44b
	H7	1	C T C A T A G T T G	3F6R44a
	H8	1	C T C A T A G T T A	4F1R44a
	H9	1	C T C A T A G T T G	9F1R44a
	H10	1	C T C A T A G C T A	4F1R44b
	H11	1	T T C A T A G T T G	SJ36R44a
	H12	1	T C T A T A G T C G	SJ16R44a
	H13	5	T C T A T A G T T A	SJ28R44a, SJ31R44a, SJ34R44a, SJ40R44a, SJ53R44a
	H14	2	T C T A T A G T T G	SJ19R44a, SJ47R44a
	H15	1	T C T G C A G T T A	SJ93R44b
	H16	3	T C T G T A G T T G	SJ129R44, SJ15R44, SJ13R44b
	H17	1	T C T G T A G T C G	SJ93R44a
N =		30		
R61R	H1	2	A T A A C A G G C G	3F1R61R, 3F6R61R
	H2	1	G T A A C A G C G	SJ15R61Ra
	H3	5	G T A G C A G C G	SJ93R61R, SJ129R61Rb, SJ40R61R, SJ36R61Ra, SJ34R61R
	H4	1	G T A G C G G C G	SJ129R61Ra
	H5	3	G T A G C A A G C G	SJ13R61Rb, SJ47R61R, SJ53R61R
	H6	1	G T A A T A G C G A	9F1R61Rb
	H7	4	G T A A C G G C G	SJ15R61Rb, SJ28R61R, SJ31R61R, SJ36R61Rb
	H8	1	G T A A C G A G C G	SJ13R61Ra
	H9	2	G T A A C G C G A	SJ16R61R, SJ19R61R
	H10	1	A C G A C A G C G A	9F1R61Ra
N =		21		



marcador	n° de haplótipos	frequência do haplótipo <sup>a</sup>	Posição do polimorfismo ao longo da sequência de DNA												isolados compartilhando o haplótipo <sup>b</sup>						
			36	41	46	51	55	62	68	70	88	89	106	112		125	144	157	199	209	216
R68L	H1	1	G	T	T	A	C	G	A	C	G	T	G	G	T	A	G	3F1R68Lb			
	H2	1	T	T	A	C	G	A	C	G	T	C	A	T	A	A	G	3F6R68Lb			
	H3	1	T	T	C	T	A	G	T	A	T	G	G	T	A	A	A	3F6R68La			
	H4	6	T	T	C	A	C	A	A	C	G	T	G	G	T	A	A	SJ93R68L, SJ129R68L, SJ31R68L, SJ28R68L, SJ16R68L, SJ13R68L			
	H5	1	T	T	C	A	C	A	G	C	G	C	G	G	T	A	A	4F1R68La			
	H6	1	T	T	C	A	C	A	A	C	G	T	G	G	T	A	A	SJ19R68L			
	H7	1	T	T	T	A	T	A	G	T	A	T	G	A	T	G	A	3F1R68La			
	H8	1	T	T	T	A	T	A	G	C	G	T	G	G	T	A	A	9F1R68La			
	H9	1	G	G	T	A	C	G	A	C	A	T	G	G	C	A	A	4F1R68Lb			
	H10	6	G	G	T	C	T	G	G	C	A	C	C	A	C	A	A	SJ34R68L, SJ36R68L, SJ40R68L, SJ44R68L, SJ47R68L, SJ53R68L			
H11	1	G	G	T	A	C	A	A	C	A	C	G	A	C	A	A	9F1R68Lb				
N =		21																			
R116L	H1	1	A	G	A	G	C	C	A	G	A	C	C	A	G	3F1R116a					
	H2	1	G	C	A	C	C	A	C	T	A	A	A	G	G	SJ36R116					
	H3	4	A	C	A	A	C	C	A	G	A	C	T	A	G	SJ53R116, SJ47R116, SJ44R116, SJ40R116					
	H4	1	A	C	T	A	C	C	A	G	A	C	T	A	G	SJ129R116b					
	H5	1	A	C	A	G	C	C	A	G	A	C	T	A	G	SJ93R116b					
	H6	4	A	C	A	G	A	C	T	A	C	C	A	G	A	SJ16R116, SJ19R116, SJ28R116, SJ31R116					
	H7	1	A	C	A	G	C	C	A	G	A	C	C	A	G	3F6R116					
	H8	1	A	C	A	A	A	C	A	C	T	A	A	G	G	SJ93R116a					
	H9	1	A	C	A	A	A	T	A	G	T	C	T	A	G	SJ129R116a					
	H10	1	A	G	A	A	C	C	A	G	A	C	T	A	G	SJ34R116					
	H11	1	A	G	A	G	A	C	T	A	C	C	G	A	A	4F1R116					
	H12	1	A	G	A	G	C	C	A	G	A	T	C	A	G	3F1R116b					
N =		18																			
R148L	H1	1	C	T	G	T	A	A	A	T											SJ13.R148La
	H2	1	G	G	T	A	G	G	C											SJ93.R148Lb	
	H3	1	C	T	C	T	A	G	A	T											SJ36.R148L
	H4	1	C	T	G	G	T	G	G	C											SJ129.R148Lb
	H5	3	C	T	G	T	A	G	A	T											SJ13.R148Lb, SJ93.R148La, SJ129.R148La
N =		7																			

