

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

VARIAÇÃO GENÉTICA E ADAPTABILIDADE EVOLUTIVA DE
***Rhizoctonia solani* AG-1 IA DA SOJA SOB CONDIÇÕES DE**
ESTRESSE

Camila Geovana Ferro
Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

VARIAÇÃO GENÉTICA E ADAPTABILIDADE EVOLUTIVA DE
***Rhizoctonia solani* AG-1 IA DA SOJA SOB CONDIÇÕES DE**
ESTRESSE

Camila Geovana Ferro

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL - SP
Fevereiro – 2012

F368v Ferro, Camila Geovana
Variação genética e adaptabilidade evolutiva de *Rhizoctonia solani*
AG-1 IA da soja sob condições de estresse / Camila Geovana Ferro. –
– Jaboticabal, 2012
vii, 30 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: Paulo Cezar Ceresini
Banca examinadora: Jaqueline Rosemeire Verzignasse, Margarete
Camargo
Bibliografia

1. *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. 2. Fungo-Componentes de
evolutibilidade. 3. Q_{ST}. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 582.284:633.34

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: camila.gferro@hotmail.com

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CAMILA GEOVANA FERRO - nascida no dia 14 de agosto de 1986, na cidade de Rio Claro, SP, filha de Ana Maria Bortolin Ferro e Joel Ferro. Concluiu o curso de Agronomia no ano de 2009, pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig). Em março de 2010, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) em nível de Mestrado, na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Campus de Jaboticabal – SP.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini, pela orientação, amizade, confiança, paciência, apoio e principalmente pelos conhecimentos transmitidos.

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

Ao CNPq/MCT (Edital Universal 2010, Auxílio 481756/2010-8) e à FAPESP (Auxílio 2010/15704-5) pela concessão de auxílios financeiros complementares para a realização desta pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal – SP, pela oportunidade da realização do curso de Mestrado.

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 na condução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro César dos Santos, da UNESP Campus de Ilha Solteira, e ao colega Guilherme Moraes Ferraud, da CanaVialis/Monsanto, pela assistência imprescindível na implementação de análises estatísticas genético-quantitativas.

Às Professoras Dra. Margarete Camargo e Dra. Rita de Cássia Panizzi pelas importantes contribuições no exame de qualificação.

À Dra. Jaqueline Rosemeire Verzignassi (EMBRAPA Gado de Corte) e à Profa. Dra. Margarete Camargo pelas valiosas sugestões e disponibilidade de participar na banca de defesa da dissertação.

Às estagiárias (Nádia Poloni, Nayara Leite, Izabela Garcia, e Grace Ingrid Conceição), à Andressa Lima e à Lina Ramos-Molina, por toda ajuda, amizade e bom humor durante a

implementação e condução dos experimentos; sem vocês, o presente trabalho não teria sido possível.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da FCAV-UNESP e aos funcionários da FEIS-UNESP, pelas diversas colaborações.

À Deus, por iluminar meu caminho e possibilitar essa vitória.

Aos meus pais, Joel e Ana, em especial, pelo amor, confiança, amparo e incentivo e principalmente por entenderem minha constante ausência em função de um ideal. Por estarem ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Lucas e Thiago, pela paciência nas horas de tensão, pelo apoio e imenso carinho.

Ao meu namorado, Ricardo, por todo amor, apoio, compreensão e paciência durante todos estes anos juntos.

À minha avó, Maria, por todas as orações para que tudo desse certo.

Aos amigos de Jaboticabal pelo companheirismo, convivência, brincadeiras, e principalmente ao Paolo, por toda a ajuda para que este trabalho pudesse chegar ao fim. Vão deixar saudade!

Aos amigos de Ilha Solteira, pela receptividade, carinho e excelente convivência.

Aos amigos de Rio Claro e de Viçosa, que mesmo com a distância, e ausência, sempre estiveram comigo de alguma forma, me dando apoio, carinho e conforto.

A todos os amigos e colegas da Pós-Graduação, pelo bom convívio e experiências trocadas.

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

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO.....	iv
SUMMARY	vi
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	3
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
V. CONCLUSÕES	23
VI. REFERÊNCIAS.....	24

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Características morfológicas de colônias de <i>Rhizoctonia solani</i> AG 1- IA sob efeito de temperatura (25 e 33,5°C) e concentração de oxiclreto de cobre (0; 0,42 e 0,84 g.L ⁻¹) aos dez dias de crescimento. (A) 25°C e 0,0 g.L ⁻¹ ; (B) 25°C e 0,42 g.L ⁻¹ ; (C) 25°C e 0,84 g.L ⁻¹ ; (D) 33,5°C e 0,0 g.L ⁻¹ ; (E) 33,5°C e 0,42 g.L ⁻¹ ; (F) 33,5°C e 0,84 g.L ⁻¹	15
Figura 2. Herdabilidade como resposta a efeitos de temperatura e concentração de fungicida oxiclreto de cobre em populações de <i>Rhizoctonia solani</i> AG- 1 IA da soja obtidas do Maranhão (MA), do Mato Grosso (MT) e de Tocantins (TO).*	17
Figura 3. Contraste entre F_{ST} e valores de Q_{ST} para tolerância à temperatura de 33,5°C e tolerância ao oxiclreto de cobre (a 0,42 e a 0,84 g.L ⁻¹) a 25°C e a 33,5°C, entre pares de populações de <i>Rhizoctonia solani</i> AG- 1 IA da soja.*	21

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Populações de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA de soja no Brasil e medidas de diversidade genotípica*.	8
Tabela 2. Análise de variância dos efeitos de população, isolados dentro de população, temperatura, concentração de fungicida e suas interações sobre o crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>Rhizoctonia solani</i> AG- 1 IA da soja.	12
Tabela 3. Análise de variância dos efeitos de isolado, concentração de fungicida, temperatura e suas interações sobre o crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>Rhizoctonia solani</i> AG- 1 IA da soja, dentro de populações.	13
Tabela 4. Efeito da temperatura e da concentração de oxiclreto de sobre o crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>Rhizoctonia solani</i> AG- 1 IA da soja.*	14

Tabela 5. Efeito da temperatura e da concentração de oxiclreto de cobre sobre os componentes de evolutibilidade para crescimento micelial em populações de <i>Rhizoctonia solani</i> AG- 1 IA da soja.	16
Tabela 6. Variação nos valores de herdabilidade (h^2) nas populações de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA da soja em função do incremento de temperatura e da concentração de oxiclreto e cobre.	18

VARIAÇÃO GENÉTICA E ADAPTABILIDADE EVOLUTIVA DE *Rhizoctonia solani* AG-1 IA DA SOJA SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE

RESUMO

Estresse devido a mudanças ambientais pode impactar caracteres quantitativos através de alterações nas variâncias, genética e ambiental. Populações do patógeno da mela da soja, *Rhizoctonia solani* grupo de anastomose AG-1 IA, são altamente diferenciadas geneticamente ao longo de um gradiente latitudinal nas mais importantes regiões de cultivo de soja do Brasil. Entretanto, os processos evolutivos que guiaram a adaptação regional dessas populações são ainda desconhecidos. Neste trabalho foi testada a hipótese de que o estresse de temperatura elevada pode aumentar a variação genética para caracteres quantitativos, como a resistência a fungicida de amplo espectro, no fungo *R. solani* AG-1 IA da soja. Isto é o mesmo que testar se um aumento da temperatura, além da temperatura ótima para crescimento, resulta em aumento da herdabilidade de senso amplo para tolerância a um fungicida. Objetivou-se, especificamente, testar o efeito do estresse de temperatura sobre a variação genética para tolerância ao fungicida oxicloreto de cobre e avaliar a importância relativa da variação genética neutra e da seleção natural sobre a divergência e adaptação regional de populações de *R. solani* AG-1 IA da soja. Para tanto, avaliou-se o crescimento micelial *in vitro* de três populações brasileiras de *R. solani* AG-1 IA da soja sob dois regimes de temperatura, ótimo (25°C) e acima do ótimo (33,5°C), e sob três concentrações de oxicloreto de cobre: nenhum fungicida, 0,42 e 0,84 g.L⁻¹. Foram determinadas os componentes de evolutibilidade: variância genética (I_G), ambiental (I_E) e a herdabilidade no sentido amplo (h^2) para o crescimento micelial nas diferentes condições. Comparou-se, também, a diferenciação fenotípica por caracteres quantitativos (Q_{ST}) e a diferenciação genética neutra (baseada em dados de microssatélites) entre três pares de populações (F_{ST}). Como medidas de respostas

fenotípicas do fungo (para caracteres quantitativos), estimou-se a tolerância ao estresse de temperatura e a tolerância ao fungicida cúprico sob condições ótimas (25°C) e de temperatura elevada (33,5°C). No geral, sob condições de estresse de temperatura (33,5°C), houve aumento da variância genética com efeito positivo sob a herdabilidade para tolerância ao oxiclreto de cobre. As diferenças genéticas foram os principais determinantes da tolerância ao oxiclreto de cobre sob estresse térmico (h^2 média = 0,70). Esses valores de herdabilidade para tolerância ao oxiclreto de cobre a 33,5°C foram considerados altos, indicando que o patógeno tem grande capacidade de adaptação sob condições de estresse. A análise da estrutura genética neutra (F_{ST}) indicou subdivisão entre os três pares de populações. A maioria dos valores estimados de Q_{ST} não diferiram significativamente de F_{ST} , indicando que a neutralidade teve importante papel na adaptação regional das populações do patógeno.

