

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

***Rhizoctonia solani* AG-1: ESTRUTURA GENÉTICA,
ETIOLOGIA E EVOLUTIBILIDADE NOS AGROECOSSITEMAS
Brachiaria spp. E ARROZ NA COLÔMBIA**

Lina Maria Ramos Molina
Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro de 2012

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

***Rhizoctonia solani* AG-1: ESTRUTURA GENÉTICA,
ETIOLOGIA E EVOLUTIBILIDADE NOS AGROECOSSITEMAS
Brachiaria spp. E ARROZ NA COLÔMBIA**

Lina Maria Ramos Molina

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)

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro de 2012

Ramos Molina, Lina Maria

R175r *Rhizoctonia solani* AG-1: Estrutura genética, etiologia e evolutibilidade nos agroecossistemas *Brachiaria* spp. e arroz na Colômbia / Lina Maria Ramos Molina. -- Jaboticabal, 2012
xiii, 92 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012

Orientador: Paulo Cezar Ceresini

Banca examinadora: Helvecio Della Coletta Filho, Celso Dornelas Fernandes, Antonio de Goes, Dilermando Perecin

Bibliografia

1. *Thanatephorus cucumeris*. 2. *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. 3. Origem de patógenos emergentes. 4. Fluxo gênico. 5. Herdabilidade. 6. Adaptabilidade evolutiva. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.4:633.2

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

E-mail: limaramo@gmail.com

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LINA MARIA RAMOS MOLINA – nascida em 19 de setembro de 1974, na cidade de Medellín, Antioquia (Colômbia). Engenheira agrônoma em 1997 pela Universidad de los Llanos (UNILLANOS), na Faculdade de Agronomia em Villavicencio, Colômbia e mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP, Campus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Desde fevereiro de 2008 é aluna de doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) na FCAV-UNESP. De setembro a novembro de 2011, realizou parte de sua tese no *Plant Pathology Group, Institute of Integrative Biology*, Instituto Federal Suíço de Tecnologia (*Eidgenössische Technische Hochschule Zurich* – ETH), em Zurique, na Suíça.

Nossas vidas são demais enriquecidas
por aqueles que tanto apreciamos...
Por aqueles que nos abençoam com sua forma de ser...
Por aquelas pessoas especiais que estão sempre em nosso coração.

A Deus, pois tudo só é possível graças a Ele.

À minha família pelo apoio, esforço,
dedicação e compreensão incondicional,
em todas as etapas da minha vida

DEDICO

A todos que fazem parte da minha vida
e que deixaram pegadas permanentes em
meu coração

OFEREÇO

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr. Paulo C. Ceresini pela receptividade, orientação, ajuda, paciência, oportunidade oferecida e aos seus ensinamentos para minha formação profissional.

À Prof. Dra. Maria del Rosario Silva Herrera pela confiança, assistência e orientação em seu laboratório de fisiologia vegetal na Universidad de los Llanos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES) e ao (CNPq) pelas concessão de bolsas de estudo de Doutorado no Brasil.

Ao CNPq/MCT (Edital Universal 2010, Auxílio 481756/2010-8) e à FAPESP (Auxílios 2010/15704-5 e 2011/50515-3 – BIOTA) pela concessão de auxílios financeiros complementares para a realização desta pesquisa.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP Campus de Jaboticabal (FCAV/UNESP), em especial aos Profs. Drs. Dilermando Perecin e Rinaldo César de Paula pelo incentivo indispensável à condução do programa de Doutorado.

Aos professores da FCAV/UNESP, pela contribuição intelectual e exemplo profissional.

Ao Prof. Dr. Antonio Ferraudo (FCAV/UNESP) pelos ensinamentos na área de estatística, e pelo carinho de sua família.

À UNESP Campus de Ilha Solteira, especialmente aos Departamentos de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos e de Química pelo apoio e cessão de uso da infraestrutura de suas dependências para realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Bruce McDonald (líder do *Plant Pathology Group, Institute of Integrative Biology, Swiss Federal Institute of Technology – ETH Zurich*) pela oportunidade de desenvolver parte do presente trabalho em seu laboratório na Suíça.