marcador	nº de haplótipos	freqüência do haplótipo <sup>a</sup>	Posição do polimorfismo ao longo da seqüência de DNA	isolados compartilhando o haplótipo <sup>b</sup>
R148R	H1	6	T	SJ36.R148R, SJ53.R148R, SJ16.R148R, SJ19.R148R, SJ28.R148R, SJ31.R148R
	H2	5	C	3F1.R148R, 3F6.R148R, 4F1.R148R, 9F1.R148R, SJ15.R148R
	N =	11		

<sup>a</sup> Incluindo uma seqüência para isolados homocarióticos e duas seqüências para cada isolado heterocariótico, como resultado da separação de bases ambíguas por clonagem de produto amplificado por PCR, com o respectivo marcador

<sup>b</sup> Isolados heterocarióticos representados por duas seqüências identificadas por a e b, representando alelos distintos

N = número de seqüências analisadas

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, G.C. *Thanathephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*), a species complex of wide host range. **Genetics of Plant Pathogenic Fungi**. Ingram, D.S., Williams, P.H. London, Academic Press. 6: 535-552, 1988.
- ADAMS JR, G.C. **Genetics of *Rhizoctonia* species**. Dordrecht, Kluwer Academic, 1996.
- AGAPOW, P.-M., BURT, A. Indices of multilocus linkage disequilibrium. **Molecular Ecology Notes** 1(1-2): 101-102, 2001.
- ALMEIDA, A.M.R., FERREIRA, L.P., YORINORI, J.T., SILVA, J.F.V., HENNING, A.A. Doenças da soja. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Kimati, H., Amorim, L., Bergamim Filho, A., Camargo, L.E.A., Rezende, J.A.M. São Paulo, Agronômica Ceres. 2: 642-664, 1997.
- ALTSCHUL, S., MADDEN, T., SCHAFFER, A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. et al., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research** 25(17): 3389-3402, 1997.
- AMOS, W., HOFFMAN, J.I., FRODSHAM, A., ZHANG, L., BEST, S., HILL, A.V.S. Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. **Molecular Ecology Notes** 7(1): 10-14, 2007.
- ANDERSON, J.B., KOHN, L.M. Genotyping, gene genealogies and genomics bring fungal population genetics above ground. **TREE** 13(11): 444-449, 1998.
- AVISE, J.C. **Phylogeography. The History and Formation of Species**. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press, 2000.
- BEERLI, P., FELSENSTEIN, J. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. **PNAS** 98(8): 4563-4568, 2001.
- BENNETT, R.S., MILGROOM, M.G., BERGSTROM, G.C. Population structure of seedborne *Phaeosphaeria nodorum* on New York wheat. **Phytopathology** 95: 300-305, 2005.
- BENSON, D.A., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D.J., OSTELL, J., WHEELER, D.L. GenBank. **Nucleic Acids Research** 35(suppl\_1): D21-25, 2007.
- BOLKAN, H.A., RIBEIRO, W.R.C. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. **Plant Pathology** 69: 599-601, 1985.
- BROOKES, A.J. The essence of SNPs. **Gene** 234: 177-186, 1999.
- BRUMFIELD, R.T., BEERLI, P., NICKERSON, D.A., EDWARDS, S.V. The utility of single