Palavras-Chave: Herdabilidade, componentes de evolutibilidade, Q_{ST} , F_{ST} , seleção direcional, neutralidade, seleção estabilizadora.

GENETIC VARIATION AND EVOLUTIONARY ADAPTABILITY OF *Rhizoctonia solani* AG-1 IA FROM SOYBEAN UNDER STRESS CONDITIONS

SUMMARY

Stress due to environmental changes can impact quantitative traits through changes in variances, genetic and environmental. Populations of soybean foliar blight pathogen, *Rhizoctonia solani* anastomosis group AG-1 IA, are highly genetically differentiated along a latitudinal gradient in the most important Brazilian cropping areas. However, the evolutionary processes that have guided the regional adaptation of these populations are still unknown. In this study we tested the hypothesis that high temperature stress can increase the genetic variation for quantitative traits such as the tolerance to a broad-spectrum fungicide, in the fungus *R. solani* AG-1 IA from soybean. This is the same as testing whether a temperature increase, beyond the optimum temperature for growth, results in increased broad sense heritability for fungicide tolerance. The specific objective was to test the effects of temperature stress on the genetic variation for tolerance to copper oxychloride and to assess the relative importance of neutral genetic variation and natural selection on the divergence and local adaptation of *R. solani* AG-1 IA populations from soybean. We evaluated the in vitro mycelial growth of three Brazilian populations of *R. solani* AG-1 IA from soybean under two temperature regimes, optimal (25°C) and above optimal (33.5°C), and under three concentrations of copper oxychloride: no fungicide, 0.42 and 0.84 g.L⁻¹. We determined the components of evolvability: genetic (I_G) and environmental (I_E) variances and the broad-sense heritability (h^2) for mycelial growth under these conditions. We also compared the phenotypic differentiation for quantitative traits (Q_{ST}) and neutral genetic differentiation (based on microsatellite data) between three pairs of populations (F_{ST}). As measures of fungal phenotypic responses (for quantitative traits), we estimated the tolerance to temperature stress and the tolerance to copper oxychloride under optimum conditions (25°C) and high temperature (33.5°C). In general, under temperature stress (33.5°C),

there was an increase in the genetic variance with a positive effect on the heritability for tolerance to copper oxychloride. Genetic differences were the main determinants of tolerance to copper oxychloride under temperature stress ($h^2 \geq 0.70$). These values of heritability for tolerance to copper oxychloride at 33.5°C were high, indicating that the pathogen has high adaptability under stress conditions. The analysis of the neutral genetic structure (F_{ST}) indicated subdivision between the three pairs of populations. Most of the Q_{ST} estimates did not differ significantly from F_{ST} , indicating that neutrality played an important role in regional adaptation of the pathogen populations.

Keywords: Heritability, components of evolvability, Q_{ST} , F_{ST} , directional selection, neutrality, stabilizing selection.

I. INTRODUÇÃO

Alterações ambientais sob condições de mudanças climáticas podem desencadear estresse, resultando em redução do desempenho médio dos organismos. Das diversas mudanças registradas no clima, a temperatura média da superfície global, por exemplo, aumentou 0,2°C por década nos últimos 30 anos (HANSEN et al., 2006). Em contrapartida, prevê-se que o estresse térmico impacta componentes de adaptabilidade de caracteres poligênicos em populações (HOFFMANN e PARSONS, 1991).

É possível que o aumento da temperatura, como efeito das mudanças climáticas, facilite a evolução da resistência quantitativa a fungicidas em populações de fitopatógenos (WILLI et al., 2011), porém há poucos dados empíricos disponíveis que dêem suporte a esta hipótese.

Neste trabalho, estimou-se o efeito do estresse do aumento da temperatura na evolutibilidade para crescimento micelial e para tolerância do fungo basidiomiceto fitopatogênico *Rhizoctonia solani* AG-1 IA da soja a um fungicida cúprico (oxicloreto de cobre). Os fungicidas cúpricos são caracterizados por possuir múltiplos sítios e largo espectro de ação. Assumiu-se, dessa forma, que o crescimento fúngico na presença do fungicida é um caráter de resistência quantitativa de base poligênica (FISHEL, 2006).

Por sua vez, o fungo fitopatogênico *R. solani* AG-1 IA da soja é considerado o principal patógeno de importantes culturas em todo o mundo, incluindo soja, milho e arroz (FENILLE et al., 2002; JONES & BELMAR, 1989; PASCUAL & HYAKUMACHI, 2000; PERDOMO et al., 2007; SAVARY et al., 2000). Apresenta distribuição mundial como patógeno da queima da bainha do arroz e da mela da soja ao longo de uma escala de zonas de clima muito diferentes. Estas populações são altamente diferenciadas geneticamente ao longo de um gradiente latitudinal, tanto ao Norte quanto ao Sul do Equador (BERNARDES DE ASSIS et al., 2009).

A diferenciação genética entre as populações pode, também, indicar diferenças funcionais dentro da escala de distribuição do fitopatógeno, podendo levar as

populações à adaptação. Como a variação genética é considerada a base para adaptação a um clima em alteração (GUNTER et al., 2000), postulou-se que a natureza genética altamente diversa de *R. solani* AG-1 IA (BERNARDES DE ASSIS et al., 2009) confere ao patógeno elevado potencial de adaptação ao estresse térmico.

Assim, os objetivos deste trabalho foram: a) Verificar como o estresse decorrente do aumento de temperatura impacta as variâncias genotípica, ambiental e fenotípica e a herdabilidade associadas à tolerância de *R. solani* AG-1 IA ao fungicida cúprico; b) Avaliar a importância relativa da variação genética neutra, seguida de deriva genética, e da seleção natural sobre a divergência entre populações de *R. solani* AG-1 IA da soja.

Hipotetizou-se que: a) O estresse pelo aumento da temperatura não afeta a herdabilidade para o crescimento micelial e a tolerância ao fungicida cúprico em populações de *R. solani* AG-1 IA da soja; b) Nestas populações de *R. solani* AG-1 IA, caracteres associados à resposta às condições ambientais (como a tolerância ao estresse de temperatura e a tolerância ao fungicida oxicloreto de cobre) não exibem qualquer evidência de seleção (direcional ou estabilizadora) para adaptação local ou regional, ou seja $Q_{ST} = F_{ST}$. Uma hipótese alternativa é a de que, considerando que as três populações analisadas são geneticamente diferenciadas e estão distribuídas ao longo de um eixo de gradiente latitudinal (CIAMPI et al., 2008), possivelmente divergiram sob efeito da seleção direcional ($Q_{ST} > F_{ST}$) imposta pelo estresse de temperatura ao longo deste gradiente latitudinal. Dessa forma, se adaptação ecotípica estiver ocorrendo, espera-se que populações dessas três zonas distintas também exibam diferenças fenotípicas e de herdabilidade quanto à tolerância ao estresse de temperatura e ao fungicida em condições de temperatura elevada.

II. REVISÃO DE LITERATURA

Em revisão sobre evolução dos organismos sob condições favoráveis e desfavoráveis de ambiente, HOFFMAN e MERILÄ (1999) apresentaram dois grupos de hipóteses com prognósticos distintos. O primeiro grupo prevê que, sob estresse, há aumento da variância genética aditiva, com um efeito positivo sob a herdabilidade, h^2 (razão entre a variância genética aditiva, V_A , e a variância genética fenotípica, V_P). Algumas explicações para um aumento imediato da variância genética postuladas por HOFFMAN e MERILÄ (1999) são: (i) a seleção temporalmente insuficiente para remover alelos deletérios em ambientes novos e estressantes; (ii) a descanalização de variações genéticas normalmente não expressas se não houver estresse; (iii) o aumento das diferenças genotípicas sob condição de recursos limitados. O segundo grupo de hipóteses prevê diminuição na herdabilidade porque o estresse aumenta a variância ambiental ou porque os organismos, sob condições de restrição à nutrição, por exemplo, não atingem o seu potencial genético.

Estudos empíricos sobre os efeitos de condições ambientais favoráveis e desfavoráveis sobre a variância genética e a herdabilidade têm sido focados quase exclusivamente em plantas, insetos e vertebrados (HOFFMANN & MERILÄ, 1999; CHARMANTIER & GARANT, 2005). Como exemplo, estudos conduzidos com *Drosophila* revelaram tendência para aumento da herdabilidade de caracteres associados ao tamanho do inseto sob condições de estresse (HOFFMANN & MERILÄ, 1999), enquanto que populações selvagens de animais vertebrados e invertebrados apresentaram maior herdabilidade para caracteres morfométricos sob condições mais favoráveis (CHARMANTIER & GARANT, 2005), dando origem a resultados conflitantes.

