

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
CURSO DE AGRONOMIA



**Mancha areolada da seringueira (*Hevea brasiliensis*) na
Amazônia: evolução do patógeno (*Thanatephorus
cucumeris* / *Rhizoctonia solani* grupo de anastomose AG 2-
2 Hb) num patossistema tropical.**

Eng^o Agr^o Marco Antonio Basseto

Orientador: Prof^o. Dr^o. Paulo Cezar Ceresini
Co-orientador: Prof^o. Dr^o. Alcebíades Ribeiro de Campos

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sistemas de Produção.

ILHA SOLTEIRA - SP
JULHO/2006



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Mancha areolada da seringueira (*Hevea brasiliensis*) na Amazônia: evolução do patógeno (*Thanatephorus cucumeris* / *Rhizoctonia solani* grupo de anastomose AG 2-2 Hb) num patossistema tropical

AUTOR: MARCO ANTONIO BASSETO
ORIENTADOR: Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em AGRONOMIA pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI
Departamento de Fitossanidade Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. CESAR JUNIOR BUENO
Pesquisador Científico, APTA Regional Extremo Oeste - Araçatuba/SP

Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO
Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu

Data da realização: 13 de junho de 2006,

Presidente da Comissão Examinadora
Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI

Aos meus pais, *Antonio Pedro Basseto* e *Neide Pereira Basseto*, que me educaram e deram a oportunidade para esta conquista, cujo exemplo de vida foi e sempre será de fundamental importância para minha formação pessoal e profissional.

DEDICO

Ao Prof. Dr. *Paulo Cezar Ceresini*, pelos ensinamentos, orientação, dedicação, paciência e companheirismo, fundamentais para a realização deste trabalho.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por sempre estar presente em minha vida, dando-me força, paciência e sabedoria nos momentos mais difíceis.

Em especial aos meus irmãos, Emerson e Tânia, e a minha cunhada Tati, que estiveram sempre presentes nesta minha trajetória, dando-me incentivos e dedicação.

Com carinho, à minha namorada Bruna, pela compreensão, paciência, companheirismo e apoio em todos os momentos.

A minha tia Maria, pelo acolhimento, amizade e incentivos, que foram de extrema importância para meu sucesso acadêmico.

A todos Docentes desta unidade de ensino, pelos ensinamentos, amizade e colaboração para minha formação profissional.

Em especial ao Prof. Dr. Alcebíades Ribeiro de Campos (Maranhão) e a Prof^ª. Dr^ª. Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva (Kitty) pela presença e auxílio nos momentos mais difíceis do curso.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP) e ao ETH ZENTRUM – Instituto Federal Suíço de Tecnologia de Zurique, na Suíça (Convênio UNESP/ETHZ) pelo auxílio financeiro para execução do trabalho de pesquisa.

À EMBRAPA (AMAZÔNIA OCIDENTAL, AMAZÔNIA ORIENTAL E ACRE) pelo auxílio logístico na amostragem das populações de *Thanatephorus* em Manaus, Belém e Rio Branco/Xapuri)

A todos amigos do curso de Pós-Graduação, em especial aos meus companheiros da República B.O.: Cristiano, Danilo, Gustavo, José Aparecido,

Marcelo e seus agregados: João Alves, Júlio, Márcia e Loraine pelos bons momentos em que passamos juntos, fundamentais ao êxito do curso.

Aos técnicos de laboratório e funcionários, Vera, José Antonio, Toninha, Ângela, Domingos, Circélia e Juarez, pelo auxílio durante o curso e desenvolvimento desta pesquisa e amizade.

Em especial as funcionárias da Seção de Pós-Graduação da FEIS-UNESP, Onilda, Fátima e Adelaide, pela paciência, ajuda e apoio durante o curso.

Às minhas ilustres e inesquecíveis companheiras de trabalho, Ana Paula e Elaine, pela ajuda e dedicação no decorrer deste trabalho.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e meu desempenho acadêmico.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Amostragem.....	23
3.2. <i>Isolamento e caracterização citomorfológica do patógeno</i>	24
3.3. <i>Extração do DNA genômico</i>	24
3.4. <i>Amplificação e sequenciamento da região ITS do rDNA</i>	25
3.5. <i>Clonagem dos produtos de PCR</i>	26
3.6. <i>Análise de dados</i>	26
3.7. <i>Análise filogenética</i>	27
3.8. <i>Evolução intraespecífica de R. solani AG 2-2, inferida por análises de reticulogramas de genes individuais</i>	27
3.9. <i>Teste de subdivisão populacional e análise de coalescência</i>	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE TABELAS

	Página
<p>Tabela 1. Haplótipos de <i>Rhizoctonia solani</i> AG 2 (dos subgrupos 2-1, 2-2 IIIB, IV e LP, e 2-3, e aqueles associados a <i>Hevea brasiliensis</i>) determinados com base em polimorfismos detectados em seqüências de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA</p>	32
<p>Tabela 2. Caracterização de haplótipos mundiais de <i>Rhizoctonia solani</i> AG 2 (subgrupos 2-1, 2-2 IIIB, IV, LP, 2-3, e aqueles associados a <i>Hevea brasiliensis</i>) de acordo com sítios polimórficos (substituições) e eventos de inserção e perda detectados em seqüências de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA.....</p>	35
<p>Tabela 3. Caracterização de haplótipos Amazônicos de <i>Rhizoctonia solani</i> AG 2-2 (subgrupo associado a <i>Hevea brasiliensis</i>) de acordo com sítios polimórficos (substituições) e eventos de inserção e perda detectados em seqüências de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA</p>	37

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Distribuição geográfica das populações de <i>Thanatephorus cucumeris</i> da mancha areolada da seringueira amostradas na Amazônia</p>	23
<p>Figura 2. Árvore filogenética ilustrando as relações filogenéticas entre haplótipos da região ITS-5.8S dos grupos AG 2-1, AG 2-2 (IIIB e IV e LP), AG 2-3 e o grupo de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> obtido de <i>Hevea brasiliensis</i> na Amazônia brasileira.....</p>	39
<p>Figura 3. Rede de haplótipos da região ITS-5.8S do rDNA de <i>Rhizoctonia solani</i> AG 2-2 (do subgrupo IV e de <i>Hevea brasiliensis</i>).....</p>	41
<p>Figura 4. Genealogia gênica coalescente com a mais alta probabilidade (verossimilhança= 1.7465×10^{-293}, desvio padrão = 0.0000) mostrando a distribuição de mutações (pontos pretos ao longo da genealogia) na região ITS-5.8S do rDNA em populações de <i>Thanatephorus cucumeris</i> (<i>Rhizotonia solani</i>) da mancha areolada da seringueira obtidas em Xapuri (AC), Belém (PA) e Manaus (AM) na região Amazônica.....</p>	44

Mancha areolada da seringueira (*Hevea brasiliensis*) na Amazônia: evolução do patógeno (*Thanatephorus cucumeris* / *Rhizoctonia solani* grupo de anastomose AG 2-2 Hb) num patossistema tropical.

RESUMO

A mancha areolada causada por *Thanatephorus cucumeris*, é uma das doenças mais importantes da seringueira (*Hevea brasiliensis*) na região Amazônica. Apesar disso, há pouca informação disponível sobre a diversidade biológica, patogênica e genética do patógeno. Uma questão importante sobre o real posicionamento filogenético deste patógeno ainda não foi respondida. Neste estudo, foram analisadas seqüências da região ITS-5.8S do rDNA de uma população de *T. cucumeris* (fase anamórfica = *Rhizoctonia solani* AG 2-2) associado à mancha areolada da seringueira, obtida em Belém (PA), Manaus (AM) e Xapuri/Rio Branco (AC). Esta população foi também comparada filogeneticamente com membros do AG 2 descritos mundialmente. Este estudo representa um passo importante para revelar a origem, os padrões de movimento e amplificação de genótipos epidemiologicamente importantes de *T. cucumeris* da seringueira. Filogeneticamente, através de análise Bayesiana e de máxima parcimônia, encontramos suporte para nomear um novo grupo de anastomose associado à mancha areolada da seringueira: o AG 2-2 Hb. Este grupo constitui-se numa unidade evolucionária independente em relação aos subgrupos mundiais do AG 2-2 analisados. Na genealogia construída por análise coalescente, observou-se que a população de *R. solani* AG 2-2 Hb, de Belém, é relativamente mais velha que as demais populações analisadas. O ancestral comum de todas as três populações analisadas está associado com a mancha foliar do maracujazeiro (*Passiflora edulis*), em Belém, e tem cerca de 0,8 unidades evolucionárias coalescentes de idade. Nenhum haplótipo da região ITS-5.8S do AG 2-2 Hb, de Belém, foi observado em outras regiões. Entretanto, a população de Manaus compartilhou dois, de seus

quatro haplótipos, com aqueles observados em Xapuri / Rio Branco, no Acre, indicando fluxo gênico e deriva genética.

Palavras chaves: *Rhizoctonia solani*, grupos de anastomose, DNA ribossomal, *Thanatephorus cucumeris*

Leaf spot of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) in the Amazon: evolution of the pathogen (*Thanatephorus cucumeris* / *Rhizoctonia solani* anastomosis group AG 2-2 Hb) in a tropical pathosystem

ABSTRACT

Thanatephorus leaf spot is one of the most important diseases of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) in the Amazon region, Brazil. However, there is little information available about the biological, pathogenic and genetic diversity of the pathogen. An important question about the actual phylogenetic placement of this pathogen is not answered yet. In this study, we analyzed sequences of the ITS-5.8S rDNA region from a population of *T. cucumeris* (anamorphase = *Rhizoctonia solani* AG 2-2) associated to the rubber tree leaf spot obtained in Belém (PA), Manaus (AM) and Xapuri/Rio Branco (AC). This population was also phylogenetically compared with members of AG 2 world-widely described. This study represents an important step to reveal the origin, the patterns of movement and amplification of epidemiologically important genotypes of rubber tree-infecting *T. cucumeris*. Phylogenetically, through both Bayesian and maximum parsimony analyses, we found support to nominate a new group of anastomosis associated with the rubber tree foliar spot: the AG 2-2 Hb. This group consisted of an independent evolutionary unit in relation to the world-wide sub-groups of AG 2-2 analyzed. In the gene genealogy built by coalescent analysis, it was observed that the population of *R. solani* AG 2-2 Hb of Belém is relatively older than the other populations analyzed. The oldest most recent common ancestor of all the three populations analyzed was associated with a sample obtained from passion-fruit (*Passiflora edulis*) leaf blight in Belém and has about 0.8 coalescent evolutionary units of age. No AG 2-2 Hb ITS-5.8S rDNA haplotype from Belém was observed in any other regions. However, the

population from Manaus shared two, of its four haplotypes, with those observed in Xapuri/Rio Branco (Acre), indicating both gene flow and genetic drift.

Keys words: *Rhizoctonia solani*, anastomosis of groups, ribosomal DNA, *Thanatephorus cucumeris*

1. INTRODUÇÃO

Sob condições naturais, *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk [fase anamórfica = *R. solani* Kuhn] é responsável por ocasionar várias doenças foliares em culturas de importância agrícola ou espécies nativas na região Amazônica do país. Entre as doenças relatadas, a mancha areolada da seringueira (DESLANDES, 1944) é uma das mais importantes para espécies da região. A infecção dessas plantas ocorre através de basidiosporos produzidos por *T. cucumeris* que podem ser disseminados rapidamente a longas distâncias (NAITO, 1996).