- nucleotide polymorphisms in inferences of population history. . **Trends in Ecology & Evolution** 18(5): 249-256, 2003.
- CARLING, D.E. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. ***Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control***. Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S.M., Dijkstra, G. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 37-47, 1996.
- CERESINI, P.C., SHEW, H.D., JAMES, T.Y., VILGALYS, R.J., CUBETA, M.A. Phylogeography of the solanaceae-infecting Basidiomycota fungus *Rhizoctonia solani* AG-3 based on sequence analysis of two nuclear DNA loci. **BMC Evolutionary Biology** 13(7): 163, 2007.
- CIAMPI, M.B., KURAMAE, E.E., FENILLE, R.C., MEYER, M.C., SOUZA, N.L., CERESINI, P.C. Intraspecific evolution of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA associated with soybean and rice in Brazil based on polymorphisms at the ITS-5.8S rDNA operon. **European Journal of Plant Pathology** 113(2): 183-196, 2005.
- CIAMPI, M.B., MEYER, M.C., COSTA, M.J.N., ZALA, M., MCDONALD, B.A., CERESINI, P.C. Genetic structure of populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from soybean in Brazil. **Phytopathology** 98(aceito para publicação), 2008.
- CONAB. Oitavo levantamento. **Avaliação da safra agrícola 2006/2007**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Brasília, Companhia Nacional de Abastecimento - Conab. 2007, 2007.
- CORNUET, J.M., LUIKART, G. Description and Power Analysis of Two Tests for Detecting Recent Population Bottlenecks From Allele Frequency Data. **Genetics** 144(4): 2001-2014, 1996.
- COSTA-SOUZA, E., KURAMAE, E.E., NAKATANI, A.K., BASSETO, M.A., PRABHU, A.S., CERESINI, P.C. Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado ao arroz em Tocantins, Brasil. **Summa Phytopathologica** 33 (2): 129-136, 2007.
- CUBETA, M.A., BRIONES-ORTEGA, R., VILGALYS, R. Reassessment of heterokaryon formation in *Rhizoctonia solani* anastomosis group 4. **Mycologia** 85(5): 777-787, 1993.
- CUBETA, M.A., VILGALYS, R. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. **Phytopathology** 87: 480-484, 1997.
- DUPANLOUP, I., SCHNEIDER, S., EXCOFFIER, L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. **Molecular Ecology** 11(12): 2571-2581, 2002.
- EL MOUSADIK, A., PETIT, R.J. High level of genetic differentiation for allelic richness among

- populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. **Theoretical and Applied Genetics** 92(7): 832-839, 1996.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews** 5: 435-445, 2004.
- EMBRAPA. Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil – 2007. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja, Embrapa Cerrados, Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de Produção 11: 225, 2006.
- EMERSON, B.C., HEWITT, G.M. Phylogeography. **Current Biology** 15(10): R367 - R371, 2005.
- EPPERSON, B.K. Mutation at high rates reduces spatial structure within populations. **Molecular Ecology** 14: 703-710, 2005.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G., SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics** 1: 47-50, 2005.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E., QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** 131(2): 479-491, 1992.
- FEARNSIDE, P.M. Soybean cultivation as a threat to the environment in Brazil. **Environmental Conservation** 28 (1 ): 23–38, 2001.
- FENILLE, R.C. Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado à soja no Brasil. **Proteção de Plantas**. Botucatu, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. PhD: 138p., 2001.
- FENILLE, R.C., CIAMPI, M.B., KURAMAE, E.E., SOUZA, N.L. Identification of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil by rDNA-ITS sequences. **Fitopatologia Brasileira** 28: 413-419, 2003.
- FENILLE, R.C., SOUZA, N.L., KURAMAE, E.E. Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil. **European Journal of Plant Pathology** 108: 783-792, 2002.
- GARNIER-GERE, P., DILLMANN, C. A computer program for testing pairwise linkage disequilibria in subdivided populations. **Journal of Heredity** 83(3): 239-, 1992.
- GLAUBITZ, J.C. Convert: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for