Aos membros do *ETH - Plant Pathology Group*, em especial a Marcello Zala e a Ulrike Rosenberger pela assistência dispendida durante minha estadia na Suíça, assim como a Joana Meyer, Rebecca Gau, Daniel Croll, Tryggvi Stefansson, Mark Lendenmann e Ueli Merz pelos ensinamentos na área de genética de populações e o companheirismo.

Às alunas e amigas Camila Ferro, Nadia Poloni e Izabela Garcia pela colaboração na execução dos experimentos de minha tese, e em especial a Grace Ingrid Conceição, pelo conviver e pelos momentos alegres de convivência.

Ao Dr. Jhon W. Miles, Daniel Vergara e Ximena P. Bonilla, pela orientação na condução da amostragem de *Rhizoctonia solani* das braquiárias na Colômbia.

Aos Engenheiros Agrônomos da empresa SEMILLANO, pela colaboração na obtenção das amostras, em especial à Marcela Pabón, Jorge M. Castaño, e Jairo Villanueva.

Ao grupo de Agronomia do Instituto Agronômico de Campinas – IAC, em Pindamonhangaba, pelos ensinamentos em melhoramento de plantas e pela amizade, a qual nunca vou esquecer, e em especial ao Dr. Cândido Bastos pela oportunidade de desenvolver estágio no IAC.

À Christina e à Giulia que me ajudaram muito em minha estadia em Zurique.

À minhas amigas Carla, Liliam, Joseane, Elma, Poliana, Gislayne, Andréia, e Karina, pelo apoio, companheirismo e amizade ao longo deste trabalho em Jaboticabal e em especial a Gislayne, Marcia, e Renata pela ajuda e amizade em Ilha Solteira.

À Elaine Costa e à Johanna Cano que estiveram de meu lado principalmente nas etapas finais e me ajudaram na conclusão do meu trabalho em Jaboticabal e em Ilha Solteira.

À Agnésia e ao Sr. Elpidio pela ajuda, compreensão e amor familiar que me brindaram em Ilha Solteira.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	1
SUMMARY	2
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	3
REFERÊNCIAS	6
CAPÍTULO 2 – ETIOLOGIA DA QUEIMA DA FOLHA DA BRAQUIARIA NOS LLANOS COLOMBIANOS	11
RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	13
MATERIAL E MÉTODOS	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
CONCLUSÕES	19
REFERÊNCIAS	20
TABELA E FIGURA	25
CAPÍTULO 3 – ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES SIMPÁTRICAS DE <i>Rhizoctonia solani</i> AG 1 IA DA BRAQUIÁRIA E DO ARROZ NA COLÔMBIA ...	28
RESUMO	28
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	35
RESULTADOS	42
DISCUSSÃO	45
CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	48
TABELAS E FIGURAS	57

CAPÍTULO 4 – POTENCIAL ADAPTATIVO DE <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA E <i>R. oryzae-sativae</i> DA BRAQUIÁRIA E DO ARROZ AO ESTRESSE TÉRMICO	65
RESUMO	65
ABSTRACT.....	66
INTRODUÇÃO.....	67
MATERIAL E MÉTODOS	69
RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
REFERÊNCIAS	73
TABELAS E FIGURA.....	78
ANEXO	81

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Localização geográfica das localidades de onde foram coletadas amostras de plantas exibindo sintomas de *Rhizoctonia* spp. em campos de braquiária e de arroz nos municípios de Villavicencio e Puerto Lopez, no Estado de Meta, Colômbia.....26
- Figura 2. Diferentes formas, cores e tamanhos de esclerócios e sintomas de fungos associados à queima da folha da braquiária ou à queima e mancha da bainha do arroz.27
- Figura 3. Coeficientes de filiação Q para genótipos multilocus microssatélites de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA amostrados de campos da braquiária em Meta, na Colômbia.....63
- Figura 4. Estimativas de parâmetros demográficos da divergência entre populações simpátricas de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA que infectam arroz e braquiária na Colômbia.....64
- Figura 5. Localização geográfica das localidades de onde foram coletadas amostras de *Rhizoctonia* spp. em campos de braquiária e de arroz nos municípios de Villavicencio e Puerto López, no Estado de Meta, Colômbia.....80

