

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**A ORIGEM DE POPULAÇÕES EMERGENTES DO
PATÓGENO DA QUEIMA-DA-FOLHA (*Rhizoctonia solani*
AG-1 IA) DA *Urochloa* SPP. NA AMAZÔNIA E SEU
POTENCIAL DE ADAPTAÇÃO A OUTROS
AGROECOSSISTEMAS BRASILEIROS**

Edisson Chavarro Mesa
Biólogo

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**A ORIGEM DE POPULAÇÕES EMERGENTES DO
PATÓGENO DA QUEIMA-DA-FOLHA (*Rhizoctonia solani*
AG-1 IA) DA *Urochloa* SPP. NA AMAZÔNIA E SEU
POTENCIAL DE ADAPTAÇÃO A OUTROS
AGROECOSSISTEMAS BRASILEIROS**

Edisson Chavarro Mesa

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini

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

Chavarro Mesa, Edison.

C512o A origem de populações emergentes do patógeno da queima-da-folha (*Rhizoctonia solani* AG-1 IA) da *Urochloa* spp. na Amazônia e seu potencial de adaptação a outros agroecossistemas brasileiros / Edison Chavarro Mesa. -- Jaboticabal: [s.n.], 2015
x, 127 p. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária. Especialidade: Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), 2015

Orientador: Paulo Cezar Ceresini

Banca Examinadora: Daniel Augusto Schurt, Alessandra Alvez de Souza, Antonio de Goes, Tiago Santana Balbuena

Inclui bibliografia

1. *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. 2. Origem de patógenos emergentes.
3. Fluxo gênico. 4. Adaptabilidade evolutiva. 5. Etiologia. 6. Filogenia.

CDU 631.52:519.2

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: A ORIGEM DE POPULAÇÕES EMERGENTES DO PATÓGENO DA QUEIMA-DA-FOLHA (Rhizoctonia solani AG-1 IA) DA UROCHLOA SPP. NA AMAZÔNIA E SEU POTENCIAL DE ADAPTAÇÃO A OUTROS AGROECOSSISTEMAS BRASILEIROS

AUTOR: EDISSON CHAVARRO MESA

ORIENTADOR: Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI

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



Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI

Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



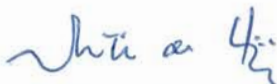
Prof. Dr. DANIEL AUGUSTO SCHURT

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Boa Vista/RR



Profa. Dra. ALESSANDRA ALVES DE SOUZA

Instituto Agrônomo de Campinas / Cordeiropolis/SP



Prof. Dr. ANTONIO DE GOÊS

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. TIAGO SANTANA BALBUENA

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 30 de março de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Edisson Chavarro Mesa - nascido em 9 de novembro de 1978, em Bogotá - Colômbia. É biólogo formado em 2005 pela *Universidad INCCA de Colombia*. Concluiu o mestrado em Ciências Agrárias com ênfase em Fitopatologia pela *Universidad Nacional de Colombia*, em 2012. Em março de 2012 iniciou o Doutorado em Agronomia, área de Genética e Melhoramento de Plantas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Campus de Jaboticabal, com bolsa de estudo de doutorado outorgada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP. Executou sua tese na UNESP no Campus de Ilha Solteira - Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos, orientado pelo professor Dr. Paulo Cezar Ceresini, durante o período de março de 2012 a abril de 2015. Entre os anos de 2003 a 2012 trabalhou no *Instituto Colombiano Agropecuario* - ICA na área de diagnóstico e caracterização molecular de fitopatógenos.

A meus filhos, Samara Chavarro Perez e Tomas Chavarro Perez, com todo meu amor porque vocês são minha luz

DEDICO

A Minha mãe Alba Leonor Mesa Espinoza

A Minha esposa Adriana Y. Perez Barragan

Minha fortaleza vem de vocês

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini pela orientação, ensinamentos, amizade e oportunidade de realizar este trabalho. Pelas valiosas contribuições nesta tese e em minha formação profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão de auxílio à Pesquisa (2011/50150-3) e bolsa de Doutorado (2011/23050-8) e ao CNPq pela concessão de auxílios (481756/2010-8, 485244/2012-8 e 454543/2013-1) e de bolsa de Pesquisador Pq2 (307361/2012-8).

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal (FCAV), e Ilha Solteira (DEFERS) pelo agradável convívio e ensinamentos proporcionados. A todos os funcionários que me acompanharam nesta caminhada.

Aos membros da banca pertencentes à UNESP-FCAV, Prof. Dr. Antonio de Goes e Prof. Dr. Tiago Santana Balbuena, e aos membros externos, Dra. Alessandra Alves de Souza (APTA/IAC) e Dr. Daniel Augusto Shurt (EMBRAPA Roraima), pelas contribuições nesta tese.

Ao Dr. Daniel A. Shurt da EMBRAPA Roraima pela colaboração na amostragem e acolhimento na cidade de Boa Vista.

À Lina Maria Ramos Molina, pela mensagem fundamental no início desta caminhada.

Ao Danilo Augusto Pereira, pela valiosa amizade: você é um amigo de verdade, meu irmão.

Aos integrantes do Laboratório de Fitopatologia UNESP - Ilha Solteira: Nadia Poloni, Juliana Reges, Vanina Castroagudín, Izabela Lopes, Samara Campos, Samanta Oliveira, Adriano Dorigan, Matheus Negrisoni, Mauro Pegolo e Diego Feitosa, pela amizade e companheirismo.

A meus amigos de Ilha solteira e Jaboticabal: Flavio Franzin, Lucas Marteli, Bruno Souza, Ismael Junior, Régis Fialho, Leonardo Webertom e Leandro Bomfim, Fernando Hernadez, Jhonathan Aziel, Leonardo Oliveira, Ricardo Tomas, Donisete Gonçalves, Julio Spada, Vinicius Guissi, Fábio Ramos, Marcos Moreira, Vinícius Tabet, Elís Pinhero, Joaci Cazari, Clissia Oliveira, Junior Cazari, Camilo Carranza, Augusto Rueda, Frank Ibarra, Mauricio Cabrera, Jorge Ibarra, Julian Ramirez, Hugo Ruiz, Sergio Guarin, Patrícia Lopez, Johana Cano, Paola Lopez, Juan Caicedo, Sonia Villamizar, Dora Tovar e Angela Niño. Obrigado. Vocês fizeram meus dias mais alegres quando longe de meu país.

A todos que, de alguma forma, contribuíram e me ajudaram, meus sinceros agradecimentos.

A DEUS.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT.....	3
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	5
REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO 2 – A ETIOLOGIA DE DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS DO GÊNERO <i>Rhizoctonia</i> EM CULTURAS SIMPÁTRICAS DE ARROZ, <i>Urochloa brizantha</i> , FEIJÃO-CAUPI E SOJA NA AMAZÔNIA, NOS CERRADOS BRASILEIROS E NAS VÁRZEAS DO VALE DO PARAÍBA.....	15
RESUMO	15
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	17
MATERIAL E MÉTODOS	19
RESULTADOS.....	23
DISCUSSÃO	26
REFERÊNCIAS	31
TABELA E FIGURA	38
CAPÍTULO 3 – ORIGIN OF EMERGING POPULATIONS OF THE LEAF BLIGHT AND COLLAR ROT PATHOGEN <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA ON <i>UROCHLOA</i> PASTURES FROM BRAZILIAN AMAZON AND COLOMBIAN LLANOS.....	54
ABSTRACT	55

INTRODUCTION	56
MATERIALS AND METHODS	60
RESULTS	67
DISCUSSION.....	71
ACKNOWLEDGMENTS	76
LITERATURE CITED	76
TABLES AND FIGURES	88
CAPÍTULO 4 – EVOLUÇÃO ACELERADA DAS ENZIMAS DEGRADADORAS DE PAREDE CELULAR DE PLANTAS EXPLICAM A ADAPTAÇÃO CONTEMPORÂNEA DO FUNGO <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA EM DISTINTOS HOSPEDEIROS	99
RESUMO	99
ABSTRACT	100
INTRODUÇÃO	101
MATERIAL E MÉTODOS	104
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	107
CONCLUSÕES.....	110
REFERÊNCIAS	111
TABELAS.....	117
FIGURA.....	125

A ORIGEM DE POPULAÇÕES EMERGENTES DO PATÓGENO DA QUEIMA DA FOLHA (*Rhizoctonia solani* AG-1 IA) DA *Urochloa* SPP. NA AMAZÔNIA E SEU POTENCIAL DE ADAPTAÇÃO A OUTROS AGROECOSSISTEMAS BRASILEIROS

RESUMO – No início dos anos 90, o fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA emergiu como um patógeno importante associado à queima foliar e podridão do coleto em pastagens do gênero braquiária (*Urochloa* spp.), na América do Sul. Este fungo surgiu pela primeira vez na Colômbia em áreas onde o cultivo de arroz (um hospedeiro altamente suscetível ao fungo) foi substituído por *Urochloa*, em resposta ao aumento da demanda por pecuária extensiva. *Urochloa* é uma forrageira de extrema importância para a pecuária da América Latina tropical. Descrito na primeira parte de nosso estudo, um amplo levantamento foi realizado na Amazônia nos estados do Pará, Rondônia, Roraima, e nos Cerrados de Mato Grosso e em áreas de várzeas do Vale do Paraíba, em São Paulo, entre 2012 e 2013. Nossas descobertas revelaram que *Rhizoctonia solani* AG-1 IA predominou como patógeno associado à queima-da-folha da braquiária no bioma Amazônico Brasileiro, especialmente em Rondônia. Na segunda parte de nosso estudo, descrevendo a estrutura genética de populações de *R. solani* AG-1 IA que infectam braquiária, arroz ou soja, testou-se a hipótese de que a emergência desse patógeno ocorreu devido a troca ou pulo de hospedeiros, dada a sobreposição geográfica de espécies hospedeiras. Para estudar a estrutura genética das populações, um total de 335 isolados de *R. solani* AG-1 IA foram coletados de campos de *U. brizantha*, de *Urochloa* híbrido Mulato, de arroz ou de soja, na Colômbia ou no Brasil. Esses isolados foram genotipados usando nove loci microssatélites. Padrões históricos de migração entre populações hospedeiro-distintas indicaram a origem provável das populações atuais que infectam braquiária na Colômbia, a partir de população que originalmente infectava o arroz. No Brasil, em contraste, não foi possível estabelecer o mesmo padrão claro assimétrico de migração histórica, uma vez que a migração entre as populações brasileiras de *R. solani* AG-1 IA da braquiária, da soja ou do arroz foram semelhantes em magnitude (média de 20 migrantes/geração). A análise filogeográfica multigênica indicou que o ancestral comum mais provável para ambas

as populações teve origem de população que infecta o arroz. Um sistema reprodutivo misto (que inclui a reprodução sexuada e a dispersão de clones adaptados) caracterizou as populações de *R. solani* AG-1 IA que infectam a braquiária. O patógeno isolado de braquiária apresentou indícios de especialização ao hospedeiro, porém mantém a habilidade de saltar entre poáceas e fabáceas hospedeiras. Finalmente, estudamos a evolução de enzimas degradadoras de parede celular de plantas (*EDPCPs*), identificadas como fatores essenciais de patogenicidade em *R. solani* AG-1 IA. A evolução acelerada das *EDPCPs* foi indicada como provável fator responsável pela adaptação de *R. solani* AG-1 IA para se especializar em hospedeiros filogeneticamente distintos, nas poáceas e fabáceas. Mais especificamente, a seleção balanceadora atuou sobre os genes *EDPCPs* em *Urochloa* sp.

Palavras chave: Fitopatógenos emergentes no agroecossistema, adaptação ecológica, *Brachiaria*, fungos fitopatogênicos, estrutura genética de populações, evolução acelerada de enzimas degradadoras de parede celular de plantas

THE ORIGIN OF THE EMERGING POPULATIONS OF THE BRACHIARIA COLLAR ROT PATHOGEN (*Rhizoctonia solani* AG-1 IA) IN THE AMAZON AND ITS POTENTIAL FOR ADAPTATION TO OTHER BRAZILIAN AGROECOSYSTEMS

ABSTRACT – The fungus *Rhizoctonia solani* AG-1 IA emerged in the early 1990s as an important pathogen causing leaf blight and collar rot on pastures of the genus *Urochloa* (signalgrass) in South America. This pathogen first emerged in Colombia in areas where rice, a host highly susceptible to the fungus, was replaced with *Urochloa* in response to increased demand for extensive livestock farming. *Urochloa* is an extremely important forage grass crop for livestock farming in tropical Latin America. Described in the first part of our study, a broad survey was conducted in the Amazon in Pará, Rondônia, Roraima states and in Mato Grosso Cerrado areas, and paddy plains in the Paraíba Valley, in São Paulo, between 2012 and 2013. Our findings revealed that *R. solani* AG-1 IA was the predominant pathogen associated with the leaf blight on *Urochloa* in the Brazilian Amazon biome, especially in Rondônia. In the second part of our study, describing the population genetic structure of different host and regional populations of *R. solani* AG-1 IA infecting *Urochloa*, rice and soybean, we tested the hypothesis that the emergence of this pathogen occurred due to host shift or jump as a result of geographical overlapping of the host species. To study the genetic structure of populations, a total of 335 *R. solani* AG-1 IA isolates were sampled from fields of *U. brizantha*, *Urochloa* hybrid Mulato, rice and soybeans in Colombia and Brazil. These isolates were genotyped using nine microsatellite loci. The historical patterns of migration of populations from different hosts indicated that the populations currently infecting *Urochloa* in Colombia most likely originated from a population that originally infected rice. In contrast, in Brazil a similar clear asymmetric pattern of historical migration was not established because the migration rates among Brazilian *R. solani* AG-1 IA populations from *Urochloa*, soybean and rice were all symmetric in magnitude (average 20 migrants/generation). Multigene phylogeographic analysis indicated that for both Brazilian and Colombian *Urochloa*-adapted populations of *R. solani* AG-1 IA, the most likely ancestor originated from a population infecting rice. A mixed reproduction system including both sexual

reproduction and dispersal of adapted clones characterized the *R. solani* AG-1 IA populations infecting *Urochloa*. The pathogen isolated from *Urochloa* exhibited evidence of incipient host specialization despite the fact that it has the ability to jump between Poaceae and Fabaceae hosts. Finally, we studied the evolution of plant cell wall degrading enzymes (*PCWDEs*), identified as essential pathogenicity factors for *R. solani* AG-1 IA. An accelerated evolution of *PCWDEs* was indicated as the most probable factor responsible for the specialization and adaptation of *R. solani* AG-1 IA to phylogenetically distinct hosts from the Poaceae and Fabaceae families. More specifically, that balancing selection acted on *PCWDEs* genes as a result of the contemporary adaptation of *R. solani* AG-1 IA to *Urochloa* grass.

Key-words: Emerging pathogens in the agroecosystem, ecological adaptation, *Brachiaria*, plant pathogenic fungi, population genetic structure, accelerated evolution of plant cell wall degrading enzymes

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Em condições naturais, o fungo basidiomiceto *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (fase assexuada *Rhizoctonia solani* Kühn) causa várias doenças foliares em culturas de importância agrícola e em espécies nativas no bioma Amazônico (LOURD et al., 1984; TRINDADE et al., 1997; POLTRONIERI et al., 1999; GASPAROTTO et al., 2001). A espécie multinucleada *R. solani* Kühn é conhecida como patógeno de diversas plantas cultivadas (OGOSHI, 1987) e é descrita como um complexo de espécies divididas em grupos de anastomose (AGs) geneticamente diferentes, cujas populações têm alta diversidade morfológica, patogênica e fisiológica (OGOSHI, 1987; SNEH et al., 1991; KUNINAGA et al., 1997; GONZALEZ et al., 2001).

Dentro do complexo de espécies *R. solani*, o grupo de anastomose 1 (AG-1) se destaca por agrupar patógenos que afetam negativamente uma ampla gama de culturas hospedeiras de importância mundial. Em Fabáceas, o complexo AG-1 causa a mela, doença economicamente importante, especialmente para o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado em áreas de alta e baixa altitude na América Latina e Caribe (GALVEZ et al., 1989), para o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L. Walp.)] e para a soja (*Glycine max* L. Merrill), cultivados no agroecossistema Amazônico (FENILLE et al., 2002; FENILLE et al., 2003; CIAMPI et al., 2005).

Especialmente em feijoeiro comum cultivado na América Latina, a mela é causada principalmente por cinco subgrupos geneticamente distintos: AG-1 IA, AG-1 IB, AG-1 IE, AG-1 1F e AG-2-2 WB (GODOY-LUTZ et al., 2008), e em menor proporção pelo AG-4 e o AG-2-2 IV (GALVEZ et al., 1989; CARLING et al., 2002).

Os isolados pertencentes aos subgrupos AG-1 IE e AG-1 IF são os mais comuns e virulentos e, além disso, também tendem a superar cultivares de feijoeiro com resistência parcial (GODOY-LUTZ et al., 1996; BEAVER et al., 2008). As principais fontes de inóculo são: micélio, escleródios, plantas infectadas, solo e basidiósporos (CARDENAS, 1989). Em condições de campo, os isolados AG-1 IE e AG-1 IF produzem micélio e escleródios em abundância, espalhando-se pela água, solo contaminado e sementes para locais distantes contribuindo para a propagação clonal do fungo (CARDENAS, 1989; GALVEZ et al., 1989). Não há dados sobre a ocorrência e distribuição destes AGs em feijoeiro comum no Brasil.

Em feijão-caupi, *R. solani* AG-1 IA foi relatado como o principal patógeno associado à cultura em Roraima, na Amazônia brasileira. Em condições de campo, a doença causa desfolha de 3 a 80% em linhagens de feijão-caupi de porte ereto (NECHET et al., 2005; NECHET & HALFELD-VIEIRA, 2006) (Figura 1). O fungo *R. solani* AG-1 IA foi também relatado como o principal agente causal da mela da soja no agroecossistema Amazônico (Figura 1), principalmente nos estados do Mato Grosso, Tocantins, Pará e Maranhão (FENILLE et al., 2002; FENILLE et al., 2003; CIAMPI et al., 2005).

O complexo *R. solani* AG-1 também causa doenças extremamente importantes em plantas poáceas. Na América do Sul o AG-1 IA causa queima da bainha no arroz (BOLKAN & RIBEIRO, 1985; CEDEÑO et al., 1996; COSTA-SOUZA et al., 2007), folha bandeada e queima da bainha no milho, uma doença que aparentemente está restrita à Venezuela (CARDONA et al., 1999; PERDOMO et al., 2007).

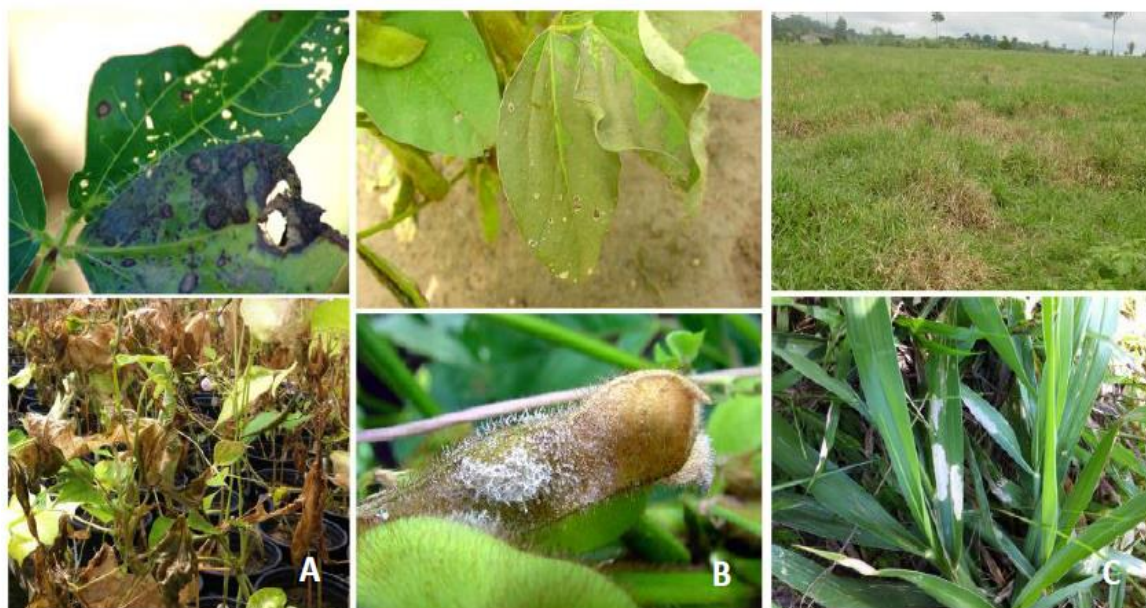


Figura 1. Sintomas característicos do fungo *Rhizoctonia Solani* AG-1 IA, presentes em poáceas e fabáceas **A.** mela no feijão-caupi **B.** mela na soja. **C.** queima-da-folha em *Urochloa* spp. **Fotos:** Bernardo Halfeld-Vieira, Daniel A. Schurt, José R. Vieira Jr. (Embrapa) e Paulo C. Ceresini.

No início dos anos 90, o fungo *R. solani* AG-1 emergiu como um patógeno importante associado à morte de pastagens do gênero *Urochloa* na América do Sul. Este fungo emergiu pela primeira vez na Colômbia, em áreas onde o cultivo de arroz [um hospedeiro altamente suscetível ao fungo (LEE & RUSH, 1983; HASHIBA & KOBAYASHI, 1996)] foi substituído pelo cultivo de *Urochloa*, em resposta à crescente demanda por pecuária extensiva. No Brasil, o fungo foi descrito como um patógeno de *Urochloa* em 1999, mas só recentemente tem sido relatado como um patógeno importante de forrageiras (Figura 1), atacando especificamente *U. brizantha* cv. Marandu nos estados do Acre, Maranhão, norte do Mato Grosso, Rondônia, sul do Pará e Tocantins, todos na região Amazônica, (VERZIGNASSI & FERNANDES, 2001; DUARTE et al., 2007).

Não há relatos históricos ou científicos indicando explicitamente que a emergência de *R. solani* AG-1 como patógeno de pastagens do gênero *Urochloa* no Brasil seguiu fenômeno semelhante ao observado na Colômbia, onde emergiu em áreas anteriormente cultivadas com arroz. Entretanto, é plausível a hipótese de que também a emergência de *R. solani* AG-1 como patógeno de *Urochloa* no Brasil seja resultado da expansão do cultivo de pastagens para áreas adjacentes ou antes cultivadas com hospedeiros suscetíveis ao patógeno, tais como o arroz, o feijão-caupi e a soja (NECHET & HALFELD-VIEIRA, 2006; COSTA-SOUZA et al., 2007).

Na primeira parte de nossa pesquisa determinou-se a etiologia e a distribuição geográfica do complexo *Rhizoctonia* associado à braquiária e a outras culturas no Brasil. Foi testada a hipótese de que os isolados de *R. solani*, provenientes do Pará, de Rondônia e de Roraima, na Amazônia brasileira, dos Cerrados de Mato Grosso, de áreas de várzeas do Vale do Paraíba, em São Paulo, e oriundos de *Urochloa* ou de cultivos adjacentes de arroz, de feijão-caupi ou de soja pertencem ao AG-1 IA. O principal objetivo foi determinar o agente causal da queima-da-folha da *Urochloa* no Brasil e compará-lo com populações simpátricas dos patógenos amostradas de arroz, de feijão-caupi e da soja. Acredita-se que a informação gerada por esta pesquisa oferece importante contribuição para o conhecimento da biologia de *R. solani* AG-1, com implicações importantes para o manejo da doença. Por exemplo, se aceita a hipótese alternativa de que um complexo de patógenos do gênero *Rhizoctonia* está envolvido com a queima-da-folha da *Urochloa*, faz-se necessário selecionar variedades resistentes para mais de um patógeno.

Tendo constatado que *R. solani* AG-1 IA predominou como patógeno associado à *Urochloa* também na Amazônia brasileira, especialmente em Rondônia, na segunda parte de nossa pesquisa buscamos evidências sobre a origem de populações emergentes do patógeno da queima da folha da *Urochloa* (*Rhizoctonia solani* AG-1 IA) na Amazônia brasileira e nos Llanos colombianos.

Testou-se a hipótese de que a emergência desse patógeno ocorreu devido a troca ou pulo de hospedeiros dada a sobreposição geográfica de espécies hospedeiras. Os objetivos específicos deste estudo foram: a) Comparar o nível de similaridade genética entre populações hospedeiro-distintas e regionais de *R. solani* AG-1 IA que infectam braquiária, arroz ou soja; b) Detectar os padrões históricos de migração entre populações de *R. solani* AG-1 IA desses três hospedeiros, na Colômbia ou no Brasil, buscando testar hipótese sobre a origem das populações atuais que infectam braquiária nos dois países; c) Reconstruir a história filogeográfica de linhagens de *R. solani* AG-1 IA da braquiária, do arroz e da soja no Brasil e na Colômbia, baseando-se em três loci de DNA nuclear (*R44L*, *R68L* e *R116*); d) Analisar a estrutura genética de populações de *R. solani* AG-1 IA infectando *Urochloa*, buscando evidências de recombinação sexual; e) Caracterizar a patogenicidade de *R. solani* AG-1 IA de *Urochloa* e do arroz, buscando evidências de especialização de hospedeiros e comparar os níveis de agressividade para a soja e o feijão-caupi dos isolados do patógeno oriundos de *Urochloa*.

Como fitopatógeno necrotrófico, *R. solani* AG-1 IA dispõe de um arsenal de enzimas degradadoras de parede celular de plantas (*EDPCP*), específicas a substratos, e é capaz de degradar componentes da parede celular, rompendo com a defesa das plantas (COOPER, 1983; COOPER et al., 1988; XU et al., 2006). Como

as *EDPCPs* desempenham função crucial tanto na destruição da célula hospedeira como na nutrição do patógeno, é provável que algum tipo de pressão de seleção tenha tido ação significativa no processo de adaptação a substratos específicos em hospedeiros distintos (i.e, a componentes de parede celular vegetal). Postula-se que a adaptação a substratos específicos reduz a diversidade em códons não-sinônimos devido à otimização funcional da atividade enzimática (BRUNNER et al., 2009; BRUNNER et al., 2013).

Nesta última parte da pesquisa, estudou-se um grupo de *EDPCP*, que foram identificadas como fatores de patogenicidade em *R. solani* AG-1 IA: *pectate-lyase B*, *celullase*, *polygalacturonase* e *beta-xylosidase*. A hipótese é que a evolução acelerada dos quatro genes dessas *EDPCPs* está relacionada com a capacidade de adaptação e especialização do fungo *R. solani* AG-1 IA a diferentes hospedeiros, que incluem poáceas e fabáceas. Mais especificamente, hipotetizamos que seleção purificadora atuou de forma semelhante sobre estes quatro genes de *EDPCP*, como resultado da adaptação contemporânea, à *Urochloa*, de populações de *R. solani* AG-1 IA originalmente adaptadas ao arroz ou à soja.

REFERÊNCIAS

BEAVER, J. S. et al. Breeding beans for resistance to web blight. **Annual report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 51, p. 30–31, 2008.

BOLKAN, H. A.; RIBEIRO, W. R. C. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. **Plant Pathology**, v. 69, p. 599-601, 1985.

BRUNNER, P. C. et al. Wheat domestication accelerated evolution and triggered positive selection in the **b**-xylosidase enzyme of *Mycosphaerella graminicola*. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7884, 2009.

BRUNNER, P. C. et al. Coevolution and life cycle specialization of plant cell wall degrading enzymes in a hemibiotrophic pathogen. **Molecular Biology and Evolution**, 2013. doi: 10.1093/molbev/mst041.

CARDENAS, M. R. **Web blight of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) incited by *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk in Colombia**. 1989. (D.Sc.) -, Cornell University.

CARDONA, R. et al. Mancha bandeada en maíz causada por *Rhizoctonia solani* en el estado Portuguesa, Venezuela. **Fitopatologia Venezolana**, v. 12, n. 2, p. 32-33, 1999.

CARLING, D. E. et al. 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**, v. 92, n. 1, p. 43-50, 2002. doi: doi:10.1094/PHYTO.2002.92.1.43.

CEDEÑO, L. et al. *Rhizoctonia solani* AG-1-IA, causa principal del añublo de la vaina del arroz en Venezuela. **Fitopatol. Venez.**, v. 9, p. 6-9 1996.

CIAMPI, M. B. et al. 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**, v. 113, n. 2, p. 183-196, 2005.

COOPER, R. M. The mechanisms and significance of enzymatic degradation of host cell walls by parasites. In: CALLOW (Ed.). **Biochemical plant pathology**. New York: John Wiley, 1983. p.101–135.

COOPER, R. M. et al. Enzymic adaptation of cereal pathogens to the monocotyledonous primary wall. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 32, p. 33-47, 1988.

COSTA-SOUZA, E. et al. Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado ao arroz em Tocantins, Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 33 n. 2, p. 129-136, 2007.

DUARTE, M. D. L. R. et al. Etiologia da podridão do coleto de *Brachiara brizantha* em pastagens da Amazônia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 261-265, 2007.

FENILLE, R. C. et al. Identification of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil by rDNA-ITS sequences. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 413-419, 2003.

FENILLE, R. C. et al. Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 783-792, 2002.

GALVEZ, G. et al. Web blight. In: SCHWARTZ; PASTOR (Ed.). **Bean production problems in the tropics**. Cali: CIAT, 1989. p.195–259.

GASPAROTTO, L. et al. Mancha areolada causada por *Thanatephorus cucumeris* em mogno africano. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 660-661, 2001.

GODOY-LUTZ, G. et al. Characterization of isolates of *R. solani* that cause web blight of common beans in Central America and the Caribbean with implications for disease management. **Annual Reports Bean Improvement Cooperative**, v. 39, p. 154–155, 1996.

GODOY-LUTZ, G. et al. Phylogenetic analysis of *Rhizoctonia solani* subgroups associated with web blight symptoms on common bean based on ITS- 5.8S rDNA. **Journal of General Plant Pathology**, v. 74, p. 32–40, 2008.

GONZALEZ, D. et al. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. **Mycologia**, v. 93, p. 1138-1150, 2001.

HASHIBA, T.; KOBAYASHI, T. Rice diseases incited by *Rhizoctonia* species. In: (Ed.). Dordrecht: Kluwer Academic, 1996. p.331–340. (*Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control).

KUNINAGA, S. et al. Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**, v. 32, n. 3, p. 237-243, 1997.

LEE, F. N.; RUSH, M. C. Rice sheath blight: a major rice disease. **Plant Disease**, v. 67, n. 7, p. 829-832, 1983. doi: 10.1094/PD-67-829.

LOURD, M. et al. Ocorrência da mancha areolada em citrus no município de Manaus-AM. **Fitopatologia Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 135, 1984.

NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp., associados à mela do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), coletados em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 505-508, 2006.

NECHET, K. L. et al. Avaliação da resistência de genótipos de feijão-caupi à mela (*Rhizoctonia solani*) no cerrado de Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 81, 2005.

OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, n. 1, p. 125-143, 1987. doi: 10.1146/annurev.py.25.090187.001013.

PERDOMO, R. et al. Caracterización y evaluación de virulencia en aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn, causante de la mancha bandeada en maíz. **Interciencia**, v. 32, n. 1, p. 48-55, 2007.

POLTRONIERI, L. S. et al. Web Blight (*Thanatephorus cucumeris*) in passion fruit in the state of Pará of Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 92, 1999.

SNEH, B. et al. **Identification of *Rhizoctonia* species**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1991. 133 p.

TRINDADE, D. R. et al. Mancha areolada causada por *Thanatephorus cucumeris* em laranjeiras no estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 115, 1997.

VERZIGNASSI, J. R.; FERNANDES, C. D. **Doenças em forrageiras**. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2001. 2p.

XU, J.-R. et al. The Dawn of Fungal Pathogen Genomics. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, n. 1, p. 337-366, 2006. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143412.

CAPÍTULO 2 - A etiologia de doenças causadas por fungos do gênero *Rhizoctonia* em culturas simpátricas de arroz, *Urochloa brizantha*, feijão-caupi e soja na Amazônia, nos Cerrados Brasileiros e nas várzeas do Vale do Paraíba

RESUMO - A queima-da-folha, a queima-da-bainha e a mela são doenças foliares comuns de grande importância no agroecossistema Amazônico, especialmente em lavouras de arroz, feijão-caupi e soja. Já a queima-da-folha de *Urochloa* emergiu recentemente na região, tendo, possivelmente, se originado de culturas adjacentes de um dos hospedeiros citados. Para esclarecer a etiologia dos agentes causais associados à queima-da-folha, queima-da-bainha ou à mela, um amplo levantamento foi realizado na Amazônia nos estados do Pará, Rondônia, Roraima, e nos Cerrados de Mato Grosso e em áreas de várzeas do Vale do Paraíba, em São Paulo, entre 2012 e 2013. Objetivou-se determinar a importância relativa dos principais AGs de *R. solani* associados a estas culturas. Testou-se a hipótese de que *R. solani* AG-1 IA é o principal agente causal deste grupo de doenças e a hipótese alternativa de que outros grupos de anastomoses do patógeno estão associados a estas doenças. Nossos dados evidenciaram a etiologia complexa das doenças causadas por fungos do gênero *Rhizoctonia* nestas regiões. De maneira inédita, esses resultados indicaram que *R. solani* AG-1 IA predominou como patógeno associado à queima-da-folha da braquiária no bioma Amazônico Brasileiro, especialmente em Rondônia. Detectou-se, também, que um novo subgrupo de *R. solani* (o AG-1 IF), relatado no Brasil, é o principal agente causal da mela em feijão-caupi e soja em Roraima. Ainda em Roraima, em proporção muito menor, constatou-se a ocorrência do AG-1 ID. Nos cerrados de Mato Grosso predominou *R. oryzae*, espécie filogeneticamente distinta do complexo *R. solani*, causando queima da base dos perfilhos de *Urochloa brizantha*. Já o fungo *R. oryzae-sativae* predominou em áreas de arroz em várzeas do Vale do Paraíba em São Paulo.