Dados empíricos sobre como o aumento da temperatura média, conforme antecipado para o cenário de mudanças climáticas (INTERGOVERNAMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, 2007), pode afetar a variação genética para caracteres quantitativos em fungos fitopatogênicos são praticamente inexistentes. Entretanto, mudanças climáticas globais e alterações antropogênicas ao ambiente terrestre e

aquático podem alterar substancialmente a incidência e a distribuição de doenças (LIPP et al., 2002; GHINI, 2005). Novas doenças podem surgir em determinadas regiões e outras doenças podem deixar de ser economicamente importantes, especialmente se a planta hospedeira migrar para novas áreas (COAKLEY et al., 1999; GHINI et al., 2008). Como os fitopatógenos são considerados onipresentes, são os primeiros a apresentar os efeitos da mudança climática devido à ampla distribuição geográfica, às populações numerosas, à facilidade de reprodução e dispersão, e ao curto período entre gerações (COAKLEY et al., 1999). Assim, por serem responsáveis por perdas de produção e potencial ameaça à sustentabilidade do agroecossistema, os fitopatógenos constituem-se num grupo fundamental de indicadores biológicos que necessitam ser avaliados quanto à adaptabilidade ao estresse imposto pelas mudanças climáticas, especialmente com relação ao aumento de temperatura (GHINI et al., 2008).

Para entender se fitopatógenos podem adaptar-se a condições de estresse devido ao aumento da temperatura, necessita-se investigar como o estresse térmico afeta o potencial evolutivo e a capacidade de adaptação destes organismos (SCHLICHTING, 2008; MCDONALD & LINDE, 2002). A capacidade dos organismos para se adaptar a modificações impostas pelo ambiente correlaciona-se com o nível de diversidade genética de suas populações (GUNTER et al., 2000), que é resultado da interação de diversos fatores evolutivos, como a seleção natural, a deriva genética, o sistema reprodutivo predominante, a mutação e a migração (FUTUYAMA, 1992).

Um exemplo de fitopatógeno com alto potencial evolutivo é o fungo basidiomiceto *Thanatephorus cucumeris* (anamorfo = *Rhizoctonia solani*) grupo de anastomose (AG) 1-IA (BERNARDES DE ASSIS et al., 2009). Três características contribuem para o elevado potencial evolutivo de *R. solani* AG-1 IA: A ampla distribuição mundial nos mais diversos agroecossistemas, a alta diversidade genética do patógeno (que resulta em elevado tamanho populacional) e a predominância de um sistema reprodutivo misto (que combina reprodução sexual freqüente e dispersão de clones bem adaptados) (BERNARDES DE ASSIS et al., 2009; GONZALEZ-VERA et al., 2010)

R. solani AG-1 IA tem distribuição mundial como patógeno necrotrófico habitante do solo que infecta poáceas e fabáceas em regiões de clima tropical e subtropical,

causando a queima da bainha no arroz, a mela da soja e a mancha bandeada do milho (BERNARDES DE ASSIS et al., 2008, 2009; GONZÁLEZ-VERA et al., 2010)..

Especificamente como patógeno da mela da soja na América do Sul, *R. solani* AG-1 IA ocorre, principalmente, no Brasil nos estados de Mato Grosso, Maranhão, Tocantins e Roraima, causando reduções médias de produtividade de 30%, podendo atingir 60% em situações de extrema favorabilidade climática (GODOY, 2005; MEYER et al., 2006). Populações de *R. solani* AG-1 IA da soja no Brasil apresentaram sistema reprodutivo misto e elevada diversidade genética (CIAMPI et al. 2008). O estudo pioneiro de CIAMPI et al. (2008) com populações do patógeno da mela obtidas das mais importantes regiões de cultivo de soja no Centro-oeste e Norte do Brasil, indicou subdivisão populacional evidente. A seleção e a deriva genética podem ter realçado a diferenciação genética (DAVIS & SHAW, 2001), já que muitas destas populações estão geográfica e geneticamente isoladas. A diferenciação genética entre as populações pode, também, indicar diferenças funcionais dentro da escala geográfica de distribuição do patógeno, podendo conduzir a população à adaptação.

Adaptações dos organismos ao estresse térmico podem ocorrer por plasticidade fenotípica e / ou diferenciação genética. Plasticidade fenotípica é o fenômeno pelo qual um genótipo produz diferentes fenótipos em resposta a diferentes condições ambientais. Em contraste com a plasticidade fenotípica, a diferenciação genética é uma propriedade intrínseca dos organismos que produz adaptações genéticas permanentes, lhes permitindo enfrentar as flutuações de temperatura local (DYBDAHL & KANE, 2005; KNIES et al., 2006; YAMORI et al., 2010). Devido ao fato de a variação genética ser considerada a base para a adaptação futura a um clima em alteração (GUNTER et al., 2000), a natureza genética altamente diversa de *R. solani* AG-1 IA provavelmente confere ao patógeno potencial elevado para a adaptação, por seleção natural, ao estresse térmico (BERNARDES DE ASSIS et al., 2009).

Adaptação local ou regional ao estresse térmico pode ser causada por pleiotropia antagônica ou por acumulação de mutação (COOPER et al., 2001). De acordo com a teoria da pleiotropia antagônica, adaptação térmica para um regime de temperatura e má adaptação a outros regimes de temperatura são causadas pelas mesmas mutações,

que levam à compensação (*trade-off*) entre os desempenhos em diferentes temperaturas. Estes dois processos distintos têm sido há muito tempo reconhecidos, mas as suas contribuições em relação à adaptação térmica das espécies raramente têm sido examinadas, porque é difícil de distingui-los (ROSE & CHARLESWORTH, 1980; FUTUYAMA & MORENO, 1988; SGRO & PARTRIDGE, 1999). A pleiotropia antagônica resulta da seleção direcional para alta aptidão de organismos sob diferentes condições de temperatura enquanto que a acumulação de mutações resulta da deriva genética (FRY et al., 1996; COOPER et al., 2001; ANGILLETTA et al., 2003).

Para se inferir e discernir entre o efeito principal da seleção natural ou da deriva genética na divergência entre populações para adaptação ao estresse térmico, recomenda-se a associação entre duas categorias de marcadores: caracteres fenotípico-quantitativos e marcadores moleculares neutros. Por exemplo, caracteres quantitativos sujeitos à seleção apresentam padrões de variabilidade genética diferentes dos obtidos com marcadores neutros. Sob neutralidade, espera-se concordância entre a diferenciação genética para traços fenotípicos (Q_{ST}) e medidas de diversidade genética neutra (F_{ST}) (LANDE, 1992; SPTIZE, 1993). Valores mais altos de Q_{ST} em relação à F_{ST} refletem a ação de seleção direcional sobre o caráter, enquanto valores menores indicam que a seleção deve estar restringindo a diferenciação populacional, ou seja, é estabilizadora (LANDE, 1992; MERILÄ & CRNOKRAK, 2001).

Se pleiotropia antagônica é o principal mecanismo responsável pela adaptação térmica de fitopatógenos, espera-se que seleção direcional em diferentes ambientes aumente a diferenciação das populações para características relacionadas à temperatura, dando origem a um Q_{ST} significativamente maior para a tolerância térmica que o F_{ST} para loci neutros ($Q_{ST} > F_{ST}$). Se o acúmulo de mutações é o principal mecanismo responsável pela adaptação térmica, espera-se encontrar níveis semelhantes de diferenciação da população para tolerância térmica e loci neutros (i.e., $Q_{ST} = F_{ST}$), porque se acredita que deriva genética tenha afetado o genoma inteiro igualmente (JARAMILLO-CORREA et al., 2001).

III. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA

As amostras de populações de isolados de *R. solani* AG-1 IA foram obtidas em 2006 em áreas de cultivo de soja no Maranhão, Mato Grosso e Tocantins (Tabela 1). Estes isolados foram genotipados por CIAMPI et al. (2008), com 10 marcadores microssatélites altamente polimórficos (ZALA et al., 2008). De cada população, foram selecionados, ao acaso, doze isolados geneticamente distintos. Cada isolado, conservado em sílica gel, foi propagado e transferido para placas de *Petri* contendo 15 mL de meio BDA (18,5 g de caldo batata-dextrose, 15 g de agar, suplementado com 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cloranfenicol e de estreptomicina). Foram efetuadas duas séries de repicagens para a reativação das culturas. Logo após, procedeu-se o preparo de inóculo para os experimentos. Discos de micélio de 4 mm de diâmetro foram cortados da margem de colônias com crescimento micelial ativo e cada disco foi transferido para o centro de cada placa de *Petri*.

Delineamento experimental

Os experimentos foram conduzidos cultivando-se o fungo em meio BDA suplementado com 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cloranfenicol e de estreptomicina. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com nove repetições, em esquema fatorial 3 x 2 x 3: três populações do patógeno (populações do Maranhão, Mato Grosso e Tocantins), duas temperaturas (25°C e 33,5°C) e três concentrações de oxiclreto de cobre (0,0; 0,42 e 0,84 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Tabela 1. Populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA de soja no Brasil e medidas de diversidade genotípica*.