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Levantamento de populações de fungos associados com à queima da folha da braquiária e da queima da bainha do arroz nos Llanos Colombianos.25
- Tabela 2. Populações simpátricas de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA de braquiária e de arroz amostradas em Meta, Colômbia, usadas nesse estudo.57
- Tabela 3. Medidas de diversidade genotípica e gênica em populações simpátricas de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA da braquiária e do arroz no Estado de Meta na Colômbia.....58

Tabela 4. Testes para associação aleatória de alelos dentro de cada locus e entre pares de loci em populações de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA da braquiária e do arroz na Colômbia.	59
Tabela 5. Número de alelos, diversidade de genes (heterozigosidade observada e esperada), desvio das proporções do EHW e frequência de alelos nulos associados a oito marcadores poliformicos microssatélites presentes para genotipagem de populações simpátricas de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA da braquiária e do arroz no estado de Meta, na Colômbia.	60
Tabela 6. Medidas de diferenciação entre populações de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA da braquiária e do arroz na Colômbia, baseadas em F_{ST}^a	62
Tabela 7. Modelo linear geral testando os efeitos de população, isolados e temperatura e suas interações sobre o crescimento micelial <i>in vitro</i> dos fitopatógenos <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA da braquiária e do arroz e <i>R. oryzae-sativae</i> do arroz.	78
Tabela 8. Efeito da temperatura sobre o crescimento micelial <i>in vitro</i> e sobre os componentes de evolutibilidade em populações de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA da braquiária (BBT1) e do arroz (OS2) e em populações de <i>R. oryzae-sativae</i> do arroz (OS3).	79

***Rhizoctonia solani* AG-1: ESTRUTURA GENÉTICA, ETIOLOGIA E EVOLUTIBILIDADE NOS AGROECOSSITEMAS *Brachiaria* spp. E ARROZ NA COLÔMBIA**

RESUMO - No início dos anos 90, o fungo *Rhizoctonia solani* emergiu como um patógeno importante associado à morte de pastagens do gênero braquiária na Colômbia. Inicialmente, esse estudo indicou que *R. solani* AG-1 IA predomina como patógeno associado à queima da folha da braquiária nos Llanos Colombianos. Para o estudo da estrutura genético-populacional do patógeno, um total de 198 isolados de *R. solani* AG-1 IA foram coletados de campos de *B. brizantha* cv. Toledo, de *Brachiaria* híbrido Mulato e do arroz. Os isolados foram genotipados usando dez loci microssatélites. Um sistema reprodutivo misto (reprodução sexuada e clones adaptados) caracterizou as populações de *R. solani* AG-1 IA que infectam a braquiária. A alta fração clonal e os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg encontrados foram consistentes com o efeito Wahlund associado à mistura de populações. Padrões históricos de migração entre populações hospedeiro-distintas indicaram a origem provável das populações que infectam braquiária a partir de populações que infectavam arroz. Para determinar o efeito do estresse térmico na evolutibilidade para crescimento micelial, populações de *R. solani* AG-1 IA infectando braquiária ou arroz e *R. oryzae-sativae* do arroz, foram submetidas à temperatura ótima e de estresse (25 e 35°C). A herdabilidade para crescimento micelial sob condições de estresse foi considerada alta na população de *R. oryzae-sativae* do arroz, indicando que os patógenos têm potencial de adaptação à temperatura de 35°C.

Palavras-chave: *Thanatephorus cucumers*, *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, origens de patógenos emergentes, fluxo gênico, herdabilidade, adaptabilidade evolutiva.

***Rhizoctonia solani* AG-1: GENETIC STRUCTURE, ETIOLOGY AND EVOLVABILITY ON *Brachiaria* spp. AND RICE AGROECOSYSTEMS IN COLOMBIA**