Palavras-chaves: *Brachiaria*, patógenos emergentes no agroecossistema, *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, *Rhizoctonia solani* AG-1 ID, *Rhizoctonia solani* AG-1 IF, *Rhizoctonia oryzae*, *Rhizoctonia oryzae-sativae*

The etiology of diseases caused by fungi from the *Rhizoctonia* genus on sympatric rice, *Urochloa brizantha* cowpea or soybean crops in the Amazon, the Cerrado and the Brazilian Paraíba Valley floodplains.

ABSTRACT - Leaf blight, sheath blight and web blight are foliar diseases of great importance in the Amazon agro-ecosystem, especially on rice, cowpea and soybean crops. In this region, *Urochloa* leaf blight has emerged recently, and it has possibly originated from adjacent crops of one of the previously mentioned hosts. To clarify the etiology of leaf blight, sheath blight and web blight, a broad survey was conducted in the Amazon in Pará, Rondônia, Roraima and Mato Grosso Cerrado areas, and paddy plains in the Paraíba Valley, in São Paulo, between 2012 and 2013. The objective of this work was to determine the relative importance of the main AGs of *R. solani* associated with these diseases on *Urochloa*, cowpea, soybean and rice crops. We tested the hypothesis that *Rhizoctonia solani* AG-1 IA is the main causal agent of this group of diseases, and the alternative hypothesis that other anastomosis groups of this pathogen are associated with the diseases. Our findings revealed that these diseases caused by fungi of the genus *Rhizoctonia* have a complex etiology. For the first time, we reported here that *R. solani* AG-1 IA was the predominant pathogen associated leaf blight in *Urochloa* in the Brazilian Amazon biome, especially in Rondônia. In addition, a subgroup of *R. solani* (AG-1 IF) not previously reported in Brazil, showed to be the causal agent of leaf blight on cowpea and soybean, in Roraima. Also in Roraima, in a much smaller proportion, a second *R. solani* AG 1 subgroup (AG-1 ID) was detected. In Mato Grosso area, *R. oryzae*, a phylogenetically distinct species of *R. solani* complex, was the predominant fungi sampled, and it was associated with collar rot on *Urochloa brizantha*. On the other hand, *R. oryzae-sativae* was the

predominant pathogen recovered from rice samples from the paddy plains in the Paraíba Valley, SP.

Key-words: *Brachiaria*, emerging pathogens in the agroecosystem, *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, *Rhizoctonia solani* AG-1 ID, *Rhizoctonia solani* AG-1 IF, *Rhizoctonia oryzae*, *Rhizoctonia oryzae-sativae*

INTRODUÇÃO

Em condições naturais, o fungo basidiomiceto *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (fase assexuada *Rhizoctonia solani* Kühn) causa várias doenças foliares em culturas de importância agrícola e em espécies nativas no bioma Amazônico (Lourd et al., 1984, Poltronieri et al., 1999, Trindade et al., 1997, Gasparotto et al., 2001). A espécie multinucleada *R. solani* Kühn é conhecida como patógeno de diversas plantas cultivadas (Ogoshi, 1987) e é descrita como um complexo de espécies dividida em grupos de anastomose (AGs) geneticamente diferentes, cujas populações têm alta diversidade morfológica, patogênica e fisiológica (Kuninaga et al., 1997, Ogoshi, 1987, Sneh et al., 1991, Gonzalez et al., 2001).

Dentro do complexo de espécies *R. solani*, o grupo de anastomose 1 (AG-1) se destaca por agrupar patógenos que afetam uma ampla gama de culturas hospedeiras de importância mundial. Em fabáceas o complexo AG-1 causa a mela, doença economicamente importante, especialmente para o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado em áreas de alta e baixa altitude na América Latina e Caribe (Galvez et al., 1989), para o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L. Walp.)] e para a soja (*Glycine max* L. Merrill) cultivados no agroecossistema Amazônico (Fenille et al., 2003, Fenille et al., 2002, Ciampi et al., 2005).

Especialmente em feijoeiro comum cultivado na América Latina a mela é causada principalmente por cinco subgrupos geneticamente distintos: AG-1 IA, AG-1 IB, AG-1 IE, AG-1 1F e AG-2-2 WB (Godoy-Lutz et al., 2008), e em menor proporção pelo AG-4 e o AG-2-2 IV (Carling et al., 2002, Galvez et al., 1989). Os isolados pertencentes aos subgrupos AG-1 IE e AG-1 IF são os mais comuns e virulentos e, além disso, também tendem a infectar cultivares de

feijoeiro com resistência parcial (Beaver et al., 2008, Godoy-Lutz et al., 1996). As principais fontes de inóculo são: micélio, escleródios, plantas infectadas, solo e basidiósporos (Cardenas, 1989). Em condições de campo, os isolados AG-1 IE e AG-1 IF produzem micélio e escleródios em abundância, espalhando-se pela água, solo contaminado e sementes para locais distantes, contribuindo para a propagação clonal do fungo (Galvez et al., 1989, Cardenas, 1989). Não há dados sobre a ocorrência e distribuição destes AGs em feijoeiro comum no Brasil,

Em feijão-caupi, *R. solani* AG-1 IA foi relatado como o principal patógeno associado à cultura em Roraima, na Amazônia brasileira. Em condições de campo, a doença causa desfolha de 3 a 80% em linhagens de feijão-caupi de porte ereto (Nechet et al., 2005, Nechet & Halfeld-Vieira, 2006). O fungo *R. solani* AG-1 IA foi também relatado como o principal agente causal da mela da soja no agroecossistema Amazônico, principalmente nos estados do Mato Grosso, Tocantins, Pará e Maranhão (Fenille et al., 2003, Fenille et al., 2002, Ciampi et al., 2005).

O complexo *R. solani* AG-1 também causa doenças extremamente importantes em plantas poáceas. Na América do Sul o AG-1 IA causa queima da bainha no arroz (Bolkan & Ribeiro, 1985, Costa-Souza et al., 2007, Cedeño et al., 1996), folha bandeada e queima da bainha no milho [doença que aparentemente está restrita à Venezuela] (Cardona et al., 1999, Perdomo et al., 2007).

No início dos anos 90, o fungo *R. solani* AG-1 emergiu como um patógeno importante associado à morte de pastagens do gênero *Urochloa* na América do Sul. Este fungo emergiu pela primeira vez na Colômbia, em áreas onde o cultivo de arroz, um hospedeiro altamente suscetível ao fungo (Lee & Rush, 1983, Hashiba & Kobayashi, 1996), foi substituído pelo cultivo de *Urochloa*, em resposta à crescente demanda por pecuária extensiva. No Brasil, o fungo foi descrito como um patógeno de *Urochloa* em 1999, mas só recentemente tem sido relatado como um patógeno importante de forrageiras, atacando especificamente *U. brizantha* cv. Marandu nos estados do Acre, Maranhão, norte do Mato Grosso, Rondônia, sul do Pará e Tocantins, todos na região Amazônica, (Verzignassi & Fernandes, 2001, Duarte et al., 2007).

Não há relatos históricos ou científicos indicando que a emergência de *R. solani* AG-1 como patógeno de pastagens do gênero *Urochloa* no Brasil seguiu fenômeno semelhante ao observado na Colômbia, onde emergiu em áreas anteriormente cultivadas com arroz. Entretanto, é plausível a hipótese de que também a emergência de *R. solani* AG-1 como patógeno de *Urochloa* no Brasil seja resultado da expansão do cultivo de pastagens para áreas adjacentes ou antes cultivadas com hospedeiros suscetíveis, tais como o arroz, o feijão-caupi e a soja (Costa-Souza et al., 2007, Nechet & Halfeld-Vieira, 2006).

Neste estudo foi testada a hipótese de que os isolados de *R. solani*, provenientes do Pará, de Rondônia e de Roraima, na Amazônia brasileira, dos Cerrados de Mato Grosso, de áreas de várzeas do Vale do Paraíba, em São Paulo, e oriundos de *Urochloa* ou de cultivos adjacentes de arroz, de feijão-caupi ou de soja pertencem ao AG-1 IA. O principal objetivo foi determinar o agente causal da queima-da-folha da *Urochloa* no Brasil e compará-lo com populações simpátricas dos patógenos amostradas de arroz, de feijão-caupi e da soja. Acredita-se que a informação gerada por esta pesquisa oferece importante contribuição para o conhecimento da biologia de *R. solani* AG-1, com implicações importantes para o manejo da doença. Por exemplo, se aceita a hipótese alternativa de que um complexo de patógenos do gênero *Rhizoctonia* está envolvido com a queima-da-folha da *Urochloa*, faz-se necessário selecionar variedades resistentes para mais de um patógeno. Os resultados desta pesquisa também são importantes para estudos objetivando determinar a origem de populações emergentes de *R. solani* AG-1 associados à *Urochloa* na Amazônia.

MATERIAL E MÉTODOS

Levantamento e amostragem de populações de patógenos do gênero Rhizoctonia associados à Urochloa e a outros cultivos adjacentes na Amazônia, nos Cerrados brasileiros e no Vale do Paraíba. Um total de 1292 amostras foram coletadas nos estados do Pará (PA), Roraima (RR) e Rondônia (RO), no bioma Amazônico, nos Cerrados de Mato Grosso (MT) e no Vale do Paraíba, em São Paulo (SP) (Tabela 1). Diversas populações simpátricas

foram amostradas: quinze de braquiária, oito de soja, duas de feijão-caupi e sete de arroz. As amostras populacionais foram coletadas entre Julho de 2012 e Agosto de 2013, de seis a oito focos/linha de cultivo, espaçadas de cerca de 10 m por foco, num total de cinco linhas por campo, seguindo o método de amostragem por transecto (McDonald, 1997). O objetivo inicial foi obter cerca de 30 a 40 isolados do patógeno por população.

Isolamento dos patógenos, Fragmentos de lesões foliares desinfestados superficialmente foram transferidos para meio de cultivo ágar-água (AA) alcalino (pH 8,5), e incubados a 25°C, na ausência de luz, por 24 h. Os crescimentos miceliais característicos de *Rhizoctonia* spp. obtidos foram purificados para meio seletivo (Ko & Hora, 1971) e, posteriormente, transferidos para meio de batata-dextrose-ágar (BDA) (Tuite, 1969), para produção de escleródios visando preservação das colônias por longo prazo. Escleródios de culturas com cerca de 10 dias de cultivo foram transferidos para tubos contendo sílica gel esterilizada e estocados à temperatura de -20°C. Os isolados purificados que não produziram escleródios foram preservados usando-se grãos de arroz parboilizado esterilizado, suplementado com cloranfenicol a 0,050 g.L⁻¹ (Sneh & Adams, 1996). Após cerca de dez dias de incubação, os grãos colonizados pelo fungo foram transferidos para tubos contendo sílica gel e armazenados a -20°C.

Identificação molecular dos patógenos para determinação da etiologia dos fungos do gênero Rhizoctonia associados à braquiária, arroz, soja ou feijão-caupi. Para produção de micélio do fungo, os isolados foram cultivados no meio de cultivo líquido de BDA + estreptomicina (0,050 g.L⁻¹) e cloranfenicol (0,050 g.L⁻¹) por cinco dias, a 25°C e agitação constante a cerca de 75 rpm. A extração de DNA genômico do micélio dos isolados dos fungos foi efetuada utilizando-se o Genelute Plant Genomic DNA Mini kit (Sigma-Aldrich® Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

De forma geral, para identificação das espécies de fungos amostradas em nosso estudo, procedeu-se à amplificação da região ITS-5,8S do rDNA por meio de reações da polimerase em cadeia (PCR), utilizando-se condições

descritas anteriormente (Gonzalez et al., 2001, Ciampi et al., 2005, Ramos Molina, 2012). Amplificações iniciais foram efetuadas usando-se o conjunto de iniciadores (*primers*) ITS4/ITS5. Os produtos de PCR foram enviados e submetidos à reação de sequenciamento (Macrogen Inc., Coréia do Sul), utilizando-se sequenciador automático PE Applied Biosystems ABI-3700. As sequências obtidas foram analisadas no programa Geneious (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia) para determinação da qualidade e edição da composição de bases, alinhadas pelo programa computacional ClustalW (Thompson et al., 1997) e comparadas com sequências de todos os AGs de *R. solani*, bem como de outras espécies fúngicas, depositadas no banco de dados do GenBank–NCBI. A busca por sequências similares foi efetuada por BLASTN (nucleotídeo-nucleotídeo), versão 2.2.27 (Altschul et al., 1997).

Posteriormente, para identificação molecular dos isolados de *Rhizoctonia* em larga escala, foram conduzidos testes de reação em cadeia da polimerase (PCR) específica baseados em amplificação seletiva da região ITS-5.8S ou 28S do DNA ribossômico de fungos do complexo *Rhizoctonia* usando iniciadores específicos desenhados para *R. solani* AG-1, no geral, e para AG-1 IA e AG-1 IF. Incluiu-se também, os testes de detecção de *R. oryzae* e de *R. oryzae-sativae*, outros patógenos costumeiramente detectados em poáceas (Johanson et al., 1998). As condições de amplificação e detecção foram as mesmas descritas por Johanson et al., (1998) e Matsumoto, (2002). Os iniciadores utilizados neste estudo encontra-se apresentados no arquivo suplementar e-Xtra 1.

Inferência filogenética de espécies do gênero Rhizoctonia. Uma análise filogenética multigênica foi implementada usando-se os seguintes genes ou regiões gênicas: espaço interno transcrito (ITS): ITS-4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' / ITS-5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3', segunda subunidade maior da polimerase II de RNA (RPB-2): RPB2-6F: 5'-TGGGGYATGGNTTGYCCYGC-3' / RPB2- 7,1R: 5'-CCCATRGCTGYTTMCCCAT-3'; fator de alongação EF-1 α (EF-F): 5'-GATGAGGATAGCGCAGTCAG-3' / EF-R: 5'-CTACAACTGCGGTGGTATCG-3' (Liu & Sinclair, 1992, O'Donnell et al., 2000, Nakatani, 2006). Os isolados utilizados para a reconstrução filogenética estão descritos na Tabela 2.

A reconstrução filogenética foi determinada por meio de análise Bayesiana, usando-se o método de Monte Carlo-Cadeia de Markov, conjugado ao algoritmo de Metrópolis (MCMCMC) com 30,000,000 de gerações, implementado o modelo GTR de substituição de nucleotídeos (modelo de tempo geral reversível ou *general time reversible*), e eliminando-se 25% das árvores iniciais geradas. As análises foram conduzidas utilizando-se o programa MrBayes versão 3.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001).

Patogenicidade de espécies do gênero Rhizoctonia a Urochloa spp. Para se testar a patogenicidade a *U. Brizantha* cv. Piatã, foram selecionadas quatro espécies de fungos do gênero *Rhizoctonia* amostradas de arroz, de soja e de *Urochloa*: *R. solani* AG-1 IA, *R. solani* AG-1 IF, *R. oryzae-sativae* (*Ceratobasidium oryzae-sativae*) e *R. oryzae* (*Waitea circinata*). Foram testados 12 isolados de *R. solani* AG-1 IA de *Urochloa* (ROB3D7, ROB3D8, ROB4A1, ROB4A5, ROB4A7, ROB4A8, ROB4A9, ROB4B7, ROB4B8, ROB4C4, ROB4C5 e ROB4D1), seis isolados de *R. solani* AG-1 IA de soja (ROS1A6, ROS1A9, ROS1B8, ROS1D8, ROS2E1 e ROS2E5) e três isolados cada de *R. solani* AG-1 IF da soja (RR-S1C8-2, RR-S1D3 e RR-S1D5-2), de *R. oryzae-sativae* do arroz (RSC1, RSD3 e RSE1) e de *R. oryzae* de arroz (PINA4, PINA6 e PINA7), totalizando 27 isolados. Foi incluída uma testemunha não inoculada com os patógenos. Os experimentos foram estabelecidos, conduzidos e avaliados de forma similar aos estudos publicados por Bernardes de Assis et al. (2008) e González et al. (2007), como descritos a seguir. *U. brizantha* cv. Piatã foi multiplicada em casa de vegetação, semeando-se em copos descartáveis de 180 mL contendo, como substrato, vermiculita expandida, de textura média, e um grama da fórmula 15-15-20 (NPK). A inoculação das plantas de braquiária foi efetuada 18 dias após a semeadura, transferindo-se um grão de arroz colonizado diretamente para a região da bainha da primeira folha verdadeira. Os copos contendo plantas inoculadas foram transferidos para bandejas e colocados dentro de sacos plásticos transparentes para manter atmosfera de alta umidade, e incubados a 25°C, sob 12 h de luz, até a avaliação. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente ao acaso, com quatro repetições. O experimento foi repetido uma vez. A severidade da doença foi avaliada cinco dias após a inoculação,

fotografando-se pelo menos uma folha infectada por planta. O nível de severidade da doença foi determinado com base na área foliar doente das folhas usando o software para análise de imagens digitais Assess da APS (ASSESS: Image Analysis Software for Plant Disease Quantification; L, Lamari, Department of Plant Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canadá). A análise de variância dos dados foi efetuada usando-se o pacote de software estatístico SAS e os procedimentos PROC MIXED para determinação de F relativo ao efeito geral de tratamentos, CONTRAST para comparar contrastes ortogonais entre grupos de isolados e ESTIMATE para comparar grupos usando o teste t de Student (versão 9.1 do SAS System for Windows, SAS Institute, Cary, Carolina do Norte, EUA).

Gama de hospedeiros e nível de adaptação fenotípica de R. solani AG-1 IF da soja e do feijão caupi a plantas Poaceae. Para testar a gama de hospedeiros e a adaptabilidade fenotípica de *R. solani* AG-1 IF a diferentes hospedeiros, foram selecionados dois grupos de seis isolados cada: o primeiro grupo obtido de soja cv. BRS Tracajá (RRS1A4.2, RRS1A5.2, RRS1A6.2, RRS1A8.2, RRS1B4.2 e RRS1B7.2) e o segundo de feijão-caupi (RRV2A4.2, RRV2B5.2, RRV2B6.2, RRV2B7.2, RRV2C3.2 e RRV2E6.2). Foram testados cinco hospedeiros, em experimentos distintos para cada um: arroz cv. Primavera, *Urochloa brizantha* cv. Toledo, milho cv. Flintisa, feijão-caupi cv. IT86D-719 e soja cv. BRS MG 820 RR. O feijão-caupi e a soja foram inoculadas após 13 ou 17 dias da semeadura. Já a inoculação do arroz, da braquiária e do milho foi realizada aos 18 dias após a semeadura. O delineamento experimental adotado para cada um dos experimentos foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições. Em cada experimento foi incluída uma testemunha não inoculada com os patógenos. O experimento foi repetido uma vez. Os experimentos foram estabelecidos, conduzidos, avaliados e analisados de forma semelhante ao descrito no item anterior.

RESULTADOS

Espécies do gênero Rhizoctonia associadas à Urochloa brizantha e a outros hospedeiros no Brasil. Em busca do principal agente causal da queima-da-folha

da braquiária e comparação com populações simpátricas de patógenos do gênero *Rhizoctonia* amostradas de arroz, de feijão-caupi e da soja, 1292 amostras de plantas infectadas foram amostradas no Brasil nos biomas Amazônico, Cerrado e em várzeas de São Paulo, no Vale do Paraíba. Um total de 684 amostras resultaram em isolamentos positivos de fungos fitopatogênicos (Tabela 1). A informação sobre a ocorrência e a distribuição geográfica das espécies identificadas está disponível no Sistema de Informação Ambiental do Biota - SinBiota, no URL <http://sinbiota.biota.org.br/project/289/> e representada de forma sucinta na Figura 1.

Neste levantamento, 517 amostras apresentaram colônias marrons claras a escura e características morfológicas de micélio semelhantes a fungos do gênero *Rhizoctonia* (Sneh et al., 1991) (Figura 2). Baseando-se em características morfológicas e culturais das colônias de *Rhizoctonia* (Figura 2) e utilizando-se um conjunto de iniciadores específicos para diferentes espécies do gênero (e-Xtra 1), discriminou-se a ocorrência das seguintes espécies (e-Xtra 2): i) *R. solani* AG-1 IA (N = 161) associada principalmente à *Urochloa brizantha* em RO (N = 113), ao arroz, à soja e à braquiária em RR (N = 27), ao arroz e à braquiária no PA (N = 11) e ao arroz no Vale do Paraíba, SP (N = 4); ii) *R. solani* AG-1 ID associada ao feijão-caupi em RR (N = 3); iii) *R. solani* AG-1 IF associada à soja e ao feijão-caupi em RR (N = 132); iv) *R. oryzae* associada ao arroz ou à braquiária em MT, no PA, em RR e em SP (N = 147); v), *R. zeae* associada ao arroz e ao milho apenas no PA (N = 7); vi) *R. oryza-sativae* associada ao arroz no Vale do Paraíba, SP (N = 46). Entre os fungos do gênero *Rhizoctonia* amostrados em menor proporção em nosso levantamento, detectamos também a ocorrência de *Rhizoctonia* spp. binucleadas (N = 21), cuja fase sexuada é *Ceratobasidium* (Sneh et al., 1991).

As restantes 167 amostras corresponderem a fungos de espécies distintas a *Rhizoctonia*. A maioria dessas outras espécies de fungos detectadas (correspondendo a N = 152 espécimes) foram amostradas de populações infectando *U. brizantha* cv. BRS Piatã ou soja BRS Tracajá em RR. Esses fungos produziram micélio inicialmente bem desenvolvido, de rápido crescimento, de cor creme-esbranquiçada e depois tornando-se amarelo clara

a escura (Figura 2). Com base no sequenciamento da região ITS-5.8S do rDNA de exemplares desses fungos associados com sintomas de queima foliar em braquiária ou à mela em soja, foram identificadas três gêneros distintos da família Choanephoraceae: *Poitrasia*, *Blakeslea* e *Choanephora*. Detectamos, ainda, o fungo basidiomiceto *Laetisaria arvalis* (Aphylllophorales, Corticiaceae) que estava presente em amostras de *U. brizanta* cv. Marandu em Paragominas (N = 13), no PA, e um isolado do fungo ascomiceto *Trichoderma koningiopsis* (Hypocreales; Hypocreaceae), obtido de amostras de feijão-caupi de RR. Detectamos, também, um único isolado do fungo basidiomiceto *Sclerotium hydrophilum* (Thelephorales; Typhulaceae), que foi encontrado em várzeas de arroz no Vale do Paraíba, SP. A identificação destes fungos também foi efetuada baseando-se em sequenciamento da região ITS-5.8S do rDNA.

Reconstrução filogenética multigênica mediante análise bayesiana. A árvore filogenética reconstruída com os genes concatenados ITS-5.8S, EF-1 α e RPB-2 retrata a relação entre o complexo *R. solani* AG-1, *R. oryzae-sativae*, *R. oryzae* e *R. zeae* e seus hospedeiros de origem (Figura 3). Nos ramos I e II foram agrupados apenas *R. solani* AG-1. Por sua vez, com suporte *bootstrap* de 99%, o ramo I subdividiu-se em dois clados: AG-1 IF e AG-1 ID. Enquanto os isolados identificados como AG-1 IF foram obtidos de soja ou de feijão-caupi, os do AG-1 ID foram isolados de feijão-caupi, ambos em Roraima. O ramo II também foi subdividido em dois clados: AG-1 1A e AG-1 1E. Isolados de *R. solani* AG-1 1A foram provenientes de arroz, braquiária ou soja, predominantemente de RO, mas também detectados no PA, em RR e em SP. No clado correspondente a AG-1 1E foram agrupados isolados amostrados por Fenille et al. (2003) e Ciampi et al. (2005) em MT, MA e TO.

No ramo III foram agrupados apenas isolados de *R. oryzae-sativae*, todos oriundos de arroz no Vale do Paraíba, SP. O complexo *R. oryzae* e *R. zeae* foi agrupado no ramo IV, não deixando clara a separação entre estas duas espécies (Figura 3). A maioria dos isolados do complexo *W. circinata* foram obtidos de arroz ou braquiária, em quatro dos cinco estados amostrados (MT, PA, RR e SP).

Patogenicidade de espécies do gênero Rhizoctonia à braquiária. Enquanto os isolados de *R. oryzae-sativae* do arroz não causaram sintomas em *U. brizantha* cv. Piatã, o grupo de isolados de *R. oryzae* foi medianamente patogênico cujo nível de severidade de sintoma foi de cerca de 10% de área foliar infectada, em média, (Figuras 4 e 5, e-Xtra 3). Já o grupo de isolados de *R. solani* AG-1 IF da soja também proporcionou baixa severidade de sintoma em *Urochloa* (cerca de 3%), não diferindo significativamente do grupo de *R. oryzae*. Por sua vez, o grupo de isolados de *R. solani* AG-1 IA de soja e de braquiária foram altamente patogênicos a *U. brizantha* cv. Piatã cujo nível de severidade média variou entre 50 e 60% de área foliar infectada, (Figuras 4 e 5, e-Xtra 3), e diferiram significativamente entre si. O grupo de isolados de *R. solani* AG-1 IA de *Urochloa* foi mais agressivo a *U. brizantha* cv. Piatã.

Gama de hospedeiros e nível de adaptação fenotípica de R. solani AG-1 IF da soja e do feijão caupi a plantas Poaceae. Não houve diferença significativa entre os dois grupos de isolados de *R. solani* AG-1 IF da soja (S) e do feijão-caupi (V), os quais foram altamente patogênicos ao milho, à soja e ao feijão-caupi (Figuras 6 e 7, e-Xtra 4). Os valores médios de severidade nesses hospedeiros variaram de 29,7 a 76,5% de área foliar infectada (Figura 6, e-Xtra 4). Por sua vez, o grupo de isolados de *R. solani* AG-1 IF (V) foi significativamente mais agressivo a *Urochloa* que o grupo AG-1 IA (S), embora a severidade da doença causada por AG-1 IF (V) neste hospedeiro tenha sido, em média, relativamente baixa (entre 6 a 10% de área foliar infectada). Já AG-1 IF (S) e (V) foram muito pouco agressivos ao arroz, cujo nível de severidade média de doença foi de 0,8 a 1,2% de área foliar infectada.

DISCUSSÃO

Distribuição geográfica do complexo Rhizoctonia associado à braquiária e a outras culturas no Brasil. Nosso levantamento efetuado no bioma Amazônico brasileiro, nos cerrados de Mato Grosso e em várzeas do Vale do Paraíba em São Paulo, indicou que o principal patógeno associado à queima-da-folha e morte da braquiária, especialmente em Rondônia, é a espécie *Thanatephorus cucumeris* (fase assexuada *R. solani* AG-1 IA, N = 158) (Figura 1; Tabela 1). Isso vai de encontro ao relato de Ramos Molina (2012) que detectou a

predominância de *R. solani* AG-1 IA associado à braquiária em Meta, nos Llanos colombianos. Quanto à patogenicidade de *R. solani* AG-1 IA à braquiária, observou-se que os isolados do AG-1 IA de braquiária do Brasil foram mais patogênicos em *U. brizantha* cv. Piatã que os isolados de soja, sugerindo incipiente especialização de hospedeiro. Fenômeno semelhante de indícios de especialização de *R. solani* AG-1 IA à braquiária foi detectado em populações colombianas do patógeno, uma vez que isolados oriundos de braquiária foram mais agressivos em *U. brizantha* cv. Toledo que os de arroz (dados do próprio autor no capítulo 3).

Não encontrada associada à braquiária, *R. solani* AG-1 IF foi detectado em alta frequência nas culturas do feijão-caupi e da soja em Roraima (N = 132). A ocorrência de *R. solani* AG-1 IF em feijão-caupi e em soja ainda não havia sido relatada no Brasil. O AG-1 IA era o único grupo relatado causando mela, tanto em feijão-caupi, quanto em soja em Roraima (Nechet & Halfeld-Vieira, 2006, Nechet et al., 2008). Por sua vez, há relatos de *R. solani* AG-1 IF associado a fabáceas na América Latina e no Caribe, causando mela em feijão comum (Godoy-Lutz et al., 2008). As análises filogenéticas indicaram divergência clara do AG-1 IF em relação aos demais grupos do complexo AG-1 de *R. solani*, consistente com o descrito na literatura (González et al., 2012, Godoy-Lutz et al., 2008). Nossas observações sobre a gama de hospedeiros de *R. solani* AG-1 IF indicaram que as populações do patógeno adaptadas às plantas fabáceas não são hospedeiro-especializadas, podendo alternar hospedeiros e atacar também poáceas. De fato, *R. solani* AG-1 IF foi bastante agressivo para o milho (Figura 6, e-Xtra 3). Nossa interpretação é de que as populações do patógeno adaptadas às fabáceas feijão-caupi e soja em Roraima poderiam emergir como patógeno importante do milho.

Como exemplo de fenômeno semelhante, pode-se citar a emergência de populações de *R. solani* AG-1 IA do arroz e adaptadas para atacar o milho na Venezuela (González-Vera et al., 2010). As populações de *R. solani* AG-1 IA do milho, consideradas evolutivamente mais recentes, embora apresentassem subdivisão genética em relação às populações do arroz, historicamente compartilharam migrantes e postulou-se sua origem de populações adaptadas

ao arroz na mesma região, via troca de hospedeiro (González-Vera et al., 2010). Considerando a importância que a mancha bandeada e a queima da bainha em milho adquiriu na Venezuela, é imprescindível que se conheça, também, o potencial adaptativo de *R. solani* AG-1 IF de poáceas para infectar o milho e até mesmo a braquiária no Brasil. Pela semelhança entre os patossistemas tropicais sul-americanos associados a *Rhizoctonia*, é provável que processo semelhante ao descrito na Venezuela venha ocorrer também com populações brasileiras do patógeno sob pressão de seleção de magnitude semelhante, por exemplo, sob sistema intensivo de rotação soja - milho.

Dentro do complexo AG-1, detectou-se, também, a ocorrência de *R. solani* AG-1 ID infectando feijão-caupi em Roraima. No Brasil há relato da associação deste AG a diversos hospedeiros na Amazônia brasileira, incluindo outra fabácea hospedeira, o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) (Gaino et al., 2010). Já o grupo AG-1 IE de *R. solani*, embora não tenha sido detectado em nossa amostragem, nossas análises filogenéticas indicaram que o mesmo já tinha ocorrência no Brasil desde 2002 em campos de soja amostrados em Mato Grosso, Tocantins e Maranhão (Fenille et al., 2002, Ciampi et al., 2005, Fenille et al., 2003). O detalhe é que esses isolados foram classificados por Fenille et al. (2003) e Ciampi et al. (2005) como AG-1 IA, pois até então o clado-irmão AG-1 IE não havia sido descrito. Apenas recentemente é que análises filogenéticas revelaram a divergência entre os grupos AG-1 IA e AG-1 IE (González et al., 2012, Godoy-Lutz et al., 2008). O AG-1 IE foi considerado um grupo irmão monofilético independente de AG-1 IA, e especializado a fabáceas, em nosso exemplo, o feijão-caupi e a soja.

Ainda considerando fungos do complexo *Rhizoctonia* amostrados, detectou-se a ocorrência de isolados de *Ceratobasidium* spp. oriundos de arroz, de feijão-caupi, de soja e de *U. brizantha* amostrados no PA, em RR e em SP. O gênero *Ceratobasidium* é considerado filogeneticamente próximo à *Thanatephorus* e agrupa espécies binucleadas de *Rhizoctonia* (Gonzalez et al., 2001, Gonzalez et al., 2006). O potencial patogênico do gênero *Ceratobasidium* para os hospedeiros citados é ainda desconhecido e deve ser investigado, uma vez que as espécies de *Rhizoctonia* binucleadas detectadas no Brasil estão

comumente associadas com controle biológico e não são patogênicas (Ceresini & Souza, 1997, Sneh et al., 1996, Basseto et al., 2008). Entretanto, na Amazônia brasileira há relatos, também, de *Ceratobasidium* spp. fitopatogênicos como a *Rhizoctonia* sp. binucleada AG-R que infecta a seringueira (Gaino et al., 2010).

Por sua vez, foi detectada alta frequência (N = 143) de ocorrência de fungos da espécie *R. oryzae* associados ou a queima-da-base-dos-perfilhos da braquiária ou à manchas da bainha do arroz em MT, no PA, em RR e nas várzeas do Vale do Paraíba, SP (Figura 1; Tabela 1). Este é um patógeno classicamente relatado como associado ao arroz (Johanson et al., 1998), mas que em nosso estudo demonstrou potencial para emergir como patógeno importante da braquiária em função da frequência de ocorrência e dos níveis médios de severidade de doença que ocasionou à *U. brizantha* cv. Piatã (Figura 4 e e-Xtra 2). Apenas no PA detectou-se a ocorrência de *W. circinata* var. *zeae* (*R. zeae*) em milho e em arroz (N = 9). Os fungos *R. oryzae* e *R. zeae* têm sido relatados como associados a doenças de espécies de gramados cultivadas nos Estados Unidos (De la Cerda et al., 2009). Não havia relatos destes patógenos no Brasil.