Em seringueira (*Hevea brasiliensis*), a mancha areolada foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1943 no Pará (DESLANDES, 1944). Já foi considerada a segunda enfermidade de maior importância econômica para a seringueira, provocando lesões foliares que evoluem para intensa desfolha em condições de viveiros, jardins clonais e plantas adultas (CONDURÚ & STEIN, 1984). Apesar de já ser conhecida há algum tempo, a doença só começou a causar danos a partir da década de 70, com o aumento das áreas de cultivo racional da seringueira na Amazônia (FERREIRA & GASPAROTTO, 1989). Prejuízos em torno de 30% na produção de látex em seringais brasileiros foram relatados nos anos 70 (CONDURÚ & STEIN, 1984)

O patógeno afeta todas as espécies de *Hevea* (DESLANDES, 1944; CARPENTER, 1950; CHEE & WASTIE, 1980). A maioria dos clones brasileiros de seringueira é considerada suscetível à mancha areolada (GASPAROTTO et al., 1982). Em um estudo feito com 70 clones orientais e 34 clones nacionais, observou-se que todos os clones foram suscetíveis ou altamente suscetíveis à mancha areolada. Entretanto, na Costa Rica, há relato de resistência em *Hevea brasiliensis* (clones FB 54 e FB 3363), *Hevea benthamiana* (clones F 4515, F 4327 e F 4542), *Hevea pauciflora* e *Hevea rigidifolia* (CARPENTER, 1951).

Apesar do *T. cucumeris* estar entre os mais importantes patógenos, infectando a cultura da seringueira na região norte do Brasil, sua etiologia não está totalmente definida, não havendo nenhuma informação concreta sobre as relações filogenéticas entre os isolados de *R. solani* AG 2 associados à seringueira e os demais membros do AG 2 descritos mundialmente (AG 2-1, AG 2-2 IIIB, IB e LP, e AG 2-3) (CARLING et al., 2001), bem como qualquer informação disponível sobre os padrões de variação genética-molecular em populações do patógeno.

Sob o ponto de vista filogenético, o primeiro objetivo deste estudo foi determinar o real posicionamento de uma população de *R. solani* AG 2 da seringueira em relação a membros do AG 2 descritos mundialmente. Para tanto, foram analisadas seqüências da região ITS-5.8S do rDNA.

Sob o ponto de vista de genética de populações de fitopatógenos, o segundo objetivo deste estudo foi descrever o nível de variação gênica na região ITS-5.8S do rDNA em *Thanatephorus*, causando a mancha areolada da seringueira. Para isto, foi explorada a diversidade genética em três populações distintas de *T. cucumeris* da região Amazônica, comparando-se os dados de seqüência do rDNA dos indivíduos amostrados. Nossa hipótese postulada é de que populações de *T. cucumeris* da seringueira desta região apresentam altos níveis de variação genética (pelo predomínio da recombinação gênica moldando a estrutura dessas populações). Pelas características epidemiológicas da mancha areolada, sendo o patógeno disseminado por basidiósporos, postulamos também que essas populações são panmíticas, e que não há barreiras ao fluxo gênico.

Acredita-se que a informação gerada por esta pesquisa é uma iniciativa pioneira de análise de aspectos da evolução molecular de populações de *Thanatephorus* em um patossistema tropical nativo do Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Evolução pode ser definida, de forma geral, como a descendência (com modificações) de diferentes populações ou espécies a partir de ancestrais comuns, ao longo das gerações. A evolução é a base da teoria Darwinista que estabelece a comunhão de origem em todos os seres vivos e a transformação das espécies como consequência da seleção natural (PAZZA, 2004).

O estudo da evolução de espécies de fungos fitopatogênicos, em particular, é muito importante para o desenvolvimento da agricultura, pois permite a compreensão das forças evolucionárias (seleção, mutação, recombinação, fluxo gênico e deriva gênica) controlando populações de fitopatógenos. A compreensão destas forças é essencial para o desenvolvimento e implementação de medidas de controle efetivas e duráveis em relação a esses organismos (MCDONALD, et al., 1989; MCDONALD & MCDERMOTT, 1993; MILGROOM & FRY, 1997). De acordo com MCDONALD (2004), “patógenos com o maior potencial evolucionário oferece o maior risco para agricultura ao vencer genes de resistência ou para neutralizar outros métodos de controle, tais como a aplicação de fungicidas”.

O primeiro passo em qualquer estudo sobre evolução de fitopatógenos é definir claramente os limites entre espécies e populações dentro de espécies. A definição de espécies para fungos é muito complexa. Os conceitos mais discutidos de espécies são três: a) espécie morfológica, onde os organismos são agrupados de acordo com suas características morfológicas; b) espécie biológica, que se baseia principalmente na capacidade dos indivíduos se cruzarem naturalmente; e c) espécie filogenética, que se define de acordo com as relações de ancestralidade entre os organismos (MAYDEN, 1997). Em fungos, o conceito filogenético tem se mostrado mais eficaz e por isso vem sendo mais usado no processo de identificação de espécies (TAYLOR et al., 2000).

De acordo com ANDERSON & KOHN (1998), para fungos fitopatogênicos, espécie pode ser definida, de maneira geral, pelo conjunto de populações naturais de indivíduos capazes de ocasionar determinada doença em um hospedeiro, que partilham o mesmo código gênico e têm habilidade de se cruzarem e se reproduzirem sexualmente, sob condições naturais, originando indivíduos férteis. O isolamento reprodutivo em relação a outros grupos de indivíduos é indicativo de divergências genéticas e pode significar início de especiação ou mesmo que a especiação já ocorreu (METTLER & GREGG, 1973).

Populações de fungos, por sua vez, podem ser definidas como o conjunto de indivíduos de uma mesma espécie, que habitam uma determinada área geográfica, se reproduzem sexuadamente, cruzando-se entre si, mas biologicamente podem reproduzir-se com todos os membros da espécie podendo incorrer em variabilidade dentro da espécie (TAYLOR et. al., 2000). A definição correta dos limites entre espécies e populações de indivíduos da mesma espécie é um pré-requisito básico para se estabelecer estratégias de controle, principalmente em relação à resistência varietal de plantas a determinados fitopatógenos (MILGROOM & FRY, 1997).

O estudo que descreve os limites genéticos, a origem ancestral e a evolução das espécies é denominado Filogenia. Sua tarefa principal é determinar os relacionamentos ancestrais entre espécies conhecidas (AMORIM, 2002). Uma análise filogenética consiste em estimar as relações de ancestralidade para um determinado número de táxons (MATIOLI, 2001). A ancestralidade nada mais é do que a busca por um ancestral, ou seja, a busca de um organismo a partir do qual se originou um outro organismo ou grupos de organismos (táxons). Os táxons ou taxa, por sua vez, correspondem a um conjunto de organismos com características semelhantes entre si, pertencentes a um mesmo grupo taxonômico (reino, filo, classe, ordem, família, gênero ou espécie) (MATIOLI, 2001).

Classicamente, os métodos utilizados na identificação de espécies de fungos têm se baseado, predominantemente, nas observações das características morfológicas, tanto da fase assexual (através do crescimento, coloração e textura superficial da colônia e características das hifas) como da fase sexual, através das características completas do corpo de frutificação (DAY et al., 1979). No entanto, apenas estes caracteres não são suficientes para definir seguramente a identidade do organismo, devido a grande variação fenotípica (possivelmente associada à variação genética) que é muito comum entre e dentro de espécies de fungos. Isto dificulta a distinção de espécie de fungos (MURPHY et al., 1996).

Atualmente, marcadores moleculares têm auxiliado na identificação e classificação de alguns fungos, reduzindo as convergências detectadas quando somente se faz uso de características morfológicas (WILLIAMS et. al., 1990). Os marcadores moleculares permitem o estudo dos polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma e, por serem independentes dos efeitos ambientais e do estágio fisiológico do fungo, permitem uma identificação precisa e precoce dos genótipos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores mais usados para identificação de fungos são as izoenzimas, RFLPs (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição), AFLPs (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Amplificados) e os microssatélites, pois são de fácil execução e geram informações detalhadas do genoma do organismo, permitindo a comparação entre as espécies correlacionadas.

Entretanto, os marcadores acima citados não podem ser utilizados para se traçar a linha de descendência entre espécies, pois não carregam (ou carregam muito pouca) informação evolutiva. Para análises filogenéticas necessita-se obter informação sobre a composição de bases do DNA de regiões gênicas conservadas (que provavelmente não estão sujeitas ao efeito de pressão de seleção), uma vez que os processos evolutivos buscam

representar padrões de variação genética em sítios específicos ao longo dos genes, numa escala de tempo (AVISE, 1994).

Com base em análises filogenéticas, pode-se refinar a caracterização de espécie para fungos, incluindo o conceito de espécie filogenética. Uma espécie filogenética pode ser definida como grupos de indivíduos que compartilham histórias evolutivas semelhantes, partindo de um ancestral comum (AMORIM, 2002; TAYLOR et. al., 2000). Este conceito permite agrupar esses indivíduos em espécies, com base não apenas em caracteres morfológicos, mas também de acordo com a relação evolutiva entre eles, e isto é possível através do uso de marcadores moleculares (sequências gênicas) responsáveis por gerar os dados para as análises filogenéticas (WILLIAMS et. al., 1990).

As análises filogenéticas são representadas através da construção de árvores filogenéticas (MIYAKI et al., 2001). As árvores filogenéticas são representações gráficas em forma de árvore, onde os táxons são posicionados em ordem filogenética, ou seja, ordenados de acordo com suas relações de parentesco (ROSENBERG & NORDBORG, 2002). Uma árvore filogenética representa a história evolutiva dos organismos presentes nela, apresentada graficamente por pontos (nós) ligados por linhas (ramos), podendo ainda ser enraizadas, quando aponta para uma espécie ancestral de todo um grupo em estudo, ou não enraizada, mostrando apenas as relações entre as unidades taxonômicas (MIYAKI et al., 2001).

Para a obtenção das árvores filogenéticas, utilizando determinadas regiões sequenciadas do DNA, faz-se necessário a escolha de algoritmos baseados em métodos que escolhem a melhor árvore dentre um conjunto delas (MIYAKI et al., 2001). Um dos métodos utilizados na escolha da melhor árvore é o método da máxima parcimônia. Esse método se baseia no princípio de que a melhor árvore filogenética é a árvore mais simples, ou seja, a que possui um menor número de passos (ramos), enfatizando o que é compartilhado entre haplótipos que diferem minimamente, permitindo uma avaliação empírica dos desvios da

parcimônia, com embasamento estatístico (POSADA & CRANDALL, 2001). Haplótipos são cada uma das várias formas alternativas do mesmo gene, ocupando um dado locus (posição num cromossomo). Um haplótipo representa uma seqüência gênica particular de um determinado marcador genético utilizado para se fazer as inferências filogenéticas (ROSENBERG & NORDBORG, 2002).

Outro método utilizado na escolha de árvores filogenéticas é o método da máxima verossimilhança (PEREIRA et. al., 2001). Esse método se baseia em avaliar a probabilidade de que um determinado modelo de mudanças evolutivas possa explicar a origem dos dados observados, requerendo um modelo probabilístico de evolução de caracteres que pode levar em conta parâmetros como a taxa de substituição entre pares de nucleotídeos em uma seqüência de DNA (NEI & KUMAR, 2000).