- commonly used population genetic software packages. **Molecular Ecology Notes** 4: 309-310, 2004.
- GONZALEZ, D., CARLING, D.E., KUNINAGA, S., VILGALYS, R., CUBETA, M.A. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. **Mycologia** 93: 1138-1150, 2001.
- GONZALEZ, D., CUBETA, M.A., VILGALYS, R. Phylogenetic utility of indels within ribosomal DNA and [ $\beta$ ]-tubulin sequences from fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 40(2): 459-470, 2006.
- GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics **Journal of Heredity** 86(6): 485-486, 1995.
- GRUNWALD, N.J., GOODWIN, S.B., MILGROOM, M.G., FRY, W.E. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. **Phytopathology** 93(6): 738-746, 2003.
- GULERIA, S., AGGARWAL, R., THIND, T.S., SHARMA, T.R. Morphological and pathological variability in rice isolates of *Rhizoctonia solani* and molecular analysis of their genetic variability. **Journal of Phytopathology** 155: 654-661, 2007.
- GUO, S.W., THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics** 48: 361-372, 1992.
- HARE, M.P. Prospects for nuclear gene phylogeography. **TRENDS in Ecology & Evolution** 16(12): 700-706, 2001.
- HARTL, D.L., CLARK, A.G. **Principles of Population Genetics**. Sunderland, MA, Sinauer Associates, 1997.
- HAYASHI, K., HASHIMOTO, N., DAIGEN, M., ASHIKAWA, I. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. **Theor. Appl. Genet.** 108: 1212–1220, 2004.
- IGREJA, A.C.M., YOKOYAMA, L.P., ROCHA, M.B., DE ALMEIDA, J. Cultura do arroz nos estados de Goiás e Tocantins: Aspectos socio-econômicos e tecnológicos nos sistemas de cultivo. **Agricultura em São Paulo** 42(2): 65-93, 1995.
- JONES, R.K., BELMAR, S.B. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolated from rice, soybean, and other crops grown in rotation with rice in Texas. **Plant Disease** 73: 1004-1010. , 1989.
- JULIAN, M.C., ACERO, J., SALAZAR, O., KEIJER, J., VICTOR, R. Mating type-correlated molecular markers and demonstration of heterokaryosis in the phytopathogenic fungus *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) AG 1-IC by AFLP DNA fingerprinting

- analysis. **Journal of biotechnology** 67(1): 49-56, 1999.
- KAMPER, J., KAHMANN, R., BOLKER, M., MA, L.-J., BREFORT, T., SAVILLE, B.J. et al.,. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. **Nature** 444(7115): 97-101, 2006.
- KIMURA, M., CROW, J.F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics** 49(4): 725-738, 1964.
- KIMURA, M., OHTA, T. Distribution of allelic frequencies in a finite population under stepwise production of neutral alleles. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 72(7): 2761-2764, 1975.
- KO, W., HORA, F. A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology** (61): 707-710, 1971.
- KOHLI, D.K., BACHHAWAT, A.K. CLOURE: Clustal Output Reformatter, a program for reformatting ClustalX/ClustalW outputs for SNP analysis and molecular systematics. **Nucleic Acids Research** 31(13): 3501–3502, 2003.
- KUHNER, M.K. LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. **Bioinformatics** 22(6): 768-770, 2006.
- KUHNER, M.K., SMITH, L.P. Comparing likelihood and bayesian coalescent estimation of population parameters. **Genetics** 175(1): 155-165, 2007.
- LINDE, C.C., ZALA, M., PAULRAJ, R.S.D., MCDONALD, B.A., GNANAMANICKAM, S.S. Population structure of the rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from India. **European Journal of Plant Pathology** 112: 113-121, 2005.
- LIU, Y.C., DOUBLE, M.L., MACDONALD, W.L., CORTESI, P., MILGROOM, M.G. Diversity and multilocus genetic structure in populations of *Cryphonectria parasitica*. **Phytopathology** 86: 1344-1351, 1996.
- LOFTUS, B.J., FUNG, E., RONCAGLIA, P., ROWLEY, D., AMEDEO, P., BRUNO, D. et al.,. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Science** 307(5713): 1321-1324, 2005.
- LUIKART, G., CORNUET, J.-M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conservation Biology** 12(1): 228-237, 1998.
- MACNISH, G.C., CARLING, D.E., BRAINARD, K.A. Characterization of *Rhizoctonia solani* AG-8 from bare patches by pectic enzyme (zymogram) and anastomosis techniques. **Phytopathology** 83: 922-927, 1993.
- MANLY, B.F.J. **Randomization and Monte Carlo methods in biology**. London, Chapman &