No caso do arroz de várzea amostrado no Vale do Paraíba, SP detectou-se elevada ocorrência (N = 46) da espécie *Ceratobasidium oryzae-sativae* (fase assexuada *R. oryzae-sativae*) associada ao complexo de doenças da bainha. De forma similar, a espécie *C. oryzae-sativae* representou 71,2% (N = 44) da amostra populacional detectada por Ramos Molina (2012) em campos de arroz na Colômbia.

Em poáceas cultivadas, em especial o arroz, a presença de sintomas semelhantes as manchas e queimas-da-bainha causadas por fungos do gênero *Rhizoctonia*, torna difícil o diagnóstico do agente causal (Cedeño et al., 1996, Johanson et al., 1998, Gutiérrez, 2007). Porém, o diagnóstico é extremamente relevante para estabelecimento de medidas apropriadas de manejo dessas doenças, recomendando-se a utilização de métodos rápidos para detecção dos patógenos baseados em reação de PCR com *primers* específicos, como os

utilizados em nosso estudo (Johanson et al., 1998, Pascual et al., 2000, Sayler & Yang, 2007, Matsumoto, 2002).

Outras espécies de fungos detectados e sua relevância. Entre outros fitopatógenos amostrados, detectou-se a ocorrência de um exemplar de *Sclerotium hydrophilum* associado ao complexo de doenças das queimas e manchas da bainha no Vale do Paraíba, em São Paulo. Esse fungo já havia sido descrito nas regiões arrozeiras da Argentina (Gutiérrez, 2007) e da Colômbia (Ramos Molina, 2012). A baixa frequência de ocorrência indica que esse fungo provavelmente não tem potencial de emergir como patógeno importante do arroz no Brasil.

Em nosso estudo detectamos a elevada incidência de espécies da família *Choanephoraceae* (N = 152) associadas com sintomas de mela em soja e em braquiária, especialmente em Roraima (dados do próprio autor, não publicados). Aparentemente, este é o primeiro relato desse grupo de patógenos causando mela em soja e em braquiária. Das três espécies de *Choanephoraceae* detectadas, *Poitrasia circinans* já havia sido descrita como associada à deterioração de amêndoas de cajueiro no Ceará e no Rio Grande do Norte (Freire & Barguil, 2001). Também, em levantamento de fungos efetuado em Cubatão, na Mata Atlântica de São Paulo, entre 1993 a 1995, *P. circinans* foi encontrada associada a amostras de solo e serapilheira (Crusius et al. 2006). Recentemente, *P. circinans* foi identificada associada à castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, planta nativa da região Amazônica) comercializada em mercados de Fortaleza (Costa, 2009). Nossos estudos indicaram que esses fungos *Choanephoraceae* foram patogênicos tanto à soja quanto à braquiária. Essas observações indicam a necessidade de se determinar o *status* atual de sua ocorrência na região e o potencial de dispersão deste patógeno para outras áreas de cultivo de soja e braquiária no agroecossistema Amazônico. É provável que este seja um novo grupo de patógenos emergentes para ambas as culturas.

Foi também detectada a ocorrência natural de duas espécies de fungos associadas ao controle biológico de fitopatógenos: *Laetisaria arvalis* e *Trichoderma koningiopsis*. O fungo basidiomiceto *Laetisaria arvalis* é

comumente encontrado em solo e tem atividade antagonista contra *R. solani* (Burdsall et al., 1980, Conway, 1995). Já os fungos ascomicetos do gênero *Trichoderma* (correspondente a *Hypocrea* na fase sexuada) geralmente são encontrados em todos os tipos de solo, mas especialmente nos orgânicos, incluindo a camada de húmus das florestas e solos agrícolas no campo. Podem viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos como *Rhizoctonia* (Druzhinina et al., 2011; Talbot et al., 2005). Embora a determinação do potencial antagônico destes isolados não seja do escopo desta pesquisa, estudo preliminar em nosso laboratório demonstrou a efetividade de *L. arvalis* e *T. koningiopsis* no biocontrole de *R. oryzae-sativae* e *R. solani* AG-1 IF (dados do próprio autor, não publicados).

Considerações finais. O fungo *T. cucumeris* (*R. solani* AG-1 IA) predominou como patógeno associado à queima-da-folha da braquiária no bioma Amazônico brasileiro, especialmente em Rondônia. Nos cerrados de Mato Grosso predominou o complexo *W. circinata* var. *oryzae* (*R. oryzae*), espécie filogeneticamente distinta do complexo *T. cucumeris* causando queima da base dos perfilhos na braquiária. Os fungos *C. oryzae-sativae* (*R. oryzae-sativae*) e *W. circinata* var. *oryzae* predominaram em áreas de arroz em várzeas do Vale do Paraíba, em São Paulo. No Brasil, esta é a primeira vez que *R. solani* AG-1 IF é relatado associado à mela da soja e do feijão-caupi em Roraima. Nosso estudo também revelou que *R. solani* AG-1 IE associado à soja tem ocorrência no Brasil. Também é a primeira vez que se relata a associação de *R. solani* AG-1 ID ao feijão-caupi.

REFERÊNCIAS

- Altschul S, Madden T, Schaffer A, et al., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-402.
- Basseto MA, Valério Filho WV, Costa Souza E, Ceresini PC, 2008. O papel de *Rhizoctonia* spp. binucleadas na indução de resistência a mela da soja. *Acta Scientiarum Agronomy* **30**, 183-9.

Beaver JS, Alameda M, Rosas J, 2008. Breeding beans for resistance to web blight. *Annual report of the Bean Improvement Cooperative* **51**, 30–1.

Bernardes De Assis J, Peyer P, Rush MC, Zala M, McDonald BA, Ceresini PC, 2008. Divergence between sympatric rice- and soybean-infecting populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA. *Phytopathology* **98**, 1326-33.

Bolkan HA, Ribeiro WRC, 1985. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. *Plant pathology* **69**, 599-601.

Burdsall HH, Hock H, Boosalis MG, Setliff EC, 1980. *Laetisaria arvalis* (Aphyllophorales, Corticiaceae): A possible Biological control agent for *Rhizoctonia solani* and *Pythium* species. *Mycologia* **72**, 728-36.

Cardenas MR, 1989. *Web blight of beans (Phaseolus vulgaris L.) incited by Thanatephorus cucumeris (Frank) Donk in Colombia*. Ithaca, NY, USA: Cornell University, D.Sc.

Cardona R, Rodríguez H, Nass H, 1999. Mancha bandeada en maíz causada por *Rhizoctonia solani* en el estado Portuguesa, Venezuela. *Fitopatologia Venezolana* **12**, 32-3.

Carling DE, Kuninaga S, Brainard KA, 2002. 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* **92**, 43-50.

Cedeño L, Nass H, Carrero C, Cardona R, Rodríguez H, Alemán L, 1996. *Rhizoctonia solani* AG-1-IA, causa principal del añublo de la vaina del arroz en Venezuela. *Fitopatologia Venezolana* **9**, 6-9

Ceresini PC, Souza NL, 1997. Associação de *Rhizoctonia* spp. binucleadas e de *R. solani* Kuhn GA 4 HGI e GA 2-2 III B ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica* **23**, 14-23.

Ciampi MB, Kuramae EE, Fenille RC, Meyer MC, Souza NL, Ceresini PC, 2005. Intraspecific evolution of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA associated with soybean

and rice in Brazil based on polymorphisms at the ITS-5.8S rDNA operon. *European Journal of Plant Pathology* **113**, 183-96.

Conway KE, 1995. Comparison of biological and chemical treatments for control of southern blight of apple Seedlings in the Field. *Biological and Cultural Tests* **10**, 49.

Costa FaK, 2009. Fungos associados à castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl) e ao amendoim (*Arachis hypogaea* L.) comercializados em Fortaleza (Ceará). *Revista Ciência Agronômica* **40**, 455-60.

Costa-Souza E, Kuramae EE, Nakatani AK, Basseto MA, Prabhu AS, Ceresini PC, 2007. Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado ao arroz em Tocantins, Brasil. *Summa Phytopathologica* **33** 129-36.

Duarte MDLR, Albuquerque FC, Sanhueza RMV, Verzignassi JR, Kondo N, 2007. Etiologia da podridão do coleto de *Brachiara brizantha* em pastagens da Amazônia. *Fitopatologia Brasileira* **32**, 261-5.

Fenille RC, Ciampi MB, Kuramae EE, Souza NL, 2003. Identification of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil by rDNA-ITS sequences. *Fitopatologia Brasileira* **28**, 413-9.

Fenille RC, Souza NL, Kuramae EE, 2002. Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 783-92.

Freire FC, Barguil BM, 2001. Fungos que deterioram amêndoas de cajueiro no Brasil. In: Embrapa, ed. *Comunicado Técnico*. Fortaleza. (2014.)

Gaino APDSDC, Basseto MA, Gasparotto L, Poltronieri LS, Ceresini PC, 2010. Phylogenetic inference reveals the complex etiology of the target and leaf spot diseases on rubber tree and other species cultivated in the Amazon. *Acta Scientiarum Agronomy* **32**, 385-95.

Galvez G, Mora B, Pastor CM, 1989. Web blight. In: Schwartz HF, Pastor CMA, eds. *Bean production problems in the tropics*. Cali: CIAT, 195–259.

Gasparotto L, Hanada RE, Albuquerque FC, Duarte MLR, 2001. Mancha areolada causada por *Thanatephorus cucumeris* em mogno africano. *Fitopatologia Brasileira* **26**, 660-1.

Godoy-Lutz G, Arias J, Saladin F, Steadman J, Carling D, 1996. Characterization of isolates of *R. solani* that cause web blight of common beans in Central America and the Caribbean with implications for disease management. *Annual Reports Bean Improvement Cooperative* **39**, 154–5.

Godoy-Lutz G, Kuninaga S, Steadman J, Powers K, 2008. Phylogenetic analysis of *Rhizoctonia solani* subgroups associated with web blight symptoms on common bean based on ITS- 5.8S rDNA. *Journal of General Plant Pathology* **74**, 32–40.

González AD, Ceresini PC, Bernardes-De-Assis J, Ciampi MB, Zala M, McDonald BA, 2007. High levels of subdivision characterize distinct Poaceae and Fabaceae infecting populations of the Basidiomycete fungus *Thanatephorus cucumeris* (with *Rhizoctonia solani* anastomosis group 1 IA anamorph) from Venezuela and Brazil. *BMC Evolutionary Biology* **submitted**.

Gonzalez D, Carling DE, Kuninaga S, Vilgalys R, Cubeta MA, 2001. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. *Mycologia* **93**, 1138-50.

Gonzalez D, Cubeta MA, Vilgalys R, 2006. Phylogenetic utility of indels within ribosomal DNA and [beta]-tubulin sequences from fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **40**, 459-70.

González N, Godoy-Lutz G, Steadman J, Higgins B, Eskridge KM, 2012. Assessing genetic diversity in the web blight pathogen *Thanatephorus cucumeris* (anamorph=*Rhizoctonia solani*) subgroups AG-1-IE and AG-1-IF with molecular markers. *Journal Genetic Plant Pathology* **78**, 85–98.

González-Vera AD, Bernardes-De-Assis J, Zala M, *et al.*, 2010. Divergence between sympatric rice- and maize-infecting populations of *Rhizoctonia solani* AG 1 IA from Latin America. *Phytopathology* **100**, 172-82.

Gutiérrez SA, 2007. *Sclerotium hydrophilum* em cultivos de arroz de Argentina. *Summa Phytopathology* **33**:, 100.

Hashiba T, Kobayashi T, 1996. Rice diseases incited by *Rhizoctonia* species. In. Dordrecht: Kluwer Academic, 331–40. (Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G, eds. *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control vol.)

Huelsenbeck JP, Ronquist F, 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**, 754-5.

Johanson A, Turner HC, McKay GJ, Brown AE, 1998. A PCR-based method to distinguish fungi of the rice sheath-blight complex, *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae* and *R. oryzae-sativae*. *FEMS Microbiology Letters* **162**.

Ko W, Hora F, 1971. A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* **61**, 707-10.

Kuninaga S, Natsuaki T, Takeuchi T, Yokosawa R, 1997. Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics* **32**, 237-43.

Lee FN, Rush MC, 1983. Rice sheath blight: a major rice disease. *Plant Disease* **67**, 829-32.

Liu ZL, Sinclair JB, 1992. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2. *Phytopathology* **82**, 778-87.

Lourd M, Braz MLA, Gasparotto L, 1984. Ocorrência da mancha areolada em citrus no município de Manaus-AM. *Fitopatologia Brasileira* **9**, 135.

Matsumoto M, 2002. Trials of direct detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG 1 and AG 2 subgroups using specifically primed PCR analysis. *Mycoscience* **43**, 185-9.

Mcdonald BA, 1997. The Population Genetics of Fungi: Tools and Techniques. *Phytopathology* **87**, 448-53.

Nakatani AK, 2006. *Diversidade genética de Rhizoctonia spp. e análise de seqüências multilocos.*: Universidad Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Nechet KDL, Halfeld-Vieira BDA, Gianluppi V, Meyer MC, 2008. Reação de cultivares de soja à mela (*Thanatephorus cucumeris*) em campo em dois estádios de desenvolvimento das plantas. *Summa Phytopathologica* **34**, 277-9.

Nechet KL, Halfeld-Vieira BA, 2006. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp., associados à mela do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), coletados em Roraima. *Fitopatologia Brasileira* **31**, 505-8.

Nechet KL, Halfeld-Vieira BA, Vilarinho AA, 2005. Avaliação da resistência de genótipos de feijão-caupi à mela (*Rhizoctonia solani*) no cerrado de Roraima. *Fitopatologia Brasileira* **30**, 81.

O'donnell K, Kistler HC, Tacke BK, Casper HH, 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 7905-10.

Ogoshi A, 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annual Review of Phytopathology* **25**, 125-43.

Pascual, Toda, Raymondo, Hyakumachi, 2000. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. *Plant pathology* **49**, 108-18.

Perdomo R, Hernández A, Gonzáles A, Pineda J, Alezones J, 2007. Caracterización y evaluación de virulencia en aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn, causante de la mancha bandeada en maíz. *Interciencia* **32**, 48-55.

Poltronieri LS, Trindade DR, Benchimol R, 1999. Web Blight (*Thanatephorus cucumeris*) in passion fruit in the state of Pará of Brazil. *Fitopatologia Brasileira* **24**, 92.

Ramos Molina LM, 2012. *Rhizoctonia solani* AG-1: *Estrutura genética, etiologia e evolutibilidade nos agroecossistemas Brachiaria spp. e arroz na Colômbia*: UNESP Campus de Jaboticabal, PhD.

Sayler RJ, Yang Y, 2007. Detection and quantification of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, the rice sheath blight pathogen, in rice using real-time PCR. *Plant Disease* **91**, 1663-8.

Sneh B, Adams GC, 1996. Culture preservation methods for maintaining genetic integrity of *Rhizoctonia* spp. isolates. . In: Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G, eds. *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Dordrecht: Kluwer academic, 139-46.

Sneh B, Burpee L, Ogoshi A, 1991. *Identification of Rhizoctonia species*. Saint Paul: The American Phytopathological Society.

Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Disjst G, 1996. *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Dordrecht: Kluwer Academic.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876-82.

Trindade DR, Poltronieri LS, Albuquerque FC, 1997. Mancha areolada causada por *Thanatephorus cucumeris* em laranjeiras no estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira* **22**, 115.

Tuite J, 1969. Plant pathological methods: fungi and bacteria. In. Minneapolis: Burgess.

Verzignassi JR, Fernandes CD, 2001. Doenças em forrageiras. In. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2p.

Tabelas

Tabela 1. Levantamento de populações de fungos associados a mela e queima da folha em Roraima, Brasil.

Regiões	Amazônia			Cerrados	Várzeas	N ^a
Estados	Pará	Rondônia	Roraima	Mato Grosso	Vale do Paraíba, São Paulo	
Amostras coletadas						
2012	-	-	256	-	-	256
2013	161	236	288	129	222	1036
						1292
Fungos isolados						
2012	-	-	226	-	-	226
2013	42	119	121	87	61	458
						684
Espécies de fungos detectadas e número total de isolados^b						
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA	11	119	27		4	161
<i>R. solani</i> AG-1 1F			132			132
<i>R. solani</i> AG-1 1D			3			3
<i>Rhizoctonia oryzae</i>	10		24	87	26	147
<i>Rhizoctonia zeae</i>	7					7
<i>Rhizoctonia oryzae-sativae</i>					46	46
<i>Rhizoctonia</i> spp	1		8		12	21
Outras espécies^c						
Choanephoraceae			152			152
(gêneros <i>Blakeslea</i> , <i>Choanephora</i> e <i>Poitrasia</i>)						
<i>Laetisaria arvalis</i>	13					13
<i>Sclerotium hydrophilum</i>					1	1
<i>Trichoderma koningiopsis</i>			1			1
Total	42	119	347	87	61	684

^a N = Tamanho amostral e número de isolados obtidos de cada população

^b *Thanatephorus*, *Waitea* e *Ceratobasidium* representam a fase sexuada de espécies do gênero *Rhizoctonia*. Caracterização baseada ou no seqüenciamento da região ITS-5.8S rDNA dos isolados ou na detecção molecular usando conjunto de iniciadores específicos para as espécies. As seqüências da região ITS serão oportunamente depositadas no banco de dados do NCBI,

^c Baseada em análise de seqüências do ITS-rDNA desses fungos.

Tabela 2. Espécies do gênero *Rhizoctonia* associadas à *Urochloa brizantha*, arroz, feijão-caupi, e soja, obtidas de diferentes ecossistemas no Brasil usadas para reconstrução filogenética multigênica.

Isolados	Espécie	Hospedeiro	Local de amostragem
RRS1C8-2	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IF	Soja cv. Tracajá	Roraima
RRS1D1-1			
RRS1D7-1			
RRV2A1-1		Caupi, variedade desconhecida	
RRV2A2-1			
RRV2A4-2			
RRV2A5-1			
RRV2A6-2			
RRV2C5-1	<i>R. solani</i> AG-1 ID	Caupi, variedade desconhecida	Roraima
RRV2D1-1			
RRV2D6-1			
BEL-59		<i>Passiflora edulis</i>	Pará
BEL-60		<i>Phaseolus vulgaris</i>	
BEL-71		<i>Piper nigrum</i>	
BHM3-B18		<i>Urochloa</i> híbrido <i>Mulato</i>	Puerto López, Colômbia
BHM3-B19			
BHM3-B29	<i>R. solani</i> AG-1 IA		
BHM4-A13			Villavicencio, Colômbia
BHM4-C31			
ROB1A5		<i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandu	Rondônia
ROB2B5			
ROB3A3			
MTS-110		Soja variedade desconhecida	Mato Grosso
SJ-129	<i>R. solani</i> AG-1 IE		
MA-173			
MA-190			
MA-71			
COS-OS5A6	<i>R. oryzae-sativae</i>	<i>Oryza sativa</i>	São Paulo
COS-OS5C17			
COS-OS5D22			
COS-OS5A5			
COS-GTF1		<i>Oryza sativa</i> cv. Puitá	
COS-PINB1			
COS-TAE2			
COS-TAF4			
COS-RSD3	<i>R. oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i> cv. EPAGRI '117'	
WC-MTB1A1		<i>Urochloa</i> Híbrido <i>Mulato</i>	Mato Grosso
WC-MTB3B4			
WC-MTB3B7			
WC-MTB3C4			
WC-MTB3C6			

Isolados	Espécie	Hospedeiro	Local de amostragem
WC-MTB3F3.2			
WC-MTB4C2.1			
WC-MTB3C1			
WC-MTB3D6			
WC-MTB4F4.1			
WC-MTB4D1			
PAR1C1	<i>R. zea</i>	<i>Oryza sativa</i> cv. Cambará	Pará
PAR1D8			
PAR1A1			

Figuras

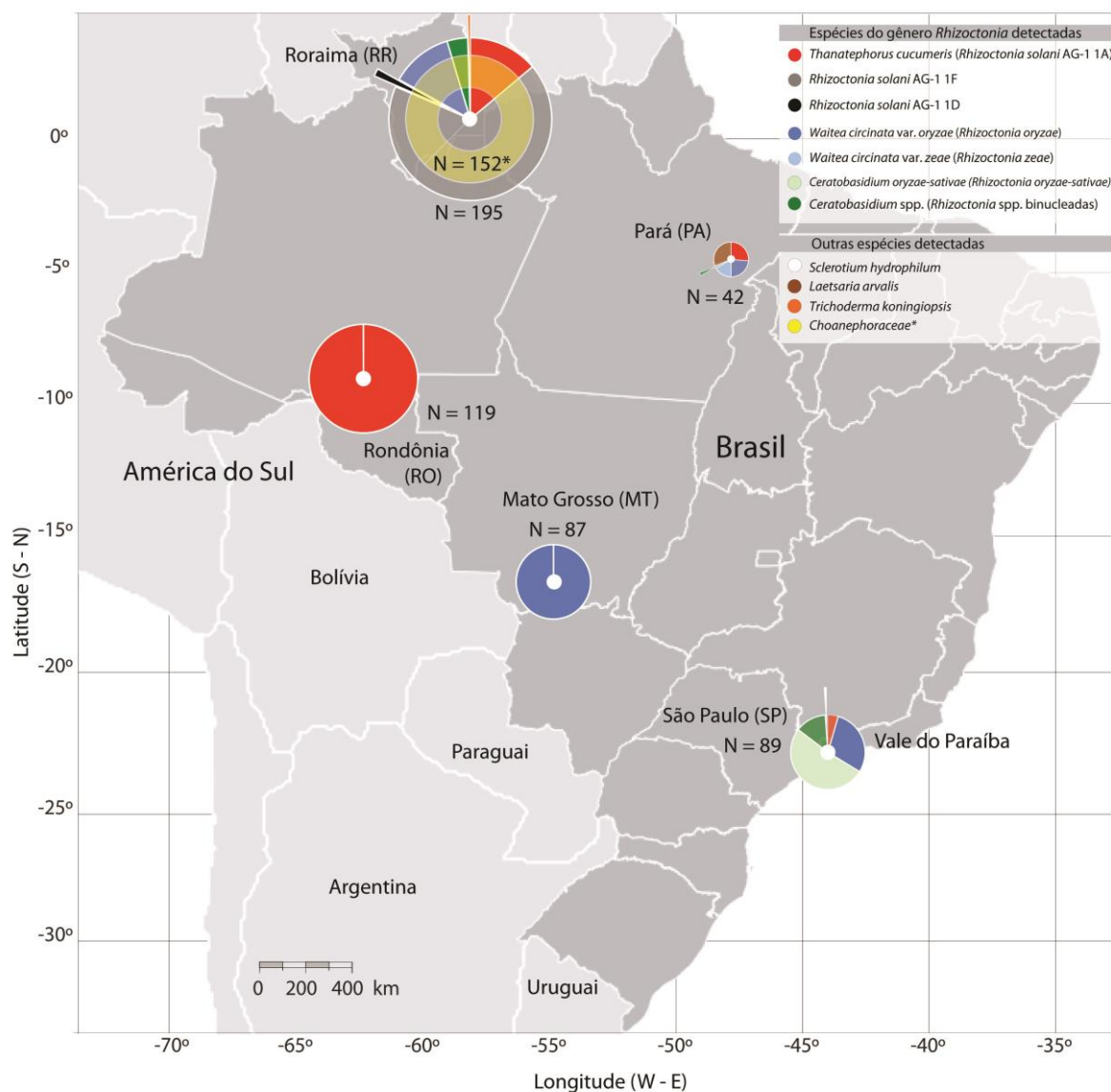


Figura 1. Distribuição geográfica da ocorrência de espécies do gênero *Rhizoctonia* associadas à *Urochloa brizantha*, ao arroz, ao milho, ao feijão-caupi e à soja no Brasil, amostradas no bioma Amazônico nos estados do Pará (PA), Rondônia (RO) e Roraima (RR), em áreas do Cerrado brasileiro do Sul de Mato Grosso (MT) e em áreas de várzeas no Vale do Paraíba, em São Paulo (SP) *.

*A distribuição de outras espécies de fungos encontradas neste levantamento foram incluídas para documentar sua ocorrência.

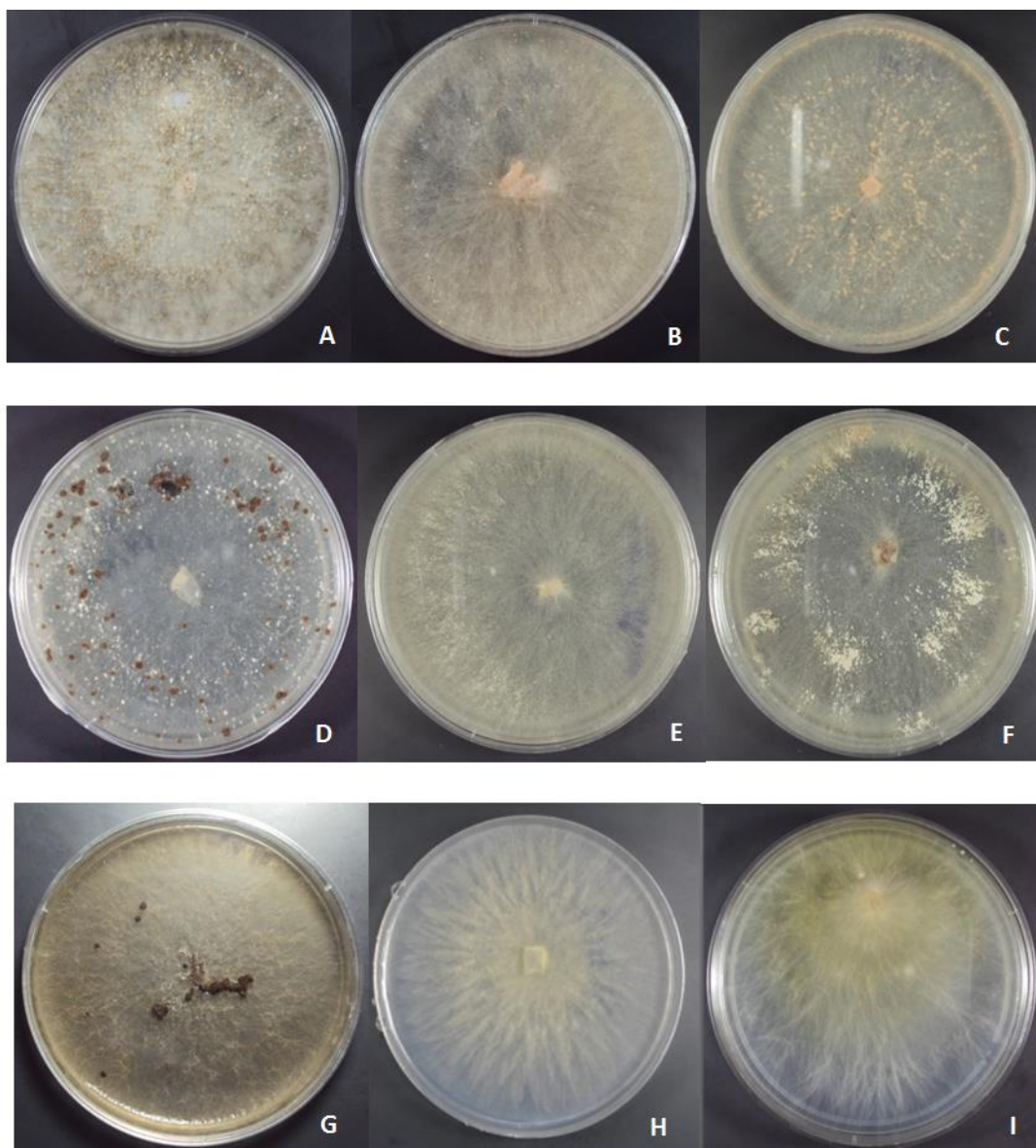


Figura 2. Diferentes formas, cor e tamanhos de escleródios e coloração de colônias das espécies de fungos do gênero *Rhizoctonia*: (A) *Rhizoctonia oryzae-sativae*; (B) *R. zeae*; (C) *R. oryzae*; (D) *R. solani* AG-1 IA; (E) *R. solani* AG-1 IF; (F) *R. solani* AG-1 ID; (G) *R. solani* AG-1 IE.*

*Comparadas com colônias de outras duas espécies encontradas em nosso levantamento: (H) *Poitrasia circinans*; (I) *Laetisaria arvalis*.

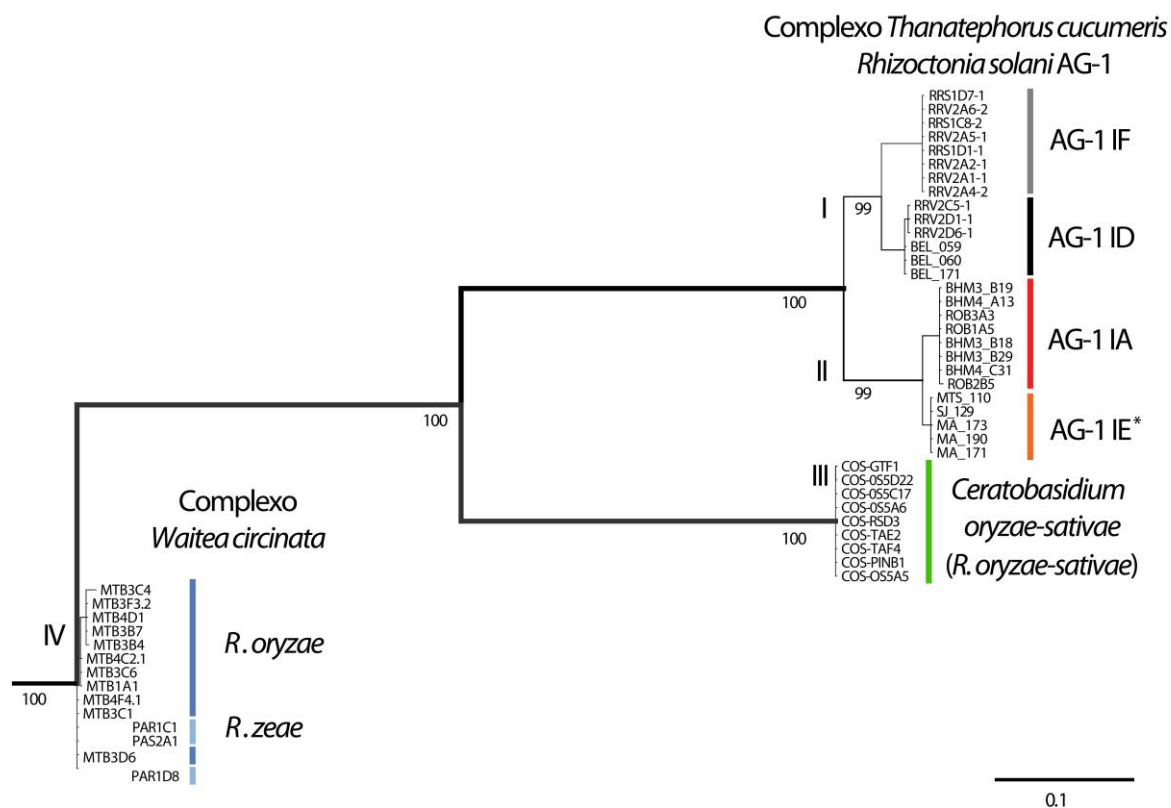


Figura 3. Reconstrução filogenética multigênica, por meio de análise Bayesiana, ilustrando as relações entre haplótipos dos genes concatenados ITS-5.8S do rDNA, RPB-2 e EF-1 α do complexo *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani* AG-1 IA, AG-1 ID, AG-1 IE e AG-1 I-F) e suas relações com haplótipos das espécies irmãs *Ceratosporium oryzae-sativae* (fase assexuada *R. oryzae-sativae*) e do complexo *Waitea circinata* (*Waitea circinata* var. *oryzae* = *Rhizoctonia oryzae* e *W. circinata* var. *zeae* = *R. zeae*). O valor da barra de escala no canto direito inferior representa a distância genética em substituições por nucleotídeo.

*Isolados originalmente descritos como AG-1 IA (Ciampi et al., 2005, Fenille et al., 2003)

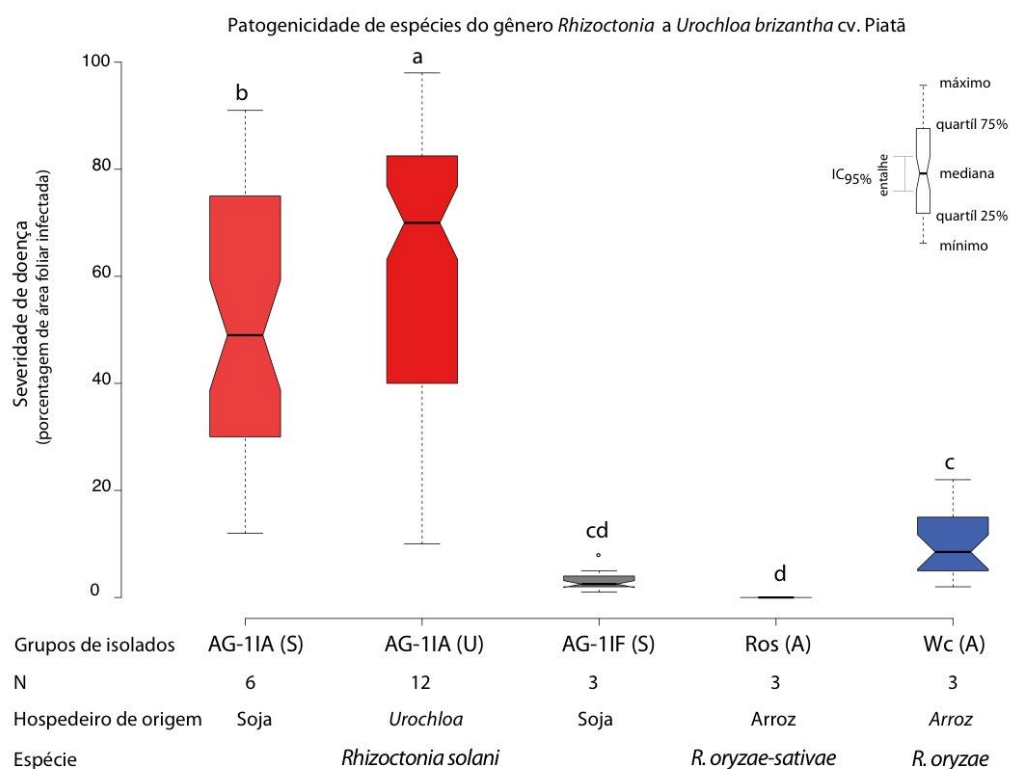


Figura 4. Diagramas de caixas (*boxplots*) representando a patogenicidade de espécies do gênero *Rhizoctonia* a *Urochloa brizantha* cv. Piatã.*

*Média de oito repetições combinando-se as duas réplicas dos experimentos. Médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes a $p < 0,05$ (pelos testes *F* e *t* de Student para contrastes entre grupos de isolados).