O método estatístico mais moderno para o estudo das relações filogenéticas é baseado no modelo de análise Bayesiana que utiliza o método de Monte Carlo - Cadeia de Markov, conjugado ao algoritmo de Metropolis (MCMCMC) (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001). Os métodos Bayesianos dirigem-se à incerteza filogenética calculando a média de inferências e as estimativas dos parâmetros sobre todas as filogenias possíveis. Baseado em parâmetros determinados a priori (como a frequência total de bases do DNA dentro da espécie, razão entre taxas de transições/transversões, modelos de substituição de bases), busca a árvore mais provável. No entanto, estes parâmetros estão modelados como distribuições da probabilidade e estimados usando a probabilidade posterior máxima (HUELSENBECK et. al., 2000). Dessa forma, pode-se observar se a árvore estimada é a árvore verdadeira sob um modelo evolucionário particular.

Além da importância da filogenia na identificação e classificação de espécies de fungos fitopatogênicos, deve-se preocupar com a caracterização do nível de variação genética

dentro e entre populações de uma mesma espécie, através de análises denominadas intraespecíficas.

O ramo de estudo que se preocupa em estudar as relações intra-específicas entre as populações é chamado de Filogeografia (AVISE, 2000). Esse ramo é definido em um sentido restrito como a análise espacial de populações, sendo importante, principalmente no que diz respeito à identificação de variabilidade dentro das populações de patógenos e a distribuição dos mesmos pelos diversos locais. Estas informações podem ser muito importantes em programas de melhoramento de plantas para resistência a fitopatógenos, bem como no estabelecimento de barreiras impedindo a dispersão destes organismos para novas áreas.

A Filogeografia é uma disciplina situada entre a sistemática biológica e a genética de populações (AVISE et al., 1987). A sistemática biológica diz respeito à classificação dos diversos organismos vivos a fim de definir o modo como eles se relacionam evolucionariamente. Já a genética de populações é o estudo da estrutura das populações e dos processos evolucionários que afeta o seu modelo de estrutura (CARBONE & KOHN, 2004).

As análises filogeográficas levam em conta vários processos evolucionários que ocorrem com a população como seleção, mutação, recombinação, fluxo gênico e deriva gênica (AVISE, 2000). A seleção é o processo essencial da evolução, e é tido como a melhor explicação para a adaptação e especialização de uma população ou grupo de indivíduos a uma dada condição, como no caso de alterações ambientais; a mutação é fonte fundamental da variação biológica sendo vista como uma modificação casual ou induzida na informação genética; a recombinação é um processo de troca de material genético de um indivíduo com outro formando uma nova combinação distinta, sexualmente ou por transferência horizontal; o fluxo gênico, também conhecido como migração, é a transferência de genes (partes do DNA que carregam informações genéticas) de uma população para outra; e por fim, a deriva gênica é um processo atuante sobre as populações, que modifica a frequência dos alelos ou

haplótipos e a predominância de certas características na população (CARBONE & KOHN, 2004).

Existem alguns métodos que buscam inferir sobre a análise populacional de fitopatógenos. Entre os métodos, merece destaque o método de análise coalescente. Este método é uma aproximação matemática (modelo) da estrutura ancestral real de uma população. Na análise coalescente, o processo genealógico é simulado muitas vezes e estas simulações fornecem estimativas simultâneas de parâmetros da população permitindo uma análise da probabilidade dos modelos evolucionários (CARBONE & KOHN, 2001). Este método procura explicar matematicamente, com base estatística, todos os processos (seleção, recombinação, mutação, deriva gênica e fluxo gênico) a nível de população, partindo de uma população atual para uma população ancestral, dentro de uma árvore filogenética (HUDSON, 1990).

Estes estudos só foram possíveis graças ao desenvolvimento das técnicas moleculares e ao advento de marcadores baseados em seqüências gênicas, mas principalmente ao desenvolvimento de algoritmos estatísticos apropriados (ANDERSON & KOHN, 1998). A partir destes estudos pode-se inferir sobre questões importante referentes a estruturas das populações de fitopatógenos, como a sua classificação dentro da espécie, sua origem, sua taxa de mutação e seu grau de dispersão.

Para o complexo gênero *Rhizoctonia* composto por espécies multinucleadas (*R. solani*) e binucleadas (*Rhizoctonia* spp.) (SNEH et al., 1996), a grande contribuição ao estudo da evolução do patógeno tem sido na área filogenética (GONZALES et al., 2001). Entretanto, há pouca ou quase nenhuma informação que permita delinear os limites entre populações que constituem os grupos de anastomose distintos (definidos em termos de espécies filogenéticas). A análise de seqüências das unidades transcricionais/genes 18S, 28S e 5.8S e dos espaços internos transcritos (ITS) do cistron rDNA têm sido usada para inferir relações

taxonômicas e filogenéticas entre os diferentes AGs de *R. solani* e *Rhizoctonia* spp. (KUNINAGA & YOKOSAWA, 1982; KUNINAGA et al., 1997; GONZALES et al., 2001).

Através de métodos filogenéticos, a análise da variação na seqüência de DNA possibilita inferir sobre a história dos alelos ou haplótipos. Conhecendo a história filogenética dos alelos em um locus entre grupos da população, é possível separar os eventos demográficos do passado (como o efeito fundador) daqueles afetando populações de forma recorrente, como os resultantes do equilíbrio entre deriva genética/fluxo gênico (NEIGEL, 1997; TEMPLETON, 1998).

Até o momento, as únicas contribuições que buscaram compreender como as populações de *R. solani* se estruturam geneticamente como evoluem/evoluíram em patossistemas tropicais, foi realizadas por ROSEWICH et. al. (1999), LINDE et. al. (2005) e CIAMPI et. al. (2005) que estudaram o patossistema *R. solani* AG-1 IA– queima da bainha do arroz/mela da soja no Texas, na Índia e no Centro-oeste/Norte do Brasil, respectivamente.

Dessa forma, o trabalho busca oferecer uma contribuição à compreensão da filogeografia de *Thanatephorus cucumeris* (fase teliomórfica de *R. solani* AG 2-2), patógeno causador da mancha areolada da seringueira (*Hevea brasiliensis*) em um patossistema tropical na Amazônia brasileira.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Amostragem.* Para o estudo sobre estrutura genética de populações de *T. cucumeris* da seringueira (cuja anamorfase é *R. solani* AG-2-2), a amostragem de isolados foi efetuada nos municípios de Rio Branco/Xapuri, no Acre; Manaus, no Amazonas; e Belém, no Pará; em janeiro de 2005. Foram definidas três populações do patógeno: uma **central**, Manaus (*B*), e duas **marginais**, Rio Branco (*A*), e Belém (*C*), geograficamente separadas entre si. A Figura 1 abaixo indica os pontos de coleta das populações de *T. cucumeris* da mancha areolada da seringueira para este estudo.



Figura 1. Distribuição geográfica das populações de *Thanatephorus cucumeris* da mancha areolada da seringueira amostradas na Amazônia.

Obteve-se 144 isolados de *T. cucumeris* da seringueira e dois de maracujazeiro amostrando-se 33 plantas infectadas em Xapuri/Rio Branco (11 ° 01.777' S , 68 ° 43.923' O), 68 em Manaus (02 ° 53.461' S, 59 ° 58.491' O) e 45 em Belém do Pará (01° 26.414' S, 48 ° 26.766' O), distribuídas casualmente dentro de cada área. As coordenadas geográficas indicativas da posição relativa de cada amostra populacional foram determinadas com auxílio de um equipamento de GPS (“Global Positioning System”) marca Garmin, modelo 12 MAP.

3.2. Isolamento e caracterização citomorfológica do patógeno. Para o isolamento do patógeno, fragmentos de lesões foliares foram inicialmente desinfestadas pela imersão em solução de álcool 70%, hipoclorito de sódio a 1% e lavados duas vezes em água destilada e esterelizada. Após este procedimento, os tecidos vegetais foram transferidos para placas de Petri, contendo meio de cultura ágar-água (AA) alcalino, pH 8,5 (GUTIERREZ et al., 1998) e mantidos a 25°C na ausência de luz por 24 horas. Amostras de colônias que apresentaram crescimento micelial característicos de *R. solani* foram repicadas novamente para o meio de cultura ágar-água (AA) alcalino e posteriormente para o meio de batata-dextrose-ágar (BDA) (TUIITE, 1969). Os isolados obtidos de plantas de seringueira foram preservados em grãos de arroz parboilizado, segundo metodologia modificada de SNEH & ADAMS (1996) e SNEH et al. (1991) e mantidos a uma temperatura de -20°C.

3.3 Extração do DNA genômico. De cada isolado de *T. cucumeris* foi produzido micélio em 25 mL de PDB (caldo de batata dextrose) contendo 50 µg de kanamicina/mL . As culturas foram incubadas em 25°C, com agitação. O micélio foi coletado após cinco dias de incubação, sendo então congelado e liofilizado. O DNA total foi extraído do tecido micelial liofilizado utilizando-se *DNeasy Plant Mini Extraction Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com recomendação do fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado em um fluorômetro

(TBS-380 Mini-Fluorometer) usando reagente PicoGreen[®] (Topac Inc., Hingham, MA) e em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio.

3.4. Amplificação e sequenciamento da região ITS do rDNA. Procedeu-se a reações de polimerase em cadeia (PCR) para a amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal (rDNA) utilizando condições semelhantes às descritas por GONZALES et al. (2001) Amplificações foram efetuadas usando-se o conjunto de iniciadores (“primers”) ITS4/ITS5 (WHITE et al., 1990). As amplificações (20 µL) foram efetuadas utilizando-se 20 ng de DNA genômico, MgCl₂ a 1,5 mM, 0,5 U de *Taq* polymerase (Gibco Life Technologies), 0,2 mM de cada um dos dNTPs, KCl a 50 mM, Tris-HCl a 10 mM, e 0,2 µM de cada iniciador. Uma alíquota de 5 µL de água milliQ foi utilizada como controle negativo ao invés do DNA alvo. O programa de amplificação em termociclador compreendeu o seguinte ciclo: dois min a 94°C, ciclo inicial de desnaturação; um min a 94°C, um min a 55°C, dois min a 72°C, 35 ciclos; cinco min a 72°C, um ciclo. Os produtos da amplificação da região ITS do rDNA foram visualizados em transiluminador de UV após eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE e coloração com brometo de etídio (SAMBROOK et al., 1987). Cada produto de PCR foi purificado utilizando-se colunas MicroSpin S-400 HR (Amersham Pharmacia), de acordo com instruções do fabricante.

No seqüenciamento do operon ITS1-5.8S-ITS2 rDNA amplificado foi utilizado kit pré-misturado para ciclo de seqüenciamento baseado em química de corante terminador (“Big-Dye[™] Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction”) (Applied Biosystems). Cerca de 75ng de DNA amplificado foram utilizados por reação e um µM de cada um dos iniciadores ITS4 ou ITS5 em reações independentes para assegurar confiabilidade dos dados de seqüenciamento dos fragmentos. Os produtos de seqüenciamento foram separados em gel de poliacrilamida a 6% utilizando-se seqüenciador automático capilar PE Applied Biosystems

ABI-3100. As seqüências obtidas foram analisadas pelo programa Sequencher™ 4.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, EUA) para avaliação da qualidade e montagem de *contigs* dos fragmentos, e alinhadas pelo programa computacional “ClustalX” (THOMPSON et al., 1997).