População	Estado	Origem	Coordenadas geográficas	Hospedeiro	Cultivar	Ano de coleta	Tamanho amostral original (N)	Número de genótipos detectados	Diversidade genotípica ^{1,2}	Genótipos utilizados
MA	Maranhão	Balsas	-47,05 L -6,52 S	Soja	Msoy 8925	2006	91	15	1,87 c	12
MT	Mato Grosso	Sorriso	-55,75 L -12,60 S	Soja	Perdiz	2006	55	22	3,54 b	12
TO	Tocantins	Tupirama	-48,17 L -8,97 S	Soja	Candeia	2006	22	16	10,52 a	12
Total							168	53		36

* Adaptado de Ciampi et al. (2008).

¹ Diversidade genotípica calculada segundo Stoddart e Taylor (1988).

² Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), segundo teste de comparações de médias baseado em *bootstrap* por meio de 1.000 re-amostragens de dados

O fungo foi incubado a 25°C, temperatura considerada ótima para o crescimento de *R. solani* AG-1 IA (COSTA-SOUZA et al., 2007) e a 33,5°C, determinada como temperatura de estresse, em teste preliminar. Após 48 horas de incubação, mediu-se o crescimento micelial diametral do fungo, ao longo da linha de maior diâmetro e a linha perpendicular, em unidades de centímetros.48 h⁻¹. Após dez dias de incubação, as colônias foram avaliadas quanto à presença e abundância de escleródios, quando se observou o máximo de sua formação *in vitro*.

O experimento foi realizado duas vezes. Como não houve diferença significativa entre eles, utilizou-se o segundo experimento por apresentar menor coeficiente de variação (CV Experimento 1 = 26,9 %; CV Experimento 2 = 18,21 %). Os dados de crescimento micelial (x) foram transformados em logaritmo ($x + 1$). Os isolados foram considerados como efeito aleatório e a temperatura e concentração de fungicida como efeitos fixos.

Adaptabilidade evolutiva do *Rhizoctonia solani* AG-1 IA sob condições de estresse térmico

Na primeira parte deste estudo determinou-se o efeito de condições de estresse térmico e de diferentes concentrações de oxicloreto de cobre sobre o crescimento micelial e os componentes de evolutibilidade do fungo. Analisou-se o efeito de isolados, dos fatores de estresse (temperatura e concentração de fungicida) e da interação isolados x fatores de estresse dentro e entre populações. Testou-se, inicialmente, o efeito dos fatores temperatura e fungicida sobre o crescimento micelial para revelar seu potencial como agentes de estresse. A análise de variância (teste F) foi efetuada usando-se o procedimento estatístico PROC GLM implementado no programa SAS (SAS INSTITUTE, 2008). As médias de crescimento micelial do fungo dentro de cada população e em diferentes ambientes foram comparadas pelo teste t .

Para análise dos efeitos do estresse térmico sobre os componentes de evolutibilidade para tolerância à temperatura e ao fungicida oxicloreto de cobre, a

variância explicada pelo fator isolados dentro de cada população foi interpretada como variância genética (V_G), e o erro experimental foi considerado como variância ambiental (V_E). A variância fenotípica calculada como $V_P = V_G + V_E$. Os componentes de variância foram determinados pelo procedimento PROC VARCOMP implementado no programa SAS (SAS INSTITUTE, 2008). As variâncias obtidas foram padronizadas pelo quadrado da média do crescimento em cada ambiente (m_i^2 , $i = 1 \dots n$ ambientes), onde: $V_G/m_i^2 = I_{Gi}$; $V_E/m_i^2 = I_{Ei}$; e $V_P/m_i^2 = I_{Pi}$, sendo então consideradas medidas de evolutibilidade ou de resposta à seleção (HOULE, 1992). A herdabilidade foi calculada como a razão entre a variância genotípica (I_G) e a variância fenotípica (I_P), ambas padronizadas. O intervalo de confiança a 95% para as estimativas de herdabilidade foram calculados por meio de análise de bootstrap baseada em 1.000 re-amostragens de dados usando o programa estatístico R.

Correlação entre variação genética e variação quantitativa entre populações

Na segunda parte deste estudo, analisou-se a correlação entre variação genética em marcadores moleculares (F_{ST}) e a variação quantitativa para tolerância à temperatura e ao fungicida oxiclóreto de cobre (Q_{ST}), entre populações. Q_{ST} é uma medida da diferenciação fenotípica, por caracteres quantitativos, entre populações, análoga ao F_{ST} (LANDE, 1992; SPTIZE, 1993).

A variação genética para loci microssatélites foi estimada de acordo com NEI (1973) considerando os componentes de variância “dentro de” e “entre” populações para medir o grau de diferenciação (F_{ST}) entre pares das três populações estudadas. Utilizou-se o programa FSTAT versão 2.9.3 (GOUDET, 1995) para determinar os valores de F_{ST} par-a-par. O intervalo de confiança a 95% das estimativas dos F_{ST} foi obtido por *bootstrap* dos dados originais, com 1.000 re-amonstragens dos dados.

Para se determinar os valores de Q_{ST} entre pares de populações, foram medidas três respostas fenotípicas: (i) Tolerância à temperatura de estresse (razão entre o

crescimento a 33,5°C e a média do crescimento na temperatura de 25°C; (ii) Tolerância ao fungicida cúprico a 25°C (razão entre o crescimento nas concentrações de 0,42 ou 0,84 g.L⁻¹ de oxiclreto de cobre e a média do crescimento na ausência de fungicida, ambas a 25°C); e (iii) Tolerância ao fungicida cúprico a 33,5°C (razão entre o crescimento nas concentrações de 0,42 ou 0,84 g.L⁻¹ de oxiclreto de cobre e a média do crescimento na ausência de fungicida, ambas a 33,5°C). A conversão das medidas de resposta fenotípica para razão de tolerância (à temperatura de 33,5°C e ao fungicida oxiclreto de cobre) é adequada pois, uma vez que variam na mesma escala (entre 0 a 1), permite comparação entre valores de Q_{ST} obtidos para respostas fenotípicas diferentes.

O nível de diferenciação populacional em caracteres quantitativos (Q_{ST}) foi estimado com base em componentes de variância genética aditiva “entre” e “dentro de” populações, como descrito por ZHAN et al. (2005) em estudo conduzido com o fungo fitopatogênico *Mycosphaerella graminicola*. Para espécies diplóides (ou organismos dicarióticos como *R. solani*, que contém dois núcleos independentes em cada célula) o nível de diferenciação populacional em caracteres quantitativos é expresso por: $Q_{ST} = \delta_{AP}^2 / (\delta_{AP}^2 + 2\delta_{WP}^2)$, onde: δ_{AP}^2 é a variância genética aditiva entre populações para tolerância a cada condição estudada e δ_{WP}^2 é a variância genética aditiva dentro de populações.

Finalmente, os valores estimados de Q_{ST} foram comparados aos de F_{ST} para testar a hipótese H_0 de divergência genética dos caracteres quantitativos devido à evolução fenotípica neutra (i.e., por mutação neutra seguida de diferenciação por deriva genética) atuando sobre as três populações de *R. solani* AG-1 IA da soja. Se o valor de Q_{ST} não difere significativamente do F_{ST} a hipótese de diferenciação populacional causada por deriva genética não pode ser rejeitada. Valores de Q_{ST} significativamente maiores que a distribuição de F_{ST} indica ação de seleção direcional sobre o caráter. Se o Q_{ST} é significativamente menor que o F_{ST} a seleção deve estar restringindo a diferenciação populacional, ou seja, é estabilizadora (MERILÄ & CRNOKRAK, 2001).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Adaptabilidade evolutiva de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA sob condições de estresse

O efeito significativo do fator população e do fator isolado dentro de população (teste *F*) indicou diferenças entre populações e entre isolados de *R. solani* AG- 1 IA, provavelmente atribuídas à variação genética para crescimento micelial entre genótipos do patógeno dentro de cada população. A concentração de oxicloreto de cobre e a temperatura também apresentaram efeito significativo sobre a taxa de crescimento micelial (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância dos efeitos de população, isolados dentro de população, temperatura, concentração de fungicida e suas interações sobre o crescimento micelial *in vitro* de *Rhizoctonia solani* AG- 1 IA da soja.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F calculado
População	2	24,37	12,19	277,71 ***
Isolado (população)	33	71,27	2,16	49,22 ***
Concentração de fungicida	2	605,32	302,66	6897,64 ***
Temperatura	1	15,71	15,71	357,95 ***
Temperatura*Concentração de fungicida	2	48,18	24,09	549,08 ***
Concentração de fungicida*Isolado (população)	70	13,59	0,19	4,42 ***
Temperatura*Isolado (população)	35	21,58	0,62	14,05 ***
Coeficiente de variação % (CV)	18,21			

(***) Significativo pelo teste *F* a $P \leq 0,0001$.

Dentro de cada população, as interações isolado*concentração de fungicida e isolado*temperatura foram significativas (pelo teste *F*), indicando que, dependendo da temperatura e da concentração de fungicida, os isolados apresentaram comportamento diferente em termos de crescimento micelial. Os efeitos dos fatores temperatura e

concentração de fungicida, atuando em conjunto, também foram significativos em todas as populações (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de variância dos efeitos de isolado, concentração de fungicida, temperatura e suas interações sobre o crescimento micelial *in vitro* de *Rhizoctonia solani* AG- 1 IA da soja, dentro de populações.