- Hall, 1991.
- MARCHETTI, M.A., BOLLICH, C.N. Quantification of the relationship between sheath blight severity and yield loss in rice. **Plant Disease** 75(8): 773-775, 1991.
- MARTIN, F., AERTS, A., AHREN, D., BRUN, A., DANCHIN, E.G.J., DUCHAUSSOY, F. et al.,. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. **Nature** 452(7183): 88-92, 2008.
- MARTINEZ, D., LARRONDO, L.F., PUTNAM, N., GELPKE, M.D.S., HUANG, K., CHAPMAN, J. et al.,. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. **Nature Biotechnology** 22: 695-700, 2004.
- MATSUMOTO, M. Trials of direct detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG 1 and AG 2 subgroups using specifically primed PCR analysis. **Mycoscience** 43: 185-189, 2002.
- MAYNARD SMITH, J., SMITH, N.H., O'ROURKE, M., SPRATT, B.G. How clonal are bacteria? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90: 4384, 1993.
- MCDONALD, B.A., LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology** 40(1): 349-379, 2002a.
- MCDONALD, B.A., LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica** 124(2): 163-180, 2002b.
- MEIRMANS, P.G., VAN TIENDEREN, P.H. GenoType and GenoDive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. **Molecular Ecology Notes** 4(4): 792-794, 2004.
- MEYER, M.C. Caracterização de *Rhizoctonia solani* Kühn, agente causal da mela da soja [*Glycine max* (L.) Merrill], seleção de genótipos e controle químico. **Proteção de Plantas**. Botucatu, SP, Brazil, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". PHD: 125, 2002.
- MEYER, M.C., BUENO, C.J., DE SOUZA, N.L., YORINORI, J.T. Effect of doses of fungicides and plant resistance activators on the control of *Rhizoctonia foliar* blight of soybean, and on *Rhizoctonia solani* AG1-IA in vitro development. **Crop Protection** 25(8): 848-854, 2006.
- MILGROOM, M.G. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. **Annual Review of Phytopathology** 34: 457-477, 1996.
- MILGROOM, M.G., PEEVER, T.L. Population biology of plant pathogens. **Plant Disease** 87(6): 608-617, 2003.



- MORIN, P.A., LUIKART, G., WAYNE, R.K., GROUP, T.S.W. SNPs in ecology, evolution and conservation. **TRENDS in Ecology and Evolution** 19(4): 208-216, 2004.
- NAITO, S. **Basidiospore dispersal and survival**. Dordrecht, Kluwer Academic, 1996.
- NAITO, S. Ecological studies on teleomorphic and anamorphic stages in *Rhizoctonia* fungi. **Journal of General Plant Pathology** 72(6): 400-403, 2006.
- NAVARINI, L.N., DALLAGNOL, L.J., BALARDIN, R.S., MOREIRA, M.T., MENEGUETTI, R.C., MADALOSSO, M.G. Controle químico da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* Sidow) na cultura da soja. **Summa Phytopathologica** 33(2): 182-186, 2007.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a number of individuals. **Genetics** 89: 538-590, 1978.
- NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York, Columbia Univ. Press, 1987.
- OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. **Annual Review of Phytopathology** 25(1): 125-143, 1987.
- OLIVEIRA, E.J., PÁDUA, J.G., ZUCCHI, M.I., VENCOVSKY, R., VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology** 29(2): 294-307, 2006.
- PIRY, S., LUIKART, G., CORNUET, J.M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. **Journal of Heredity** 90: 502-503, 1999.
- PRICE, E.W., CARBONE, I. SNAP: workbench management tool for evolutionary population genetic analysis. **Bioinformatics** 21(3): 402-404, 2005.
- PRITCHARD, J.K., STEPHENS, M., DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** 155(2): 945-959, 2000.
- RAYMOND, M., ROUSSET, F. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity** 86(3): 248-249, 1995.
- ROSENBERG, N.A., BURKE, T., ELO, K., FELDMAN, M.W., FREIDLIN, P.J., GROENEN, M.A.M. et al.,. Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. **Genetics** 159(2): 699-713, 2001.
- ROSEWICH, U.L., PETTWAY, R.E., MCDONALD, B.A., KISTLER, H.C. High levels of gene flow and heterozygote excess characterize *Rhizoctonia solani* AG-1 IA (*Thanatephorus cucumeris*) from Texas. **Fungal Genetics and Biology** 28(3): 148-159, 1999.
- ROZAS, J., SANCHEZ-DELBARRIO, J.C., MESSEGUER, X., ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics** 19(18):

2496-2497, 2003.