3.5. Clonagem dos produtos de PCR. Dada à condição predominante de heterocário no ciclo de vida de *T. cucumeris* (*R. solani*) é comum observar-se heterogeneidade nas seqüências de DNA em produtos de PCR não clonados. Para separar diferentes alelos no operon ITS1-5.8S-ITS2 dentro de uma reação heterogênea de PCR, os amplicons/produtos da amplificação foram clonados dentro de um vetor PCR2.1-TOPO® (Invitrogen, San Diego). Plasmídeos selecionados de *Escherichia coli* One Shot® DH5a™-T1R recombinantes (Invitrogen, San Diego) foram extraídos de cada amostra, e purificados por QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN®). Foram usados *primers* iniciadores universal e reverso, para um dos múltiplos sítios de clonagem do vetor, visando reamplificar e seqüenciar os clones obtidos.

3.6. Análise de dados. Inicialmente, para confirmar que o grupamento de anastomose dos isolados de *T. cucumeris* (anamorfase *R. solani*) da seringueira pertencem ao AG 2-2, as seqüências obtidas foram comparadas com seqüências da região ITS do rDNA dos grupos de anastomose AG 2-1, AG 2-2 (IIIB, IV e LP) e AG 2-3 de *R. solani* depositadas no banco de dados do NCBI/GenBank®. As comparações de similaridade entre estas seqüências foram obtidas por BLASTN (nucleotídeo-nucleotídeo) versão 2.2.6 de 09/04/2003, disponível no site [http:// www.ncbi.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nih.gov/BLAST) (ALTSCHUL et al., 1997).

3.7. *Análise filogenética.* As relações filogenéticas entre haplótipos da região ITS-5.8S do rDNA dos isolados de *T. cucumeris* da seringueira foram determinadas através de análise Bayesiana usando o método de Monte Carlo - Cadeia de Markov, conjugado ao algoritmo de Metropolis (MCMCMC), usando o programa MrBayes v 2.01 (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001). Foram incluídas na análise seqüências rDNA dos grupos de anastomose AG 2-1, AG 2-2 (IIIB, IV e LP) e AG 2-3 de *R. solani* depositadas no banco de dados do NCBI/GenBank®.

Para a análise de MCMCMC, MODELTEST 3.7 (POSADA & CRANDALL, 1998) [implementado no programa PAUP4* (SWOFFORD, 1998)] foi utilizado para se determinar o modelo de substituição de bases de DNA o qual mais se ajustou aos dados. Um teste hierárquico da razão da verossimilhança implementado no MODELTEST selecionou o modelo GTR + I (proporção de sítios invariáveis = 0; frequência de bases A = 0.2266, C = 0.2745; G = 0.1684 e T = 0.3304; parâmetro da distribuição gama = 0.2303). Sob este modelo evolutivo, o valor de ML da árvore mais provável foi de -ln L 843.13.

A análise filogenética através de MCMCMC foi executada usando como hipótese *a priori* o modelo de substituição de bases de DNA acima descrito. Procurou-se por 3.000.000 de gerações usando-se quatro cadeias de buscas, eliminando-se as primeiras 250 árvores, e armazenando-se uma árvore a cada 500. Valores de probabilidade posterior (PP) para as ramificações da árvore consenso foram gerados considerando-se a regra de no mínimo 50% do total de 11542 árvores apresentarem a respectiva ramificação.

3.8. *Evolução intraespecífica de R. solani AG 2-2, inferida por análises de reticulogramas de genes individuais.* Para inferir sobre a evolução intraespecífica de *T. cucumeris* da seringueira, foram construídas redes de haplótipos, usando o algoritmo proposto por POSADA & CRANDALL (2001) e o “shareware” TCS, desenvolvido por CLEMENT et al. (2000). Este

método estima o máximo número de diferenças entre os haplótipos como resultado de uma única substituição em um único sítio, com nível de significância estatística de 95%, e é denominado limite de parcimônia (ou limite de conexão de parcimônia). Desse modo, haplótipos diferindo por uma única mudança/alteração serão conectados, e finalmente, aqueles que diferem por dois, três ou mais alterações, até que todos os haplótipos estejam incluídos em uma única rede ou quando o limite de conexão de parcimônia for atingido. O método da parcimônia estatística enfatiza o que é compartilhado entre haplótipos que diferem minimamente, ao invés de diferenças entre haplótipos, e permite uma avaliação empírica dos desvios da parcimônia. Este método também permite a identificação de prováveis recombinantes, através de observações da distribuição espacial de homoplasias nas conexões definidas pela rede (CRANDALL & TEMPLETON, 1999).

3.9. Teste de subdivisão populacional e análise de coalescência. Para cada população amostrada (Xapuri/Rio Branco, Manaus e Belém) foi estimado o valor de Θ (taxa de mutação populacional), baseando-se no número de sítios segregantes s para a região ITS-5.8S do rDNA (WATTERSON, 1975). Isto possibilitou a estimativa, *a priori*, de parâmetros populacionais e a inferência sobre o padrão de crescimento populacional, i.e., equilíbrio versus não-equilíbrio. Para testar-se diferenciação populacional utilizou-se SNAP Map (algoritmo implementado no programa SNAP Workbench) para gerar os arquivos apropriados de seqüências, Seqtomatrix (HUDSON et al., 1992a) para converter o arquivo de seqüências numa matriz de distâncias e Permtest (HUDSON et al., 1992b) para testar a subdivisão geográfica em amostras de DNA para duas ou mais localidades. É importante testar a hipótese de que não há nenhuma diferenciação genética para determinar ou não se assumimos um modelo de população panmítica ou subdividida, para então examinarmos a divergência de populações usando Genetree (também implementado pelo programa SNAP Workbench). O

programa MIGRATE (BEERLI & FELSENSTEIN, 2001), implementado no SNAP Workbench foi utilizado para estimar taxas de migração assumindo equilíbrio entre taxas de migração (simétrico ou assimétrico) na história ancestral das populações. A genealogia com a maior probabilidade de enraizamento, e o tempo desde o mais recente ancestral comum (TCMR) da amostra foi estimada pelas simulações coalescentes. As posições (i.e., tempo para coalescência) das mutações dando origem a alterações/substituições na região estudada foram determinadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, buscou-se determinar o grupamento de anastomose dos 144 isolados obtidos de seringueira e dois de maracujá na amostragem de populações de Belém, Manaus e Xapuri / Rio Branco, na Amazônia brasileira. Para facilitar o processo de identificação, e dar mais consistência à caracterização do grupamento de anastomose dos isolados, optou-se pela utilização de ferramentas moleculares. O método tradicional de identificação de grupos através de reações de anastomose de hifas (embora largamente utilizado e considerado confiável), quando analisado isoladamente, não possibilita a alocação correta de isolados a sub-grupos dentro do complexo AG 2 (CARLING et al., 2001). Dessa forma, decidiu-se pela análise de seqüências da região ITS-5.8S do rDNA amplificado dos isolados e comparação filogenética destas com seqüências de *R. solani* AG 2 depositadas no GenBank®/NCBI.

Os 144 isolados obtidos de seringueira apresentaram seqüências da região ITS-5.8S do rDNA similares (por BLASTN) a seqüências do grupo de anastomose AG 2-2 (IV) de *R. solani*, consistente com os dados da literatura sobre a associação do AG 2-2 à mancha areolada da seringueira (CAMPOS & CERESINI, 2004). Dois isolados obtidos de maracujazeiro na região de Benevides, próximo a Belém, no Pará, também foram caracterizados como AG 2-2.

Numa etapa seguinte, buscou-se determinar a composição e diversidade de haplótipos (seqüências da região ITS-5.8S do rDNA dos indivíduos amostrados) associados com a mancha areolada da seringueira e do maracujazeiro na Amazônia brasileira, bem como comparar com os haplótipos mundiais depositados no GenBank®/NCBI. No total de 146 indivíduos analisados, apenas oito haplótipos distintos da região ITS-5.8 rDNA foram observados. De forma bastante peculiar, nenhum dos haplótipos identificados na amostra de *T. cucumeris* da Amazônia brasileira foi similar a haplótipos do grupo de anastomose AG 2-2

IV identificados no resto do mundo. De forma global, no total, 22 haplótipos da região ITS-5.8S do rDNA do AG 2-2 IV foram caracterizados sendo: oito brasileiros e 14 do resto do mundo (Tabela 1). Optou-se por utilizar uma nomenclatura para os haplótipos mundiais (incluindo os brasileiros) do AG 2, que variou de H01 a H47, e outra nomenclatura distinta apenas para os haplótipos brasileiros usados na análise de coalescência (variando de A a H).

A Tabela 2 apresenta a caracterização de todos os haplótipos depositados no NCBI da região ITS-5.8S do rDNA de *R. solani* AG 2 (subgrupos 2-1, 2-2 IIIB, IV, LP, de *H. brasiliensis*, e 2-3) de acordo com sítios polimorficos (substituições) e eventos de inserção/perda. Ao longo de 742 pares de base analisados, 100 mutações, caracterizaram os diferentes haplótipos da amostra mundial do AG 2 (Tabela 2). Analisando-se apenas o AG 2-2 IV, quarenta e seis mutações (num total de 662 pb analisados) caracterizam as diferenças entre os 22 haplótipos identificados mundialmente.

Quando analisada apenas a amostra brasileira do AG 2-2 associado com *H. brasiliensis* ou com *P. edulis* (Tabela 3), o número de mutações de ponto observadas ao longo da região ITS-5.8S diminuiu para 11, no total. Os haplótipos mais frequentes na população amazônica foram o B (31,8%), o E (25,0%) e o A (18,9%). Já os menos frequentes foram o C, D e H, representado, cada um, apenas 1,35% do total da amostra (Tabela 3).