Fontes de Variação	GL	F calculado		
		Maranhão	Mato Grosso	Tocantins
Isolado	11	102,44 ***	23,97 ***	23,38 ***
Concentração de fungicida	2	2146,92 ***	212,04 ***	2952,89 ***
Temperatura	1	244,42 **	160,00 ***	17,96 ***
Temperatura*Concentração de fungicida	2	220,12 ***	167,01 ***	209,33 ***
Isolado*Concentração de fungicida	22	5,33 ***	5,90 ***	2,25 **
Isolado*Temperatura	11	15,83 ***	13,76 ***	8,03 ***
Coeficiente de Variação % (CV)		20,49	19,39	14,62

Significativo pelo teste *F* a $P \leq 0,001$ (**) e $P \leq 0,0001$ (***).

Levando-se em conta apenas o efeito temperatura (Tabelas 3 e 4), o aumento de 25 para 33,5°C provocou uma diminuição significativa no crescimento micelial dos isolados de *R. solani* AG-1 IA. A literatura descreve que os isolados de *R. solani* AG- 1 IA apresentam crescimento ideal e máximo de 25 e 35°C, respectivamente (FENILLE et al., 2002; COSTA–SOUZA et al., 2007). Nas condições testadas no presente experimento, como houve crescimento micelial na temperatura de 33,5°C, porém numa taxa muito inferior, pode-se afirmar que esta temperatura pode ser considerada uma condição de estresse para as populações.

Para o efeito do fungicida oxiclreto de cobre, o aumento da concentração (de 0 para 0,42 ou 0,84 g.L⁻¹ do ingrediente ativo), também promoveu diminuição na taxa de crescimento micelial dos isolados. Houve diferença significativa entre a adaptabilidade das populações, observada através da média do crescimento micelial nos diferentes ambientes. A maior adaptabilidade foi da população de Tocantins, seguida por Mato Grosso e Maranhão (Tabela 4 e Figura 1). A produção de escleródios foi inibida sob condições de estresse. Apenas à temperatura de 25°C e na ausência de fungicida

houve produção de escleródios (Figura 1). A inibição da produção de escleródios sob condições de estresse provavelmente ocorreu em função da menor produção de micélio detectada, dada a necessidade de grande quantidade de micélio para que haja produção de escleródios (CARLING e SUMNER,1992).

Tabela 4. Efeito da temperatura e da concentração de oxiclreto de sobre o crescimento micelial *in vitro* de *Rhizoctonia solani* AG- 1 IA da soja.*

População	Diâmetro médio (cm.48h ⁻¹) das colônias nas concentrações de oxiclreto de cobre					
	0 g.L ⁻¹		0,42 g.L ⁻¹		0,84 g.L ⁻¹	
	25°C	33,5°C	25°C	33,5°C	25°C	33,5°C
Maranhão	7,18 b	3,12 c	2,16 b	1,48 c	0,41 b	0,73 b
Mato Grosso	7,85 a	3,88 b	2,29 b	1,93 b	0,60 a	0,82 b
Tocantins	8,00 a	5,40 a	2,85 a	2,29 a	0,61 a	1,30 a

* Médias seguidas de letra distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de *t* ($P \leq 0,0001$).

Para a análise estatística, os dados foram transformados para logaritmo ($x + 1$).

Na ausência de fungicida, a magnitude da variação da herdabilidade (h^2) para o crescimento micelial sob condição de estresse térmico foi distinta dentro de cada população. Enquanto que, para as populações de Maranhão e de Mato Grosso a h^2 diminuiu a 33,5° C sob ausência de fungicida, para a população de Tocantins houve aumento significativo da herdabilidade (Tabela 5 e Figura 2). Entretanto, em comparação com dados obtidos por WILLI et al. (2011), as medidas de herdabilidade para crescimento micelial (h^2) observadas para todas as populações de *R. solani* AG-1 IA são consideradas altas. WILLI et al. (2011), estudando a adaptabilidade de uma população de *R. solani* AG-3 da batata sob condição desfavorável de temperatura, detectaram valores similares de h^2 para crescimento micelial do patógeno sob condições de estresse, variando entre 0,6 a 0,9.

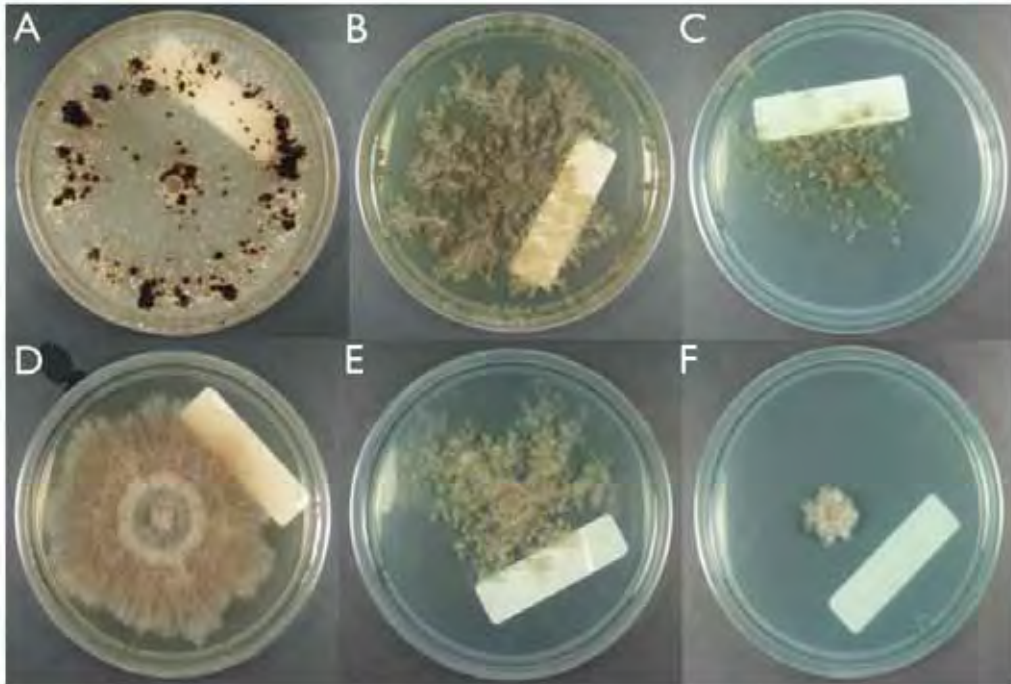


Figura 1. Características morfológicas de colônias de *Rhizoctonia solani* AG 1- IA sob efeito de temperatura (25 e 33,5°C) e concentração de oxiclóreto de cobre (0; 0,42 e 0,84 g.L⁻¹) aos dez dias de crescimento. (A) 25°C e 0,0 g.L⁻¹; (B) 25°C e 0,42 g.L⁻¹; (C) 25°C e 0,84 g.L⁻¹; (D) 33,5°C e 0,0 g.L⁻¹; (E) 33,5°C e 0,42 g.L⁻¹; (F) 33,5°C e 0,84 g.L⁻¹.

*Nota-se presença abundante de escleródios apenas em A.

Com relação aos efeitos do estresse causado pelo aumento de temperatura sobre as medidas de evolutibilidade do patógeno para tolerância ao oxiclóreto de cobre, observou-se um padrão de aumento da herdabilidade em todas as populações de *R. solani* AG- 1 IA (Tabelas 5 e 6; Figura 2). Essas observações indicaram que o aumento da temperatura causou impacto positivo na variância genotípica associada à tolerância do fungo ao oxiclóreto de cobre. Em média, a 33,5° C, houve um incremento de $0,37 \pm 0,18$ unidades na h^2 , o que representou um aumento de 1,7 (para a concentração de 0,84 g.L⁻¹ de oxiclóreto de cobre) a 2,3 vezes (para a concentração de 0,42 g.L⁻¹ de oxiclóreto de cobre) em relação à h^2 na temperatura ótima para crescimento do patógeno.

Tabela 5. Efeito da temperatura e da concentração de oxicloreto de cobre sobre os componentes de evolutibilidade para crescimento micelial em populações de *Rhizoctonia solani* AG- 1 IA da soja.