Figura 5. Sintomas em folhas de plantas de *Urochloa brizantha* cv. *Piatã* inoculadas com *R. solani* AG-1 IA e *R. oryzae*. (A) e (B), páginas superior e inferior da folha de *Urochloa* inoculada com *R. solani* AG-1 IA; (C) e (D) páginas superior e inferior da folha de *Urochloa* inoculada com *R. oryzae*.

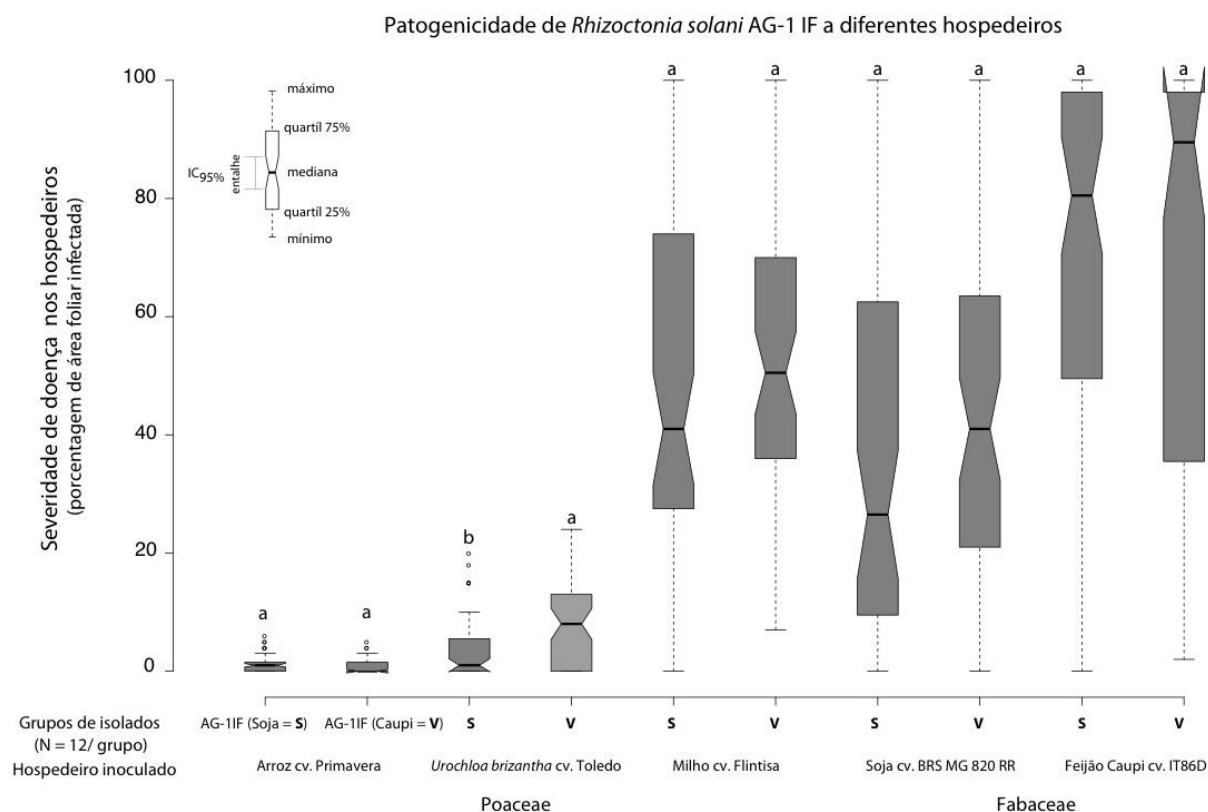


Figura 6. Diagramas de caixas (*boxplots*) representando a patogenicidade de *Rhizoctonia solani* AG-1 IF da soja e do feijão-caupi a diferentes hospedeiros.*

* Foram conduzidos experimentos distintos para cada hospedeiro testado. Média de dez repetições, combinando-se as duas réplicas dos experimentos. Médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes a $p < 0,05$ (pelos testes *F* e *t* de Student para contrastes entre grupos de isolados).

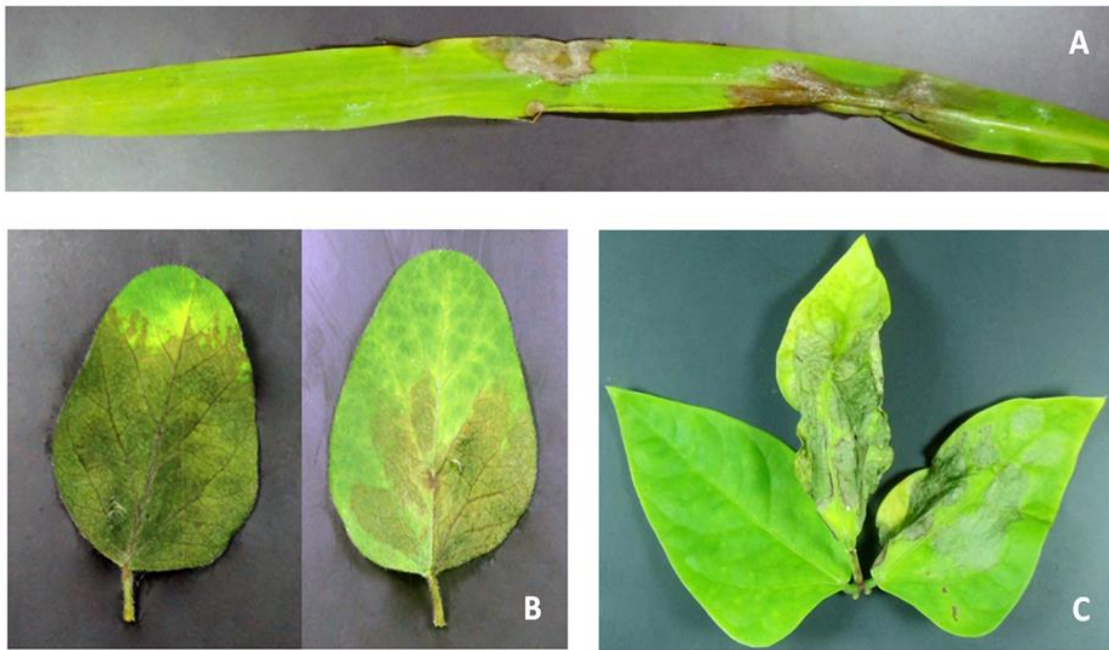


Figura 7. Sintomas de mela e queima-da folha em milho (A), soja (B) e feijão-caupi (C) inoculadas com *Rhizoctonia solani* AG-1 IF.

Arquivos adicionais

e-Xtra 1. Pares de iniciadores utilizados para detecção específica de espécies de fungos do gênero *Rhizoctonia* usando reação em cadeia da polimerase (PCR).

Iniciadores	Direção	Sequência 5'- 3'	Especificidade	Tamanho do produto de PCR	Fonte
GMROS-6	Senso (<i>forward</i>)	GAAAGAGAGAGAGGTCGCCTC	<i>R. oryzae-sativae</i>	1200	Johanson et al. (1998), baseado na região ITS1-ITS2 do rDNA
GMRO-3	Senso	TACGCCTTGAAGTCCCTGTAG	<i>R. oryzae</i>	800	
R635	Antisenso (<i>reverse</i>)	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	-	-	
RS-CMF	Senso	CTCAAACAGGCATGCTC	<i>R. solani</i> AG-1 IA	256	Matsumoto (2002) <i>et al.</i> (2002), baseado na região 28S do rDNA
AG-1AR	Antisenso (<i>reverse</i>)	CAGCAATAGTTGGTGGA	-	-	
WB-A (A-AF)	Senso	CCTTAATTTGGCGGGAGGCA	<i>R. solani</i> AG-1 IE	540	Godoy-Lutz et al. (2008) <i>et al.</i> (2008), baseado na região ITS-5.8S do rDNA
WB-B (B-BF)	Senso	GTTGGTTTGGAGTCGGTGTG	<i>R. solani</i> AG-1 IF	510	
WB-A (A-AR)	Antisenso	GACTATTAGAAGCGGTTCA			

e-Xtra 2. Espécies do gênero *Rhizoctonia* associadas à *Urochloa brizantha*, arroz, feijão-caupi, milho e soja detectadas em amplo levantamento realizado no Brasil em 2012 e 2013.

Bioma e Estado	Município	Hospedeiros	Populações	Espécies do gênero <i>Rhizoctonia</i> identificadas por detecção molecular							
				<i>R. solani</i> AG-1 IA	<i>R. solani</i> AG-1 1D	<i>R. solani</i> AG-1 1F	<i>R. oryzae</i>	<i>R. zeae</i>	<i>R. oryzae-sativae</i>	<i>Rhizoctonia</i> spp.	
Amazônia											
Pará	Paragominas	Milho	PAZM					2			
		<i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandu	PAB1	7			3				
		<i>U. brizantha</i> cv. Marandu	PAB2				3				
		<i>U. brizantha</i> cv. Marandu	PAB4				2				
	Dom Eliseu	Arroz cv. Cambará	PAR1				2	5		1	
		<i>U. brizantha</i> cv. Marandu	PAB3	4							
Total: PA				11	0	0	10	7	0	1	
Rondônia	Itapuã do Oeste	Soja, variedade desconhecida	ROS1	10							
		<i>U. brizantha</i> cv. Marandu	ROB1	30							
	Alto Paraíso	Soja, variedade desconhecida	ROS2	10							
		<i>U. brizantha</i> cv. Marandu	ROB2	20							
		<i>U. brizantha</i> cv. Marandu	ROB4	12							
	Nova União/Ouro Preto do Oeste	<i>U. brizantha</i> cv. Marandu	ROB3	37							
		Total: RO				119	0	0	0	0	0
Roraima	Mucajaí	<i>U. brizantha</i> cv. Piatã	RRB1	2				1			2
		<i>U. brizantha</i> cv. Piatã	RRB2	3				2			
		Soja cv. Tracajá	RRS2								
	Boa Vista	Caupi, variedade desconhecida	RRV1			8					1

(Continua na próxima página)

(Continuação de e-Xtra 2)

Bioma e estado	Município	Hospedeiros	Populações	Espécies do gênero <i>Rhizoctonia</i> identificadas por detecção molecular						
				<i>R.solani</i> AG-1 IA	<i>R. solani</i> AG-1 1D	<i>R. solani</i> AG-1 1F	<i>R. oryzae</i>	<i>R. zeae</i>	<i>R. oryzae-sativae</i>	<i>Rhizoctonia</i> spp.
Roraima	Boa Vista	Caupi, variedade desconhecida	RRV2		3	31	1			4
		Soja cv. Tracajá	RRS1	1		43				1
		Soja cv. Tracajá	RRS1	2		17				
		Soja cv. Tracajá	RRS2			33				
		<i>B. brizantha</i> cv. Piatã	RRB1				17			
	Cantá	Arroz, variedade desconhecida	RRA1	14			3			
	Água Boa	Arroz, variedade desconhecida	RRAB	5						
	Total: RR				27	3	132	24	0	0
Cerrados										
Mato Grosso	Alto do Garças	<i>Urochloa</i> Híbrido Mulato II	MTB1				15			
	Primavera do Leste,	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	MTB2				4			
	Tesouro	<i>Urochloa</i> Híbrido Mulato II	MTB3				48			
	Itiquira	<i>Urochloa</i> Híbrido Mulato II	MTB4				20			
	Total: MT			0	0	0	87	0	0	0
Varzeas										
Vale do Paraíba, São Paulo	Pindamonhangaba, Ponte alta	Arroz cv. Puitá	VPPIN				8		15	3
	Tremembé	Arroz cv. Puitá	VPTR				8			
	Guaratinguetá	Arroz cv. Puitá	VPGT	3			8		4	3
	Roseira	Arroz cv. EPAGRI 117	VPRS						23	3
	Taubaté	Arroz cv. Puitá	VPTA	1			2		4	3
	Total: SP			4	0	0	26	0	46	12
Total geral e totais por espécie identificada			N = 517	161	3	132	147	7	46	21

e-Xtra 3. Patogenicidade de isolados de *Rhizoctonia* spp. à *Urochloa brizantha* cv.

Piatã,

Espécie de <i>Rhizoctonia</i>	Hospedeiro de origem Grupo	Isolados	Percentagem média de área foliar infectada*	
			Experimento 1	Experimento 2
<i>Rhizoctonia oryzae-sativae</i>	Arroz cv. Puitá	RSC1	0,0	0,0
		RSD3	0,0	0,0
		RSE1	0,0	0,0
		Ros (A) N = 3	0,0 d	0,0 d
<i>R. oryzae</i>	Arroz cv. Puitá	PIN A4	9,5	8,8
		PIN A6	2,8	7,3
		PIN A7	17,0	15,8
		Wc (A) N = 3	9,75 c	10,6 c
<i>R. solani</i> AG-1 IF	Soja cv. Tracajá	RR-S1C8-2	2,5	1,5
		RR-S1D3	6,3	3,8
		RR-S1D5-2	2,5	1,8
		AG-1 IF (S) N = 3	3,8 cd	2,3 cd
<i>R. solani</i> AG-1 IA	<i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandú	ROB3D7	83,8	78,3
		ROB3D8	67,5	60,0
		ROB4A1	90,3	77,8
		ROB4A5	68,8	65,8
		ROB4A7	63,0	67,5
		ROB4A8	79,3	71,8
		ROB4A9	39,5	42,5
		ROB4B7	24,3	30,5
		ROB4B8	84,8	89,5
		ROB4C4	18,8	28,8
		ROB4C5	93,3	83,3
		ROB4D1	16,8	45,5
		AG-1 IA (U) N = 12	60,8 a	61,8 a
<i>R. solani</i> AG-1 IA	Soja	ROS1A6	81,3	68,5
		ROS1A9	83,5	75,0
		ROS1B8	33,8	24,8
		ROS1D8	30,0	24,3
		ROS2E1	40,0	43,0
		ROS2E5	51,3	58,3
		AG-1 IA (S) N = 6	53,29 b	48,9 b
	Média geral de severidade (%)	N = 27	38,05	37,4
	Testemunha não inoculada	N = 1	0,00	0,0
Estimativas de F	F tratamentos		51,02	27,24
	p		< 0,0001	< 0,0001
	F blocos		0,31	0,12
	p		0,81	0,95

*Média de quatro repetições/experimento. Médias seguidas de mesma letra, nas colunas apenas, não são significativamente diferentes a $p < 0,05$ (pelos testes F e t de Student de contrastes entre grupos de isolados).

e-Xtra 4. Gama de hospedeiros de isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IF da soja e do feijão-caupi.

Fungo	Hospedeiro Grupo	Isolado	Percentagem média de área foliar infectada nos hospedeiros*				
			Arroz cv. Primavera	<i>Urochloa brizanta</i> cv. Piatã	Milho cv. Flintisa	Soja cv. BRS MG 820 RR	Feijão-caupi cv. IT86D
Experimento 1							
<i>R. solani</i> AG-1 IF	<i>Glycine max</i> cv. BRS Tracajá	RRS1A4.2	1,8	8,4	14,8	52,0	98,4
		RRS1A5.2	1,0	5,2	57,2	26,0	66,0
		RRS1A6.2	0,4	6,8	48,4	47,0	73,6
		RRS1A8.2	0,4	0,8	57,2	30,2	59,2
		RRS1B4.2	0,8	0,2	38,6	38,8	74,0
		RRS1B7.2	0,4	0,2	39,2	56,4	87,8
		AG-1 IF (S)	N = 6	0,8 a	3,6 b	42,6 a	41,7 a
<i>R. solani</i> AG-1 IF	<i>Vigna unguiculata</i>	RRV2A4.2	1,4	1,6	47,0	36,6	67,4
		RRV2B5.2	0,8	8,8	65,8	63,8	60,4
		RRV2B6.2	1,0	6,0	45,6	50,8	52,4
		RRV2B7.2	0,6	4,4	38,2	71,2	62,0
		RRV2C3.2	0,6	8,8	32,8	56,0	63,2
		RRV2E6.2	0,4	6,0	68,6	3,2	92,8
		AG-1 IF (V)	N = 6	0,8 a	5,9 a	49,7 a	46,9 a
Média geral de severidade (%)		N=12	0,8	4,8	46,1	44,3	71,4
Testemunha não inoculada		N = 1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Estimativas de F</i>	<i>F tratamentos</i>		0,68	3,02	2,75	3,07	2,88
	<i>p</i>		0,76	0,00	0,01	0,00	0,00
	<i>F blocos</i>		1,15	1,05	0,72	0,91	1,58
	<i>p</i>		0,34	0,39	0,58	0,47	0,19

(Continua na próxima página)

Fungo	Hospedeiro Grupo	Isolado	Percentagem média de área foliar infectada nos hospedeiros*				
			Arroz cv. Primavera	<i>Urochloa brizanta</i> cv. Piatã	Milho cv. Flintisa	Soja cv. BRS MG 820 RR	Feijão-caupi cv. IT86D
(Continuação de e-Xtra 4)			Experimento 2				
<i>R. solani</i> AG-1 IF	<i>Glycine max</i> cv. BRS Tracajá	RRS1A4.2	2,6	9,8	65,8	49,0	92,4
		RRS1A5.2	2,2	5,2	55,0	26,0	59,8
		RRS1A6.2	1,0	2,6	74,2	58,2	71,6
		RRS1A8.2	0,4	1,0	34,8	11,0	30,2
		RRS1B4.2	1,4	0,2	62,6	16,4	79,4
		RRS1B7.2	1,0	0,2	51,8	17,8	56,0
	AG-1 IF (S)	N = 6	1,4 a	3,2 b	57,4 a	29,7 a	64,9 a
	<i>Vigna unguiculata</i>	RRV2A4.2	1,2	11,2	51,8	34,2	73,4
		RRV2B5.2	0,8	13,8	70,2	25,6	70,0
		RRV2B6.2	1,6	16,2	48,2	79,0	61,2
		RRV2B7.2	0,8	10,8	42,2	50,2	67,4
		RRV2C3.2	0,6	4,6	43,4	57,8	65,0
		RRV2E6.2	0,6	4,4	73,6	2,0	91,6
	AG-1 IF (V)	N = 6	0,9 a	10,2 a	54,9 a	41,5 a	71,4 a
Média geral de severidade (%)		N=12	1,2	6,7	56,1	35,6	68,2
Testemunha não inoculada		N = 1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Estimativas de F</i>	<i>F tratamentos</i>		1,27	3,59	3,26	4,94	4,28
	<i>p</i>		0,27	0,0008	0,0017	<0,0001	0,0001
	<i>F blocos</i>		0,82	0,40	1,06	1,40	2,39
	<i>p</i>		0,52	0,81	0,39	0,25	0,06

* Foram conduzidos experimentos distintos para cada hospedeiro testado. Média de cinco repetições/experimento. Médias seguidas de mesma letra, nas colunas apenas, não são significativamente diferentes a $p < 0,05$ (pelos testes *F* e *t* de Student de contrastes entre grupos de isolados).

CAPÍTULO 3 - Origin of emerging populations of the leaf blight and collar rot pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA on *urochloa* pastures from Brazilian amazon and Colombian Llanos

Edisson Chavarro Mesa[†], Paulo C. Ceresini[†], Lina M. Ramos Molina[†], Danilo A. S. Pereira, Daniel A. Schurt, José R. Vieira Jr., Nadia M. Poloni, and Bruce A. McDonald

First and third authors, UNESP University of São Paulo State, Jaboticabal Campus, SP, Brazil; second, fourth and seventh authors, UNESP, Ilha Solteira Campus, SP, Brazil; fifth author, EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Boa Vista, RR, Brazil; sixth author, EMBRAPA, Porto Velho, RO, Brazil; eighth author, Institute of Integrative Biology, ETH Zurich, Switzerland.

Submitted to Phytopathology for publication

Corresponding author: Paulo C. Ceresini, paulo.ceresini@bio.feis.unesp.br

[†]The first, second and third authors contributed equally to this manuscript.

ABSTRACT - The fungus *Rhizoctonia solani* AG-1 IA emerged in the early 1990s as an important pathogen causing leaf blight and collar rot on pastures of the genus *Urochloa* (signalgrass) in South America. This pathogen first emerged in Colombia in areas where rice, a host highly susceptible to the fungus, was replaced with *Urochloa* in response to increased demand for extensive livestock farming. *Urochloa* is an extremely important forage grass crop for livestock farming in tropical Latin America. In Brazil, the fungus was described as an *Urochloa* pathogen in 1999, but only recently was reported as an important forage pathogen in the Amazon. In the present study, the hypothesis that the emergence of this pathogen occurred due to host shift or jump as a result of geographical overlapping of the host species was tested. The specific goals of the study were a) to compare the level of genetic similarity among

different host and regional populations of *R. solani* AG-1 IA infecting *Urochloa*, rice and soybean; b) to determine the historical migration patterns of *R. solani* AG-1 IA populations infecting these three hosts in Colombia and Brazil and to test the hypothesis about the origin of the current populations infecting *Urochloa* in the two countries; c) to reconstruct the phylogeographic history of *R. solani* AG-1 IA strains infecting *Urochloa*, rice and soybean in Brazil and Colombia based on three nuclear DNA loci (*R44L*, *R68L* and *R116*); d) to analyze the genetic structure of *R. solani* AG-1 IA populations infecting *Urochloa* searching for evidence of sexual recombination; and e) to characterize the pathogenicity of *R. solani* AG-1 IA from *Urochloa* and rice searching for evidence of host specialization. To study the genetic structure of populations, a total of 335 *R. solani* AG-1 IA isolates were sampled from fields of *U. brizantha*, *Urochloa* hybrid Mulato, rice and soybeans in Colombia and Brazil. These isolates were genotyped using nine microsatellite loci. The historical patterns of migration of populations from different hosts indicated that the populations currently infecting *Urochloa* in Colombia most likely originated from a population that originally infected rice. In contrast, in Brazil a similar clear asymmetric pattern of historical migration was not established because the migration rates among Brazilian *R. solani* AG-1 IA populations from *Urochloa*, soybean and rice were all symmetric in magnitude (average 20 migrants/generation). Multigene phylogeographic analysis indicated that for both Brazilian and Colombian *Urochloa*-adapted populations of *R. solani* AG-1 IA, the most likely ancestor originated from a population infecting rice. A mixed reproduction system including both sexual reproduction and dispersal of adapted clones characterized the *R. solani* AG-1 IA populations infecting *Urochloa*. The pathogen isolated from *Urochloa* exhibited evidence of incipient host specialization despite the fact that it has the ability to jump between Poaceae and Fabaceae hosts.

Keywords: Gene flow, migration, phylogeography, origin of emerging pathogens in agriculture, reproduction system

INTRODUCTION

The fungus *Rhizoctonia solani* anastomosis group 1 IA (AG-1 IA) emerged in the early 1990s as an important pathogen causing leaf blight, collar rot and death of *Urochloa* (formerly classified as *Brachiaria* (91)) pastures in South America (21). This fungus emerged for the first time in Colombia in areas where rice crops, a host highly susceptible to the fungus (40,51), were replaced by *Urochloa* (i.e., signalgrass) in response to a growing demand for extensive livestock farming. *Urochloa* is a forage grass of great importance in tropical Latin America, where it is cultivated on approximately 160 million hectares in Brazil alone (42,43). *R. solani* AG-1 IA was described as an *Urochloa* pathogen in Brazil in 1999 but was only recently reported as an important forage grass pathogen. This pathogen specifically attacks *U. brizantha* cv. Marandu in the states of Acre, Maranhão, Northern Mato Grosso, Rondônia, Southern Pará and Tocantins, all of which located in the Amazon region (24,93,95).

STUKENBROK & MCDONALDS (85) proposed that the high homogeneity associated with the large extension of agroecosystems promotes the emergence, propagation and dispersion of plant pathogens and contributes to the development of large pathogen populations and to the evolution of their virulence. The two main *Urochloa* species grown in Brazilian pasture agroecosystems, *U. brizantha* and *U. decumbens*, in addition to forming extensive monocultures with few varieties, are composed of apomictic ecotypes (23). This implies that these grasses predominantly reproduce asexually, resulting in high population homogeneity of the established pasture populations. This genetic uniformity exposes the agroecosystem and its components to very high selection pressure, thereby increasing the risk of emergence of new pests and/or diseases. This may result in the loss of highly susceptible varieties, as reported for *U. decumbens* in the Amazon region (81).

There are no conclusive indications in historical or scientific reports that the pattern of emergence of *R. solani* as a pathogen of *Urochloa* pastures in Brazil is similar to the pattern observed in Colombia, where *R. solani* emerged in areas where rice was previously cultivated. However, the emergence of *R. solani* as an *Urochloa* pathogen may also have resulted from pasture expansion into adjacent areas or into

areas previously cultivated with pathogen-susceptible hosts such as rice, cowpea and soybean (22,29,67).

Considering the favorable conditions that exist for the disease within the Amazon region, it is possible that *R. solani* strains that cause *Urochloa* leaf blight and death can potentially adapt to local agroecosystems and thereby become a serious threat to forage production in the Brazilian Amazon because the local *Urochloa* varieties are susceptible to the pathogen.

R. solani occurs in foci and causes leaf blight, collar rot and death of *Urochloa* clumps (2,83,92). Although the losses have not been accurately quantified, extensive damage on *Urochloa* due to leaf blight have been reported in both Brazil and Colombia (2,24). Reports on the etiology of the disease indicated that it is caused by more than one *R. solani* AG. In fact, *R. solani*, an anamorph stage whose teleomorph is the basidiomycete *Thanatephorus cucumeris*, is a complex fungal species consisting of several anastomosis groups (AGs) (14). *Urochloa* is the host to two different *R. solani* AGs: AG-1 IA and AG-1 IB (8). Both AG-1 IA and AG-1 IB produce abundant sclerotia in infected tissue. However, AG-1 IA produces larger sasakii-type sclerotia; these sclerotia are between 1 and 6 mm in diameter and are generally not air-dispersed (86,101). In contrast, AG-1 IB produces microsclerotia, allowing the pathogen to be air-dispersed (34,97).

In the first study describing the reaction of *Urochloa* species to the leaf blight disease in Colombia (47), *R. solani* AG-1 IA was most likely the pathogen used as inoculum because the isolate produced large sclerotia, probably of the sasakii-type. The existing reports describing the occurrence of *R. solani* in Amazon pastures in Brazil do not specify which AGs were associated with *Urochloa* (24,95). Recently, GAINO et al. (33) reported the association of AG-4 HGI with *Urochloa* in Paragominas in Pará state. A broad survey performed by our research group indicated that *R. solani* AG-1 IA was the sole pathogen responsible for *Urochloa* leaf blight and death in the Colombian Llanos (17) and in the Brazilian Amazon, especially in Rondônia (18).

R. solani AG-1 IA is considered an important pathogen with worldwide distribution, affecting a wide range of host crops (45,75). In South America, AG-1 IA causes leaf blight on rice (9,15,22), banded leaf spot and leaf blight on corn (the

latter is apparently restricted to Venezuela (13,76)), leaf blight on soybeans (29) and web blight on cowpea (67). Although *R. solani* AG-1 IA is associated with a wide range of hosts, recent studies indicated that sympatric populations of isolates infecting Poaceae or Fabaceae represent two phylogenetically well-defined sister groups and that selection for host specialization most likely resulted in the observed divergence between the populations (6,19). The ecology of the survival and dispersal of *R. solani* AG-1 associated with Poaceae has been widely studied. In general, *R. solani* AG-1 IA survives as mycelia and sclerotia on plant seeds and in soil. Repeated infection cycles increase the inoculum level in soil (70), and the common practice of sharing equipment between different cultivation areas plays an important role in dispersal of the inoculum to contiguous fields and plantations. The dispersal of inoculum associated with weeds may also play an important role in dissemination of the pathogen among different crops (8).

Although the formation of basidiospores of *R. solani* has been observed in paddy rice fields in several countries (40,45,64,71), the role of sexual spores in the disease cycle was not fully understood until recently. Because the reproduction of the fungus was considered to be host dependent, *R. solani* AG-1 IA was believed to be asexual in Poaceae, with mycelium and sclerotia as the primary inoculum sources (49,70); in contrast, reproduction was thought to be sexual in Fabaceae, with predominance of *T. cucumeris* basidiospores in the disease cycle (29,45). However, evidence from population genetic studies of *R. solani* AG-1 IA adapted to Poaceae in China, India, South America (Venezuela) and the USA (Texas and Louisiana) has challenged the view that reproduction of the fungus on Poaceae is always asexual. The results of these studies were consistent with the idea that the fungus reproductive system varies from strictly recombinant, predominantly sexual or mixed, characterized by recombination events followed by clonal propagation during the crop season (6,7,36,52,80). These evidences indicates that basidiospores constitute an important part of the life history of the fungus and that they contribute to the genetic diversity of field populations of *R. solani* AG-1 IA .

In the present study, the following questions were addressed: What is the genetic relationship among pathogen populations adapted to *Urochloa*, rice and

soybean in Colombia and Brazil? Are the *R. solani* AG-1 IA populations adapted to *Urochloa*, rice or soybean genetically differentiated? What is the origin of the *R. solani* AG-1 IA populations adapted to *Urochloa*? To answer these questions we aimed to determine the levels of historical migration and contemporary gene flow between sympatric pathogen populations adapted to *Urochloa* and those adapted to rice or soybean from the same geographical region. Using nine microsatellite markers, classical analyses of genetic diversity within and between populations were performed to identify migration patterns, to determine the origins of *Urochloa*-adapted populations and to clarify the main reproductive system of *R. solani* AG-1 IA in each region. We also searched for evidences about the origin of the *Urochloa*-adapted populations of *R. solani* AG-1 IA using coalescent analysis coupled with ancestral reconstruction and discrete phylogeography using three nuclear DNA loci.

More specifically, the goals of the present study were the following:

- a. To determine the genetic and genotypic diversity of different sympatric host populations and allopatric regional populations of *R. solani* AG-1 IA infecting *Urochloa*, rice and soybean in Colombia and Brazil.
- b. To compare the level of subdivision between host and regional populations of *R. solani* AG-1 IA populations infecting *Urochloa*, rice and soybean.
- c. To detect the historical patterns of migration among *R. solani* AG-1 IA populations infecting *Urochloa*, rice and soybeans in Colombia and Brazil to test the hypothesis about the origin of the populations currently infecting *Urochloa* in the two countries.
- d. To analyze the genetic structure of *R. solani* AG-1 IA populations infecting *Urochloa* searching for evidences of sexual recombination.
- e. To reconstruct the phylogeographic history of *R. solani* AG-1 IA lineages adapted to *Urochloa*, rice and soybeans from Brazil and Colombia based on three nuclear DNA loci (*R44L*, *R68L* and *R116*).
- f. To determine whether adaptation to *Urochloa* spp. promoted phenotypic differences in the aggressiveness of *R. solani* AG-1 isolates to different hosts.

The following hypotheses were tested:

- a. Geographical populations of *R. solani* AG-1 IA from *Urochloa* are genetically homogeneous or undifferentiated.
- b. *R. solani* AG-1 IA populations from different hosts (*Urochloa*, rice and soybean) are genetically homogeneous.
- c. *R. solani* AG-1 IA populations currently infecting *Urochloa* originated from historical migration from populations adapted to rice or soybean.
- d. *R. solani* AG-1 IA populations infecting *Urochloa* reproduce sexually.
- e. *R. solani* AG-1 IA populations infecting *Urochloa*, rice and soybean in Brazil and Colombia share multigene lineages, indicating a common origin for these populations.
- f. The pathogen populations adapted to *Urochloa* spp are not host-specialized.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and isolation of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA populations from *Urochloa*, rice soybeans grown in Colombia or in Brazil. Population samples of *R. solani* AG-1 IA were collected between 2010 and 2013. A total of 204 fungal isolates were obtained from the Llanos region of northeast Colombia. Three sympatric populations of *R. solani* AG-1 IA were sampled from Puerto López and Villavicencio counties, in Meta State: one infecting *Urochloa brizantha* cv. Toledo (COL_BBT), one infecting *Urochloa* hybrid Mulato (COL_BHM) and one infecting rice (COL_OS) (Table 1).