Tabela 1. Haplótipos de *Rhizoctonia solani* AG 2 (dos subgrupos 2-1, 2-2 IIIB, IV e LP, e 2-3, e aqueles associados a *Hevea brasiliensis*) determinados com base em polimorfismos detectados em seqüências de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA. (Continua)

Haplótipos mundiais (filogenia)	Frequência	Haplótipos brasileiros (análise coalescente)	Frequência	Grupo de anastomose	Código da seqüência	Isolados	Hospedeiro	Local de origem	Fonte*
Amostra da Amazônia									
H1	62	B	45		N.D. ¹	H115, H113-T, H112, H111, H109, H108, H106, H105-T, H104-T, H102, H100, H099, H098-T, H097, H096, H095, H094-T, H093-T, H092, H091, H090-T, H089, H088, H087-T, H085, H083-T, H081, H080-T, H077, H076-T, H075, H074, H072, H070, H069-T, H068, H067-T, H066, H064, H063, H062, H056, H055, H054-T, H053	<i>Hevea brasiliensis</i>	Brasil, Amazonas, Manaus	P. C. Ceresini
		B	02		N.D.	H005, H144	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil, Acre, Xapuri / Rio Branco	P. C. Ceresini
		F	15		N.D.	H054-C, H067-C, H069-C, H076-C, H080-C, H083-C, H084, H087-C, H090-C, H093-C, H094-C, H098-C, H104-C, H105-C, H113-C	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil, Amazonas, Manaus	P. C. Ceresini
H43	02	D	02		N.D.	H057, H073	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil, Amazonas, Manaus	P. C. Ceresini
H44	13	G	13		N.D.	H119, H121, H122, H123, H132, H134, H135, H142, H150, H154, H155, H158, H160	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil, Pará, Belém	P. C. Ceresini
H45	02	C	02		N.D.	Pe162, Pe163	<i>Passiflora edulis</i>	Brasil	P. C. Ceresini
		E	06		N.D.	H082, H078, H065, H061, H060, H059,	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil, Amazonas, Manaus	P. C. Ceresini
H46	65	E	31		N.D.	H036, H035, H034, H032, H031, H030, H029, H027, H026, H025, H024, H023, H022, H021, H020, H019, H018, H017, H016, H015, H014, H012, H010, H009, H008, H007, H006, H004, H003, H002, H001,	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil, Acre, Xapuri / Rio Branco	P. C. Ceresini
		A	28		N.D.	H013, H116, H117, H118, H124, H126, H128, H129, H130, H133, H136, H137, H138, H139, H140, H141, H143, H145, H146, H148, H149, H151, H152, H153, H156, H157543T, H159543T, H161	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil, Pará, Belém	P. C. Ceresini
H47	02	H	02		N.D.	H157543C, H159543C	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil, Pará, Belém	P. C. Ceresini

Tabela 1. Continuação.

Haplótipos mundiais (filogenia)	Frequência	Haplótipos brasileiros (análise coalescente)	Frequência	Grupo de anastomose	Código da sequência	Isolados	Hospedeiro	Local de origem	Fonte*
Amostra Mundial									
H2	06			AG 2-1	AB000026	P-2	-	Japão	S. Kuninaga
				AG 2-1	AB054844	F56L	-	Japão	S. Kuninaga
				AG 2-1	AF354063	8RS	solo	Austrália	D. Gonzales
				AG 2-1	AB054847	F48	-	Japão	S. Kuninaga
				AG 2-1	AB054849	88-033	-	Japão	S. Kuninaga
				AG 2-1	AF354105	56Rs	<i>Solanum tuberosum</i>	USA	D. Gonzales
H3	04			AG 2-3	AB019025	237258	-	Japão	S. Kuninaga
				AG 2-3	AB054871	H17-4	-	Japão	S. Kuninaga
				AG 2-3	AB054870	H5-307	-	Japão	S. Kuninaga
				AG 2-3	AY154312	SoyJ	<i>Glycine max</i>	Brasil	E. E. Kuramae
H4	01			AG 2-3	U57741	23R02	-	Japão	V. Rubio
H5	02			AG 2-3	U57743	23R01L	-	Japão	V. Rubio
				AG 2-3	U57740	23R01	-	Japão	V. Rubio
H6	01			AG 2-3	TCU57742	23R03	-	Japão	V. Rubio
H7	01			AG 2-3	AB054872	LB17-3-2	-	Japão	S. Kuninaga
H8	01			AG 2-1	AB054853.1	RT-23	-	Japão	S. Kuninaga
H9	01			AG 2-1	AB054848	RHS47	-	Japão	S. Kuninaga
H10	01			AG 2-1	AB000027	P-5	-	Japão	S. Kuninaga
H11	08			AG 2-1	AB122124	B1	<i>Coffea arabica</i>	Japão	M. Hyakumachi
				AG 2-1(2-t)	AB054850.1	R002	-	Japão	S. Kuninaga
				AG 2-1	AY241672	1A	<i>Fagus sylvatica</i>	Noruega	A. M. Hietala
				AG 2-1	AY154317	PS4	-	Brasil	E. E. Kuramae
				AG 2-1(2-t)	AB054852	R144	-	Japão	S. Kuninaga
				AG 2-1	AB054851	R105-2-t	-	Japão	S. Kuninaga
				AG 2-1	AB054846	PS2	-	Japão	S. Kuninaga
				AG 2-1	AB054845	R123	-	Japão	S. Kuninaga
H12	01			AG 2-1	AY241673	22A	<i>F. sylvatica</i>	Noruega	A. M. Hietala
H13	01			AG 2-1	AY241674	19A	<i>F. sylvatica</i>	Noruega	A. M. Hietala
H14	01			AG 2-1	AJ419933	HK1	<i>Pinus sylvestris</i>	Finlândia	H. Gronberg
H15	01			AG 2-2 LP	AJ238160.1	AJ-1-10-1	-	Japão	M. C. Julian
H16	01			AG 2-2 IV	AB054860.1	H13	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Honduras	G. Godoy-Lutz
H17	02			AG 2-2 IV	AJ238172.1	S2	-	Japão	M. C. Julian
				AG 2-2 LP	AJ238173.1	SLP3-3	-	Japão	M. C. Julian
H18	01			-	AJ000201.1	IMI 360038	Arroz	Costa do Marfim	A. Johanson
H19	01			AG 2-2 IIIB	AJ238166.1	No-2	-	Japão	M. C. Julian
H20	01			AG 2-2	AF308623	DR-EEAL	<i>P. vulgaris</i> cv. PC-50	Republica Dominicana	G. Godoy-Lutz
H21	03			AG 2-2 IV	AB054859.1	87-24-4A	<i>Beta vulgaris</i>	EUA, Minnesota	S. Kuninaga
				AG 2-2 IV	AB000014.1	BC-10	<i>B. vulgaris</i>	Japão	S. Kuninaga
				AG 2-2 IV	AF354117.1	16Rs	<i>B. vulgaris</i>	Japão	D. Gonzales
H22	01			AG 2-2 IV	AJ238168.1	R64	-	Japão	M. C. Julian
H23	01			AG 2-2 IV	AB054864.1	W-22	<i>P. vulgaris</i>	EUA, Wisconsin	S. Kuninaga

Tabela 1. Continuação.

Haplótipos mundiais (filogenia)	Frequência	Haplótipos brasileiros (análise coalescente)	Frequência	Grupo de anastomose	Código da sequência	Isolados	Hospedeiro	Local de origem	Fonte*
H24	01			AG 2-2 IV	AB054865.1	RI-64	<i>B. vulgaris</i>	Japão	S. Kuninaga
H25	01			AG 2-2 IV	AJ238164.1	K-1	-	Japão	M. C. Julian
H26	01			AG 2-2 IV	AJ238158.1	92155-1-2	-	Japão	M. C. Julian
H27	01			AG 2-2 IV	AJ238167.1	R56	-	Japão	M. C. Julian
H28	01			AG 2-2 IV	AB054861.1	DR-G02	<i>P. vulgaris</i>	Republica Dominicana	S. Kuninaga
H29	02			AG 2-2 LP	AJ238171.1	RGR39	-	Japão	M. C. Julian
				AG 2-2 LP	AJ238170.1	RGR38	-	Japão	M. C. Julian
H30	01			AG 2-2 IV	AB054863.1	R9	<i>B. vulgaris</i>	EUA, Colorado	S. Kuninaga
H31	01			AG 2-2 LP	AJ238165.1	L-9-1S	-	Japão	M. C. Julian
H32	01			AG 2-2 IIIB	AY270015.1	SJ07	<i>G. max</i>	Brasil	R. C. Fenille
H33	03			AG 2-2 LP	AB054867.1	G4	<i>Zoysia tenuifolia</i>	Japão	S. Kuninaga
				AG 2-2 LP	AB054868.1	G8	<i>Z. tenuifolia</i>	Japão	S. Kuninaga
				AG 2-2 LP	AB054866.1	48R	<i>Z. tenuifolia</i>	Japão	S. Kuninaga
H34	01			AG 2-2 IV	AB054862.1	H-3-77	<i>Daucus carota</i>	EUA, Minnesota	S. Kuninaga
H35	01			AG 2-2	AF308621	A28	<i>P. vulgaris aboragineus</i>	Cuba	G. Godoy-Lutz
H36	02			AG 2-2 IIIB	AB054858.1	65-L-2	<i>G. max</i>	EUA, Illinois	S. Kuninaga
				AG 2-2 IIIB	AB054856.1	88-40-1	<i>B. vulgaris</i>	EUA, New York	S. Kuninaga
H37	01			AG 2-2 IIIB	AB054857.1	89-21-4	<i>Zea mays</i>	EUA	S. Kuninaga
H38	01			AG 2-2 IIIB	AJ238162.1	C-306	-	Japão	M. C. Julian
H39	01			AG 2-2 IIIB	AB054855.1	87-36-1	<i>P. vulgaris</i>	EUA, North Dakota	S. Kuninaga
H40	01			AG 2-2 IIIB	AB054854.1	C96J	<i>Juncus effusus</i>	Japão	S. Kuninaga
H41	01			AG 2-2 IIIB	AF354116.1	15Rs	<i>Lomandra longifolia</i>	Japão	D. Gonzales
H42	01			AG 2-2 IIIB	AJ238157.1	9207	-	Japão	M. C. Julian

* A. Johanson, Pest Management Department, Natural Resources Institute, Central Avenue, Chatham Maritime, Chatham, Kent, ME4 4TB, Reino Unido;

* A. M. Hietala, Forest Ecology, Skogforsk, Hogskoleveien 12, Aas 1432, Noruega;

* D. E. Gonzáles, Sistemática Vegetal, Instituto de Ecología, A. C., Km 2.5 Antigua Carretera a Coatepec, Xalapa, Veracruz 91000, México;

* E. E. Kurame, CBS, Uppsalalaan 8, NL 3584 CT Utrecht, Holanda;

* G. Godoy-Lutz, Plant Pathology, University of Nebraska-Lincoln, 406 Plant Sciences Hall, Lincoln, NE 68583-0722, EUA;

* H. Gronberg, Department of Biosciences, University of Helsinki, Viikki Biocenter, P.O.Box 56, Viikinkaari 9, FIN-00014, Finlândia;

* M. C. Julian, Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología CNB-CSIC, Campus Cantoblanco UAM, Madrid 28049, Espanha;

* M. Hyakumachi, Gifu University, Faculty of Agriculture; Yanagido 1-1, Gifu, Gifu, 501-1193, Japão;

* R. C. Fenille, Ministério da Agricultura, Goiás, Brasil;

* S. Kuninaga, Health Sciences University of Hokkaido; Tohbetu, 1757, Ishikari-gun, Hokkaido 061-0293, Japão;

* V. Rubio, Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, Campus Cantoblanco-UAM, Madrid 28049, Espanha;

¹ Sequências ainda não depositadas no GenBank@NCBI.