População	Componentes de evolutibilidade ¹																	
	Variância Genética (I_G) ²						Variância ambiental (I_E) ²						Herdabilidade (h^2) ²					
	Oxicloreto de cobre (g.L ⁻¹)						Oxicloreto de cobre (g.L ⁻¹)						Oxicloreto de cobre (g.L ⁻¹)					
	0		0,42		0,84		0		0,42		0,84		0		0,42		0,84	
	25°C	33,5°C	25°C	33,5°C	25°C	33,5°C	25°C	33,5°C	25°C	33,5°C	25°C	33,5°C	25°C	33,5°C	25°C	33,5°C	25°C	33,5°C
Maranhão	0,0436	0,0424	0,0616	0,2031	0,5312	0,6574	0,0079	0,0182	0,0249	0,0401	0,6975	0,1005	0,8466	0,7001	0,712	0,8350	0,4323	0,8674
Mato Grosso	0,0005	0,0315	0,0040	0,0503	0,1368	0,4268	0,0002	0,0305	0,0299	0,0124	0,4105	0,2629	0,7578	0,5083	0,1178	0,8026	0,2499	0,6188
Tocantins	0	0,0135	0,0067	0,0285	0,0456	0,0662	0	0,0108	0,0093	0,0077	0,3712	0,0987	0	0,5570	0,4163	0,7867	0,1094	0,4013

¹ Os componentes de evolutibilidade I_G , I_E e h^2 correspondem a medidas de variância genética (V_G), ambiental (V_E) e a herdabilidade (h^2) padronizadas pelo quadrado da média do crescimento no respectivo ambiente.

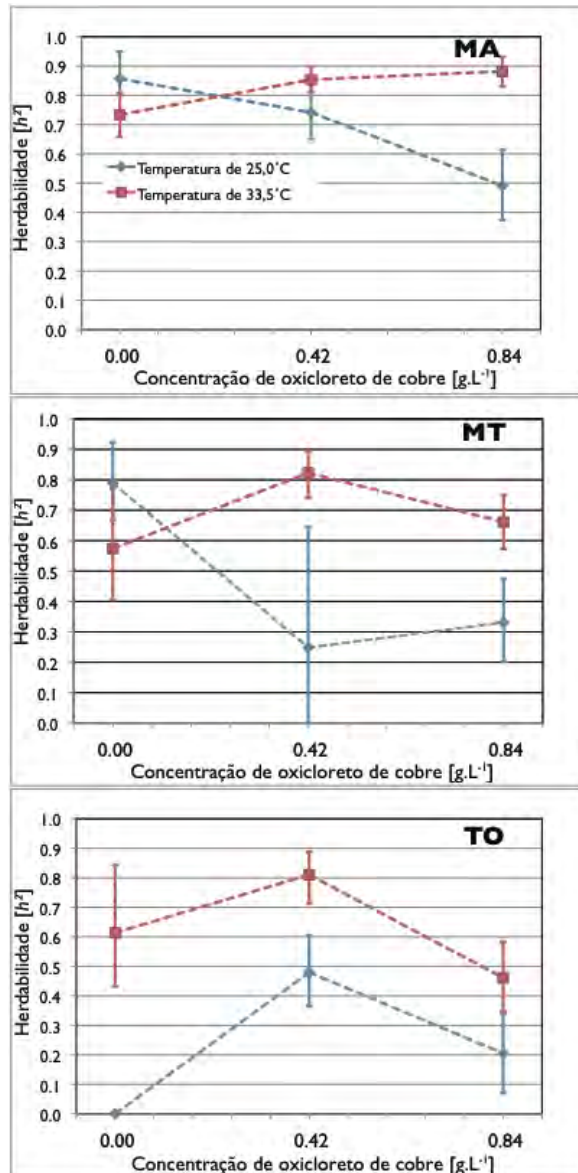


Figura 2. Herdabilidade como resposta a efeitos de temperatura e concentração de fungicida oxicloreto de cobre em populações de *Rhizoctonia solani* AG- 1 IA da soja obtidas do Maranhão (MA), do Mato Grosso (MT) e de Tocantins (TO).*

* As barras verticais indicam intervalo de confiança das estimativas a 95%, obtidos por *bootstrap* com 1.000 reamostragens dos dados.

Tabela 6. Variação nos valores de herdabilidade (h^2) nas populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA da soja em função do incremento de temperatura e da concentração de oxicloreto e cobre.

Populações	Herdabilidade (h^2)		Incremento	Desvio padrão	Magnitude do incremento (em vezes)	Desvio padrão
	Concentração de oxicloreto de cobre: 0,0 g.L ⁻¹					
	25°C	33,5°C				
Maranhão	0,847	0,700	-0,147		-0,17	
Mato Grosso	0,758	0,508	-0,250		-0,33	
Tocantins	0,100	0,557	0,457		4,57	
Média	0,568	0,588	0,020	0,382	1,356	2,785
0,42 g.L ⁻¹						
	25°C	33,5°C				
Maranhão	0,712	0,835	0,123		0,17	
Mato Grosso	0,118	0,803	0,685		5,81	
Tocantins	0,416	0,787	0,370		0,89	
Média	0,415	0,808	0,393	0,282	2,292	3,071
0,84g.L ⁻¹						
	25°C	33,5°C				
Maranhão	0,432	0,867	0,435		1,01	
Mato Grosso	0,250	0,619	0,369		1,48	
Tocantins	0,109	0,401	0,292		2,67	
Média	0,264	0,629	0,365	0,072	1,717	0,857

Mesmo com diminuição da herdabilidade para as populações de Mato Grosso e Tocantins nas condições de máximo estresse (33,5°C e concentração de 0,84 g.L⁻¹), evidenciou-se que a herdabilidade ainda assim foi maior quando comparada à observada na temperatura ideal (Tabelas 5 e 6 e Figura 2).

HOFFMANN & MERILÄ (1999) sugeriram que as mudanças na herdabilidade sob condições de estresse são difíceis de prever, porque múltiplos componentes de variância podem mudar simultaneamente além dos efeitos serem população-dependente. Contudo, sob as condições de estresse térmico deste estudo, houve aumento da variância genética para tolerância ao fungicida oxicloreto de cobre nas três populações de *R. solani* AG-1 IA da soja, com um efeito positivo sob a herdabilidade. Isto está de acordo com o primeiro grupo de hipóteses de HOFFMANN e MERILÄ (1999) que associam o aumento da herdabilidade ao mecanismo de descanalização. Sob o mecanismo de descanalização, são expressas variantes genéticas que

normalmente só se manifestam em ambientes de estresse ou pela seleção temporalmente insuficiente para remover alelos deletérios em ambientes novos e estressantes.

Verificou-se, também, a contribuição relativa entre as diferenças genéticas e a plasticidade para tolerância ao fungicida oxicloreto de cobre sob estresse de temperatura (33,5°C). A variância genética média, neste caso equivalente à herdabilidade média das três populações nas duas concentrações de fungicida ($h^2_{0,42\text{ g.L}^{-1}} = 0,81$; e $h^2_{0,84\text{ g.L}^{-1}} = 0,63$), foi responsável por 72% da variação fenotípica total para tolerância ao fungicida a 33,5°C, indicando que a contribuição média da plasticidade deve ser $\leq 28\%$. A contribuição genética foi, em média, 2,6 vezes maior que a plasticidade. Dessa forma, estes resultados indicaram que as diferenças genéticas foram os principais determinantes de adaptação para tolerância a oxicloreto de cobre sob estresse térmico em *R. solani* AG-1 IA da soja.

O grande tamanho populacional apresentado pelo patógeno, associado a um sistema reprodutivo predominantemente misto e à sua elevada gama de hospedeiros (BERNARDES DE ASSIS et al., 2008, 2009; GONZÁLEZ-VERA et al., 2010), fazem de *R. solani* AG-1 IA um patógeno com alta capacidade de adaptabilidade a estresses climático-ambientais.

Correlação entre variação genética e variação quantitativa entre populações

Comparou-se a diferenciação genética neutra entre populações (F_{ST}) com a diferenciação fenotípica por caracteres quantitativos (Q_{ST}) entre três pares de populações. A análise da estrutura genética neutra (F_{ST}) indicou subdivisão entre os três pares de populações, consistente com a divergência entre populações anteriormente detectada por CIAMPI et al. (2008). Os valores de F_{ST} par-a-par não diferiram significativamente entre si, indicando que as populações apresentaram níveis

semelhantes de subdivisão ($IC_{95\%}$ para F_{ST} (MA x MT) = 0,042 – 0,128; para F_{ST} (MA x TO) = 0,040 – 0,231 e para F_{ST} (MT x TO) = 0,030 – 0,133) (Figura 3).

O primeiro grupo de contrastes dos valores de F_{ST} e Q_{ST} entre as populações de Maranhão e Mato Grosso (MA x MT) indicou distribuição de Q_{ST} menor que a de F_{ST} para a condição de tolerância à temperatura de 33,5°C e ao fungicida oxicloreto a 0,84 g.L⁻¹ a 33,5°C. Nestes casos, a seleção estabilizadora deve ter restringido a diferenciação populacional em caracteres quantitativos. Os poucos casos documentados de $Q_{ST} < F_{ST}$ mostram grande diferenciação populacional em genes neutros (MERILÄ & CRNOKRAK, 2001; MCKAY & LATTA, 2002). Já para as condições de tolerância ao fungicida a 0,42 g.L⁻¹ (a 25 e a 33,5°C) e a 0,84 g.L⁻¹ a 25°C, a distribuição Q_{ST} encontrou-se dentro da distribuição F_{ST} , o que indicou tendência à neutralidade (Figura 3). Sob neutralidade, espera-se uma concordância entre a diferenciação genética para traços fenotípicos, Q_{ST} , e medidas de diversidade genética neutra, F_{ST} , (LANDE, 1992; SPTIZE, 1993). Nesta situação, segundo JARAMILLO-CORREA et al. (2001) o acúmulo de mutações neutras afetando o genoma inteiro igualmente, seguido de deriva genética, é, possivelmente, o responsável pela adaptação regional.