In Brazil, a total of 146 fungal isolates were obtained from sampling at three different locations in Rondônia state. Four sympatric populations were collected in Alto Paraíso, Nova União and Itapuã d'Oeste counties: one infecting soybean (population RO_S) and three infecting *U. brizantha* cv. Marandu (RO_B1, RO_B2 and RO_B3). One allopatric population was sampled from rice in Roraima state (RR_R) (Table 1).

Samples of infected plants showing symptoms of *Urochloa* leaf blight, rice sheath blight or soybean foliar blight were collected from six to eight foci per row (with approximately 10 m between each infection focus) in a total of five rows per

field. The goal was to obtain approximately 30 - 40 isolates per population. Isolation and preservation of the fungal isolates were performed as previously described (20). Isolation was performed by placing fragments of the infected leaves into petri dishes containing the modified Ko & Hora selective medium (48) and incubating at 25°C in the dark. Pure cultures of *R. solani* were established by transferring hyphal fragments obtained following 24 to 48 hours growth in the selective medium into potato-dextrose-agar medium containing 50 µg/mL chloramphenicol and streptomycin. Sclerotia from five-day-old cultures of each isolate were transferred to 1.8-mL cryotubes containing anhydrous silica gel for long-term storage at -20°C following 10 days incubation at 25°C (20).

Fungal mycelium production, DNA extraction and identification of *R. solani* anastomosis groups. Fungal mycelium was grown in 30 mL potato dextrose broth (18.5 g/L) for four days with stirring, after which the culture was freeze-dried for approximately 48 h. Fungal DNA was extracted using the GenElute kit (Sigma-Aldrich, Germany) according to the manufacturer's instructions. The anastomosis group of each isolate was determined through selective amplification of a fragment of the fungal 28S ribosomal DNA (rDNA) by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers designed for *R. solani* AG-1 IA using the *R. solani* AG common primer (forward) 5'-CTCAAACAGGCATGCTC-3', and the *R. solani* AG 1- IA specific primer (reverse) 5'-CAGCAATAGTTGGTGGA-3' (20,57).

Genotyping of *R. solani* AG-1 IA isolates using SSR markers. *R. solani* AG-1 IA isolates were genotyped using nine co-dominant microsatellite (SSR) markers representing nine previously described polymorphic loci (102). All forward primers were designed to contain a 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3' (M13F) tail. Each SSR locus was labeled with a fluorescent dye by adding to the PCR an extra primer containing a sequence similar to the M13F primer that was labeled with one of the following fluorophores: 6-FAM, NED, VIC or PET (Life Technologies, USA) (SCHUELKE, 2000). The PCR reactions were performed separately for each SSR locus in 20 µL final volume. Each reaction contained approximately 5 µL genomic DNA (final concentration between 5 and 15 ng/µL), 2 µL of 10x buffer, 0.4 mM

dNTPs, 0.3 μ M of each primer, 0.5 μ M of fluorophore-labeled M13F and 1 unit of Taq polymerase (Sigma-Aldrich, Germany). For all sets of primers, the PCR program included an initial denaturation step at 94°C for 3 min followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 35 seconds, annealing at 55°C for 30 seconds and extension at 72°C for 40 seconds and a final extension step at 72°C for 8 min. Fragment analysis of the amplified PCR products was performed by Macrogen, South Korea, using an ABI 3700 sequencer (Applied Biosystems, USA) and GeneScan 500 Liz as an internal size standard (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's instructions.

Analysis of contemporary population genetic structure. For all analyses, *R. solani* AG-1 IA was assumed to be a heterokaryon or functional diploid. The data obtained were analyzed in accordance with this assumption.

Genotypic diversity. The multilocus SSR genotype for each isolate was determined using GenoDive software (60). Isolates exhibiting the same multilocus SSR genotype were considered members of the same clonal lineage. The following indices of genotypic diversity were determined: (a) number of genotypes per population; (b) population-specific genotypes; and (c) clonal fraction or percentage isolates originated through asexual reproduction, calculated as 1- (number of different genotypes)/(total number of isolates); (d) G_O , the effective number of genotypes and their (e) evenness (103). The statistical significance of differences in genotypic diversity between each pair of populations was tested using bootstrap resampling with 1000 permutations (sub-sampling to match the size of the smaller population with 19 individuals). Individuals of each population were resampled, and diversity indices were calculated and compared following each run (54).

Gene diversity and allelic richness. Clone-corrected data were used for these analyses, retaining only one unique individual of each multilocus microsatellite genotype per population.

Allelic richness was estimated for each *R. solani* AG-1 IA population as the average allele number per locus using rarefaction (25). Rarefaction uses the allele

frequency of a given locus to estimate the number of alleles that could occur at that locus in smaller samples, standardizing the measure according to the smallest-sized population (68,69).

Differences in allelic richness between different groups of populations were tested using FSTAT 2.9.3.2 software (37). *P* values for the significance of differences between pairs of means were obtained with 1000 permutations.

Genetic differentiation among populations. The level of population subdivision and the distribution of gene diversity between sympatric host populations and allopatric regional populations of *R. solani* AG-1 IA adapted to *Urochloa*, rice or soybean was determined by performing a hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) (27,98). The AMOVA was performed by subdividing the variance components into variance between populations, variance within populations and variance within individuals. The significance of the fixation index (R_{ST} , based on the squared size differences between alleles for SSR microsatellite loci) was tested using a non-parametric approach (27) with 1000 permutations using ARLEQUIN 3.11 software (28). Differentiation between populations was determined by calculating the pairwise fixation indices (Φ_{ST} , analogous to R_{ST}). A null Φ_{ST} distribution, under the hypothesis of no differentiation between two populations, was obtained by haplotype permutation between population pairs using ARLEQUIN 3.11. Genetic differentiation between population pairs was considered significant at $P < 0.05$.

Hardy-Weinberg equilibrium and gametic disequilibrium tests. To assess the relative contribution of recombination to the genetic structure of the *R. solani* AG-1 IA populations, associations within and between loci were investigated using the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and multilocus association tests, respectively. HWE examines the random association of alleles within each locus and tests the genotype frequencies that would be expected assuming HWE against those observed in the sample (39) for each population. A test analogous to Fisher's exact test was used (38). *P* values were obtained using the Markov chain Monte Carlo (MCMC) method using ARLEQUIN 3.11, thereby generating an exact probability distribution not biased by rare alleles or small sample size (28). The mean inbreeding coefficient

(F_{IS}) across all loci was calculated for each population (99) to check for significant heterozygote deficit or excess relative to HWE predictions, with 1000 permutations in ARLEQUIN 3.11. Associations between loci were examined using two gametic disequilibrium tests. The first test was the proportion of pairs of loci in gametic disequilibrium determined using Fisher's exact test (35) based on the MCMC algorithm, with 1000 randomizations, in GENEPOP 3.4 software (79). A pair of loci was considered to be in gametic disequilibrium or linkage disequilibrium when the resulting P values were equal to or less than 0.05 following Bonferroni correction for multiple comparisons (10). The second gametic disequilibrium test used to examine associations between loci was the multilocus association index (r_D) for each population (58), a traditional measure of multilocus linkage disequilibrium, corrected for the total number of loci. The significance of r_D values was tested with 1000 randomizations using both MULTILOCUS 1.3 software (1) and the poppr 1.0.5 R package (46). The null hypothesis of complete panmixia, i.e., no linkage between pairs of loci, was tested within each population.

Test for admixture or hidden population structure. The deviations from HWE and gametic disequilibrium observed in some *R. solani* AG-1 IA populations could be caused by the Wahlund effect; this could occur, for example, when there is genotype mixture between populations. To determine whether the sampled individuals were immigrants relative to their reference geographical populations, STRUCTURE v.2.2 software was used (78). Ten runs with 100,000 generations burn in and simulations with 1,000,000 MCMC iterations for each run were performed. The membership coefficient for each sampled genotype was determined by setting each of the eight different reference geographical or host populations as the potential population of origin of the genotypes ($k = 8$ populations was also the most likely number of groups) considering an admixture model with $\lambda = 0.63$, defined *a priori*.

Historical migration. Historical migration rates among *R. solani* AG-1 IA populations from Brazil and Colombia were estimated using a Bayesian method based on coalescent theory as proposed by BEERLI & FELSENSTEIN (5). This method permits estimation of the effective population size or theta (θ) ($\theta = 4N\mu$ for diploids,

where N_e is the effective population size and μ is the mutation rate of each locus) and the asymmetric historical migration rate ($M = 4Nm$, where Nm is the number of migrants per generation) between two populations, indicating the likely migration route of the pathogen. The three *R. solani* populations from *Urochloa* from Brazil were combined into a single population to decrease the number of parameter pairs to be estimated. Historical migration between populations was estimated using MIGRATE 3.0.3 software (5) and 10 runs with 1,000,000 iterations per run. The run with the highest likelihood was chosen to represent the migration pattern.

Origin and historical phylogeography of *R. solani* AG-1 IA multigene lineages.

Three nuclear DNA loci [*R44L*, *R68L* and *R116L*; CIAMPI *et al.*, 2009] were sequenced from *R. solani* AG -1 IA isolates belonging to different multilocus SSR genotypes obtained from different host populations at two sites: from *Urochloa* and rice from Colombia (N = 26 haplotypes) and from *Urochloa* and soybean from Brazil (N = 30 haplotypes). Our hypothesis was that *R. solani* AG-1 IA populations from different hosts share multigene lineages, indicating a common origin of these populations. The sequences were aligned using *Geneious* software (URL: <http://www.geneious.com>). Because *R. solani* AG-1 IA is heterokaryotic (N+N nuclear condition), the different phases of the heterogeneous sequences obtained were analyzed using the algorithm implemented in PHASE 2.1.1 software (84) to infer and recover the alleles for each individual genotype. To meet the assumptions of the phylogenetic analysis, four neutrality tests of the molecular markers used were performed: Ewens-Watterson (26,96), Chakraborty (16), Tajima's *D* (87), and Fu and Li's *FS* (32). The best-fit nucleotide substitution model was determined using the hierarchical likelihood ratio test (*ML*) in MEGA 5.0 software (88).

The phylogeographic history of multigene lineages of *R. solani* AG-1 IA infecting *Urochloa*, rice and soybean was reconstructed through ancestral reconstruction/discrete phylogeography coalescent analysis using BEAST 2.0 software (11). The phylogenetic relationships between lineages were determined through a coalescent Bayesian approach using the Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo method (MCMCMC) with 100,000,000 generations. Ten different runs were performed with the same number of generations. The run with the highest

likelihood was chosen to represent the phylogeographic history of the lineages, and the maximum clade credibility tree was determined using the *Tree-Annotator* module of BEAST 2.0 (11).

Cross-pathogenicity of *R. solani* AG-1 to *Urochloa* and rice. Twelve *R. solani* AG-1 IA isolates obtained from *Urochloa* and 12 isolates obtained from rice were selected to test their cross-pathogenicity to rice cv. Fedearroz 50 and to *U. brizantha* cv. Toledo. Control rice and *Urochloa* plants that were not inoculated with the pathogen were also included in the assay.

Rice and *Urochloa* were sown in plastic pots containing a soil and sand mix (2:1) and fertilized with one gram of 15-15-15 (NPK). Seeds were surface-sterilized with sodium hypochlorite for 20 minutes prior to sowing. Four seeds were sown in each pot. Following germination, one plant was left per pot. The two hosts were inoculated with the 24 isolates. A complete randomized block design with three replicates was used. The experiment was repeated once.

Inoculation with *R. solani* sclerotia was performed when the plants exhibited four leaves. The inoculum was applied to the initial portion of the last or second-to-last leaf of the main tiller. The infected plants were kept in a phytotron under high humidity (95%) with daytime temperatures between 25 and 27°C. Evaluation was performed six days after inoculation on rice and 12 days after inoculation on *Urochloa* measuring the maximum tiller lengths and the lesion lengths at the tiller. A disease index was calculated according to the following equation: length of the lesion at the tiller/maximum tiller length multiplied by nine (44). To detect evidence of host specialization, an standard analysis of variance followed by a planned *a priori* contrast analysis between groups of isolates was performed using SAS 9.1 software (SAS System for Windows, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA).

Pathogenicity of *R. solani* AG-1 IA from *Urochloa* to Fabaceae. Whether *R. solani* AG-1 IA isolates adapted to *Urochloa* spp. maintain a wider range of hosts that includes Fabaceae species was tested. Twelve *R. solani* AG-1 IA isolates from *U. brizantha* cv. Toledo and 12 additional isolates obtained from the *Urochloa* hybrid Mulato were used to infect two Fabaceae species: cowpea cv. IT86D-719 (65) and soybean (66). Two different experiments were performed, one for each host. The

experiments were set up, conducted and evaluated similarly to previous studies (6,36). The experiments used a complete randomized block design with five replicates and were repeated at least once. Disease severity was evaluated by photographing at least one infected leaf per plant. The level of disease severity was determined measuring the diseased leaf area using the image analysis software ASSESS (ASSESS: Image Analysis Software for Plant Disease Quantification, L. Lamari, Department of Plant Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada). An analysis of variance followed by planned contrast analysis for comparisons between groups of isolates was performed as previously described.

RESULTS

Genetic and genotypic diversity. One hundred eighty different multilocus genotypes were found among the 350 isolates analyzed (Table 2). Although the majority (172 of 180) of the multilocus genotypes were site specific, three were shared by *Urochloa* and rice fields in Colombia, and five were shared by *Urochloa* and rice fields in Brazil. In Colombia, two genotypes were shared by *U. brizantha* cv. Toledo (COL_BBT) and *Urochloa* hybrid Mulato (COL_BHM) populations, and one was also shared with the rice population (COL_OS). In Brazil, five genotypes were shared between RO_B1 and all the remaining populations, including the allopatric rice population RR_R from Roraima. No genotype was shared with the soybean population (RO_S). In addition, no genotypes were shared between populations from Colombia and Brazil.

The effective number of genotypes, a measure of genotypic diversity, was higher for soybean (RO_S) and *Urochloa* (RO_B1) populations, which exhibited genotypic diversity G_o of 17.34 and 16.47, respectively, and were significantly different from those of the Colombian populations. The three populations with the lowest genotypic diversity were COL_BBT, COL_BHM and COL_OS, which exhibited G_o values ranging from 4.13 to 5.27.

The clonal fraction varied from very low (0.05 for soybean population RO_S) to very high (0.74 for *U. brizantha* cv. Toledo population COL_BBT). Evenness varied from 0.23 for population COL_OS to 0.88 for population RO_B1 and 0.96 for

population RO_S. In general, the genotypes found in the rice population COL_OS were not uniformly distributed, whereas a more even distribution of genotypes was detected for the *Urochloa* RO_B1 and soybean populations. The average allelic richness of the eight populations was 3.50. Allelic richness was not significantly different among populations originating from soybean or *Urochloa* in Brazil and Colombia (AR ranging from 3.29 to 4.33). Populations COL_OS and RR_R, both from rice, exhibited lower allelic richness than the remaining populations (AR = 2.56 to 2.78) (Table 2).

Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and gametic disequilibrium. All nine microsatellite markers were polymorphic. A significant deviation in the number of loci in HWE was observed for most of the *R. solani* AG-1 IA populations sampled; only two to four loci were in HWE in the populations COL_BBT, COL_BHM, COL_OS, RO_B1, RO_B3 and RR_R (Table 3). In contrast, most of the loci were in HWE in the RO_S and RO_B2 populations. Inbreeding was not observed in any of the populations given that the mean F_{IS} coefficients per population were not significantly different from zero (Table 3). In contrast, gametic disequilibrium between loci was observed in all populations (r_D significant at $P \leq 0.001$). The proportion of pairs of loci in gametic disequilibrium varied between 0.15 (RR_R) and 0.57 (COL_BHM) (Table 3).

Genetic differentiation among *R. solani* AG-1 IA populations from *Urochloa*, soybean and rice in Brazil and Colombia. The overall fixation index R_{ST} of 0.145 ($P \leq 0.001$) indicated differentiation among geographical- and host-distinct populations of *R. solani* AG-1 IA from *Urochloa*, soybean and rice from Brazil and Colombia. Evidence of a significant subdivision between most *R. solani* AG-1 IA population pairs was detected. In contrast, populations COL_BHM, RO_B1 and RO_B3 from *Urochloa* did not exhibit genetic differentiation from each other, indicating gene flow over short and long distances. No differentiation was observed between the *R. solani* AG-1 IA populations COL_BHM from *Urochloa* and COL_OS from rice (Table 4).

Test for admixture or hidden population structure. Overall, 29% admixture was detected for sympatric (from the same region) and allopatric (from different regions) populations of *R. solani* AG-1 IA from *Urochloa*, rice and soybean from Brazil and Colombia. This corresponded to 52 genotypes that could have originated from populations different from their reference populations (Fig. 1). The degree of admixture varied from a minimum of 6% for population RO_S (only one admixed genotype) to a maximum of 63% for RO_B3 (equivalent to 14 admixed genotypes). In fact, all populations sampled from *Urochloa* exhibited a high proportion of admixed genotypes. No admixed genotypes were observed in *R. solani* AG-1 IA populations infecting rice in either Colombia or Roraima, Brazil. Population COL_BBT exhibited two admixed genotypes, which were attributed to the rice population. Population RO_B1 exhibited five mixed genotypes; these were attributed to the soybean population.

Historical migration. No significant differences were observed in the population size estimates of Brazilian and Colombian *R. solani* AG-1 IA populations infecting *Urochloa*, rice and soybean (Table 5). High asymmetry in historical migration rates among different geographic and host populations was observed. The migration rates of the *R. solani* AG-1 IA population infecting rice (COL_OS) to the two *Urochloa* populations (COL_BBT and COL_BHM) ($\theta_4 M_{6 \rightarrow 4} = 98.1$ and $\theta_5 M_{6 \rightarrow 5} = 30.1$) were significantly different. Similarly, migration rates in the opposite direction, i.e., from populations COL_BBT and COL_BHM to COL_OS, also differed significantly ($\theta_4 M_{4 \rightarrow 6} = 27.5$ and $\theta_5 M_{5 \rightarrow 6} = 1.3$) (Table 5). Moreover, whereas the migrant exchange between populations COL_OS and COL_BBT was asymmetric, with a ratio of approximately 4:1, higher asymmetry between populations COL_OS and COL_BHM was observed. Population COL_OS contributed 23 times more migrants to population COL_BHM than it received from that population. The rates of migration towards the Brazilian *R. solani* AG-1 IA population infecting *Urochloa* (RO_B) from all the remaining five populations were similar ($\theta_1 M_{x \rightarrow 1}$ varied between 15.1 and 26.9 migrants/generation). This indicates that population RO_B from *Urochloa* received similar proportions of migrants from all of the remaining populations sampled either in Brazil or in Colombia. Population RO_B asymmetrically contributed significantly more

migrants to four of the five populations sampled ($\theta_x M_{1 \rightarrow x}$ varying between 53.1 and 82.3, equivalent, on average, to four times more migrants). As an exception, this population contributed only 1.3 migrants/generation to population COL_OS.

Origin and historical phylogeography of *R. solani* AG-1 IA multigene lineages.

The neutrality tests performed indicated neutral evolution for the combination of the three loci (*R44L*, *R68L* and *R116L*) in the four pathogen populations (Table 6). The coalescent Bayesian phylogenetic maximum clade credibility tree indicated the occurrence of two main phylogenetic clades, A and B, with posterior probability support values higher than 99% for group A and 92% for group B (Fig. 2). The phylogeographic analysis indicated that the most likely common ancestor of both clades originated from a rice population (shown in purple in the figure). Clade A, which was older, originated at 0.65 coalescence units, whereas clade B, which was more recent, originated at approximately 0.34 coalescence units. Within clade A, the results supported subdivision into two subclades according to the geographic origin of the *R. solani* AG-1 IA isolates. The monophyletic subclade A-1 grouped the isolates sampled in Brazil from soybean and *Urochloa*. The paraphyletic subclade A-2 grouped isolates from rice and *Urochloa* sampled in Colombia, whereas the monophyletic clade B included mainly rice and *Urochloa* isolates from Colombia but also soybean and *Urochloa* isolates from Brazil.

Cross-pathogenicity of *R. solani* AG-1 in *Urochloa* and rice. *R. solani* AG-1 IA isolates from *Urochloa* were more aggressive to *Urochloa* than the rice isolates, indicating incipient host specialization (Table 7). No significant difference in aggressiveness between the two groups of isolates was observed on rice.

Pathogenicity to Fabaceae of *R. solani* AG-1 IA isolated from *Urochloa*. The two groups of *R. solani* AG-1 IA isolates from *Urochloa* [from *U. brizantha* cv. Toledo (BBT) or *Urochloa* hybrid Mulato (BHM)] were highly aggressive on cowpea and on soybean (Table 8).

DISCUSSION

This study provides the first detailed analysis combining both population genetic structure and phylogeographical approaches to describe the emergence of *R. solani* AG-1 IA as the *Urochloa* leaf blight and collar rot pathogen from Colombia and Brazil. The populations of *R. solani* AG-1 IA from *Urochloa* were sampled from Meta state in the Colombian Llanos and from Rondônia in the Brazilian Amazon, where a high number of disease foci were observed on forage grass pastures. In addition to these populations, sympatric populations of *R. solani* AG-1 IA from rice in Colombia and from soybean in Rondônia, as well as from one allopatric rice population in Roraima, were included to test hypotheses about the origin of the *Urochloa* pathogen populations.

Firstly, we tested the hypothesis that geographical and distinct host populations of *R. solani* AG-1 IA from *Urochloa*, rice and soybean are genetically homogeneous and therefore are not subdivided or differentiated (Table 4). Although a contemporary subdivision between the *R. solani* AG-1 IA populations obtained from *Urochloa* in Colombia was detected (COL_BBT and COL_BHM; Table 4), the level of subdivision was relatively low ($R_{ST} = 0.06$) compared to the remaining pairs, which were significantly differentiated. The high number of admixed genotypes between these two *Urochloa* populations (nine shared genotypes, representing 33 to 42% admixture; Fig. 1) indicated dispersal of pathogen genotypes between them, supporting the hypothesis of contemporary gene and genotypic flow. Moreover, contemporary gene flow between COL_BHM and the population COL_OS sampled from rice in the same region was observed ($R_{ST} = 0.001^{NS}$). In addition, historical migration between the sympatric *R. solani* AG-1 IA populations from rice and *Urochloa* in Colombia was observed. Population COL_OS contributed between 30 and 98 migrants/generation to the two populations adapted to *Urochloa*. In particular, high asymmetry (approximately 4 to 23 times more migrants) was detected in the historical migration from COL_OS to COL_BBT or to COL_BHM, respectively. The high rate of unidirectional historical migration from COL_OS to COL_BHM possibly

explains why these two populations are still not genetically differentiated. It is therefore likely that populations of *R. solani* AG-1 IA currently infecting *Urochloa* in Colombia derived from an *R. solani* AG-1 IA population infecting rice. This hypothesis is supported by the results of the phylogeographic analysis, which indicated that the most likely common ancestor for the *R. solani* AG-1 IA populations currently infecting *Urochloa* in Colombia and Brazil most likely originated from rice populations (Fig. 2).

In Brazil, no asymmetric migration route towards the population RO_B from *Urochloa* in Rondônia was detected as clearly as those observed for the Colombian populations. Population RO_B received a similar proportion of migrants (between 15 and 27 migrants/generation) from all of the remaining sampled pathogen populations, including those from soybean and rice in Brazil and from *Urochloa* and rice in Colombia. Besides, population RO_B contributed four times more migrants (between 53 and 94 migrants/generation) to most pathogen populations except COL_OS.

The most plausible explanation for the high historical and contemporary long-distance gene flow observed, especially between *Urochloa*-adapted *R. solani* AG-1 IA populations from Brazil and Colombia, may be the extensive long distance dispersal of the pathogen associated with infected seeds. Such dispersal would be favored by the intense exchange of seeds between the two countries. Brazil is considered the highest worldwide producer and exporter of tropical forage plants seeds including *Urochloa*, exporting to more than 20 countries. Forage seed export represents an income of approximately US\$250 million/year (94). Although there is legislation regulating and establishing norms and standards for the production of forage seeds (62), the health quality of *Urochloa* seeds produced in Brazil is considered low, thus favoring the dispersal of several pathogens, including *R. solani* AG-1 IA (30,53). As an example, the frequency of *Rhizoctonia* in commercial seed lots of *Urochloa* varied between 7.7 and 22.9% of the lots analyzed in 2004 and 2006 cropping seasons, with an average incidence of approximately 1% of infected seeds (56).

How can one explain the high historical migration of the *R. solani* AG-1 IA population from *Urochloa* (RO_B) to populations of other hosts, such as soybean (RO_S) and rice (RR_R), in Brazil? Two particular characteristics of the extensive *Urochloa* cultivation in Brazil are believed to have facilitated both an increase in

pathogen population adapted to *Urochloa* and its dispersal to other hosts on adjacent plantations. Historically, the expansion of grass pasture cultivation, such as that of *Urochloa* in the Amazon region, led to the occupation of vast extensions of territory overlapping areas cultivated with rice or soybean (77). In addition, the cultivation of pastures of the genus *Urochloa* exhibits spatial and temporal continuity throughout the year (4,82), possibly providing a continuous reservoir of inoculum for plant pathogens associated with adjacent crops (55).

From an ecological point of view, the extensive cultivation of *Urochloa* in Brazil results in increased connectivity between pathogen populations beyond macro-geographical borders and a consequent increase in the dynamics of diseases in the remaining hosts. The possible evolutionary and epidemiological consequences of this high degree of connectivity include higher probability of accelerated evolution of the pathogen and increased risk of the disease becoming endemic or pandemic (12,90,104). In fact, the connectivity between agricultural crops and natural components of rural landscapes has the potential to positively affect disease dynamics (dissemination and severity) as well as the evolution of plant pathogens in agroecosystems; consequently, it may increase the rate at which new pathotypes emerge (12).

Plant disease management using agricultural landscape ecology concepts that relate environmental spatial patterns to ecological and epidemiological processes can provide strategies for decreasing the connectivity between agricultural crops (63,73,74). The main goal of agro-ecological management of plant diseases is to stimulate spatial or time heterogeneity through habitat fragmentation or through fragmentation of agricultural landscapes, thereby limiting the dynamics of disease spread and the propagation of plant pathogens among host populations (63,73,74). Proposals of this type demand that the scale of application of disease management strategies be elevated from the simple field level to the level of complex agricultural landscapes. Given the magnitude of pasture cultivation in Brazil, the proposal of decreasing connectivity between susceptible host populations of *R. solani* AG-1 IA (including rice, soybean, cowpea, and *Urochloa* pastures) in agricultural landscapes with the goal of limiting the dynamics of pathogen populations between crops, although theoretically sound, is currently impracticable in South American

agroecosystems.

We favor the hypothesis that the emergence of *Urochloa* leaf blight in Colombia most likely occurred through host shift (85). Moreover, the considerable magnitude of pathogen migration between *Urochloa* and soybean populations in Rondônia, Brazil (Table 5), and the pathogen's ability to infect other Fabaceae such as cowpea and soybean (Table 8), suggests that *R. solani* AG-1 IA also has the ability to jump between hosts (85).

Incipient ecological adaptation of the *R. solani* AG-1 IA populations adapted to rice and *Urochloa* in Colombia could explain the relatively low contemporary levels of genetic divergence observed (41,50). However, the pathogen populations adapted to *Urochloa* may already exhibit some level of host specialization. Cross-pathogenicity essays of *R. solani* AG-1 IA from rice and *Urochloa* indicated that AG-1 IA isolates from *Urochloa* were more aggressive in *Urochloa* than the isolates from rice. A similar phenomenon of emergence of host-specific populations of *R. solani* AG-1 IA infecting corn and rice has been observed in Venezuela. Although the corn populations, which were considered more recent than the rice populations, exhibited genetic subdivision relative to the rice populations ($R_{ST} = 0.13$ to 0.17^{***}), they historically shared migrants; it was suggested that the corn-adapted populations originated from rice populations via host shift in the same region (36).

No previous studies have provided information on the predominant reproductive system of *R. solani* AG-1 IA from *Urochloa*. Evidence from worldwide population genetic analyses of the fungus *R. solani* AG-1 IA infecting rice, corn and soybeans indicates the predominance of either a mixed reproductive system including both sexual reproduction and local clonal dispersal or an essentially recombinant system (7,20,36,52,80). The indicators of a sexually reproducing organism are high genotypic diversity, reduced clonality, neutral molecular markers that follow expected HWE proportions and gametic equilibrium (59,61).

Most populations of *R. solani* AG-1 IA sampled from Colombia exhibited high clonal fraction, with 43 to 57% of the markers exhibiting the expected HWE proportions. The highest clonal fraction observed was 0.74 for population COL_BBT (Table 2). Significant deviations from HWE for most loci were observed for COL_BBT, COL_BHM and COL_OS populations of *R. solani* AG-1 IA from *Urochloa* and rice

(Table 3). The COL_BBT and COL_BHM populations exhibited the highest number of pairs of loci in gametic disequilibrium. The clonal fraction observed in *R. solani* AG-1 IA populations from Brazil was relatively lower, varying between 0.10 and 0.39 for *Urochloa* in Rondônia, with 22 to 56% loci exhibiting HWE proportions. Gametic disequilibrium varied between 17 and 72% for pairs of loci from the *Urochloa* populations, with a minimum of 15% for the rice-adapted population sampled from RR.

In general, we can state that the genetic structure of the two *R. solani* AG-1 IA populations infecting *Urochloa* in Colombia and Brazil was essentially clonal, possibly representing clones that were successful in infecting *Urochloa* or combinations of favorable genes originating from sexual reproduction (100). In contrast, a very different population structure was observed for the RO_B2 population from *Urochloa* from Rondônia, which exhibited most loci in HWE and low gametic disequilibrium. This indicates the occurrence of recombination and the likely existence of a sexual reproductive system for the pathogen population.

The causes of the HWE deviations and gametic disequilibrium observed in pathogen populations associated with *Urochloa* were investigated. One plausible cause of the observed disequilibrium would be the occurrence of inbreeding (non-random mating) (39,89). However, inbreeding was not observed in these populations given that the inbreeding coefficients, F_{IS} , were not significant. A second possible explanation for the observed disequilibrium could be the Wahlund effect resulting from the admixture between populations, possibly due to contemporary or historical gene flow (39,78). In fact, the hypothesis of admixture between populations cannot be rejected for any of the *Urochloa* populations sampled either in Colombia or in Brazil (Figure 1). Therefore, the observed deviations from the pattern commonly classified as a mixed reproductive system (6,7,72) were associated with the demographic aspects that shaped the pathogen populations, especially the admixture between populations experiencing high migration rates and significant gene flow.

According to a previously proposed evolutionary risk model (3,59), the ability of long-distance gene and genotypic flow and the presence of a mixed reproduction system to produce high genotypic diversity places *R. solani* AG-1 IA in the category of plant pathogens with high evolutionary potential, as previously described for other *R. solani* AG-1 IA pathosystems (7,20,31,36). This in turn suggests that classical disease management strategies based, for example, on the application of systemic fungicides with specific modes of action or on the use of qualitative genetic resistance (governed by one or a few genes) should be implemented carefully and at reduced spatial scales because the use of such strategies would result in high selection pressure on the pathogen populations (3,104).

ACKNOWLEDGMENTS

E. Chavarro Mesa L. M. Ramos Molina contributed equally to this manuscript. This work was funded by a FAPESP (São Paulo Research Foundation, Brazil) – Biota research grant to P. C. Ceresini (2011/50150-3), research fellowships (Pq-2 308394/2009-7 and Pq-2 307361/2012-8) and grants (481756/2010-8, 485244/2012-8 and 454543/2013-1) from CNPq (Brazilian National Council for Scientific and Technological Development) to P. C. Ceresini. E. Chavarro Mesa was supported by a PhD studentship from FAPESP (2011/23050-8), L. M. Ramos Molina by a PhD studentship from CNPq – DR (140564/2009-8) and D. A. S. Pereira by a MSc studentship from FAPESP (2013/11944-0).

LITERATURE CITED

1. Agapow, P.-M., and Burt, A. 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Mol. Ecol. Notes* 1 (1-2):101-102.
2. Argel, P.J., Miles, J.W., Guiot, J.D., and Lascano, C.E. 2005. Cultivar Mulato (*Brachiaria* h.brido CIAT 36061). Gramínea de alta producción y calidad forrajera para los trópicos. Palmira: CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical.

- 3.Barrett, L.G., Thrall, P.H., Burdon, J.J., and Linde, C.C. 2008. Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host–parasite interactions. *Trends Ecol. Evol.* 23 (12):678-685.
- 4.Batistella, M., and Moran, E.F. 2005. Dimensões humanas do uso e cobertura das terras na Amazônia: uma contribuição do LBA. *Acta Amazonica* 35:239-247.
- 5.Beerli, P., and Felsenstein, J. 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (8):4563-4568.
- 6.Bernardes de Assis, J., Peyer, P., Rush, M.C., Zala, M., McDonald, B.A., and Ceresini, P.C. 2008. Divergence between sympatric rice- and soybean-infecting populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA. *Phytopathology* 98 (12):1326-1333.
- 7.Bernardes-de-Assis, J., Storari, M., Zala, M., Wang, W., Jiang, D., ShiDong, L., Jin, M., McDonald, B.A., and Ceresini, P.C. 2009. Genetic structure of populations of the rice-infecting pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from China. *Phytopathology* 99 (9):1090-1099.
- 8.Black, B.D., Griffin, J.L., Russin, J.S., and Snow, J.P. 1996. Weed hosts for *Rhizoctonia solani*, causal agent for rhizoctonia foliar blight of soybean (*Glycine max*). *Weed Technol.* 10:865-869.
- 9.Bolkan, H.A., and Ribeiro, W.R.C. 1985. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. *Plant Pathol.* 69:599-601.
- 10.Bonferroni, C.E. 1935. Il calcolo delle assicurazioni su gruppi di teste. In *Studi in onore del professore Salvatore Ortu Carboni*. Rome, Italy.
- 11.Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.-H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A., and Drummond, A.J. 2014. BEAST 2: A software platform for bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology* 10 (4):e1003537.
- 12.Burdon, J.J., and Thrall, P.H. 2008. Pathogen evolution across the agro-ecological interface: implications for disease management. *Evol. Appl.* 1 (1):57-65.