Tabela 3. Caracterização de haplótipos Amazônicos de *Rhizoctonia solani* AG 2-2 (subgrupo associado a *Hevea brasiliensis*) de acordo com sítios polimórficos (substituições) e eventos de inserção e perda detectados em seqüências de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA.*

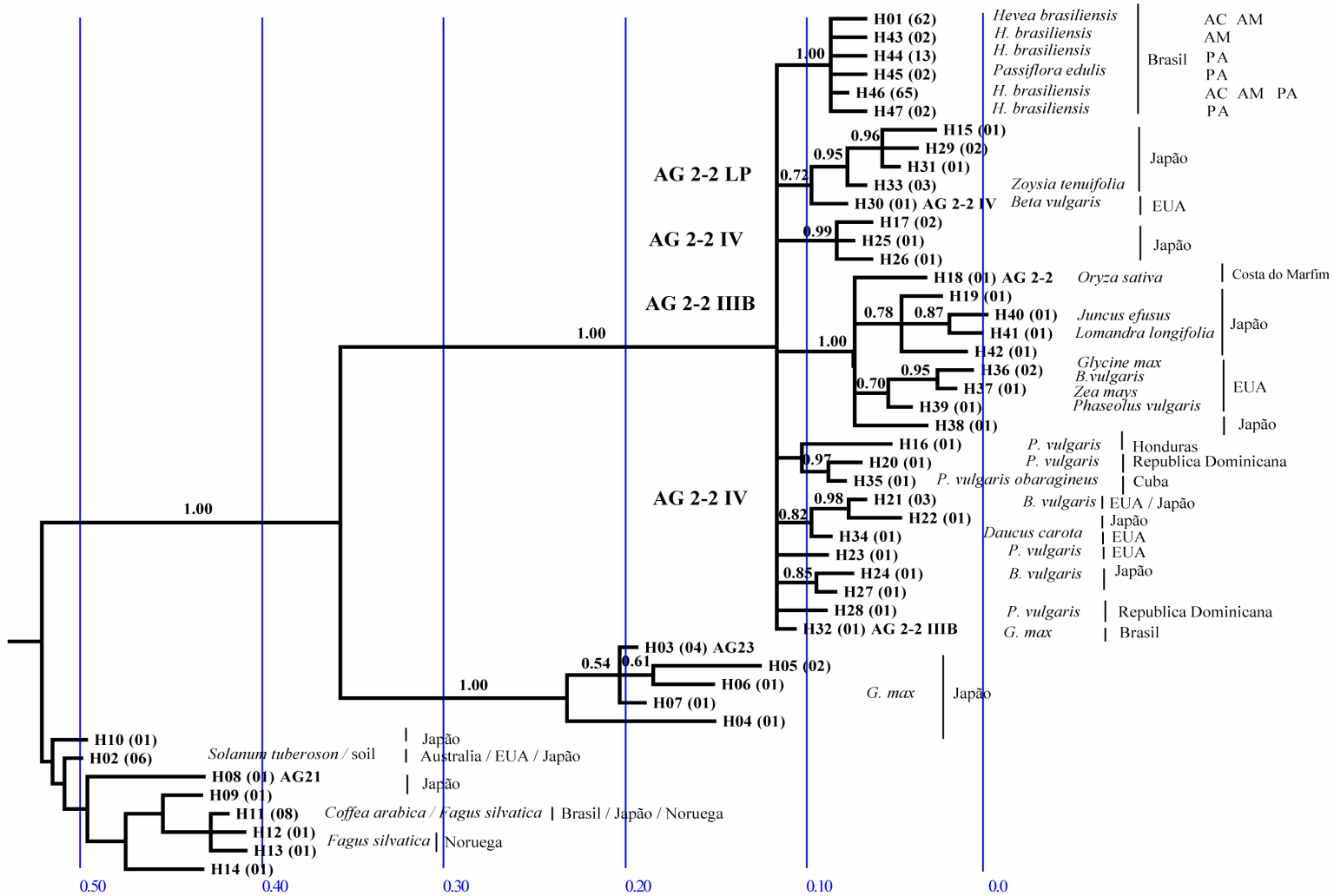
Posição ao longo da região		25	106	151	168	238	278	370	449	533	538	662
Número do sítio *		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tipo de sítio		t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
Tipo de caráter		i	i	-	-	i	-	-	-	i	-	-
Consenso		A	T	T	C	G	C	T	C	C	T	T
Haplótipos / freqüência		Proporção										
H46	A	28	0.192	G	C
H01	B	47	0.321	A	.	.	T	.
H45	C	2	0.014	.	C	C	T	.	.	T	.	.
H43	D	2	0.014	A	T	.	.	.
H46	E	37	0.253	A
H01	F	15	0.102	A	.	.	T	C
H44	G	13	0.09	G	C	C	.	.
H47	H	2	0.014	G	C	C
8 Haplótipos		146	1									

* O número do sitio (1 a 11) indica a posição do polimorfismo ao longo da região ITS-5.8S do rDNA, que vai da 1^a A 662^a base. Os símbolos a seguir indicam: t, substituições do tipo transições; v, transversões; i, sítios informativos filogeneticamente; -, sítios não informativos. As regiões monomórficas são indicadas por pontos enquanto as substituições por bases distintas em relação à seqüência consenso. O número do haplótipo mundial (H01, H43-H47) é seguido da designação do haplótipo amazônico (de A a H), de sua freqüência (i.e., indica o número de vezes que o haplótipo foi observado na amostra) e da proporção na amostra.

Considerou-se significativo o número de mutações separando os haplótipos amazônicos ITS-5.8S de *H. brasiliensis* e de *P. edulis* dos demais haplótipos mundiais do AG 2-2 IV (35 mutações, ou 5,29% do total de sítios analisados). Este nível de variação gênica num marcador é suficiente para justificar a separação entre duas espécies filogenéticas (TAYLOR et al., 2000). Dessa forma, neste ponto, questionamos se todos os isolados brasileiros associados com a mancha areolada pertencem realmente ao AG 2-2 IV.

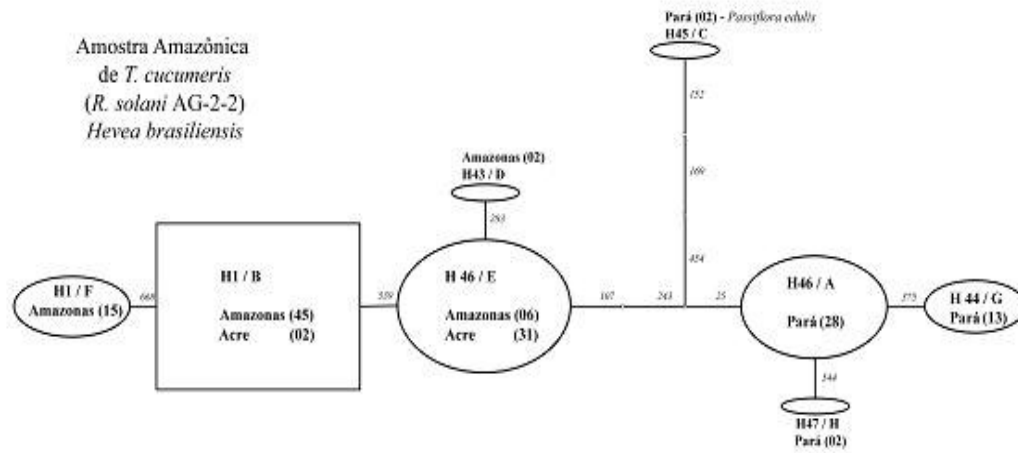
Construiu-se então, árvore filogenética da região ITS-5.8S do rDNA, baseada em análise Bayesiana por MCMCMC, para representar as relações evolucionárias entre os haplótipos amazônicos em comparação com haplótipos do AG 2-1, AG 2-2 (IIIB, IV e LP) e AG 2-3 (Figura 2). Todos os haplótipos amazônicos amostrados foram agrupados num único clado com suporte estatístico (probabilidade posterior) máximo (=1.00) O clado dos haplótipos ITS-5.8S brasileiros está relacionado com o AG 2-2 de *R. solani*, mas representam um clado ou uma unidade evolucionária distinta em relação ao AG 2-2 IIIB, 2-2 IV e 2-2 LP.

Para dar maior suporte a esta hipótese de que os isolados de *H. brasiliensis* e de *P. edulis* representam uma unidade evolucionária distinta em relação ao AG 2-2 IV, construímos uma rede de haplótipos ITS-5.8S usando algoritmo de máxima parcimônia estatística. O limite máximo de diferenças entre seqüências de haplótipos foi fixado em 5% para unir haplótipos numa única rede. Corroborando a observação anterior, a amostra amazônica de haplótipos ITS-5.8S de *R. solani* da seringueira e do maracujá representou uma rede totalmente independente em relação ao AG 2-2 IV (Figura 3). De forma interessante, três outros haplótipos obtidos especialmente de *Phaseolus vulgaris* na América Central não se conectaram a nenhuma das redes (à do AG 2-2 IV e à rede brasileira).



Substituições/sítio

Figura 2. Árvore filogenética ilustrando as relações filogenéticas entre haplótipos da região ITS-5.8S dos grupos AG 2-1, AG 2-2 (IIIB e IV e LP), AG 2-3 e o grupo de isolados de *Rhizoctonia solani* obtido de *Hevea brasiliensis* na Amazônia brasileira. Estas relações são baseadas no modelo GTR + I de evolução de bases de DNA. Valores de probabilidades posteriores (variando de 0 a 1.0) geradas por análise Bayesiana de MCMCMC são apresentados para os ramos principais. Valores próximos a 1.0 indicam elevada significância estatística para o respectivo ramo, avaliada em 11542 árvores artificialmente geradas. A árvore foi enraizada usando seqüências da região ITS-5.8S do rDNA de *R. solani* AG 2-1. Os taxa são identificados pelo código do haplótipo mundial, seguido pelo tamanho da amostra, hospedeiro e local de origem. As seqüências da região ITS-5.8S dos diferentes grupos de anastomose utilizadas para inferir as relações filogenéticas são oriundas do GenBank® (NCBI). A designação de haplótipos mundiais de *R. solani* AG2 é apresentada na Tabela1.



Amostra Mundial de *T. cucumeris* (*R. solani* AG-2-2 IV).

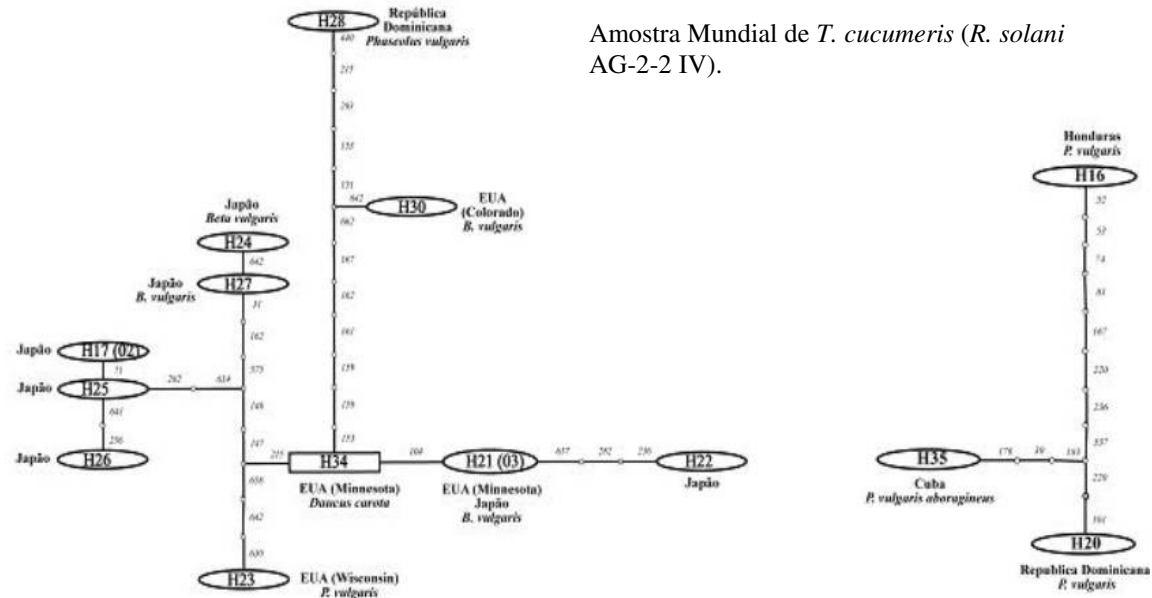


Figura 3. Rede de haplótipos da região ITS-5.8S do rDNA de *Rhizoctonia solani* AG 2-2 (do subgrupo IV e de *Hevea brasiliensis*). . Figuras geométricas agrupam haplótipos e a área de cada figura representa a frequência relativa de cada haplótipo na população. No interior das figuras observa-se referência aos haplótipos mundiais e amazônicos (entre parênteses) e sua frequência, por exemplo, H01 (F): 15, indica o haplótipo mundial H01, relativo ao haplótipo amazônico F, que aparece quinze vezes na população. Os haplótipos são separados uns dos outros por passos mutacionais. Números ao lado de cada passo mutacional indica a posição ao longo da região ITS-5.8S onde a alteração foi detectada. Círculos sem denominação indicam haplótipos mutantes hipotéticos não amostrados. A rede de haplótipos da amostra Amazônica não apresentou conexão com as redes mundial e Centro-Americana (AG 2-2 IV), tendo excedido ao limite máximo de 5% de parcimônia.