SUMMARY - In the early '90s, the fungus *Rhizoctonia solani* has emerged as an important pathogen associated with the death of *Brachiaria* pastures in the Colombian Llanos. Initially, this study indicated that *R. solani* AG-1 IA was the predominant pathogen associated with the leaf blight in the Colombian Llanos. To study the population genetic structure of the pathogen, a total of 198 isolates of *R. solani* AG-1 IA were collected from fields of *B. brizantha* cv. Toledo, *Brachiaria* Mulato hybrid and from rice. These isolates were genotyped using ten microsatellite loci. A mixed mating system (sexual reproduction and dispersal of adapted clones) characterized the populations of *R. solani* AG-1 IA infecting *Brachiaria*. The high clonal fraction and deviations from Hardy-Weinberg equilibrium found in three out of four populations were consistent with Wahlund effect associated with the mixing of populations. Historical patterns of migration between different host-populations indicated that the likely source of the current populations infecting *Brachiaria* in the Colombian Llanos was from populations that originally infected rice. To determine the effect of heat stress on the evolvability for mycelial growth, two host distinct populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA infecting either brachiaria or rice and a rice-infecting population of *R. oryzae-sativae*, were submitted to optimal and stress temperatures (25°C and 35°C). The heritability values for mycelial growth under heat stress was considered high for rice-infecting population of *R. oryzae-sativae*, indicating that these pathogen's population have a high potential to adapt to 35°C temperature.

Keywords: *Thanatephorus cucumeris*, *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, origins of emerging pathogens, gene flow, reproductive system, heritability, evolutionary adaptability

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Fitopatógenos emergentes são descritos como patógenos que: (i) foram recentemente descobertos ou recém descritos; (ii) evoluíram recentemente; (iii) aumentaram em incidência, expandiram geograficamente ou sua gama de hospedeiros; e (iv) tiveram alterações em suas propriedades patogênicas (ANDERSON et al., 2004; STUKENBROCK & MCDONALD, 2008). Um patógeno emergente pode ser um novo vírus, bactéria ou fungo que tem o potencial para se tornar endêmico, epidêmico e até mesmo adquirir natureza pandêmica. Fungos fitopatogênicos, em particular, são conhecidos por causarem perdas elevadas de rendimento nas culturas agrícolas, com consequente impacto na economia, e novas doenças fúngicas devastadoras estão constantemente emergindo nos agroecossistemas (STUKENBROCK & MCDONALD, 2008). Como a compreensão do risco da emergência de fitopatógenos nos agroecossistemas ainda é pobre, é necessário que estratégias de monitoramento, vigilância e previsão do risco de emergência sejam desenvolvidas.

Alguns fatores podem levar à emergência de fitopatógenos nos agroecossistemas (ANDERSON et al., 2004): (i) a introdução de patógenos. Também conhecida como "poluição patogênica", que é impulsionada principalmente por atividades mediadas pelo homem (por exemplo, através da introdução de material vegetal propagativo infestado, pela adoção de certas práticas agrícolas, e por perturbações ocasionadas ao ambiente). A introdução por semente ou outro material propagativo é o fator principal para a emergência de fitopatógenos numa nova região ou país. Durante o período de 1997 - 2007, a evolução do mercado de sementes no mundo, tem-se multiplicado quase que por três, a partir de aproximadamente US\$ 13 para 36 bilhões (LE BUANEC, 2008); (ii) a intensificação, a diversificação e a globalização da agricultura. A intensificação da agricultura pode levar à expansão de populações de fitopatógenos, a diversificação facilita a introdução de novos hospedeiros e a globalização leva à introdução de novos patógenos. A facilidade de deslocar fisicamente um produto de um ponto do planeta a outro, incrementou a

globalização do comércio. No período de 1997 a 2006, o comércio mundial de produtos do agronegócio cresceu de US\$388,6 bilhões para US\$609,8 bilhões, o que significa um incremento de 56,9%. Este processo de globalização refletiu-se na abrangência e dimensão das crises alimentares devido a problemas sanitários e doenças, como o BSE (*Bovine spongiform encephalopathy*) ocorrido nos anos 90 e, posteriormente, a disseminação da gripe aviária (SATO, 2009); (iii) a coevolução patógeno-hospedeiro. Nas interações planta-patógeno, coevolução é caracterizada pelo desenvolvimento cíclico de resistência no hospedeiro e de virulência no patógeno, com a seleção natural afetando a adaptação, tanto do patógeno quanto do hospedeiro (MCDONALD, 2010); (iv) as alterações climáticas e antropogênicas. Mudanças climáticas globais e alterações antropogênicas das paisagens terrestres e aquáticas em larga escala (por exemplo, a conversão de florestas em áreas agrícolas e a construção de barragens) podem alterar a incidência e distribuição das doenças (LIPP et al., 2002). Tem sido demonstrado para vários sistemas hospedeiro-parasita que a virulência de patógenos pode variar significativamente com a temperatura (THOMAS & BLANFORD, 2003), e postula-se que o impacto global das doenças emergentes serão influenciados pelas mudanças climáticas (COAKLEY et al., 1999; AYRES & LOMBARDERO, 2000; LIPP et al., 2002). Entretanto, a direção e a magnitude dessas mudanças continuam muito imprevisíveis.