Para o segundo grupo de contrastes entre as populações de Maranhão e Tocantins (MA x TO) para as condições de tolerância a temperatura e tolerância ao oxicloreto de cobre a 0,42 g.L⁻¹ (a 25°C) e a 0,84 g.L⁻¹ (a 25 e a 33,5°C), observou-se a distribuição Q_{ST} dentro da distribuição de F_{ST} , o que indicou tendência à neutralidade. Já para a condição de tolerância ao fungicida a 0,42 g.L⁻¹ (a 33,5°C), Q_{ST} foi menor que F_{ST} , indicando ação da seleção estabilizadora.

No terceiro par de comparações, entre as populações de Mato Grosso e Tocantins (MT x TO), para a condição de tolerância ao fungicida a 0,42 g.L⁻¹ (a 25°C) e a 0,84 g.L⁻¹ (a 33,5°C), os valores de Q_{ST} foram semelhantes ao F_{ST} indicando, também, tendência à neutralidade.

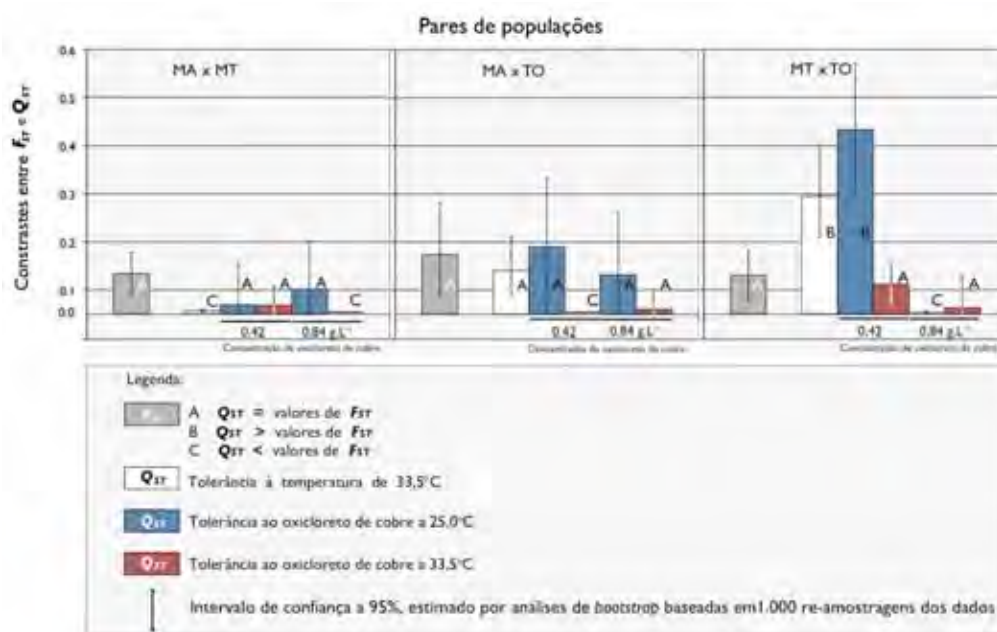


Figura 3. Contraste entre F_{ST} e valores de Q_{ST} para tolerância à temperatura de 33,5°C e tolerância ao oxicleto de cobre (a 0,42 e a 0,84 g.L⁻¹) a 25°C e a 33,5°C, entre pares de populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA da soja.*

*MA = Maranhão; MT = Mato Grosso; TO= Tocantins.

Já para tolerância à temperatura (33,5°C) e para tolerância ao oxicleto de cobre a 0,42 g.L⁻¹ (a 25°C), observou-se, de forma peculiar, distribuição Q_{ST} maior do que a distribuição F_{ST} (Figura 3). Esta observação dá suporte à hipótese de que a seleção direcional para adaptação local ou regional atuou na divergência entre essas duas populações. Neste caso, pleiotropia antagônica poderia ter atuado como mecanismo responsável pela divergência das populações por adaptação térmica (FRY et al., 1996; COOPER et al., 2001; ANGILLETTA et al., 2003)..

Embora estas tenham sido as únicas observações de Q_{ST} superior a F_{ST} no presente trabalho, este tem sido um padrão comum relatado na literatura. A ocorrência comum de seleção direcional (Q_{ST} superior a F_{ST}) foi relatada por MERILÄ e CRNOKRAK (2001) em uma extensa revisão de dezoito trabalhos já publicados comparando Q_{ST} s (de caracteres morfológicos, de história de vida ou da mistura dos dois tipos de caracteres, em plantas e vertebrados e invertebrados) com dados de F_{ST} (baseados em aloenzimas, marcadores microssatélites, DNA ribossomal, DNA mitocondrial, loci RAPD e RFLP) e por MCKAY e LATTA (2002) em pesquisa sob variação hereditária de características adaptáveis com vinte e nove espécies vegetais. Em estudo pioneiro para fungos fitopatogênicos, ZHAN et al. (2005) também detectaram correlações positivas e significativas entre as medidas de variação genética de caracteres quantitativos (Q_{ST}) e marcadores moleculares (F_{ST}) para o fungo *M. graminicola*. Mais recentemente, ZHAN e MCDONALD (2011) relataram, para populações de *M. graminicola*, correlação positiva entre medidas de variação genética de caracteres quantitativos (Q_{ST}) para sensibilidade à temperatura, tendo detectado seleção direcional para adaptação térmica em cinco populações (cerca de 140 isolados) do fitopatógeno.

A divergência entre as populações de Mato Grosso e Tocantins quanto à tolerância à temperatura de estresse ($Q_{ST} = 0,25$) ao fungicida cúprico a 25°C ($Q_{ST} = 0,38$) pode ter resultado tanto do efeito da seleção natural atuando sobre a variação genética pré-existente (já que as duas populações apresentaram comportamento diferente nessas condições (Figura 2), quanto de novas mutações que surgiram

independentes em cada população. A adaptação regional para essas populações se deve, provavelmente, ao efeito do isolamento geográfico entre elas, já que a diferenciação genética observada entre as duas populações ($F_{ST} = 0,081$) é considerado um requisito para adaptação local ou regional segundo VENABLE (1984) e LAZZARO et al. (2008).

Por sua vez, de forma geral, a maior parte das distribuições Q_{ST} estimadas neste estudo (9 em 15 comparações), não diferiram de F_{ST} , tendendo à neutralidade. Estes resultados estão de acordo com a hipótese H_0 levantada neste estudo, onde caracteres associados à resposta às condições ambientais (como a tolerância ao estresse térmico e para tolerância ao fungicida oxicloreto de cobre sob condições de estresse térmico) nas populações de *R. solani* AG-1 IA não exibem evidências de seleção direcional para adaptação regional, i.e. $Q_{ST} = F_{ST}$. O fato de não haver diferença significativa entre F_{ST} e Q_{ST} não indica, necessariamente, ausência de seleção, mas, possivelmente, que os efeitos da seleção são indistinguíveis daqueles causados por deriva em um determinado caráter (MERILÄ e CRNOKRAK, 2001).

Estas conclusões devem ser interpretadas dentro de limites, considerando o número reduzido de populações que se analisou nesse estudo. Segundo O'HARA e MERILÄ (2005), estimativas de Q_{ST} são intrinsecamente enviesadas e sua precisão para os conjuntos de dados tipicamente analisados (< 20 populações) é baixa.

V. CONCLUSÕES

As medidas de herdabilidade para crescimento micelial (h^2) observadas para todas as populações de *R. solani* AG-1 IA foram consideradas altas.

Sob condições de estresse térmico houve aumento da variância genética para tolerância ao fungicida oxicloreto de cobre nas três populações, com efeito positivo sob a herdabilidade.

As diferenças genéticas foram os principais determinantes da tolerância ao oxiclreto de cobre sob estresse térmico em *R. solani* AG-1 IA da soja.

A maior parte das distribuições Q_{ST} estimadas não diferiram de F_{ST} , indicando neutralidade para divergência populacional quanto à tolerância à temperatura e à tolerância a oxiclreto de cobre sob estresse térmico.

VI. REFERÊNCIAS

ANGILLETTA JR, M. J.; WILSON, R. S.; NAVAS, C. A.; JAMES, R. S. Tradeoffs and the evolution of thermal reaction norms. **Trends in Ecology and Evolution**, v.18, p.234–240, 2003.

BERNARDES DE ASSIS, J.; PEYER, P.; RUSH, M.C.; ZALA, M.; MCDONALD, B.A.; CERESINI, P.C. Divergence between sympatric rice- and soybean infecting populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA. **Phytopathology**, v.98, p.1326-1333, 2008.

BERNARDES DE ASSIS, J.; STORARI, M.; ZALA, M.; WANG, W.; JIANG, D.; SHIDONG, L.; JIN, M.; MCDONALD, B.A.; CERESINI, P.C. Population genetics of the rice-infecting pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from China. **Phytopathology**, v.99, p.1090-1099, 2009.