Com base nessas observações, acreditamos ser oportuno postular que a população brasileira de *Thanatephorus* causando mancha areolada da seringueira e queima das folhas do maracujá, pertencentes ao grupo AG 2-2 de *R. solani*, compreendem um grupo de anastomose distinto do AG 2-2 IV. Pretendemos propor a denominação AG 2-2 Hb. Nosso objetivo é de obter, junto aos pesquisadores que depositaram as seqüências do ITS-5.8S do AG 2-2 IV no GenBank/NCBI, os respectivos isolados utilizados. Isto será necessário para podermos estender o estudo sobre qual a relação filogenética existente entre membros descritos do AG 2-2 (e o novo AG 2-2 Hb) buscando informação de outros marcadores moleculares, que desenvolvemos em nosso laboratório (especialmente genes mitocondriais como o *atp6*, *nad1* e *nad2*, e outros nucleares como a região IGS do rDNA).

Finalmente, usando de abordagem inédita para qualquer patossistema envolvendo *Thanatephorus*, efetuamos análise evolucionária da população amazônica do AG 2-2 Hb da seringueira e de *P. edulis* usando o modelo coalescente (Figura 4). Na genealogia gênica construída, a direção da divergência ocorre do topo da genealogia (significando o haplótipo mais velho, ou o passado) para a base (o haplótipo mais jovem, ou o presente). O processo coalescente vai da base (presente) ao topo (passado). Como a genealogia gênica é enraizada, todas as mutações e bifurcações estão também organizadas (ordenadas) do topo para a base. Os números abaixo de cada ramo da árvore denominam (em ordem) cada haplótipo Amazônico distinto (de A a H), sua frequência total (i.e., o número total de ocorrências do haplótipo na amostra populacional) e a frequência de cada haplótipo nas amostras de Xapurí, Belém e Manaus (Figura 4).

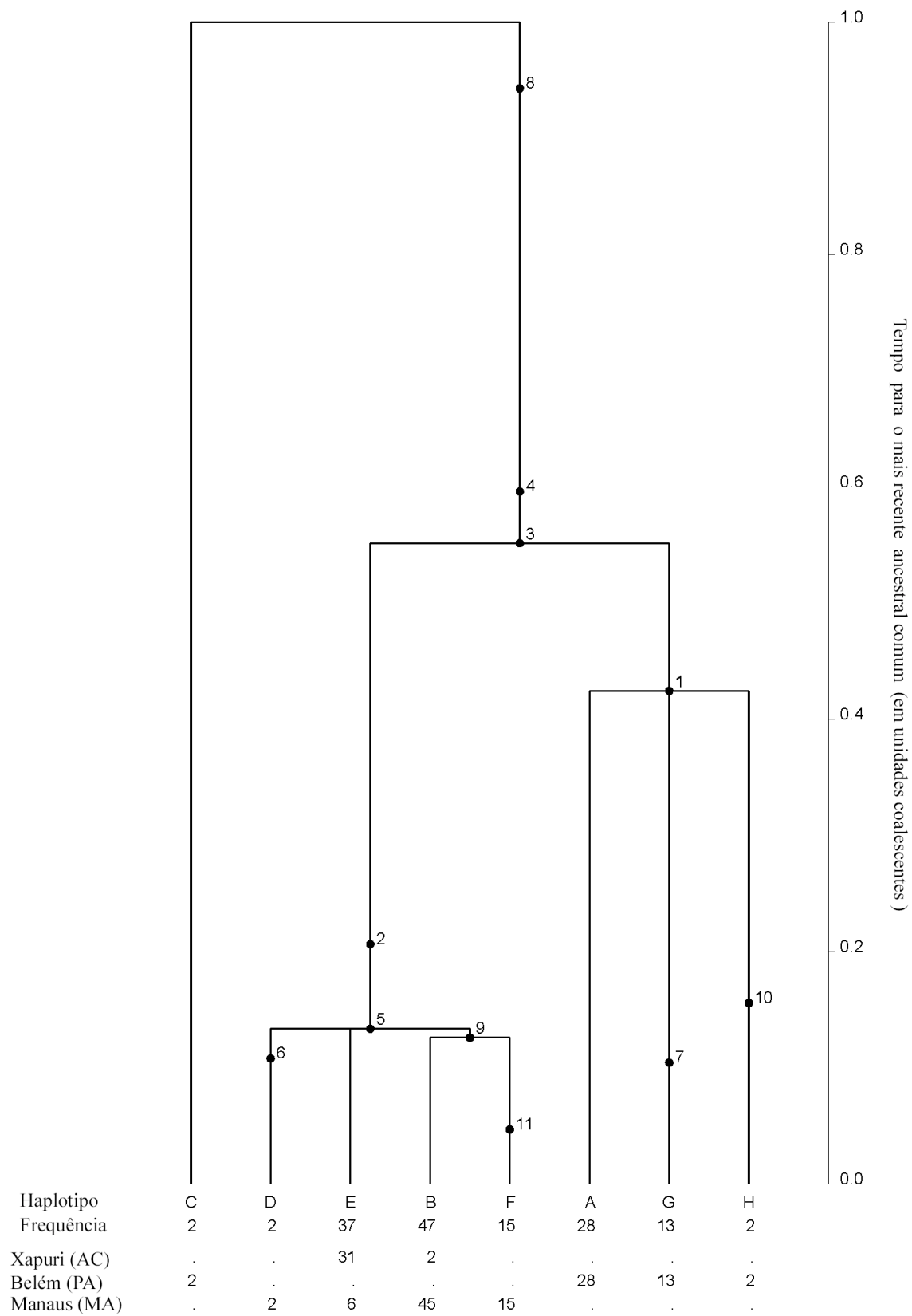


Figura 4. Genealogia gênica coalescente com a mais alta probabilidade (verossimilhança = 1.7465×10^{-293} , desvio padrão = 0.0000) mostrando a distribuição de mutações (pontos pretos ao longo da genealogia) na região ITS-5.8S do rDNA em populações de *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizotonia solani*) da mancha areolada da seringueira obtidas em Xapuri (AC), Belém (PA) e Manaus (AM) na região Amazônica. As simulações do processo coalescente foram baseadas em estimador de Watson para $\Theta = 0,75$ e populações de tamanho constante e freqüente. A escala de tempo é expressa em unidades coalescentes de tamanho efetivo de população. Na genealogia gênica a direção da divergência ocorre do topo da genealogia (significando o haplótipo mais velho, ou o passado) para a base (o haplótipo mais jovem, ou o presente). O processo coalescente vai da base (presente) ao topo (passado). Como a genealogia gênica é enraizada, todas as mutações e bifurcações estão também organizadas (ordenadas) do topo para a base. Os números abaixo de cada ramo da árvore denominam (em ordem) cada haplótipo Amazônico distinto (de A a H), sua freqüência total (i.e., o número total de ocorrências do haplótipo na amostra populacional) e a freqüência de cada haplótipo nas amostras de Xapuri, Belém e Manaus.

Através desta análise observou-se inicialmente que a população de *R. solani* AG 2-2 Hb de Belém é relativamente mais velha que as demais populações analisadas. O tempo para ancestral comum mais antigo desta população, com a mutação número 1 na genealogia, é de cerca de 0,45 unidades evolucionárias coalescentes (numa escala de 0 a 1,0). O ancestral comum de todas as três populações analisadas (indicado por conter apenas a mutação número 8 na genealogia, de T para C) está associado ao maracujá, em Belém, e tem cerca de 0,8 unidades evolucionárias coalescentes de idade.

Nenhum haplótipo da região ITS-5.8S do AG 2-2 Hb de Belém foi observado em outras regiões. Entretanto, a população de Manaus compartilhou dois, de seus quatro haplótipos, com aqueles observados em Xapuri / Rio Branco, no Acre. De forma interessante, esses haplótipos (E e B), aparecem com frequências consistentemente diferentes em Manaus e em Xapuri / Rio Branco, indicando efeito de fluxo gênico (ou migração) e deriva genética (ou amostragem casual). Essas duas populações também compartilham o mesmo ancestral, relativamente mais jovem que a população de Belém, com cerca de 0,2 unidade evolucionária coalescente. Embora a hipótese de fluxo gênico a longas distâncias entre essas populações do patógeno parece de difícil aceitação, soubemos, por informação pessoal na visita ao Acre, que a cultura da seringueira foi estabelecida naquele Estado através da introdução de mudas do Amazonas. Isto vem corroborar nossas observações.

Este estudo representa uma iniciativa pioneira em análise filogeográfica de populações de fungos fitopatogênicos do gênero *Thanatephorus* num patossistema tropical. O desenvolvimento de marcadores moleculares nucleares, variáveis e seletivamente neutros, ainda é necessário para explorarmos importantes aspectos sobre a origem e evolução do patógeno. O desenvolvimento de novos marcadores de importância para genética de populações tais como microssatélites, faz parte de nossos planos para estudo das forças evolucionárias atuais moldando a estrutura

populacional de *T. cucumeris* na Amazônia. A idéia futura é utilizar este sistema como um modelo para estudos genéticos em *Thanatephorus*, considerando as peculiaridades deste patógeno para as condições brasileiras, especialmente a habilidade de esporulação *in vitro*.

Em termos de impacto deste estudo, a principal questão sobre a aplicabilidade da teoria e estudos sobre evolução molecular e genética de populações de fitopatógenos é qual a importância de se conhecer o potencial evolucionário de um patógeno. A hipótese postulada por geneticistas de populações de fitopatógenos é que “patógenos com o maior potencial evolucionário oferece o maior risco de vencer genes de resistência ou evoluir para neutralizar outros métodos de controle, tais como a aplicação de fungicidas” (MCDONALD, 2004).