13. Cardona, R., Rodríguez, H., and Nass, H. 1999. Mancha bandeada en maíz causada por *Rhizoctonia solani* en el estado Portuguesa, Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 12 (2):32-33.
14. Carling, D.E. 1996. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*, edited by Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. M. and Dijst, G. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
15. Cedeño, L., Nass, H., Carrero, C., Cardona, R., Rodríguez, H., and Alemán, L. 1996. *Rhizoctonia solani* AG-1-IA, causa principal del añublo de la vaina del arroz en Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 9:6-9
16. Chakraborty, R. 1990. Mitochondrial DNA polymorphism reveals hidden heterogeneity within some Asian populations. *Am. J. Hum. Genet.* 47:87-94.
17. Chavarro Mesa, E., Ramos Molina, L.M., Silva Herrera, M.R., Conceição, G.H., and Ceresini, P.C. 2012. Etiologia e detecção molecular do patógeno da queima da folha da Braquiária: *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. *Tropical Plant Pathology* 37:153.
18. Chavarro Mesa, E., Pereira, D.A.S., Schurt, D.A., Vieira Júnior, J.R., and Ceresini, P.C. 2014. A etiologia complexa de doenças causadas por fungos do gênero *Rhizoctonia* em Brachiaria e em culturas simpátricas de arroz, feijão-caupi ou soja na Amazônia, nos Cerrados Brasileiros e no Vale do Paraíba. In Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 47. Londrina, PR: SBF - Sociedade Brasileira de Fitopatologia.
19. Ciampi, M.B., Kuramae, E.E., Fenille, R.C., Meyer, M.C., Souza, N.L., and Ceresini, P.C. 2005. 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. *Eur. J. Plant Pathol.* 113 (2):183-196.
20. Ciampi, M.B., Meyer, M.C., Costa, M.J.N., Zala, M., McDonald, B.A., and Ceresini, P.C. 2008. Genetic structure of populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA from soybean in Brazil. *Phytopathology* 98 (8):932-941.

- 21.CIAT. 1993. Annual Report, Tropical Forages Program. Document number 166. Cali: CIAT-Cali, Colombia.
- 22.Costa-Souza, E., Kuramae, E.E., Nakatani, A.K., Basseto, M.A., Prabhu, A.S., and Ceresini, P.C. 2007. Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado ao arroz em Tocantins, Brasil. *Summa Phytopathol.* 33 (2):129-136.
- 23.Dall'Agnol, M., and Schifino-Wittmann, M.T. 2005. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. *R. bras. Agrociência* 11 (2):127-133.
- 24.Duarte, M.d.L.R., Albuquerque, F.C., Sanhueza, R.M.V., Verzignassi, J.R., and Kondo, N. 2007. Etiologia da podridão do coleto de *Brachiara brizantha* em pastagens da Amazônia. *Fitopatol. Bras.* 32 (3):261-265.
- 25.El Mousadik, A., and Petit, R.J. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.* 92 (7):832-839.
- 26.Ewens, W.J. 1972. The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theoretical population biology* 3:87-112.
- 27.Excoffier, L., Smouse, P.E., and Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131 (2):479-491.
- 28.Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinf.* 1:47-50.
- 29.Fenille, R.C., Souza, N.L., and Kuramae, E.E. 2002. Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil. *Eur. J. Plant Pathol.* 108:783-792.
- 30.Fernandes, C.D., Marchi, C.E., Jerba, V.d.F., and Borges, M.d.F. 2005. Patógenos associados às sementes de forrageiras tropicais e estratégias de controle. In *Sementes: qualidade fitossanitária.*, edited by Zambolim, L. Viçosa: UFV.

31. Ferrucho, R.L., Ceresini, P.C., Ramirez-Escobar, U.M., McDonald, B.A., Cubeta, M.A., and García-Domínguez, C. 2013. The Population Genetic Structure of *Rhizoctonia solani* AG-3PT from Potato in the Colombian Andes. *Phytopathology* 103 (8):862-869.
32. Fu, Y.X., and Li, W.H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133:693-709.
33. Gaino, A.P.d.S.d.C., Basseto, M.A., Gasparotto, L., Poltronieri, L.S., and Ceresini, P.C. 2010. Phylogenetic inference reveals the complex etiology of the target and leaf spot diseases on rubber tree and other species cultivated in the Amazon. *Acta Sci. Agron.* 32 (3):385-395.
34. Galindo, J.J., Abawi, G.S., Thurston, H.D., and Galvez, G. 1983. Source of inoculum and development of bean web blight in Costa Rica. *Plant Dis.* 67:1016-1021.
35. Garnier-Gere, P., and Dillmann, C. 1992. A computer program for testing pairwise linkage disequilibria in subdivided populations. *J. Hered.* 83:239.
36. González-Vera, A.D., Bernardes-de-Assis, J., Zala, M., McDonald, B.A., Correa-Victoria, F., Graterol-Matute, E.J., and Ceresini, P.C. 2010. Divergence between sympatric rice- and maize-infecting populations of *Rhizoctonia solani* AG 1 IA from Latin America. *Phytopathology* 100 (2):172-182.
37. Goudet, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86 (6):485-486.
38. Guo, S.W., and Thompson, E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372.
39. Hartl, D.L., and Clark, A.G. 1997. *Principles of Population Genetics*. 3rd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
40. Hashiba, T., and Kobayashi, T. 1996. Rice diseases incited by *Rhizoctonia* species. In *Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*, edited by Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. and Dijst, G. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

41. Huyse, T., Poulin, R., and Theron, A. 2005. Speciation in parasites: a population genetics approach. *Trends Parasitol.* 21 (10):469-475.
42. IBGE Instituto Brasileiro de Geografia and Estatística. Séries estatísticas e séries históricas: Agropecuária IBGE, 2006 [cited 01/12/2014. Available from <http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?no=1&op=0&vcodigo=AGRO03&t=utilizacao-terras-ha>.
43. ———. 2006. *Censo agropecuário 2006: Brasil, grandes regiões e unidades da federação*. Rio de Janeiro: IBGE.
44. Jia, Y., Correa-Victoria, F., McClung, A., Zhu, L., Liu, G., Wamishe, Y., Xie, J., Marchetti, M., Pinson, S.R.M., Rutger, J.N., and Correll, J.C. 2007. Rapid determination of rice cultivar responses to the sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* using micro-chamber screening method. *Plant Dis.* 91:485-489.
45. Jones, R.K., and Belmar, S.B. 1989. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolated from rice, soybean, and other crops grown in rotation with rice in Texas. *Plant Dis.* 73:1004-1010. .
46. Kamvar, Z.N., Tabima, J.F., and Grünwald, N.J. 2014. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2:e281.
47. Kelemu, S., Miles, J.W., Bonilla, X.P., and Badel, J.L. 1995. Sources of resistance in species of Brachiaria to foliar blight disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Trop. Grassl.* 29:257-262.
48. Ko, W., and Hora, F. 1971. A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* 61:707-710.
49. Kobayashi, T., Mew, T.W., and Hashiba, T. 1997. Relationship between incidence of rice sheath blight and primary inoculum in the Philippines: Mycelia in plant debris and sclerotia. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 63:324-327.
50. Kohn, L.M. 2005. Mechanisms of fungal speciation. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43 (1):279-308.

- 51.Lee, F.N., and Rush, M.C. 1983. Rice sheath blight: a major rice disease. *Plant Dis.* 67 (7):829-832.
- 52.Linde, C.C., Zala, M., Paulraj, R.S.D., McDonald, B.A., and Gnanamanickam, S.S. 2005. Population structure of the rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from India. *Eur. J. Plant Pathol.* 112:113-121.
- 53.Mallmann, G., Verzignassi, J.R., Fernandes, C.D., Santos, J.M.d., Vechiato, M.H., Inácio, C.A., Batista, M.V., and Queiroz, C.d.A. 2013. Fungos e nematoides associados a sementes de forrageiras tropicais. *Summa Phytopathol.* 39:201-203.
- 54.Manly, B.F.J. 1991. *Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in Biology*. 2 ed. London: Chapman & Hall / CRC.
- 55.Marchi, C.E., Fernandes, C.D., and Verzignassi, J.R. 2011. Doenças em forrageiras. In Documentos. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte.
- 56.Marchi, C.E., Fernandes, C.D., Bueno, M.L., Batista, M.V., and Fabris, L.R. 2010. Fungos veiculados por sementes comerciais de braquiária. *Arquivos do Instituto Biológico* 77 (1):65-73.
- 57.Matsumoto, M. 2002. Trials of direct detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG 1 and AG 2 subgroups using specifically primed PCR analysis. *Mycoscience* 43:185-189.
- 58.Maynard Smith, J., Smith, N.H., O'Rourke, M., and Spratt, B.G. 1993. How clonal are bacteria? . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:4384–4388.
- 59.McDonald, B.A., and Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40 (1):349-379.
- 60.Meirmans, P.G., and Van Tienderen, P.H. 2004. GenoType and GenoDive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Mol. Ecol. Notes* 4 (4):792-794.
- 61.Milgroom, M.G. 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:457-477.
- 62.Ministério da Agricultura Pecuária and Abastecimento - Brasil. 2008. Instrução Normativa nº 30, de 21 de maio de 2008. Estabelece normas e padrões para

produção e comercialização de sementes de espécies forrageiras de clima tropical, na forma dos Anexos I a VII desta Instrução, que terão validade em todo o território nacional: Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção I, p.45, 23 de maio 2008.

- 63.Mundt, C.C., Sackett, K.E., and Wallace, L.D. 2010. Landscape heterogeneity and disease spread: experimental approaches with a plant pathogen. *Ecol. Appl.* 21 (2):321-328.
- 64.Naito, S. 2006. Ecological studies on teleomorphic and anamorphic stages in *Rhizoctonia* fungi. *J. Gen. Plant Pathol.* 72 (6):400-403.
- 65.Nechet, K.d.L., and Halfeld-Vieira, B.A. 2007. Reação de cultivares de feijão-caupi à mela (*Rhizoctonia solani*) em Roraima. *Fitopatol. Bras.* 32:424-428.
- 66.Nechet, K.d.L., Halfeld-Vieira, B.d.A., Gianluppi, V., and Meyer, M.C. 2008. Reação de cultivares de soja à mela (*Thanatephorus cucumeris*) em campo em dois estádios de desenvolvimento das plantas. *Summa Phytopathol.* 34:277-279.
- 67.Nechet, K.L., and Halfeld-Vieira, B.A. 2006. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp., associados à mela do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), coletados em Roraima. *Fitopatol. Bras.* 31:505-508.
- 68.Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a number of individuals. *Genetics* 89:538-590.
- 69.Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia Univ. Press.
- 70.Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25 (1):125-143.
- 71.Oniki, M., Ogoshi, A., and Araki, T. 1986. Development of the perfect state of *Rhizoctonia solani* Kühn AG-1. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 52:169-74.
- 72.Padasht-Dehkaei, F., Zala, M., Okhovvat, S.M., Nikkhah, M.J., McDonald, B.A., and Ceresini, P.C. 2010. Population genetic evidence that basidiospores play an important role in the disease cycle of rice-infecting populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA in Iran. *Plant Pathol.* submitted.

73. Papaïx, J., Touzeau, S., Monod, H., and Lannou, C. 2014. Can epidemic control be achieved by altering landscape connectivity in agricultural systems? *Ecol. Model.* 284:35-47.
74. Papaïx, J., Adamczyk-Chauvat, K., Bouvier, A., Kiêu, K., Touzeau, S., Lannou, C., and Monod, H. 2014. Pathogen population dynamics in agricultural landscapes: The Ddal modelling framework. *Infection, Genetics and Evolution* 27 (0):509-520.
75. Pascual, Toda, Raymondo, and Hyakumachi. 2000. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. *Plant Pathol.* 49 (1):108-118.
76. Perdomo, R., Hernández, A., Gonzáles, A., Pineda, J., and Alezones, J. 2007. Caracterización y evaluación de virulencia en aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn, causante de la mancha bandeada en maíz. *Interciencia* 32 (1):48-55.
77. Prates, R.C., and Bacha, C.J.C. 2011. Os processos de desenvolvimento e desmatamento da Amazônia. *Economia e Sociedade* 20:601-636.
78. Pritchard, J.K., Stephens, M., and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155 (2):945-959.
79. Raymond, M., and Rousset, F. 1995. Genepop (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86 (3):248-249.
80. Rosewich, U.L., Pettway, R.E., McDonald, B.A., and Kistler, H.C. 1999. High levels of gene flow and heterozygote excess characterize *Rhizoctonia solani* AG-1 IA (*Thanatephorus cucumeris*) from Texas. *Fungal Genet. Biol.* 28 (3):148-159.
81. Seiffert, N.F. 1984. Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria*. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte.
82. Silva, E.B.d., Ferreira Júnior, L.G., Anjos, A.F.d., and Miziara, F. 2013. Análise da distribuição espaço-temporal das pastagens cultivadas no bioma Cerrado entre 1970 e 2006. *Revista IDeAS - Interfaces em Desenvolvimento, Agricultura e Sociedade* 7 (1):174-209.

- 83.Souza, O.C., Zimmer, A.H., Valle, L.C.S., and Koller, W.W. 2000. Diagnóstico de morte de pastagens de *Brachiaria brizantha* nas regiões de Araguaína, TO and Redenção, PA. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte.
- 84.Stephens, M., Smith, N.J., and Donnelly, P. 2001. A New statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.* 68 (4):978-989.
- 85.Stukenbrock, E.H., and McDonald, B.A. 2008. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46 (1):75-100.
- 86.Sumner, D.R. 1996. Sclerotia formation by *Rhizoctonia* species and their survival. In *Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*, edited by Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. and Dijst, G. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- 87.Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123 (3):585-595.
- 88.Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731-2739.
- 89.Taylor, J.W., Jacobson, D.J., and Fisher, M.C. 1999. The evolution of asexual fungi: Reproduction, Speciation and Classification. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37 (1):197-246.
- 90.Thrall, P.H., Oakeshott, J.G., Fitt, G., Southerton, S., Burdon, J.J., Sheppard, A., Russell, R.J., Zalucki, M., Heino, M., and Ford Denison, R. 2011. Evolution in agriculture: the application of evolutionary approaches to the management of biotic interactions in agro-ecosystems. *Evol. Appl.* 4 (2):200-215.
- 91.Torres González, A.M., and Morton, C.M. 2005. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 37 (1):36-44.

- 92.Valério, J.R., Souza, O.C., Vieira, J.M., and Corrêa, E.S. 2000. Diagnóstico de morte de pastagens nas regiões central e norte do Estado de Mato Grosso. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte.
- 93.Valle, L.d.C.S., Valério, J.R., Souza, O.C.d., Fernandes, C.D., and Corrêa, E.S. 2000. Diagnóstico de morte de pastures nas regiões leste and nordeste do estado de Mato Grosso. In Documentos. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 13p.
- 94.Vechiato, M.H., and Aparecido, C.C. 2008. Fungos em sementes de gramíneas forrageiras: restrição fitossanitária e métodos de detecção. In Comunicado Técnico, 89. São Paulo: Instituto Biológico, 2p.
- 95.Verzignassi, J.R., and Fernandes, C.D. 2001. Doenças em forrageiras. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte.
- 96.Watterson, G.A. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor. Popul. Biol.* 7 (2):256-276.
- 97.Weber, G.F. 1939. Web-blight, a disease of beans caused by *Corticium microsclerotia*. *Phytopathology* 29:559-575.
- 98.Weir, B.S. 1996. *Genetic Data Analysis*. 2 ed. Sunderland: Sinauer.
- 99.Weir, B.S., and Cockerman, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- 100.Xu, J. 2005. Cost of interacting with sexual partners in a facultative sexual microbe. *Genetics* 171 (4):1597-1604.
- 101.Yang, X.B., Snow, J.P., and Berggren, G.T. 1989. Morphogenesis of microsclerotia and sasakii-type sclerotia in *Rhizoctonia solani*, anastomosis group 1, intraspecific groups IA and IB. *Mycol. Res.* 93 (4):429-434.
- 102.Zala, M., McDonald, B.A., Bernardes de Assis, J., Ciampi, M.B., Storari, M., Peyer, P., and Ceresini, P.C. 2008. Highly polymorphic microsatellite loci in the maize- and rice-infecting fungal pathogen *Rhizoctonia solani* anastomosis group 1 IA. *Mol. Ecol. Res.* 8:686-689.

- 103.Zhan, J., Pettway, R.E., and McDonald, B.A. 2003. The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. *Fungal Genet. Biol.* 38 (3):286-297.
- 104.Zhan, J., Thrall, P.H., and Burdon, J.J. 2014. Achieving sustainable plant disease management through evolutionary principles. *Trends Plant Sci.* 19 (9):570-575.

TABLES AND FIGURES

Table 1. Sympatric populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from *Urochloa*, rice and soybean sampled at Meta, Colombia and at Rondônia and Roraima, Brazil

Countries, states and municipalities	District	Isolates <i>N</i> ^a	Population	Coordinates	Host	Year of collection
Colombia						
Meta						
Puerto López	Puerto López	80	COL_BBT	4°07'13,40" N 72°49'52,99" W	<i>Urochloa brizantha</i> cv. Toledo	2010
Villavicencio	El Alcaravan			4°05'12,14" N 73°19'06,21" W	<i>U. brizantha</i> cv. Toledo	2011
Puerto López	La Bonga	81	COL_BHM	4°13'35,45" N 72°28'58,36" W	<i>Urochloa</i> Hybrid Mulato	2010
Villavicencio	La Libertad			4°03'25,17" N 73°27'45,38" W	<i>Urochloa</i> Hybrid Mulato	2010
Villavicencio	Pompeya	43	COL_OS	4°02'26,64" N 73°21'15,76" W	Thailandia Rice variety	2011
Brazil						
Rondônia (RO)						
Itapuã do Oeste		20	RO_S	9° 13,281' S 63° 10,598' W	Soybean, unknown variety	2013
Alto Paraíso				9° 42,810' S 63° 20,259' W		
		30	RO_B1	9° 29,205' S 63° 23,948' W	<i>U. brizantha</i> cv. Marandú	2013
		32	RO_B2	9° 50,486' S 63° 39,661' W	<i>U. brizantha</i> cv. Marandú	2013
Nova União		37	RO_B3	10° 42,506' S 62° 27,340' W	<i>U. brizantha</i> cv. Marandú	2013
				10° 41,163' S 62° 28,831' W		
Roraima (RR)						
Boa Vista		27	RR_R	2° 48,718' S 60° 39,073' W	Rice	2013

^a *N* = Sample size (number of isolates) of each population.

Table 2. Measures of genotypic and gene diversity in sympatric populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from *Urochloa*, rice and soybean from Meta, Colombia and from Rondônia and Roraima, Brazil

Population	Sample size (N)	Number of genotypes	Site-specific and shared genotypes ^a	Genotypic diversity (G _O) ^b	Clonal fraction	Evenness ^{bc}	Allelic richness (AR) ^{de}
Colombia							
COL_BBT	80	21	18 (3)	5.27 cd	0.74	0.29 e	3.29 abc
COL_BHM	81	28	25 (3)	7.66 cd	0.65	0.34 d	3.63 abc
COL_OS	43	19	18 (1)	4.13 d	0.56	0.23 f	2.78 bc
Total in Colombia	204	68	65 (3)		0.68		
Brazil							
RO_S	20	19	19 (0)	17.34 a	0.05	0.96 a	4.33 a
RO_B1	30	27	22 (5)	16.47 ab	0.10	0.88 b	4.15 a
RO_B2	32	24	23 (1)	12.72 bc	0.25	0.70 c	3.61 abc
RO_B3	37	23	20 (3)	11.97 bc	0.38	0.72 c	3.71 ab
RR_R	27	19	18 (1)	11.67 bc	0.30	0.73 c	2.56 c
Total in Brazil	146	112	107 (5)		0.22		
Overall total	350	180	172 (8)				

^a Number of genotypes shared with other populations are shown in parentheses.

^b Means followed by the same letter are not significantly different according to a pairwise test for differences in clonal diversity indices among populations, with 1000 permutations per bootstrap resampling. For G_O, sub-samplings were used to match the size of the smallest population, with 19 individuals.

^c Evenness equal to 1.0 indicates that all genotypes exhibited identical frequencies in the population.

^d Comparisons between mean allelic richness (with rarefaction, based on a sample of 19 diploid individuals) were performed using FSTAT 2.9.3.2. software (37) based on 1000 permutations; means followed by the same letter are not significantly different ($P \geq 0.05$).

^e Calculated according to El Mousadik & Petit (25).

Table 3. Tests of random allelic association within each locus and between pairs of loci in *Rhizoctonia solani* AG-1 IA populations from *Urochloa* and rice from Colombia

Population	Clone-corrected 2 <i>N</i>	Number of loci in HWE ^a	<i>F</i> _{IS} population-specific ^b	<i>P</i> value for <i>F</i> _{IS}	<i>r</i> _{<i>D</i>} ^c	<i>P</i> value for <i>r</i> _{<i>D</i>}	Number and proportion of pairs of loci in gametic disequilibrium ^d	
Colombia								
COL_BBT	42	3 in 7 ^e	-0.064	0.68	0.258	0.001	9/21 ^e	0.43
COL_BHM	56	4 in 7 ^e	-0.265	0.99	0.265	0.001	12/21 ^a	0.57
COL_OS5	38	4 in 7 ^e	0.017	0.39	0.147	0.001	4/21 ^e	0.19
Brazil								
RO_S	38	5 in 9	0.211	0.068	0.224	0.001	12/36	0.33
RO_B1	54	2 in 9	-0.020	0.56	0.272	0.0001	26/36	0.72
RO_B2	48	5 in 9	-0.090	0.73	0.245	0.001	6/36	0.17
RO_B3	46	4 in 9	-0.158	0.90	0.435	0.001	18/36	0.50
RR_R	38	4 in 9 [†]	-0.287	0.96	0.113	0.001	3/21 [†]	0.15

^a Test analogous to the Fisher's exact test (38). P values were obtained using the Markov Chain Monte Carlo method (MCMC), generating an exact probability distribution not biased by rare alleles or small sample size in the ARLEQUIN 3.11 software (28) at $P \leq 0.05$ following Bonferroni correction for multiple comparisons (10).

^b Inbreeding coefficient (F_{IS}) and respective P values determined using ARLEQUIN 3.11 software.

^c r_D is a multilocus disequilibrium index (58), corrected for the total number of loci. Significant values were determined using both MULTILOCUS 1.3 software (1) and the poppr 1.0.5 R package (46), testing the null hypothesis of complete panmixia (i.e., no association between pairs of loci) with 1,000 randomizations.

^d Fisher's exact test (35) performed using GENEPOP 3.4 software (79) at $P \leq 0.05$ following Bonferroni correction (10) for multiple comparisons.

^e Two monomorphic loci (T10 and TC13).

^f Two loci with a single heterozygous genotype (TC02 and TC07).

Table 4. Measures of differentiation between populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA of *Urochloa*, rice and soybean in Colombia and Brazil based on R_{ST}^a

	COL_BBT	COL_BHM	COL_OS	RO_S	RO_B1	RO_B2	RO_B3
Colombia							
COL_BBT	-						
COL_BHM	0.057 **	-					
COL_OS5	0.094 **	0.001 ^{NS}	-				
Brazil							
RO_S	0.174 ***	0.173***	0.310 ***	-			
RO_B1	0.105 ***	0.014 ^{NS}	0.094 **	0.119 ***	-		
RO_B2	0.123 ***	0.071 ***	0.139 ***	0.141 **	0.116 ***	-	
RO_B3	0.102 **	0.010 ^{NS}	0.037 *	0.197 ***	0.019 ^{NS}	0.118**	-
RR_R	0.307 ***	0.173 ***	0.209 ***	0.489 ***	0.310 ***	0.214***	0.221 **

^a Fixation index between populations: $R_{ST} = 0.145$ ($P \leq 0.001$).

Distances measured based on the squared differences in allele size between two haplotypes.

Significance was tested using a non-parametric approach (27) with 1,000 permutations: * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$ and ns = non-significant.

Table 5. Estimates of demographic parameters of divergence between different host populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA infecting *Urochloa*, rice and soybean in Brazil and Colombia^{a, b}

Deomographic parameters	Quantiles ^{c, d}			Comparison of means
	2.50%	Mode	97.50%	
Population size				
θ_1 (RO_B)	0.0	1.5	3.2	
θ_2 (RO_S)	0.0	1.1	2.8	
θ_3 (RR_R)	0.0	1.9	3.6	
θ_4 (COL_BBT)	0.0	0.7	2.6	
θ_5 (COL_BHM)	0.0	1.1	2.8	
θ_6 (COL_OS)	0.0	1.9	3.8	
Historical migration rates to specific populations				
$\theta_1 M_{2 \rightarrow 1}$ (RO_B)	22.2	26.9	36.4	
$\theta_1 M_{3 \rightarrow 1}$	13.0	18.5	23.6	
$\theta_1 M_{4 \rightarrow 1}$	9.8	15.1	19.0	
$\theta_1 M_{5 \rightarrow 1}$	9.0	15.1	21.4	
$\theta_1 M_{6 \rightarrow 1}$	17.0	26.7	31.6	
$\theta_2 M_{1 \rightarrow 2}$ (RO_S)	69.8	82.3	100.0	
$\theta_2 M_{3 \rightarrow 2}$	14.8	20.1	29.0	
$\theta_2 M_{4 \rightarrow 2}$	27.0	47.3	55.2	
$\theta_2 M_{5 \rightarrow 2}$	38.4	55.7	67.6	
$\theta_2 M_{6 \rightarrow 2}$	63.2	81.3	99.2	
$\theta_3 M_{1 \rightarrow 3}$ (RR_R)	62.0	93.5	100.0	
$\theta_3 M_{2 \rightarrow 3}$	30.2	41.3	55.2	
$\theta_3 M_{4 \rightarrow 3}$	18.2	26.1	33.0	
$\theta_3 M_{5 \rightarrow 3}$	11.0	16.9	25.8	
$\theta_3 M_{6 \rightarrow 3}$	33.2	45.3	62.2	
$\theta_4 M_{1 \rightarrow 4}$ (COL_BBT)	46.4	53.1	84.6	
$\theta_4 M_{2 \rightarrow 4}$	15.8	26.3	32.8	
$\theta_4 M_{3 \rightarrow 4}$	24.4	37.5	43.6	
$\theta_4 M_{5 \rightarrow 4}$	27.8	37.9	71.8	
$\theta_4 M_{6 \rightarrow 4}$	67.6	98.1	100.0	
$\theta_5 M_{1 \rightarrow 5}$ (COL_BHM)	41.8	57.1	67.6	
$\theta_5 M_{2 \rightarrow 5}$	29.2	37.5	52.8	
$\theta_5 M_{3 \rightarrow 5}$	18.6	26.7	43.4	
$\theta_5 M_{4 \rightarrow 5}$	50.0	58.3	71.2	
$\theta_5 M_{6 \rightarrow 5}$	19.2	30.1	36.2	
$\theta_6 M_{1 \rightarrow 6}$ (COL_OS)	0.0	1.3	3.2	
$\theta_6 M_{2 \rightarrow 6}$	0.0	1.1	2.8	
$\theta_6 M_{3 \rightarrow 6}$	0.0	1.9	4.0	
$\theta_6 M_{4 \rightarrow 6}$	20.6	27.5	32.6	
$\theta_6 M_{5 \rightarrow 6}$	0.0	1.3	3.2	

Table 5. Legend.

^a Theta (θ) values represent a measure of the effective population size. For diploids, $\theta = 4N_e\mu$, where N_e = effective population size and μ = mutation rate for each locus. The migration rate M (θM) between host populations was estimated using an isolation-with-migration model in MIGRATE v.3.0.3 software.

^b θ or migration rate values followed by different-colored rectangles in the same column are significantly different based on parameter estimates at 95%.

^c Bayesian estimates of 95% credibility intervals for each parameter are given by the 0.025 and 0.975 quantiles of its *a posteriori* distribution.

^d The harmonic mean of the data log-probability considering the established model was -800.69 for the combined analysis of the Colombian and Brazilian pathogen populations.

Table 6. Ewens-Watterson (26,96), Chakraborty (16), Tajima *D* (87) and Fu and Li *F_S* (32) neutrality tests applied to the set of three nuclear DNA loci (*R44L*, *R68L* and *R116*), concatenated and per population

Neutrality tests	Statistics	Colombia, <i>Urochloa</i>		Colombia, rice		Brazil, <i>Urochloa</i>		Brazil, soybean		Average		Standard deviation
Ewens- Watterson	<i>F</i> observed	0.13		0.11		0.15		0.31		0.17		0.09
	<i>F</i> expected	0.14		0.11		0.16		0.28		0.17		0.08
	Watterson test: $P(F_{\text{random}} \leq F_{\text{observed}})$	0.42	NS	0.69	NS	0.52	NS	0.74	NS	0.59	NS	0.15
	Slatkin's exact test: <i>P</i> value	0.51	NS	0.72	NS	0.52	NS	0.85	NS	0.65	NS	0.17
Chakraborty	Expected homozygosity	0.07		0.02		0.06		0.14		0.07		0.05
	Expected number of alleles	11.89		10.89		9.02		7.49		9.82		1.96
	<i>P</i> (k or more alleles)	0.68	NS	0.56	NS	0.68	NS	0.40	NS	0.58	NS	0.13
Tajima's <i>D</i>	<i>S</i>	37		34		28		24		30.75		5.85
	<i>P_i</i>	11.43		7.89		7.73		4.29		7.83		2.92
	Tajima <i>D</i>	0.38		-0.60		-0.34		-1.53		-0.52		0.79
	<i>P</i> value for Tajima <i>D</i>	0.70	NS	0.31	NS	0.38	NS	0.04	NS	0.36	NS	0.27
Fu's <i>F_S</i>	Theta <i>P_i</i>	11.43		7.89		7.73		4.29		7.83		2.92
	Expected number of alleles	11.89		10.89		9.02		7.49		9.82		1.96
	<i>F_S</i>	1.11		-1.24		0.46		1.80		0.53		1.30
	<i>P</i> value for <i>F_S</i>	0.70	NS	0.29	NS	0.59	NS	0.80	NS	0.60	NS	0.22

Estimation of neutrality test parameters performed prior to the coalescent phylogeographic analysis was inferred using the ARLEQUIN 3.11 software (28).^{NS}

Non-significant at $P \leq 0.05$.

Table 7. Cross-pathogenicity of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA isolates from the Colombian Llanos in *Urochloa* and rice

Origin of the isolates	Isolates	Mean disease index on the two separate experiments					
		<i>Urochloa brizantha</i> cv. Toledo			Rice cv. Fedearroz		
Isolates from <i>Urochloa</i>	BBT1_A2	0.41			1.37		
	BBT1_B8	1.84			3.05		
	BBT1_B12	0.81			4.09		
	BBT1_C16	0.60			0.41		
	BBT1_D20	0.93			2.85		
	BBT1_D21	2.93			5.31		
	BBT1_D23	1.58			4.32		
	BBT1_E28	0.32			1.32		
	BBT1_E30	1.94			5.41		
	BBT1_E32	1.71			2.46		
	BBT1_E36	0.61			1.65		
	BBT1_E37	3.00			2.67		
	N = 12	1.39			2.91		
Isolates from rice	OS6_B11	0.64			0.28		
	OS6_B12	0.72			2.25		
	OS6_C17	0.39			3.30		
	OS6_C18	0.82			2.10		
	OS6_C19	2.30			4.89		
	OS5_C20	0.24			5.39		
	OS5_C21	0.67			1.84		
	OS6_D27	2.14			4.27		
	OS6_D28	1.41			2.66		
	OS6_D30	0.60			2.34		
	OS6_D33	0.83			4.20		
	OS6_D37	0.20			0.29		
	N = 12	0.91			2.82		
All isolates	N = 24	1.15			2.86		
Non-inoculated control		0			0		
Contrasts		Estimate	F	Pr > F	Estimate	F	Pr > F
<i>R. solani</i> AG-1 IA isolates from <i>Urochloa</i> vs. rice		5.7	11.58	0.001	1.09	0.08	0.7756

^a The *Urochloa* and rice experiments were conducted independently. The experimental design utilized completely randomized blocks with three replicates. The experiment was repeated once.