CARLING, D. E.; SUMNER, D. R. *Rhizoctonia*. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1992. p.157-165.

CHARMANTIER, A.; GARANT, D. Environmental quality and evolutionary potential: lessons from wild populations. **Proceedings of the Royal Society B**, v.272, p. 1415–1425, 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* anastomosis group-1 IA from soybean in Brazil. **Phytopathology**, v.98, p.932-941, 2008.

COAKLEY, S.M.; SCHERM, H.; CHAKRABORTY, S. Climate change and plant disease management. **Annual Review of Phytopathology**, v.37, p. 399-426, 1999.

COOPER, V. S.; BENNETT, A. F.; LENSKI, R. E. Evolution of thermal dependence of growth rate of *Escherichia coli* populations during 20,000 generations in a constant environment. **Evolution**, v.55, p.889–896, 2001.

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**, v.33, p.129-136, 2007.

DAVIS, M.B.; SHAW, R.G. Range shifts and adaptive responses to quaternary climate change. **Science**, v.292, p.673-679, 2001.

DYBDAHL, M. F.; KANE, S. L. Adaptation vs. phenotypic plasticity in the success of a clonal invader. **Ecology**, v.86, p.1592–1601, 2005.

EDELAAR, P.; BJÖRKLUND, M. If F_{ST} does not measure neutral genetic differentiation, then comparing it with Q_{ST} is misleading. Or is it? **Molecular Ecology**, v.20, p.1805-1812, 2011.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews**, v.5, p.435-445, 2004.

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

FISHEL, F. M. **Fungicide Resistance Action Committee's (FRAC) classification scheme of fungicides according to mode of action**. Gainesville: University of Florida, 2006, 9 p. (Publication #PI-94).

FRY, J. D.; HEINSOHN, S. L.; MACKAY, T. F. C. The contribution of new mutations to genotypes–environment interaction for fitness in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**, v.50, p.2316–2327, 1996.

FUTUYAMA, D. J.; MORENO, G. The evolution of ecological specialization. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.19, p.207–233, 1988.

FUTUYAMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2. Ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 646p, 1992.

GHINI, R. **Mudanças climáticas globais e doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005. 104p.

GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. Climate change and plant diseases. **Scientia Agricola**, v.65, p. 98-107, 2008.

GODOY, C. V. **Ensaio em rede para controle de doenças na cultura da soja. Safra 2004/2005**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. p.27-30. (Documentos 266)

GONZÁLEZ-VERA, A.D.; BERNARDES DE ASSIS, J.; ZALA, M.; MCDONALD, B.A.; CORREA-VICTORIA, F.; GRATEROL-MATUTE, E.J.; CERESINI, P.C. Divergence between sympatric rice and maize-infecting populations of *Rhizoctonia solani* AG 1 IA from Latin America. **Phytopathology**, v.100, p.172-182, 2010.

GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, v.86, p.485-486, 1995.

GUNTER, L. E.; TUSKAN, G.A.; GUNDERSON, C.A.; NORBY, R.J. Genetic variation and spatial structure in sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) and implications for

predicted global-scale environmental change. **Global Change Biology**, v.6, p.335-344, 2000.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of Population Genetics**. 3. Ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1997. 542 p.

HANSEN, J.; SATO, M.; RUEDY, R.; LO, K.; LEA, D.W.; MEDINA-ELIZADE, M. Global temperature change. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, p.14288-14293, 2006.

HOFFMANN, A. A.; PARSONS, P. A. **Evolutionary Genetics and Environmental Stress**. Oxford: Oxford University Press, 1991. 248p.

HOFFMANN, A. A.; MERILÄ J. Heritable variation and evolution under favourable and unfavourable conditions. **Trends in Ecology and Evolution**, v.14, p. 96–101, 1999.

HOULE, D. Comparing evolvability and variability of quantitative traits. **Genetics**, v.130, p.195–204, 1992.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press, 2007. 996 p.

JARAMILLO-CORREA, J. P.; BEAULIEU, J.; BOUSQUET, J. Contrasting evolutionary forces driving population structure at expressed sequence tag polymorphisms, allozymes and quantitative traits in White spruce. **Molecular Ecology**, v. 10, p.2729--2740, 2001.

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

KNIES, J. L.; IZEM, R.; SUPLER, K. L.; KINGSOLVER, J. G.; BURCH, C. L. The genetic basis of thermal reaction norm evolution in lab and natural phage populations. **PLoS Biology**, v.4, e201, 2006.

LANDE, R. A quantitative genetic theory of life history evolution. **Ecology**, v.63, p.607–615, 1982.

LANDE, R. Neutral theory of quantitative genetic variance in an island model with local extinction and colonization. **Evolution**, v.46, p.381-389, 1992.

LAZZARO, B. P.; FLORES, H. A.; LORIGAN, J. G.; YOURTH, C. P. Genotype-by-environment interactions and adaptation to local temperature affect immunity and fecundity in *Drosophila melanogaster*. **PLoS Pathogens**, v.4, e1000025, 2008.

LIPP, E. K.; HUQ, A.; COLWELL, R. R. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.4, p.757-770, 2002.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 349-379, 2002.

MCKAY, J. K.; LATTA, R. G. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. **Trends in Ecology and Evolution**, v.17, n.6, p.285-291, 2002.

MERILÄ, J.; CRNOKRAK, P. Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. **Journal of Evolutionary Biology**, v.14, p.892–903, 2001.

MEYER, M.C.; BUENO, C.J.; 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**, v.25, p.848-854, 2006.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.70, p.3321–3323, 1973.

O'HARA, R. B.; MERILÄ, J. Bias and precision in Q_{ST} estimates: Problems and some solutions. **Genetics**, v.171, p.1331-1339, 2005.

PASCUAL, C. B.; HYAKUMACHI, M. Distribution of vegetatively compatible populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA in a field planted with different host species. **Journal of General Plant Pathology**, v.66, p.206-209, 2000.

PERDOMO, R.; HERNÁNDEZ, A.; GONZÁLES, A.; PINEDA, J.; ALEZONES, J. Caracterización y evaluación de virulencia en aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kuhn, causante de la mancha bandeada en maíz. **Interciencia**, v.32, p.48-55, 2007.

ROSE, M.; CHARLESWORTH, B. A test of evolutionary theories of senescence. **Nature**, v.287, p.141–142, 1980.

SAS INSTITUTE. **SAS OnlineDoc**, Version 9.1.3. Cary, NC: SAS Institute, 2008.

SAVARY, S.; WILLOCQUET, L.; ELAZEGUI, F.A.; CASTILLA, N.P.; TENG, P. S. Rice pest constraints in tropical Asia: Characterization of injury profiles in relation to production situations. **Plant Disease**, v.84, p.341-56, 2000.

SCHLICHTING, C.D. Hidden reaction norms, cryptic genetic variation, and evolvability. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1133, p. 187–203, 2008.

SGRO, C. M.; PARTRIDGE, L. A delayed wave of death from reproduction in *Drosophila*. **Science**, v.286, p.2521–2524, 1999.

STODDART, J. A.; TAYLOR, J. F. Genotype diversity: estimation and prediction in samples. **Genetics**, v.118, p.705–711, 1998.

VENABLE, D. L. Using intraspecific variation to study the ecological significance and evolution of plant life histories. In: DIRZO, R. e SARUKHAN, J. (Ed.). **Perspectives in Plant Population Ecology**. Sunderland, MD: Sinauer Associates, 1984. p.213–228.

WILLI, Y.; FRANK, A.; HEINZELMANN, R.; KALIN, A.; SPALINGER, L.; CERESINI, P. C. The adaptive potential of a plant pathogenic fungus, *Rhizoctonia solani* AG-3, under heat and fungicide stress. **Genetica**, v.139, p.903-908, 2011.

YAMORI, W.; NOGUCHI, K.; HIKOSAKA, K.; TERASHIMA, I. Phenotypic plasticity in photosynthetic temperature acclimation among crop species with different cold tolerances. **Plant Physiology**, v.152, p.388–399, 2010.

YOSHIDA, Y.; HONJO, M.; KITAMOTO, N.; OHSAWA, R. Genetic variation and differentiation of floral morphology in wild *Primula sieboldii* evaluated by image analysis data and SSR markers. **Breeding Science**, v.58, p.301-307, 2008.

ZALA, M.; MCDONALD, B. A.; BERNARDES DE ASSIS, J.; CIAMPI, M. B., STORARI, M.; PEYER, P.; CERESINI, P. C. Highly polymorphic microsatellite loci in the maize- and rice-infecting fungal pathogen *Rhizoctonia solani* anastomosis group 1 IA. **Molecular Ecology Resources**, v.8, p.686-689, 2008.

ZHAN, J.; LINDE, C. C.; JÜRGENS, T.; MERZ, U.; STEINEBRUNNER, F.; MCDONALD, B. A. Variation for neutral markers is correlated with variation for quantitative traits in the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. **Molecular Ecology**, v.14, p.2683-2693, 2005.

ZHAN, J.; MCDONALD, B. A.; Thermal adaptation in the fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Molecular Ecology**, v.20, p.1689-1701, 2011."