MCDONALD & LINDE (2002) propuseram uma teoria para avaliar o potencial evolucionário de populações de fitopatógenos. Por exemplo, patógenos que apresentam recombinação regularmente representam maior risco evolutivo que patógenos com pouca ou nenhuma recombinação. A recombinação permite que novas combinações de alelos (especialmente alelos mutantes, por exemplo, genes de avirulência) sejam reunidas num único indivíduo e testadas contra novos ambientes. Esta possibilidade de recombinação no patógeno pode afetar estratégias de melhoramento genético de longo-prazo envolvendo a piramidização de genes de resistência.

Segundo os mesmos autores, patógenos com alto fluxo gênico representa maior risco do que patógenos com baixo fluxo gênico, por duas razões: 1) populações com fluxo gênico alto são maiores, e mantêm assim mais alelos; 2) populações de patógeno com alto fluxo gênico têm maior probabilidade de transmitir, para uma área geográfica maior, mutantes virulentos ou resistentes a fungicida. No caso de fluxo gênico elevado, o objetivo do manejo da doença é limitar a magnitude do fluxo gênico entre populações. Embora não possamos afetar a dispersão natural de propágulos de patógenos, é possível limitar o potencial para dispersão a longa distância

facilitada pelo homem (como o movimento de material infectado, solo, ou equipamentos entre populações de certa forma isoladas).

Os riscos evolucionários de *T. cucumeris* da seringueira são conhecidos apenas hipoteticamente, pois não se conhece exatamente qual a importância da recombinação e do fluxo gênico afetando a estrutura populacional do patógeno, os quais se objetiva determinar no futuro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Reserch**, Bethesda, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AMORIM, D.S. Classificações Filogenéticas. In: **Fundamentos de Sistemática Filogenética**. Editora Holos. Ribeirão Preto – SP. 2002, p. 99-109.
- ANDERSON, J. B.; KOHN, L.M. Genotyping, gene genealogies and genomics bring fungal population genetics above ground. **Trends Ecological Evolution**. Oxford University Press, New York, v.13, p. 444-449, 1998.
- AVISE, J. C. **Phylogeography: The history and formation of species**. Harvard University Press, Londres, 2000.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N.C. **Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetic and systematics**. Annual Revision Ecological Systems. Los Angeles, v.18. 1987, p. 489-522.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Chapman & Hall, New York, 1994.
- BEERLI, P., FELSENSTEIN, J. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in subpopulations by using a coalescent approach. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, New York, v.98, p.4563–4568, 2001
- CARLING, D. E.; KUNINAGA, S.; BRAINARD, K. A. Hyphal anastomosis reactions, rDNA-Internal Transcribed Spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia*

- solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. **Phytopathology**, St. Paul, v.92, p. 43-50, 2001.
- CAMPOS, A. P. da S.; CERESINI, P.C. Caracterização de *Thanatephorus cucumeris* associada à seringueira e mimosa na região Amazônica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília: SBF, v. 29, p.S326, 2004.
- CARBONE, I.; KOHN, L. Inferring Process from Pattern In Fungal Population Genetics. **Applied Mycology & Biotechnology An International Series. Fungal Genomics**. New York, v. 4, 2004, p. 1-30.
- CARBONE, I.; KOHN, L. M. A microbial population-species interface: nested cladistic and coalescent inference with multilocus data. **Molecular Ecology**, Edinburgh, v.10, p.947-964, 2001.
- CARPENTER, J. B. Plant pathology in the Division of Rubber Plant Investigations. **Plant Disease Reporter**, Supplement, Washington, USDA. v.190, p.60-66, 1950.
- CARPENTER, J. B. Target leaf spot of the *Hevea* rubber tree in relation to host development, infection, defoliation and control. In: **USDA Technical Bulletin**. Washington: USDA, 1951. p.34. (Technical Bulletin, 1028).
- CHEE, K. H.; WASTIE, R. L. The status and future prospects of rubber diseases in tropical America. **Review of Plant Pathology**, Germantown, v.59, p.541-548, 1980.
- 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**. Netherlands, v. 113, n° 2, p. 183-196, 2005.

- CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, Edinburgh, v.9, p.1657-1660, 2000.
- CONDURÚ, J. M. H; STEIN, R. L. B. Doenças da seringueira. In: CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM HEVEICULTURA, 14, 1984, Belém. **Curso de Especialização em Heveicultura...** Belém: [s.n.], 1984. v.1. p.1-17.
- CRANDALL, K.A.; TEMPLETON, A.R. Statistical methods for detecting recombination. In: CRANDALL, K. A. (Ed.). **The Evolution of HIV**. Baltimore: The Johns Hopkins Univ. Press, 1999, p.153-176.
- DAY, P. R.; FINCHAM, J. R. S.; RADFORD, A. **Fungal Genetics**. 1979. v. 4. p. 79-98.
- DESLANDES, J. A. Observações fitopatológicas na Amazônia. **Boletim Fitossanitário**, Rio de Janeiro, v.1, p.223-228, 1944.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3^{ed}. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220 p. 1998.
- FERREIRA, F. A.; GASPAROTTO, L. Principais doenças florestais no Brasil. **Patologia Florestal**, Viçosa, v.1, p.326-332, 1989.
- GASPAROTTO, L.; TRINDADE, D. R.; LIEBEREI, R. Sistema de avaliação da incidência da mancha areolada [*Thanatephorus cucumeris* (FRANK) DONK] em seringueira (*Hevea* spp.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.7, p.349-357, 1982.
- GONZALEZ, D.; CARLING, D.E.; KUNINAGA, S.; VILGALYS, R.; CUBETA, M.A. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. **Mycologia**, New York, v.93, p.1138-1150, 2001.
- GUTIERREZ, W.A; SHEW, H.D.; MELTON, T.A. Sources of inoculum and management for *Rhizoctonia solani* damping-off on tobacco transplants under greenhouse conditions. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, p.S35, 1998.

- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, Oxford University Press, New York, v.17, p.754-755, 2001.
- HUELSENBECK, J. P.; LARGET, B.; SWOFFORD, D. A compound poisson process for relaxing the molecular clock. **Genetics**, Pittsburgh, v. 154, p.1879-1892, 2000.
- HUDSON, R. R., BOOS, D. D., KAPLAN, N. L. A statistical test for detecting geographic subdivision. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford University Press, New York, v. 9, p. 138–151, 1992a.
- HUDSON, R. R., SLATKIN, M., MADDISON, W. P. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. **Genetics**, Pittsburgh, v.132, p.583–589, 1992b.
- HUDSON, R. R. Gene genealogies and the coalescent process. **Oxf. Surv. Evol. Biol.** Oxford University Press, New York, p.1-44, 1990.
- KUNINAGA, S.; NATSUAKI, T.; TAKEUCHI, T.; YOKOSAWA, R. Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**, Berlin, v.32, p.237-243, 1997.
- KUNINAGA, S.; YOKOSAWA, R. DNA based sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kuhn. I. Genetic relatedness within anastomosis group 1. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**. Tóquio, Japan, v.48, p.659-67, 1982.
- 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**. Netherlands. v. 112. n° 2. p. 113-121. 2005.
- MATIOLI, S. R. Grossário. In: **Biologia Molecular e Evolução**. Editora Holos, Riberão Preto-SP. 2001, p. 193-197.

- MAYDEN, R. L. A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. In: Species: **The Units of Biodiversity** (M. F. Claridge, H. A. Dawah, and M. R. Wilson, Eds.). CHAPMAN & HALL, London, p.381–424, 1997.
- MCDONALD, B.A. **Population genetics of plant pathogens**. Saint Paul: APS, 2004. CD-ROM.
- MCDONALD, B.A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.40, p.349-379, 2002.
- MCDONALD, B. A.; MCDERMOTT, J. M. Population genetics of plant pathogenic fungi. **Bioscience**, Washington, v.43, p. 311-319, 1993.
- MCDONALD, B. A.; MCDERMOTT, J. M.; GOODWIN, S. B.; ALLARD, R. W. The population biology of host-pathogen interactions. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v. 27, p. 77-94, 1989.
- METTLER, L.E.; GREGG, T.G. **Genética de populações e evolução**. Tradução por Roland Vencovsky, João Lúcio de Azevedo, Gerhard Bandel. São Paulo: EDUSP, Polígono. p.225-255, 1973.
- MILGROOM, M. G.; FRY, W. E. Contributions of population genetics to plant disease epidemiology and management. **Advances in Botanical Research**. Oxford University Press, New York, v. 24, p. 1-30, 1997.
- MIYAKI, C. Y.; RUSSO, C. A. M.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: **Biologia Molecular e Evolução**. MATIOLI, S. R. Editora Holos, Riberão Preto-SP. 2001, p. 97-107.
- MURPHY, R. W.; SITES JR, J. W.; BUTH, D. G.; HAUER, C. H. Proteins: Isozyme electrophoresis In: DM Hillis, C Moritz, BK Mable, eds. **Molecular Systematics**. Sunderland, MA:Sinauer Associates, 1996, p. 51–120.

- NAITO, S. Basidiospore dispersal and survival. In: SNEH, B. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (Ed.) ***Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1996, p.197-205.
- NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. Oxford University Press, New York, 2000.
- NEIGEL, J.E. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.28, p.105-128, 1997.
- PAZZA, R. O que é Evolução Biológica? **Projeto Evoluindo - Biociência.org**. Disponível em: <http://www.evoluindo.biociencia.org>. Acesso em: 2004.
- PEREIRA, S. L.; MIYAKI, C. Y.; RUSSO, C. A. M. Reconstrução filogenética: Métodos probabilísticos. In: **Biologia Molecular e Evolução**. MATIOLI, S. R. Editora Holos, Riberão Preto-SP. 2001, p. 117-129.
- POSADA, D.; CRANDALL, K.A. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. **Trends in Ecology and Evolution**, Oxford University Press, New York, v.1, p.37-45, 2001.
- POSADA, D.; CRANDALL, K.A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, Oxford University Press, New York, v.14, p.817-818, 1998.
- 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**, New York, v.28, p.148-159, 1999.
- ROSENBERG, N. A.; NORDBORG, M. Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. **Genetics**. Nature Publishing Group. Bethesda, v.3, p. 380-389, 2002.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987.

- SNEH, B.; ADANS, G. C. Culture preservation methods for maintaining genetic integrity of *Rhizoctonia spp.* Isolates. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (Ed.) ***Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control.*** Dordrecht: Kluwer academic, 1996, p.139-146.
- SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. **Identification of *Rhizoctonia* species.** Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1991, p.133.
- SWOFFORD, D.L. PAUP*. **Phylogenetic Analysis Using Parsimony** (*and Other Methods), Versão 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1998.
- TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D. M.; HIBBETT, D. S.; FISHER, M. C. Phylogenetic species recognition and species concepts in Fungi. **Fungal Genetics and Biology**, New York, v.31, p.21-32, 2000.
- TEMPLETON, A.R. Nested clade analysis of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. **Molecular Ecology**, Edinburgh, v.7, p.381-397, 1998.
- THOMPSON, J. D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nuclei Acids Research**, Bethesda, v.25, p. 4876-4882, 1997.
- TUITE, J. Plant pathological methods: fungi and bacteria. Minneápolis: Burgess, 1969, p.239.
- WATTERSON, G. A. On the number of segregating sites in genetic models without recombination. **Theoretical Population Genetics**, Medline, v.7, p.256-276, 1975
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. & WHITE, T. J. (Eds). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.** San Diego, CA, USA: Academic Press, 1990, p.315-322.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, Bethesda, v.18, p.6531–6535, 1990.