- ROZEN, S., SKALETSKY, H.J. PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology** Krawetz S,S, M. Totowa, NJ, Humana Press: pp.365-386, 2000.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SATO, G.S., MOORI, R.G. The impact of the biotechnology in the Brazilian seed industry. **Informações Econômicas - Instituto de Economia Agrícola** 33(9): 44-53, 2003.
- SHARMA, M., GUPTA, S.K., SHARMA, T.R. Characterization of variability in *Rhizoctonia solani* by using morphological and molecular markers. **Journal of Phytopathology** 153: 449-456, 2005.
- SIMON, M.F., GARAGORRY, F.L. The expansion of agriculture in the Brazilian Amazon. **Environmental Conservation** 32 (3): 203–212, 2005.
- SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics** 139: 457-462, 1995.
- STODDART, J.A., TAYLOR, J.F. Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. **Genetics** 118: 705, 1988.
- TAHERI, P., GNANAMANICKAM, S., HOFTE, M. Characterization, genetic structure, and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. associated with rice sheath diseases in India. **Phytopathology** 97(3): 373-383, 2007.
- TAJIMA, F. Measurement of DNA polymorphism. **Mechanisms of Molecular Evolution.** Takahata, N., Clark, A.G. Massachusetts, Sinauer Associates: 37-59, 1993.
- THOMPSON, J., GIBSON, T., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** 25: 4876-4882, 1997.
- TODA, T., HYAKUMACHI, M. Heterokaryon formation in *Thanatephorus cucumeris* anastomosis group 2-2 IV. **Mycologia** 98(5): 726-736, 2006.
- VAN TIENDEREN, P.H., DE HAAN, A.A., VAN DER LINDEN, C.G., VOSMAN, B. Biodiversity assessment using markers for ecologically important traits. **TRENDS in Ecology & Evolution** 17(12): 577-582, 2002.
- VILGALYS, R., CUBETA, M.A. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. **Annual Review of Phytopathology** 32: 135-155, 1994.
- WEIR, B.S. **Genetic Data Analysis.** Sunderland, Sinauer, 1996.

- WEIR, B.S., COCKERMAN, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution** 38: 1358-1370, 1984.
- WOOD, V., GWILLIAM, R., RAJANDREAM, M.A., LYNE, M., LYNE, R., STEWART, A. et al.,. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. **Nature** 415(6874): 871-880, 2002.
- WRATHER, J.A., ANDERSON, T.R., ARSYAD, D.M., GAI, J., PLOPER, L.D., PORTA-PUGLIA, A. et al.,. Soybean Disease Loss Estimates for the Top 10 Soybean Producing Countries in 1994. **Plant Disease** 81(1): 107-110, 1997.
- XU, J. Cost of interacting with sexual partners in a facultative sexual microbe. **Genetics** 171(4): 1597-1604, 2005.
- XU, X., PENG, M., FANG, Z., XU, X. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. **Nature Genetics** 24: 396-399, 2000.
- YANG, H.A., TOMMERUP, I.C., SIVASITHAMPARAM, K., O'BRIEN, P.A. Heterokaryon formation with homokaryons derived from protoplasts of *Rhizoctonia solani* anastomosis group eight. **Exp Mycol** 16: 268-278, 1992.
- YANG, X.B., BERGGREEN, G.T., SNOW, J.T. Seedling infection of soybean by isolates of *Rhizoctonia solani* AG-1, the causal agent of aerial blight and web blight of soybean. **Plant Disease** 74 485-488, 1990.
- YORINORI, J.T. Estratégias de controle das doenças da soja. **Correio Agrícola** 2: 8-12, 1998.
- ZALA, M., MCDONALD, B.A., BERNARDES DE ASSIS, J., CIAMPI, M.B., STORARI, M., PEYER, P. et al.,. Highly polymorphic microsatellite loci in the maize- and rice-infecting fungal pathogen *Rhizoctonia solani* anastomosis group 1 IA. **Molecular Ecology Resources** 8(3): 686–689, 2007.
- ZHAN, J., PETTWAY, R.E., MCDONALD, B.A. The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. **Fungal Genetics and Biology** 38(3): 286-297, 2003.
- ZHANG, D.-X., HEWITT, G.M. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. **Molecular Ecology** 12(3): 563-584, 2003.