A migração do patógeno do estado natural a um novo agroecossistema pode ser considerada como outro fator de emergência, um claro exemplo pode-se observar na agricultura Sul Americana, quem está particularmente vulnerável à emergência de fitopatógenos, num cenário de mudanças climáticas por causa da grande variedade de ecossistemas onde a agricultura é praticada (variando de equatorial, a tropical e subtropical). De acordo com ANDERSON et al. (2004) e MCDONALD & LINDE (2002), o estudo do potencial evolutivo dos fitopatógenos, bem como a investigação de fatores ambientais e ecológicos indutivos relacionados, é essencial para a parametrização e compreensão dos processos de emergência de fitopatógenos num novo agroecossistema.

Dessa forma, uma proposta de pesquisa com o objetivo de determinar a

emergência de fitopatógenos em agroecossistemas, deve focar questões pertinentes como: **i.** Se a emergência de uma nova doença é devido a mudanças evolutivas, que tipos de mudanças evolutivas ocorreram e como essas alterações podem ser detectadas? **ii.** A emergência de uma nova doença ocorreu devido à introdução (única ou múltipla) do patógeno em um novo agroecossistema? **iii.** A emergência de uma nova doença foi facilitada ou induzida por alterações no habitat, por exemplo, pela adoção de rotação de culturas em particular, ou devido à simples substituição ou troca de hospedeiro em áreas comuns ou contíguas geograficamente? **iv.** Considerando o potencial evolutivo de patógenos em trocar de hospedeiros, bem como a suscetibilidade dos respectivos hospedeiros, é possível prever os padrões de dispersão destes patógenos para novos agroecossistemas (geograficamente contíguos ou descontínuos)?

Foi escolhido como primeiro modelo para estudo de patógenos emergentes, o fungo basidiomiceto *Thanatephorus cucumeris* (anamorfase *Rhizoctonia solani* grupo de anastomose AG-1 IA), que é considerado um patógeno importante, afetando uma ampla gama de culturas hospedeiras de importância mundial (JONES & BELMAR, 1989; PASCUAL & HYAKUMACHI, 2000). Na América do Sul o AG-1 IA causa queima da bainha no arroz (SOUZA et al., 2007; BOLKAN & RIBEIRO, 1985; CEDEÑO et al., 1996), folha bandeada e queima da bainha no milho (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). Recentemente, *R. solani* AG-1 IA emergiu como patógeno adaptado à braquiária na Amazônia Colombiana (CIAT, 1993; KELEMU et al., 1995) e Brasileira (SOUZA et al., 2000; VERZIGNASSI & FERNANDES, 2001; DUARTE et al., 2007). A doença ocorre em reboleiras e causa queima das folhas e morte das touceiras de braquiária (SOUZA et al., 2000; VALERIO et al., 2000; ARGEL et al., 2005). Ainda não há relato contundente esclarecendo a etiologia da doença. De fato, *R. solani* é uma espécie complexa composta por diversos grupos de anastomose (AGs) (CARLING, 1996). Os AGs são unidades taxonômicas correspondentes a espécies filogenéticas do complexo denominado de *Rhizoctonia solani* (GONZALEZ et al., 2001) e cada grupo de anastomose está frequentemente associado a determinado

hospedeiro ou a um grupo restrito de hospedeiros (OGOSHI, 1987; SNEH et al., 1991). Segundo BLACK et al. (1996), braquiária é hospedeira de dois AGs distintos de *R. solani*, o AG-1 IA e o AG-1 IB. Ambos produzem escleródios em abundância no tecido doente. Entretanto, o AG-1 IA produz escleródios maiores “tipo *sasakii*” (de 1 a 6 mm de diâmetro) e que, geralmente, não são dispersos pelo ar (SUMNER, 1996; YANG et al., 1989). Em contraste, o AG-1 IB produz microescleródios, o que permite ao patógeno dispersão aérea (WEBER, 1939; GALINDO et al., 1983). No geral, *R. solani* AG-1 IA sobrevive como micélio e escleródios no solo e em sementes, onde ciclos recorrentes de infecção aumentam o inóculo no solo (OGOSHI, 1987). A dispersão de inóculo associado com plantas invasoras pode ter também um papel importante na disseminação do patógeno entre cultivos distintos (BLACK et al., 1996).