Table 8. Pathogenicity of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from *Urochloa* from the Colombian Llanos in cowpea and soybean

Origin of the isolates	Isolates	Mean percentage of infected leaf area on the two separate experiments					
		Cowpea cv. IT86D-719			Soy cv. FT16		
Isolates from <i>Urochloa brizantha</i> cv. Toledo	BBT1-A1	63.78			80.14		
	BBT1-A2	36.36			93.77		
	BBT1-A3	53.85			76.53		
	BBT1-A6	37.11			88.75		
	BBT1-D25	34.79			88.00		
	BBT1-E27	73.73			96.48		
	BBT2-A1	25.37			73.96		
	BBT2-A4	50.24			76.94		
	BBT2-A5	57.59			89.72		
	BBT2-B10	35.01			81.91		
	BBT2-B16	53.53			76.33		
	BBT2-C24	43.25			98.33		
	N = 12	47.05			85.07		
Isolates from <i>Urochloa</i> hybrid Mulato	BHM3-A1	61.06			81.44		
	BHM3-A10	35.11			79.76		
	BHM3-A5	26.2			75.01		
	BHM3-B11	51.98			90.98		
	BHM3-B13	39.21			93.8		
	BHM3-C28	79.33			99.81		
	BHM4-A10	48.42			86.6		
	BHM4-A4	65.78			82.36		
	BHM4-A5	77.53			92.83		
	BHM4-A6	54.86			90.99		
	BHM4-B19	43.35			99.4		
	BHM4-D36	66.14			59.74		
	N = 12	54.08			86.06		
All isolates	N = 24	50.57			85.57		
Non-inoculated control		0			0		
Contrast		Estimate	F	Pr > F	Estimate	F	Pr > F
<i>Urochloa brizantha</i> cv. Toledo vs. <i>Urochloa</i> hybrid Mulato		-84.35	1.91	0.1704	-11.87	0.1	0.7523

^a The cowpea and soybean experiments were conducted independently. The experimental design utilized completely randomized block, with five replicates. The experiment was repeated once.

Figure 1

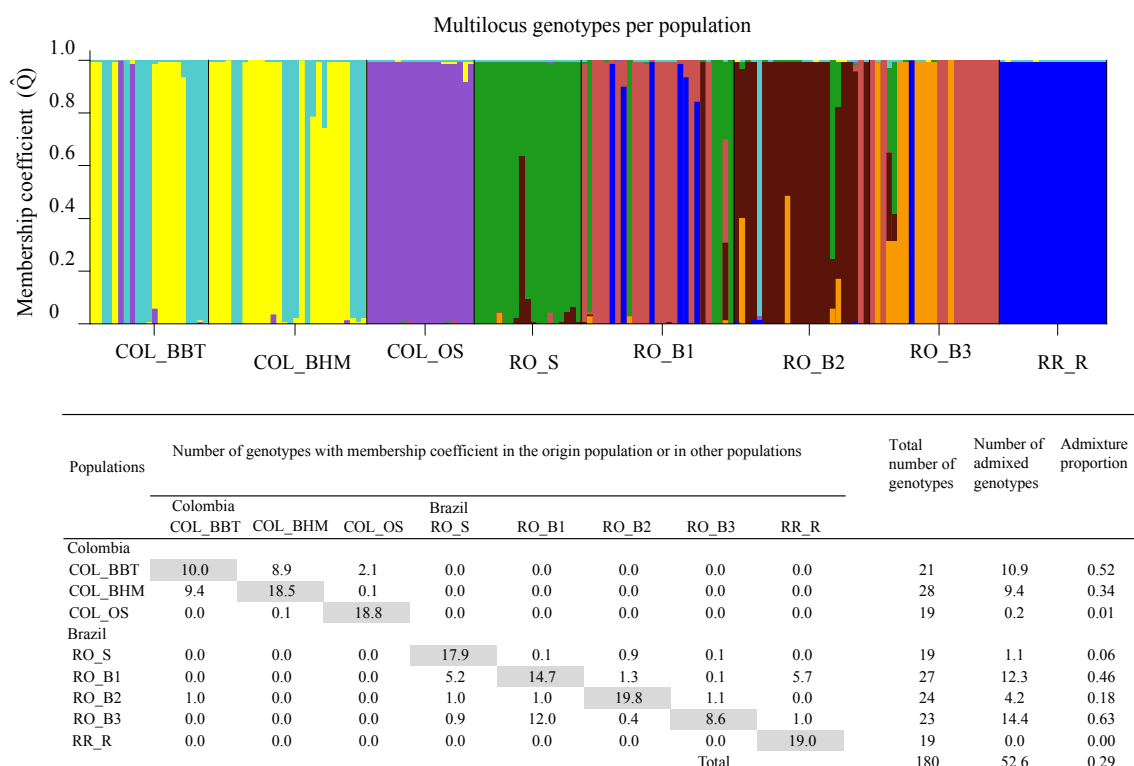


Figure 1. Membership coefficient Q for multilocus microsatellite genotypes of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from *Urochloa*, rice or soybean fields in Colombia and Brazil. Groups of individuals based on populations defined *a priori* are represented by different colors. Each vertical bar represents a multilocus genotype. The colors represent the most likely ancestor group from which the genotype derived. Groups with individuals with multiple colors have admixed genotypes relative to the population defined *a priori*. The bar size indicates the membership coefficient (Q) for populations shown in different colors. The number of individuals and the admixture proportions for each population are presented below the figure.

Figure 2

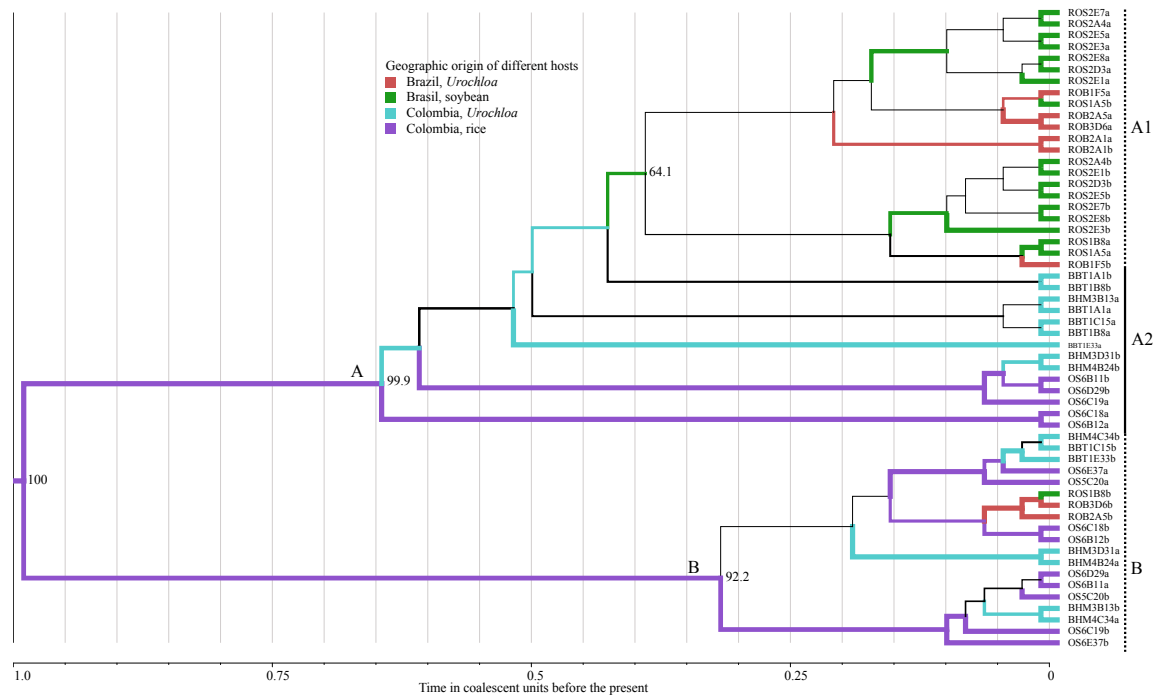


Figure 2. Maximum clade credibility tree obtained through Bayesian coalescent phylogenetic reconstruction using BEAST2 software, illustrating the phylogenetic relationships between the multigene haplotypes of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA isolated from rice, soybean or *Urochloa* from Brazil and Colombia based on three nuclear DNA loci (*R44L*, *R68L* and *R116*). Credibility values are exhibited for the three main lineages (or clades) (A1, A2 and B). Different colored branches indicate different geographical origins and different hosts. Branch thickness indicates the level of posterior probability node support within lineages.

CAPÍTULO 4 - Evolução acelerada das enzimas degradadoras de parede celular de plantas explicam a adaptação contemporânea do fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em distintos hospedeiros

RESUMO - Enzimas degradadoras de parede celular de plantas (*EDPCPs*) são identificadas como fatores essenciais de patogenicidade em fungos fitopatogênicos, incluindo-se *Rhizoctonia solani* grupo de anastomose 1 IA, que dependem da digestão de parede celular vegetal para liberar polissacarídeos como nutrientes. As *EDPCPs* e seus produtos de degradação podem elicitar respostas de defesa nas plantas, assim elas podem estar sob seleção diversificadora, dados aos processos co-evolutivos antagonistas resultantes da interação hospedeiro-patógeno. *EDPCPs* podem, também, ter evoluído sob seleção devido aos processos de especialização a hospedeiros. Esse mecanismo de seleção seguido de especialização a hospedeiros possivelmente atuou sobre populações do fungo *R. solani* AG-1 IA. A evolução acelerada das enzimas degradadoras de parede celular vegetal foi responsável pela adaptação de *R. solani* AG-1 IA a hospedeiros filogeneticamente distintos das famílias Fabaceae e Poaceae. Mais especificamente, predominou sobre os genes a seleção de equilíbrio ou balanceadora.

Palavras chaves: Emergência de fitopatógenos no agroecossistema, seleção natural, ampliação da gama de hospedeiros, braquiária, queima-da-folha e morte de pastagens

Accelerated evolution of plant cell wall degrading enzymes explain the recent adaptation of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA to different hosts

ABSTRACT - Plant cell wall degrading enzymes (*PCWDEs*) have been identified as essential pathogenicity factors for plant pathogenic fungi, including *Rhizoctonia solani* anastomosis group 1 IA, that depend on digesting plant cell walls to release polysaccharides as nutrients. Because *PCWDEs* and their degradation products may elicit plant defense responses, they can be under diversifying selection due to the process of antagonistic co-evolution caused by host-pathogen interactions. *PCWDEs* could also be evolving under selection due to host specialization processes. This mechanisms of selection followed by host specialization has probably acted on populations of the fungus *R. solani* AG-1 IA. An accelerated evolution of plant cell wall degrading enzymes was responsible for the adaptation of *R. solani* AG-1 IA to phylogenetically distinct hosts from the Poaceae and Fabaceae families. More specifically, equilibrium or balancing selection acted on the genes.

Key-words: Emerging pathogens in the agroecosystem, natural selection, host range expansion, *Brachiaria*, leaf blight and death of forage pastures

INTRODUÇÃO

Rhizoctonia solani grupo de anastomose AG-1 IA é um fungo basidiomiceto fitopatogênico de importância mundial, com ampla gama de hospedeiros (Jones & Belmar, 1989, Pascual & Hyakumachi, 2000, Lee et al., 2006). Na fase sexuada é classificado como *Thanatephorus cucumeris*. Na América do Sul, *R. solani* AG-1 IA causa queima da bainha no arroz (Bolkan & Ribeiro, 1985, Cedeño et al., 1996, Costa-Souza et al., 2007), folha bandeada e queima da bainha no milho, doença aparentemente restrita à Venezuela, (Perdomo et al., 2007, Cardona et al., 1999), queima foliar da soja (Fenille et al., 2002) e mela no feijão caupi (Nechet & Halfeld-Vieira, 2006). As plantas de arroz e de milho infectadas por *R. solani* AG-1 IA tornam-se enfezadas, e lesões necróticas se desenvolvem na bainha, na lâmina foliar e no colmo das plantas (Jones & Belmar, 1989, Cedeño et al., 1996). Na década de 90, *R. solani* AG-1 IA emergiu como patógeno importante da queima das folhas e morte de pastagens do gênero *Urochloa* (CIAT, 1993), tendo sido relatada em capim braquiária nos Llanos orientais colombianos (Ramos Molina et al., 2015) e em Rondônia, na Amazônia brasileira (Chavarro Mesa et al., 2014).

É provável que a população contemporânea de *R. solani* AG-1 IA adaptada à *Urochloa* spp. tenha se originado de populações do patógeno que infectavam arroz (Ramos Molina et al., 2015). Exemplos similares de salto, de arroz para soja, ou troca, do arroz para milho foram relatados para populações de *R. solani* AG-1 IA que originalmente infectavam arroz no sul dos Estados Unidos (Bernardes de Assis et al., 2008) e na Venezuela (González-Vera et al., 2010).

Estudos recentes com o grupo AG-1 IA de *R. solani* indicam que populações simpátricas de isolados que infectam poáceas e fabáceas representam dois grupos-irmãos filogeneticamente bem definidos, e que provavelmente a seleção para especialização a hospedeiros conduziu à divergência observada entre populações (Bernardes de Assis et al., 2008, Ciampi et al., 2005).

A ecologia da sobrevivência e da dispersão de *R. solani* AG-1 IA associado as poáceas têm sido amplamente estudada. No geral, *R. solani* AG-1 IA sobrevive como micélio e escleródios no solo e em sementes infectadas.

Ciclos recorrentes de infecção aumentam o inoculo no solo (Ogoshi, 1987, Naito, 2006, Brooks, 2007,).

A incidência de *R. solani* AG-1 IA numa cultura representa um verdadeiro desafio para o manejo fitossanitário do patógeno. A dificuldade no manejo se deve à longa sobrevivência de *R. solani* AG-1 IA no solo, à habilidade de superar ou evadir as defesas das plantas e à logística e custo e ineficácia da aplicação de fungicidas. Resistência a fungicidas em *R. solani* AG-1 IA do arroz já foi relatada e representa uma preocupação para o manejo da queima-da-bainha (Castroagudin et al., 2013). Embora a integração de práticas seja requisito para o manejo adequado de *Rhizoctonia*, a resistência genética continua sendo o componente chave que ainda falta no manejo (Okubara et al., 2014). Não há fontes de resistência genética naturais a esse patógeno (Jha & Chattoo, 2010, Rivero et al., 2012). O fato de que *R. solani* AG-1 IA causa doenças em diversos hospedeiros, compromete, inclusive, a eficácia de medidas de rotação de culturas (Okubara et al., 2014).

Como fitopatógeno essencialmente necrotrófico, *R. solani* AG-1 IA obtém nutrientes de células mortas, ou que estão morrendo, dos hospedeiros. Entretanto, este patógeno provavelmente tem uma curta fase biotrófica durante a qual reconhece hospedeiros específicos e iniciam a fase parasítica. As hifas de *R. solani* crescem em associação íntima com as superfícies dos hospedeiros, especialmente ao longo das junções entre células epidérmicas, formando agregados de hifas conhecidos como almofadas de infecção (Dodman & Flentje, 1970, Keijer, 1996). Patógenos como *R. solani* AG-1 IA ao infectar partes aéreas das plantas (Hofman & Jongbloed, 1988, Marshall & Rush, 1980), entram nos tecidos via almofadas de infecção ou apressórios lobados que penetram a cutícula, ou via estômatos ou por ferimentos (Aliferis & Jabaji, 2012, Dodman & Flentje, 1970, Keijer, 1996, Dodman et al., 1968, Weinhold & Sinclair, 1996). Hifas crescem tanto inter como intra-celularmente nos tecidos da maioria das espécies hospedeiras (Bateman, 1970). A morte celular dos hospedeiros é resultante da ação de toxinas (Brooks, 2007) e facilitada por enzimas degradadoras de parede, que desempenham papel importante na infecção (Bateman, 1970, Weinhold & Sinclair, 1996).

Fitopatógenos necrotróficos como *R. solani* AG-1 IA dispõem de um arsenal de enzimas degradadoras de parede celular de plantas (EDPCP)

específicas a substratos e são capazes de degradar componentes da parede celular, rompendo a defesa das plantas (Cooper, 1983, Cooper et al., 1988, Xu et al., 2006). Como as *EDPCPs* desempenham função crucial, tanto na destruição da célula hospedeira como na nutrição do patógeno, é provável que algum tipo de pressão de seleção tenha ação significativa no processo de adaptação a substratos específicos em hospedeiros distintos (i.e, a componentes de parede celular vegetal). Postula-se que a adaptação a substratos específicos reduz a diversidade em códons não-sinônimos devido à otimização funcional da atividade enzimática (Brunner et al., 2009, Brunner et al., 2013).

Dado ao fato que *EDPCPs* e seus produtos de degradação podem elicitar respostas de defesa nas plantas, elas podem estar sob seleção diversificadora dados aos processos co-evolutivos antagonistas resultantes da interação hospedeiro-patógeno em ecossistemas naturais (Brunner et al., 2013, Brunner et al., 2009, Stukenbrock & Bataillon, 2012, Stukenbrock, 2013). Já nos processos de emergência de novos fitopatógenos nos agroecossistemas, há indicações de que os fitopatógenos, ao se adaptarem ou se especializarem a hospedeiros filogeneticamente distintos, estão sujeitos à intensa seleção purificadora (Brunner et al., 2009, Brunner et al., 2013, Stukenbrock & Bataillon, 2012, Stukenbrock, 2013). Esse mecanismo de seleção seguido de especialização a hospedeiros possivelmente atuou sobre populações contemporâneas do fungo *R. solani* AG-1 IA adaptadas à braquiária, ainda que o fungo mantenha ampla gama de hospedeiros nas fabáceas e poáceas (Poloni et al., 2015).

Há forte relação entre o repertório de enzimas ativas em hidratos de carbono (*CAZYmes*) no genoma de fungos e os seus hábitos saprofítico–necrotróficos (Cantarel et al., 2009). Um complexo multi-enzimático muito elaborado de *CAZYmes*, designado celulosoma, e usado para a degradação eficiente de polissacarídeos da parede celular vegetal, é encontrado em fungos celulolíticos (Pinheiro et al., 2012). A parede celular vegetal rica em celulosas e hemicelulosas é considerada um substrato recalcitrante e de difícil degradação, que além de sua função estrutural, proporciona a primeira linha de defesa contra fitopatógenos, mas que oferece uma importante fonte de nutrição ao patógeno capaz de degradá-la (De Lorenzo et al., 1997).

O genoma de *R. solani* AG-1 IA codifica um grande número e diversos conjuntos de proteínas secretadas, enzimas do metabolismo primário-secundário, carboidratos e enzimas transportadoras, o que provavelmente reflete seu estilo de vida de patógeno necrotrófico (Zheng et al., 2013). Do total de 6.156 genes anotados, 257 foram descritos em processos interação patógeno-hospedeiro (Zheng et al., 2013). Em particular, as enzimas degradadoras de celulose e hemicelulose estão em número reduzido em *R. solani* AG-1 IA (Zheng et al., 2013). Comparações com outros fitopatógenos indicam que o número total de 223 CAZYmes detectadas em *R. solani* AG-1 IA é maior apenas que o total detectado no basidiomiceto *Ustilago maydis*, porém menor que o descrito para a maioria dos fitopatógenos com genoma já analisado (Zheng et al., 2013). Por sua vez, o fungo *R. solani* AG-1 IA tem um amplo arsenal de outros genes que codificam enzimas degradadoras de parede, incluindo genes de *pectinase*, *xylanase* e *laccase*.

Na presente proposta de pesquisa, estudamos um grupo de *EDPCP*, que foram identificadas como fatores de patogenicidade em *R. solani* AG-1 IA: *beta-xylosidase* (*xynB*), *celullase* (*GH5*), *pectate-lyase B* (*PL1*) e *polygalacturonase* (*PG1*). Nossa hipótese é que a evolução acelerada dos quatro genes dessas *EDPCPs* está relacionada com a capacidade de adaptação e especialização do fungo *R. solani* AG-1 IA a diferentes hospedeiros, que incluem poáceas e fabáceas. Mais especificamente, hipotetizamos que seleção purificadora atuou de forma semelhante sobre estes quatro genes de *EDPCP*, como resultado da adaptação contemporânea, à braquiária, de populações de *R. solani* AG-1 IA originalmente adaptadas ao arroz ou à soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem dos isolados. Foram selecionadas amostras de duas populações *R. solani* AG-1 IA, originalmente adaptadas ao arroz e à soja, e uma que recentemente emergiu adaptada à braquiária (Tabela 1). As populações do patógeno usadas neste estudo foram genotipadas anteriormente por nosso grupo de pesquisa usando marcadores microssatélites (Chavarro Mesa et al., 2014, Ramos Molina et al., 2015).

Desenvolvimento de novos iniciadores para amplificação de genes EDPCPs do fungo R. solani AG-1. Para o desenvolvimento de iniciadores específicos e amplificação de genes *EDPCPs*, foram utilizados dados públicos de sequências genômicas de *R. solani* AG- 1 IA derivadas do GeneBank/NCBI e depositadas por Zheng et al. (2013) (Tabela 2).

Utilizou-se o programa *Geneious* (disponível no URL: <http://www.geneious.com>) para o desenho e desenvolvimento dos iniciadores, usando-se a sub-rotina Primer3 v.4.0 (Untergrasser et al., 2012). Quatro pares de iniciadores apresentaram as melhores características para amplificação em cadeia da polimerase (PCR) (Tabela 3).

Produção de micélio fúngico, extração de DNA, reações de PCR e sequenciamento de diferentes genes EDPCPs de R. solani. Micélio fúngico foi produzido em 30 mL de caldo de batata dextrose (a 18,5 g/L), por quatro dias, sob agitação. Em seguida, o micélio foi liofilizado por cerca de 48 h. Para a extração do DNA fúngico foi utilizado o kit Genelute (Sigma – Aldrich, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. As reações de PCR foram realizadas como descrito por Matsumoto (2002) e Ciampi *et al.* (2008). Os produtos de PCR obtidos dos quatro genes foram enviados e submetidos à reação de sequenciamento (Macrogen Inc, Coréia do Sul), utilizando-se sequenciador automático PE Applied Biosystems ABI-3700. As sequências foram alinhadas usando-se o programa computacional *Geneious*. Uma vez que *R. solani* AG-1 IA é um organismo heterocariótico, de condição nuclear N+N, para inferir as fases de sequências heterogêneas eventualmente obtidas, utilizou-se algoritmo implementado no programa PHASE 2.1.1 (Stephens et al., 2001) para inferir e recuperar os alelos distintos para cada indivíduo genotipado.

Diversidade haplotípica e nucleotídica. Inicialmente, de forma descritiva, foram comparados os níveis de diversidade haplotípica e nucleotídica nas populações adaptadas aos três grupos de hospedeiros distintos. Usando-se o programa DNASP v.4.5 foram determinados: o número de haplótipos, número de sítios

polimórficos e diversidade de nucleotídeos por gene e por população (Rozas & Rozas, 1999).

Testes de neutralidade intra-espécies. Como o objetivo principal desta etapa do estudo era discriminar o efeito e o tipo de seleção atuando sobre os genes completos (éxons e íntrons) e sobre a região expressa codificante de cada *EDPCPs*. Os tamanhos dos genes completos amplificados (éxons e íntrons) estão descritos na Tabela 3. Removendo-se os íntrons, o tamanho final das sequências dos genes *EDPCPs* foi de 690 pb para *beta-xylosidase*, 618 pb para *celulase*, 729 pb para *pectate-lyase B* e 528 pb para *polygalacturonase*. Tais tamanhos correspondem a códons de leitura aberta (ORFs), que são expressos em proteínas. Para avaliar se o espectro de frequência local de mutações nos genes que codificam *EDPCPs* putativas está de acordo com as expectativas do modelo padrão neutro, aplicou-se o os testes D^* e F^* de Fu e Liu (Liu et al., 1993), implementado no programa DNASP v.4.5, que usa os valores críticos de Fu e Li para obter a significância estatística dos valores observados de D^* e F^* . Os valores esperados de D^* e F^* para as populações que estão em conformidade com um modelo neutro padrão é zero. Valores significativamente negativos para essas estatísticas indicam um excesso de variantes de baixa frequência, que podem resultar da expansão da população, de fraca seleção negativa ou de seleção positiva. Valores significativamente positivos para estas estatísticas refletem um excesso de alelos de frequência intermediária, o que pode ser resultado de gargalos em população, de estruturação populacional e/ou de seleção de equilíbrio (Barreiro & Quintana-Murci, 2010).

Análises evolutivas. Com objetivo de reconstruir a história evolutiva dos genes *EDPCPs* de *R. solani* AG-1 IA infectando o arroz, a braquiária e a soja, utilizou-se análise Bayesiana, usando-se o método de Monte Carlo-Cadeia de Markov, conjugado ao algoritmo de Metrópolis (MCMCMC) com 30,000,000 de gerações, implementado o modelo GTR de substituição de nucleotídeos (modelo de tempo geral reversível ou *General Time Reversible*), e eliminando-se 25% das árvores iniciais geradas. As análises foram conduzidos utilizando-se o programa MrBayes versão 3.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Foram

reconstruídas filogenias para os genes completos (contendo éxons e íntrons) e para as regiões expressas codificantes de cada *EDPCPs*. Entre dez análises filogenéticas realizadas para cada gene, escolheu-se aquela de maior verossimilhança para representar a história evolutiva do gene. Foram efetuadas 10 corridas distintas, com o mesmo número de gerações. A corrida com a maior verossimilhança foi escolhida para representar a história filogenética do patógeno.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo detalhado de evolução de enzimas degradadoras de parede celular de plantas (EDPCPs) no fungo *R. solani* AG-1 IA. Esses resultados permitiram compreender os fatores evolutivos que contribuem para a emergência de *R. solani* AG-1 IA em *Urochloa* spp., esclarecendo pela primeira vez as pressões de seleções presentes nos genes de enzimas EDPCs e as distintas genealogias nos diferentes hospedeiros do fungo.

Diversidade nucleotídica e haplotípica. Foram detectados 20 sítios polimórficos e entre 4 a 5 haplótipos, em média, para cada um dos quatro genes analisados (Tabela 4). A média de diversidade haplotípica foi de 0,54 para o total dos quatro genes. O número médio de sítios polimórficos por gene foi relativamente semelhante para *beta-xylosidase*, *celulase* e *polygalacturonase* (*S* variando entre 22,0 a 29,0). Já o gene *pectate-lyase B* foi o de menor polimorfismo geral (*S* = 3). O mesmo padrão de variação diferencial entre os genes foi observado para o número de sítios parcimoniosos (*P*) e para a diversidade haplotípica [*K(h)* e *Sd(Hd)*], sendo que o gene *pectate-lyase B* foi a de menor variação. Por sua vez, detectou-se diferenças nos níveis de variação haplotípica entre os grupos de isolados de diferentes hospedeiros. Isolados de *Urochloa* apresentaram, no geral, os índices mais altos de diversidade haplotípica (*Sd (Hd)* = 0,83 a 0,92) para *beta-xylosidade*, *cellulase* e *polygalacturonase*. Já os grupos de isolados de *R. solani* AG-1 IA do arroz ou

de soja apresentaram baixa ou nenhuma diversidade haplotípica (Sd (Hd) = 0) para pelo menos um ou dois dos genes estudados (Tabela 4).

Testes de neutralidade. Para os testes de neutralidade D^* e F^* de Fu e Li (Fu & Li, 1993) aplicados para cada um dos quatro genes de *EDPCPs*, foram encontradas evidências de desvios do padrão de neutralidade (Tabela 6). Nas análises de seleção utilizando-se a informação genética completa de cada gene (incluindo-se éxons e íntrons), encontrou-se níveis significativos para os testes D^* ou F^* , descartando-se a evolução neutra dos genes *beta-xylosidase*, *cellulase* e *pectate-lyase B* no grupo de isolados de *R. solani* AG-1 IA de *Urochloa* spp. Entretanto, ao remover-se os íntrons, não se detectou seleção sobre as regiões exônicas dos quatro genes para *R. solani* AG-1 IA de *Urochloa* spp. Por sua vez, observou-se princípios de seleção no grupo de isolados de *R. solani* AG-1 IA de soja e arroz em níveis significativos para os testes D^* ou F^* nos genes *cellulase* e *polygalacturonase*, descartando-se a evolução neutra para esses dois loci tanto para o gene completo quanto para as regiões exônicas apenas (Tabela 5).

Não foi possível aplicar os testes de neutralidade para os genes *beta-xylosidase* e *pectate-lyase B* do grupo de isolados da soja, e para o gene *cellulase* do grupo de isolados do arroz, uma vez que os valores de diversidade haplotípica e nucleotídica corresponderam à zero para esses genes nos respectivos hospedeiros (Tabelas 4 e 5).

De forma geral, todos os valores de D^* ou F^* detectados nos testes de neutralidade foram positivos, indicando excesso de alelos de frequência intermediária. Isto pode ser resultado de seleção de equilíbrio, que é um tipo geral de seleção que favorece a manutenção da diversidade em uma população (Hurst, 2009, Barreiro & Quintana-Murci, 2010, Nielsen, 2005, Kreitman, 2000, Charlesworth, 2006).

No presente estudo foi observado desvio do padrão de neutralidade tanto nas regiões codificantes como nas não codificantes. Resultado semelhante foi observado por Rech et al. (2014), que demonstraram que as regiões não codificantes regulam genes envolvidos em patogenicidade no fungo *Colletotrichum graminicola*, evidenciando que tanto as regiões

codificantes como as não codificantes estão sob diferente pressão de seleção em comparação com outros genes. De fato, relata-se que os genes envolvidos nos processos de infecção possuem amplo número de sequências intrônicas, que estão diretamente relacionadas com a expressão gênica em células eucarióticas (MacKenzie and Quinn 1999; Le Hir et al. 2003; Gaffney and Keightley 2006; Albert 2011).

Análises evolutivas Bayesianas. A reconstrução filogenética usando éxons e íntrons ou somente íntrons resultou em topologias semelhantes para os quatro genes (Figura 1). No processo evolutivo de três dos quatro genes (exceto o gene *PL1*), observou-se elevada diversificação haplotípica em duas das populações hospedeiro - distintas de *R. solani* AG-1 IA das poáceas arroz e *Urochloa* ($K(h) = 15$ a 22 haplótipos, Tabela 4, Figura 1).

No geral, não se detectou haplótipos compartilhados entre isolados do patógeno oriundos de hospedeiros diferentes, com exceção do haplótipo *GH5_01*, compartilhado entre isolados de *R. solani* AG-1 IA do arroz e da soja (Tabela 6). Entretanto, a análise evolutiva dos genes *xynB* da enzima *beta-xylosidase* e *GH5* da enzima *celulase* não indicou suporte para grupamentos entre haplótipos oriundos de hospedeiros filogeneticamente distintos. Isso indica que haplótipos distintos dos genes *xynB* e *GH5* podem ter tido origem ancestral comum.

Por sua vez, para o gene *PL1* relativo à enzima *pectate-lyase B* (que apresentou a menor diversidade haplotípica [$K(h) = 1$ a 2 haplótipos, Tabela 4, Figura 1]), foi encontrado indícios de especialização de hospedeiro de *R. solani* AG-1 IA em arroz, soja e *Urochloa* spp. Detectou-se que haplótipos se agruparam em clados independentes, sugerindo possível seleção negativa ou purificadora para esse gene em cada um dos três hospedeiros (haplótipos *PL1*, Figura 1).

Já para o gene *PG1* da enzima *polygalacturonase* detectou-se agrupamento filogenético de haplótipos específicos em dois clados independentes constituídos de haplótipos de *R. solani* AG-1 IA de fabáceas (haplótipos *PG1_12* e *PG1_13*; Figura 1) e de poáceas (todos os demais haplótipos; Figura 1). Enquanto detectou-se especialização de hospedeiro para

haplótipos oriundos de isolados da soja, observou-se indícios de seleção balanceadora ou de equilíbrio (Barreiro & Quintana-Murci, 2010) para isolados proveniente das poáceas arroz e *Urochloa* spp. (Figura 1)

CONCLUSÕES

Provavelmente, a evolução das EDPCPs foi responsável pela adaptação de *R. solani* AG-1 IA a hospedeiros filogeneticamente distintos nas poáceas e fabáceas. Hipotetizamos que a seleção predominante foi de equilíbrio ou balanceadora.

REFERÊNCIAS

- Aliferis KA, Jabaji S, 2012. FT-ICR/MS and GC-EI/MS metabolomics networking unravels global potato sprout's responses to *Rhizoctonia solani* infection. *PLoS ONE* **7**, e42576.
- Albert PR. 2011. What is a functional genetic polymorphism? Defining classes of functionality. *J Psychiatry Neurosci.* **36**:363–365.
- Barreiro LB, Quintana-Murci L, 2010. From evolutionary genetics to human immunology: how selection shapes host defence genes. *Nature Reviews Genetics* **11**, 17-30.
- Bateman DF, 1970. Pathogenesis and disease. In: Parmeter Jr. JR, ed. *Rhizoctonia solani, biology and pathology*. Berkeley/Los Angeles/London: University of California Press, 161–71.
- Bernardes De Assis J, Peyer P, Rush MC, Zala M, McDonald BA, Ceresini PC, 2008. Divergence between sympatric rice- and soybean-infecting populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA. *Phytopathology* **98**, 1326-33.
- Bolkan HA, Ribeiro WRC, 1985. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. *Plant pathology* **69**, 599-601.
- Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, et al., 2014. BEAST 2: A software platform for bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology* **10**, e1003537.
- Brooks SA, 2007. Sensitivity to a phytotoxin from *Rhizoctonia solani* correlates with sheath blight susceptibility in rice. *Phytopathology* **97**, 1207–12.
- Brunner PC, Keller N, McDonald BA, 2009. Wheat domestication accelerated evolution and triggered positive selection in the B-xylosidase enzyme of *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS ONE* **4**, e7884.
- Brunner PC, Torriani SFF, Croll D, Stukenbrock EH, McDonald BA, 2013. Coevolution and life cycle specialization of plant cell wall degrading enzymes in a hemibiotrophic pathogen. *Molecular Biology and Evolution*.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B, 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research* **37**, D233-D8.

- Cardona R, Rodríguez H, Nass H, 1999. Mancha bandeada en maíz causada por *Rhizoctonia solani* en el estado Portuguesa, Venezuela. *Fitopatologia Venezolana* **12**, 32-3.
- Castroagudin VL, Fiser S, Cartwright RD, Wamishe Y, Correll JC, 2013. Evaluation of *Rhizoctonia solani* AG 1 - IA and *Rhizoctonia* species for resistance to QoI fungicides. *Phytopathology* **103**, 212-P.
- Cedeño L, Nass H, Carrero C, Cardona R, Rodríguez H, Alemán L, 1996. *Rhizoctonia solani* AG-1-IA, causa principal del añublo de la vaina del arroz en Venezuela. *Fitopatologia Venezolana* **9**, 6-9.
- Charlesworth D, 2006. Balancing selection and its effects on sequences in nearby genome regions. *PLoS Genet* **2**, e64.
- Chavarro Mesa E, Pereira DaS, Schurt DA, Vieira Júnior JR, Ceresini PC. A etiologia complexa de doenças causadas por fungos do gênero *Rhizoctonia* em *Brachiaria* e em culturas simpátricas de arroz, feijão-caupi ou soja na Amazônia, nos Cerrados Brasileiros e no Vale do Paraíba. *Proceedings of the CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 2014*. Londrina, PR: SBF - Sociedade Brasileira de Fitopatologia.
- Ciampi MB, Kuramae EE, Fenille RC, Meyer MC, Souza NL, Ceresini PC, 2005. Intraspecific evolution of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA associated with soybean and rice in Brazil based on polymorphisms at the ITS-5.8S rDNA operon. *European Journal of Plant Pathology* **113**, 183-96.
- Ciampi MB, Meyer MC, Costa MJN, Zala M, McDonald BA, Ceresini PC, 2008. Genetic structure of populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA from soybean in Brazil. *Phytopathology* **98**, 932-41.
- Ciat, 1993. Annual Report, Tropical Forages Program. In. Palmira: CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical, s.p. (Working document, 166).
- Cooper RM, 1983. The mechanisms and significance of enzymatic degradation of host cell walls by parasites. In: Callow JA, ed. *Biochemical plant pathology*. New York: John Wiley, 101–35.

- Cooper RM, Longman D, Campbell A, Henry M, Lees PE, 1988. Enzymic adaptation of cereal pathogens to the monocotyledonous primary wall. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **32**, 33-47.
- Costa-Souza E, Kuramae EE, Nakatani AK, Basseto MA, Prabhu AS, Ceresini PC, 2007. Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado ao arroz em Tocantins, Brasil. *Summa Phytopathologica* **33** 129-36.
- De Lorenzo G, Castoria R, Bellincampi D, Cervone F, 1997. Fungal invasion enzymes and their inhibition. In: Carroll GC, Tudzynski P, eds. *The Mycota*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 61–83.
- Dodman RL, Barker KR, Walker JC, 1968. Modes of penetration by different isolates of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* **58** 31–3.
- Dodman RL, Flentje NT, 1970. The mechanism and physiology of plant penetration by *Rhizoctonia solani* In: Parmeter Jr. JR, ed. *Rhizoctonia solani, biology and pathology*. Berkeley/Los Angeles/London: University of California Press, 149–60.
- Fenille RC, Souza NL, Kuramae EE, 2002. Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 783-92.
- Fu YX, Li WH, 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* **133**, 693-709.
- Gaffney DJ, Keightley PD. 2006. Genomic selective constraints in Murid noncoding DNA. *PLoS Genet.* **2**:e204.
- González-Vera AD, Bernardes-De-Assis J, Zala M, *et al.*, 2010. Divergence between sympatric rice- and maize-infecting populations of *Rhizoctonia solani* AG 1 IA from Latin America. *Phytopathology* **100**, 172-82.
- Hofman TW, Jongbloed PHJ, 1988. Infection process of *Rhizoctonia solani* on *Solanum tuberosum* and effects of granular nematicides. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **94**, 243–52.
- Hurst LD, 2009. Genetics and the understanding of selection. *Nature Reviews Genetics* **10**, 83-93.

Jha S, Chattoo BB, 2010. Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens. *Transgenic Research* **19** 373–84.

Jones RK, Belmar SB, 1989. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolated from rice, soybean, and other crops grown in rotation with rice in Texas. *Plant Disease* **73**, 1004-10. .

Keijer J, 1996. The initial steps of the infection process in *Rhizoctonia solani*. In: Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G, eds. *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease Control*. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 149–62.

Kreitman M, 2000. Methods to detect selection in populations with applications to the human. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **1**, 539-59.

Lee J, Bricker TM, Lefevre M, Pinson SRM, Oard JH, 2006. Proteomic and genetics approaches to identifying defense-related proteins in rice challenged with the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Molecular Plant Pathology* **7** 405–16.

Liu ZL, Domier LL, Sinclair JB, 1993. ISG-specific ribosomal DNA polymorphism of the *Rhizoctonia solani* species complex. *Mycologia* **85**, 795-800.

Marshall DS, Rush MC, 1980. Infection cushion formation on rice sheaths by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* **70**, 947–50.

Matsumoto M, 2002. Trials of direct detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG 1 and AG 2 subgroups using specifically primed PCR analysis. *Mycoscience* **43**, 185-9.

Naito S, 2006. Ecological studies on teleomorphic and anamorphic stages in *Rhizoctonia* fungi. *Journal of General Plant Pathology* **72**, 400-3.

Nechet KL, Halfeld-Vieira BA, 2006. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp., associados à mela do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), coletados em Roraima. *Fitopatologia Brasileira* **31**, 505-8.

Nielsen R, 2005. Molecular signatures of natural selection. *Annual Review of Genetics* **39**, 197-218.

Ogoshi A, 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annual Review of Phytopathology* **25**, 125-43.

Okubara PA, Dickman MB, Blechl AE, 2014. Molecular and genetic aspects of controlling the soilborne necrotrophic pathogens *Rhizoctonia* and *Pythium*. *Plant Science*.

Pascual CB, Hyakumachi M, 2000. Distribution of vegetatively compatible populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA in a field planted with different host species. *Journal of General Plant Pathology* **66**, 206-9.

Perdomo R, Hernández A, Gonzáles A, Pineda J, Alezones J, 2007. Caracterización y evaluación de virulencia en aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn, causante de la mancha bandeada en maíz. *Interciencia* **32**, 48-55.

Pinheiro BA, Brás JLA, Najmudin S, *et al.*, 2012. Flexibility and specificity of the cohesin–dockerin interaction: implications for cellulosome assembly and functionality. *Biocatalysis and Biotransformation* **30**, 309-15.

Poloni NM, Ramos Molina LM, Chavarro Mesa E, Garcia IL, Perez Barragan AY, Ceresini PC, 2015. Evidência de que o fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA adaptado à *Urochloa* na Colômbia mantém ampla gama de hospedeiros incluindo o milho. *Ciência Rural* **45(submetido)**.

Ramos Molina LM, Chavarro Mesa E, Pereira DaDS, Silva Herrera MDR, Perez Barragan AY, Ceresini PC, 2015. Amplo levantamento de fungos associados à queima da folha de *Urochloa* nos Llanos Colombianos indica predominância de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. *Ciência Rural* **45 (submetido)**.

Rech Gabriel E., Sanz-Martín Jose M., Anisimova Maria, Sukno Serenella A., and Thon Michael R. Natural selection on coding and noncoding DNA sequences is associated with virulence genes in a plant pathogenic fungus. *Genome Biol. Evol.* **6(9)**:2368–2379.

Rivero M, Furman N, Mencacci N, *et al.*, 2012. Stacking of antimicrobial genes in potato transgenic plants confers increased resistance to bacterial and fungal pathogens. *Journal of biotechnology* **157** 334–43.

Rozas J, Rozas R, 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* **15**, 174-5.

Stephens M, Smith NJ, Donnelly P, 2001. A New statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics* **68**, 978-89.

Stukenbrock EH, 2013. Evolution, selection and isolation: a genomic view of speciation in fungal plant pathogens. *New Phytologist* **199**, 895-907.

Stukenbrock EH, Bataillon T, 2012. A population genomics perspective on the emergence and adaptation of new plant pathogens in agro-ecosystems. *PLoS Pathogens* **8**, e1002893.

Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, *et al.*, 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* **40**, e115.

Weinhold AR, Sinclair JB, 1996. *Rhizoctonia solani*: penetration, colonization and host response. In: Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G, eds. *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 163–74.

Xu J-R, Peng Y-L, Dickman MB, Sharon A, 2006. The Dawn of Fungal Pathogen Genomics. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 337-66.

Zheng A, Lin R, Zhang D, *et al.*, 2013. The evolution and pathogenic mechanisms of the rice sheath blight pathogen. *Nature Communications* **4**, 1424.

Tabelas

Tabela 1. Origem das amostras de populações hospedeiro-distintas de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA utilizados neste estudo.

Patógeno	Origem	Hospedeiro	Número de isolados utilizados por enzima estudada				Ano	Coletor
			<i>Beta xylosidase</i> (<i>xynB</i>)	<i>Celullase</i> (<i>GH5</i>)	<i>Pectate-lyase B</i> (<i>PL1</i>)	<i>Polygalacturonase</i> (<i>PG1</i>)		
<i>R. solani</i>	Colômbia	Arroz	8	7	10	9	2011	L. Ramos Molina
AG-1 IA	Brasil	<i>Urochola</i>	8	7	7	11	2013	E. Chavarro-Mesa
		Soja	8	8	12	7		
Total			24	28	29	29		

Tabela 2. Genes utilizados para o desenvolvimento de iniciadores específicos para *EDPCPs* de *Rhizoctonia solani* AG- 1 IA.

Gene	Código NCBI	Tamanho/aminoácidos
<i>Beta-xylosidase (xynB)</i>	GI:443924547	1509 aa
<i>Celullase (glycoside hydrolase family 5 = GH5)</i>	GI:443926476	451 aa
<i>Pectate-lyase B (PL1)</i>	GI:443926706	524 aa
<i>Polygalacturonase (PG1)</i>	GI:443924779	324 aa

Tabela 3. Iniciadores desenhados para a amplificação específica de genes *EDPCPs* desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa.

Gene	Iniciador	Sequência (5' – 3')	%GC ^a	Tm ^b	Tamanho (pb)
<i>Beta-xylosidase</i> (<i>xynB</i>)	BX_318 F	TTCCCGAGCGTATTACGACG	55	60	1369
	BX_1,686 R	GGGCAAAAATTCCACCGCTT	50	60	
<i>Cellulase</i> (<i>GH5</i>)	C_474 F	CGTCGGAATCCAGTCGGTAG	60	60	1552
	C_2,025 R	TAGGGCTGCTCTCCTCCATT	55	60	
<i>Pectate-lyase B</i> (<i>PL1</i>)	PL_96 F	TCGTGACTTTCTCCACCAGC	55	60	1077
	PL_1,172 R	TTCCGACGCTCTCGAATACG	55	60	
<i>Polygalacturonase</i> (<i>PG1</i>)	P_465 F	TGGACATACCTTCAACGGCC	55	60	969
	P_1,433 R	TTGACTTCGACCTCCTTGGC	55	60	

^a Percentagem de conteúdo de guanina e citosina.

^b Temperatura de fusão dos *primers*/iniciadores.

Tabela 4. Diversidade nucleotídica para as sequências de genes codificantes das enzimas degradadoras de parede celular de plantas (EDPCPs) de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

Gene	Hospedeiro	<i>n</i>	<i>S</i>	<i>P</i>	<i>n_s</i>	<i>K(h)</i>	<i>Sd (Hd)</i>	π (<i>Pi</i>)
<i>Beta-xylosidase</i> (<i>xynB</i>)	Arroz	16	45	38	7	6	0,817	0,0088
	<i>Urochola</i>	16	43	41	2	8	0,833	0,0136
	Soja	16	0	0	0	1	0,000	0,0000
	Total	48	51	44	7	15	0,856	0,015
	Média	16	29	26	3	5	55	0,01
<i>Celullase</i> (<i>GH5</i>)	Arroz	14	0	0	0	1	0,000	0,000
	<i>Urochola</i>	14	36	34	2	8	0,923	0,140
	Soja	16	30	30	0	4	0,733	0,010
	Total	56	91	88	3	18	0,885	0,018
	Média	14	22	21	0,67	4	55	5
<i>Pectate-lyase B</i> (<i>PL1</i>)	Arroz	20	1	1	0	2	0,526	0,000
	<i>Urochola</i>	14	6	6	0	2	0,538	0,003
	Soja	24	0	0	0	1	0,000	0,000
	Total	58	9	9	0	5	0,753	0,002
	Média	19	3	3	0	2	36	0
<i>Polygalacturonase</i> (<i>PG1</i>)	Arroz	18	37	36	1	7	0,693	0,012
	<i>Urochola</i>	22	34	29	5	11	0,922	0,014
	Soja	14	5	5	0	2	0,444	0,002
	Total	58	62	57	2	22	0,929	0,020
	Média	18	25	23	2	7	69	1
Média geral		17	20	19	1,4	4,4	0,54	0,02

n = Número de sequências analisadas

S = número de sítios polimórficos (variáveis)

P = número de sítios parcimoniosos informativos

n_s = número de sítios únicos variáveis

K(h) = número de haplótipos

Sd (Hd) = diversidade haplotípica

π (*Pi*) = diversidade nucleotídica

Tabela 5. Testes de neutralidade F_S (D^* e F^*) de Fu e Li (Fu & Li, 1993) aplicados para quatro genes de enzimas degradadoras de parede celular de plantas (EDPCPs), de *Rhizctonia solani* AG-1 IA.

Regiões codificantes (éxons) e não codificantes (íntrons)																									
Estatística	<i>Beta-xylosidase xynB</i>						<i>Celullase (GH5)</i>						<i>Pectate-lyase B (PL1)</i>						<i>Polygalacturonase (PG1)</i>						
	<i>Urochloa</i>		Arroz		Soja		<i>Urochloa</i>		Arroz		Soja		<i>Urochloa</i>		Arroz		Soja		<i>Urochloa</i>		Arroz		Soja		
S	43,00		45,00		ND		36,00		ND		30,00		6,00		1,00		ND		34,00		37,00		5,00		
K	16,85		10,93		ND		14,45		ND		10,47		3,23		0,53		ND		11,71		14,07		2,20		
θ	12,96		13,56		ND		11,32		ND		9,04		1,89		0,28		ND		9,33		11,05		1,57		
π	0,01		0,01		ND		0,01		ND		0,01		0,00		0,00		ND		0,01		0,02		0,00		
Teste D*	1,43		*	0,86	<i>NS</i>	ND	1,37		*	ND	1,63		**	1,29	<i>NS</i>	0,65	<i>NS</i>	ND	0,83		<i>NS</i>	1,53	**	1,23	<i>NS</i>
Teste F*	1,60		*	0,44	<i>NS</i>	ND	1,51		<i>NS</i>	ND	1,56		<i>NS</i>	1,86	**	1,02	<i>NS</i>	ND	1,02		<i>NS</i>	1,64	*	1,45	<i>NS</i>

Regiões codificantes (éxons)																						
Estatística	<i>Beta-xylosidase xynB</i>				<i>Celullase (GH5)</i>			<i>Pectate-lyase B (PL1)</i>			<i>Polygalacturonase (PG1)</i>											
	<i>Urochloa</i>		Arroz		Soja	<i>Urochloa</i>		Arroz		Soja	<i>Urochloa</i>		Arroz		Soja							
S	12		14		ND	22		ND		17	2		1		ND	12		10		2		
<i>n</i> _s	1		5		ND	2		ND		0	0		0		ND	3		0		0		
K	4,31		3,03		ND	8,088		ND		6,567	1,077		0,526		ND	3,870		3,242		0,879		
θ	3,62		4,22		ND	6,918		ND		5,123	0,629		0,282		ND	3,292		2,907		0,629		
π	0,0081		0,0061		ND	0,013		ND		0,01	0,001		0,000		ND	0,006		0,005		0,001		
Teste D*	1,08	<i>NS</i>	-0,16	<i>NS</i>	ND	1,147	<i>NS</i>	ND		1,533	**	0,935	<i>NS</i>	0,649	<i>NS</i>	ND	0,190	<i>NS</i>	1,412	*	0,935	<i>NS</i>
Teste F*	1,13	<i>NS</i>	-0,49	<i>NS</i>	ND	1,180	<i>NS</i>	ND		1,633	*	1,352	<i>NS</i>	1,020	<i>NS</i>	ND	0,366	<i>NS</i>	1,306	<i>NS</i>	1,104	<i>NS</i>

ND, Não disponível em função de apenas um haplótipo compor a amostra populacional do patógeno para este gene S = número de sítios polimórficos (variáveis); n_s = número de sítios únicos variáveis; K = Número médio de diferenças de nucleotídeos; π (P_i) = diversidade nucleotídica. NS Não significativo, * significativo a $p < 0,05$; ** significativo a $p < 0,02$.

Tabela 6. Haplótipos de isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA amostrados de arroz, soja ou *Urochloa brizantha* no Brasil ou na Colômbia baseando-se em quatro genes de enzimas degradadoras de parede celular de plantas (EDPCP).

Beta-xylosidase (xynB)				Celullase (GH5)			
Haplótipo		Isolado e sequência	H O	Haplótipo		Isolado e sequência	H O
éxons e íntrons	éxons			éxons e íntrons	éxons		
xynB_01	xynB_01	OS5-D21a		GH5_01	GH5_01	OS5-D21a1	
xynB_02_01	xynB_02	OS5-D21b				OS5-D21a2	
xynB_02_02		RO_B1A7b				OS6-C17a1	
xynB_02_03		RO_B1C4b				OS6-C17a2	
xynB_03	xynB_03	OS6-B11a				OS6-C18a1	
		OS6-B12a				OS6-C18a2	
xynB_04	xynB_04	OS6-B11b				OS6-C19a1	
		OS6-B12b				OS6-C19a2	
xynB_05	xynB_05	OS6-C17a				OS6-D27a1	
		OS6-C19a				OS6-D27a2	
		OS6-D27a				OS6-D28a1	
		OS6-D28a				OS6-D28a2	
		OS6-D33a				OS6-D33a1	
xynB_06	xynB_06	OS6-C17b				OS6-D33a2	
		OS6-C19b				RO_S1C3a1	
		OS6-D27b				RO_S1C3a2	
		OS6-D28b		GH5_02	GH5_02	RO_B1A7a	
		OS6-D33b				RO_B2A5a	
xynB_07	xynB_07	RO_B1A7a		GH5_03	GH5_03	RO_B1A7b	
xynB_08	xynB_08	RO_B1C4a				RO_B1C4b	
xynB_09	xynB_09	RO_B3B4a				RO_B2A5b	
		RO_B3C5a		GH5_04	GH5_04	RO_B1C4a	
		RO_B3C6a		GH5_05	GH5_05	RO_B2C2a	
		RO_B3D6a		GH5_06	GH5_06	RO_B2C2b	
		RO_B3D7a		GH5_07	GH5_07	RO_B3C5a	
xynB_10	xynB_10	RO_B3B4b				RO_B3C6a	
		RO_B3C5b		GH5_08	GH5_08	RO_B3C5b	
		RO_B3C6b				RO_B3C6b	
		RO_B3D6b		GH5_09	GH5_09	RO_S2A4a	
		RO_B3D7b				RO_S2D3a	
xynB_11_01	xynB_11	RO_B3B8a				RO_S2E1a	
xynB_11_02		RO_B3B8b				RO_S2E3a	
xynB_11_03		RO_S1A6a1				RO_S2E5a	
		RO_S1A6a2				RO_S2E9a	
		RO_S2A4a1		GH5_10	GH5_10	RO_S2A4b	
		RO_S2A4a2				RO_S2D3b	
		RO_S2D3a1				RO_S2E1b	
		RO_S2D3a2				RO_S2E3b	

<i>Beta-xylosidase (xynB)</i>				<i>Celullase (GH5)</i>			
Haplótipo		Isolado e sequência	H O	Haplótipo		Isolado e sequência	H O
éxons e íntrons	éxons			éxons e íntrons	éxons		
<i>xynB_11_03</i>	<i>xynB_11</i>	RO_S2E1a1		<i>GH5_10</i>	<i>GH5_10</i>	RO_S2E5b	
		RO_S2E1a2				RO_S2E9b	
		RO_S2E3a1					
		RO_S2E3a2					
		RO_S2E5a1					
		RO_S2E5a2					
		RO_S2E7a1					
		RO_S2E7a2					
		RO_S2E9a1					
		RO_S2E9a2					

Hospedeiro
de origem
(HO)
Arroz
Urochloa
Soja

Tabela 6 (continuação)

<i>Pectate-lyase B (PL1)</i>				<i>Polygalacturonase (PG1)</i>			
Haplótipo		Isolado e Sequência	H O	Haplótipo		Isolado e Sequência	H O
éxons e íntrons	éxons			éxons e íntrons	éxons		
<i>PL1_01</i>	<i>PL1_01</i>	OS5-C20a		<i>PG1_01_01</i>	<i>PG1_01</i>	OS5-C20a	
		OS5-D21a		<i>PG1_01_02</i>		OS6-D29a	
		OS6-B11a		<i>PG1_02_01</i>	<i>PG1_02</i>	OS5-C20b	
		OS6-B12a		<i>PG1_02_02</i>		OS6-D29b	
		OS6-C17a		<i>PG1_03</i>	<i>PG1_03</i>	OS5-D21a1	
		OS6-C19a				OS5-D21a2	
		OS6-D27a		<i>PG1_04</i>	<i>PG1_04</i>	OS6-B12a1	
		OS6-D28a				OS6-B12a2	
		OS6-D33a		<i>PG1_05</i>	<i>PG1_05</i>	OS6-C17a1	
		OS6-E37a				OS6-C17a2	
<i>PL1_02_01</i>	<i>PL1_02</i>	OS5-C20b				OS6-C19a1	
		OS5-D21b				OS6-C19a2	
		OS6-B11b				OS6-D27a1	
		OS6-B12b				OS6-D27a2	
		OS6-C17b				OS6-D28a1	
		OS6-C19b				OS6-D28a2	
		OS6-D27b				OS6-D33a1	
		OS6-D28b				OS6-D33a2	
		OS6-D33b		<i>PG1_06</i>	<i>PG1_06</i>	RO_B1A7a1	
		OS6-E37b				RO_B1A7a2	
<i>PL1_02_02</i>		RO_S1A5a1				RO_B1C4a1	
		RO_S1A5a2				RO_B1C4a2	
		RO_S1A6a1		<i>PG1_07</i>	<i>PG1_07</i>	RO_B2C2a	
		RO_S1A6a2		<i>PG1_08_01</i>	<i>PG1_08</i>	RO_B2C2b	
		RO_S1B8a1		<i>PG1_08_02</i>		RO_B3B4b	
		RO_S1B8a2		<i>PG1_08_03</i>		RO_B3C5b	

<i>Pectate-lyase B (PL1)</i>				<i>Polygalacturonase (PG1)</i>						
Haplótipo		Isolado e Sequência	H O	Haplótipo		Isolado e Sequência	H O			
éxons e íntrons	éxons			éxons e íntrons	éxons					
<i>PL1_02_02</i>	<i>PL1_02</i>	RO_S1C3a1		<i>PG1_08_04</i>	<i>PG1_08</i>	RO_B3C6b				
		RO_S1C3a2				RO_B3D6b				
		RO_S1D8a1		<i>PG1_08_05</i>		RO_B3D7b				
		RO_S1D8a2		<i>PG1_09</i>	<i>PG1_09</i>	RO_B2C8a1				
		RO_S2A4a1				RO_B2C8a2				
		RO_S2A4a2		<i>PG1_10_01</i>	<i>PG1_10</i>	RO_B3B4a				
		RO_S2D3a1				RO_B3C6a				
		RO_S2D3a2				RO_B3D6a				
		RO_S2E1a1		<i>PG1_10_02</i>		RO_B3C5a				
		RO_S2E1a2				RO_B3D7a				
		RO_S2E3a1		<i>PG1_11</i>	<i>PG1_11</i>	RO_B3B5a1				
		RO_S2E3a2				RO_B3B5a2				
		RO_S2E5a1				RO_B3B8a1				
		RO_S2E5a2				RO_B3B8a2				
		RO_S2E7a1		<i>PG1_12</i>	<i>PG1_12</i>	RO_S1A5a1				
		RO_S2E7a2				RO_S1A5a2				
		<i>PL1_03</i>		<i>PL1_03</i>	RO_S2E9a1				RO_S1A6a1	
					RO_S2E9a2				RO_S1A6a2	
RO_B1C4a	<i>PG1_13</i>		<i>PG1_13</i>		RO_S2D3a1					
RO_B2C2a					RO_S2D3a2					
RO_B2C8a					RO_S2E1a1					
RO_B3B4a					RO_S2E1a2					
RO_B3B8a					RO_S2E3a1					
RO_B3C5a		RO_S2E3a2								
<i>PL1_04</i>	<i>PL1_04</i>	RO_B3D7a			RO_S2E7a1					
		RO_B1C4b			RO_S2E7a2					
		RO_B2C2b			RO_S2E9a1					
		RO_B2C8b			RO_S2E9a2					
		RO_B3B4b								
		RO_B3B8b								
		RO_B3C5b								

Figura 1

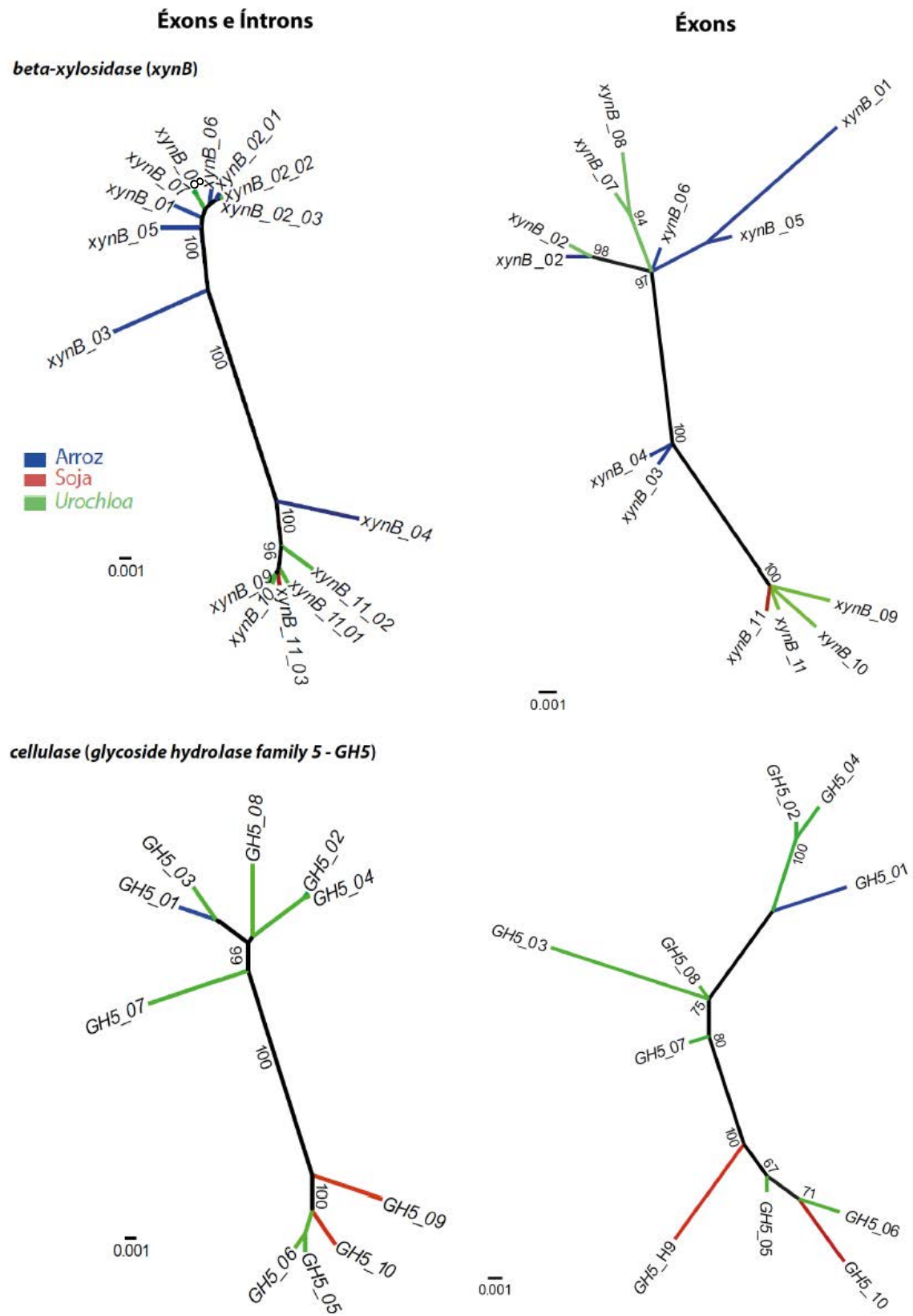


Figura 1 (continuação)

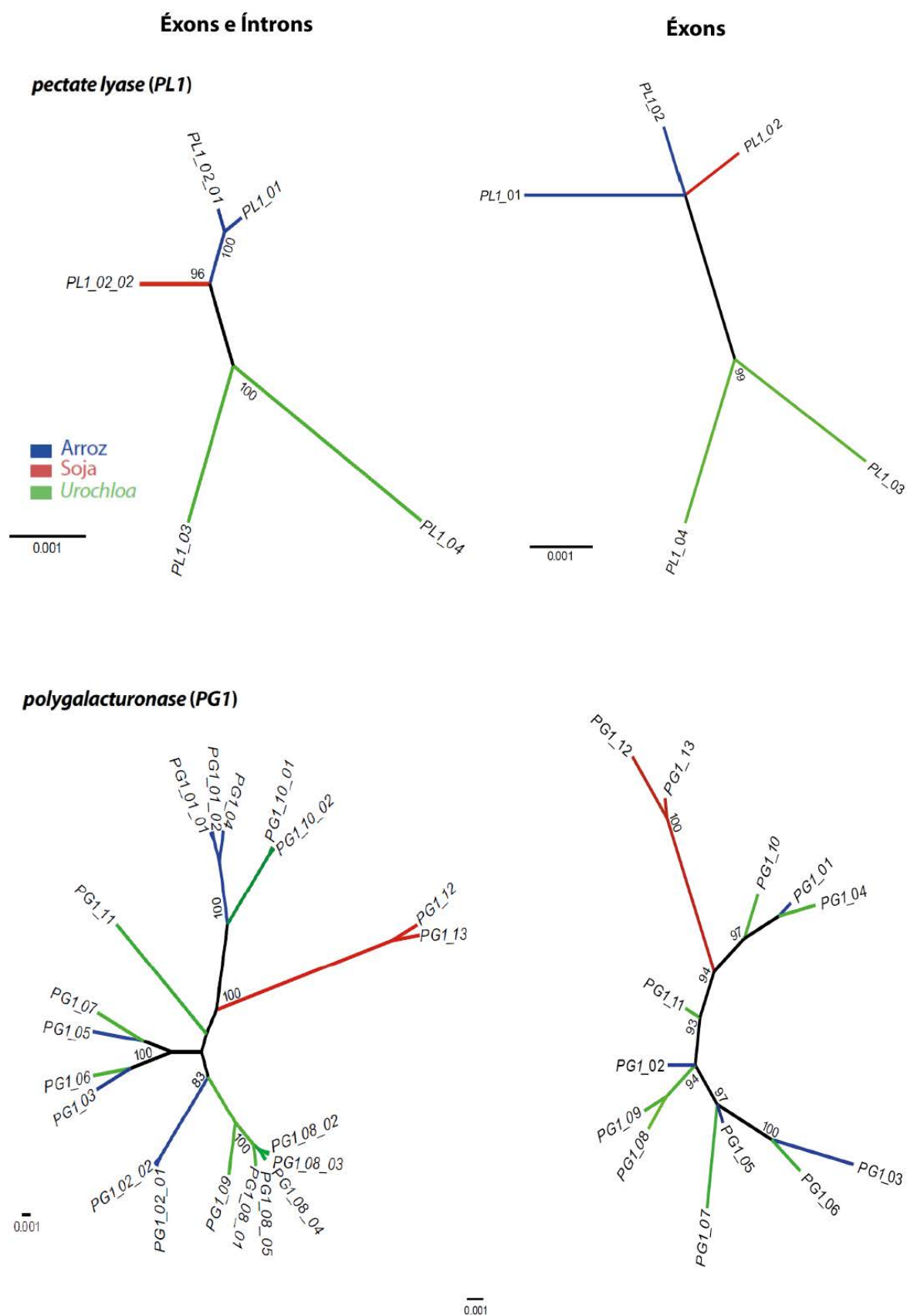


Figura 1. Árvores obtidas por reconstrução filogenética bayesiana com MrBayes. ilustrando as relações filogenéticas entre haplótipos de isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA amostrados de arroz, soja ou *Urochloa brizantha* no Brasil ou na Colômbia baseando-se em quatro genes de enzimas degradadoras de parede celular de plantas (EDPCPs): *beta-xylosidase*, *cellulase*, *pectate-lyase B* e *polygalacturonase*. *

* Para a construção das árvores foram utilizadas a combinação das regiões codificantes e não codificantes dos genes (éxons e íntrons) ou somente os éxons. Os valores de credibilidade são apresentados para as três linhagens (ou clados) principais. Ramos de diferentes cores indicam distintos hospedeiros. Valores ao lado de nós indicam o nível de suporte posterior dos nós dentro de linhagens. O valor da barra de escala no canto esquerdo inferior representa a distância genética em substituições por nucleotídeo.