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, P. K.; CUNNINGHAM, A. A.; PATEL, N. G.; MORALES, F. J.; EPSTEIN, P. R.; DASZAK, P. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 19, n. 10, p. 535-544, 2004.
- ARGEL, P. J.; MILES, J. W.; GUIOT, J. D.; LASCANO, C. E. **Cultivar Mulato (*Brachiaria* híbrido CIAT 36061). Gramínea de alta producción y calidad forrajera para los trópicos**. Palmira: CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical, 2005. 24 p. (Boletim Técnico).
- AYRES, M. P.; LOMBARDERO, M. J. Assessing the consequences of global change for forest disturbance from herbivores and pathogens. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 262, n. 3, p. 263-286, 2000.

BLACK, B. D.; GRIFFIN, J. L.; RUSSIN, J. S.; SNOW, J. P. 1996. Weed hosts for *Rhizoctonia solani*, causal agent for rhizoctonia foliar blight of soybean (*Glycine max*). **Weed Technology**, v. 10, p. 865-869, 1996.

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

CARDONA, R.; RODRÍGUEZ, H.; NASS, H. Mancha bandeada en maíz causada por *Rhizoctonia solani* en el estado Portuguesa, Venezuela. **Fitopatología Venezolana**, v. 12, n. 2, p. 32-33, 1999.

CARLING, D. E. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S. M.; DIJST, G. (Ed.). **Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.37-47.

CEDEÑO, L.; NASS, H.; CARRERO, C.; CARDONA, R.; RODRÍGUEZ, H.; ALEMÁN, L. *Rhizoctonia solani* AG-1-IA, causa principal del añublo de la vaina del arroz en Venezuela. **Fitopatología Venezolana**, v. 9, p. 6-9 1996.

CIAT. Biennial Report 1992-1993. **Tropical Forages Program**. Cali: CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1993. 83 p. (Document, 166)

COAKLEY, S. M.; SCHERM, H.; CHAKRABORTY, S. Climate change and plant disease management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, n. 1, p. 399-426, 1999.

DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; SANHUEZA, R. M. V.; VERZIGNASSI, J. R.; KONDO, N. 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.; SOUZA, N. L.; KURAMAE, E. E. Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 783-792, 2002.

GALINDO, J. J.; ABAWI, G. S.; THURSTON, H. D.; GALVEZ, G. Source of inoculum and development of bean web blight in Costa Rica. **Plant Disease**, v.67, p.1016-1021, 1983.

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

KELEMU, S.; MILES, J. W.; BONILLA, X. P.; BADEL, J. L. Sources of resistance in species of *Brachiaria* to foliar blight disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Tropical Grasslands**, v. 29, p. 257-262, 1995.

LE BUANEC, B. A evolução da indústria sementeira durante os últimos 40 anos. Reportagem de capa do mês, Revista SEED News. Praga, República Checa, v. 12, n. 4, 2008.

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

MCDONALD, B. A. How can we achieve durable disease resistance in agricultural ecosystems? **The New Phytologist**, Oxford, v. 185, p. 3-5, 2010.

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

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.

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

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

PERDOMO, R.; HERNÁNDEZ, A.; GONZÁLES, A.; PINEDA, J.; ALEZONES, J. Caracterización y evaluación de virulencia en aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn, causante de la mancha bandeada en maíz. **Interciencia**, v. 32, n. 1, p. 48-55, 2007.

SATO, G. S. Globalização e Diferenciação no Consumo de Alimentos. Análises e Indicadores de Agronegócio, v.4, n.6, junho 2009.

SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. **Identification of *Rhizoctonia* species**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1991. 133 p.

SOUZA, E. C.; KURAMAE, E. E.; NAKATANI, A. K.; BASSETO, M. A.; PRABHU, A. S.; CERESINI, P. C. Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado ao arroz em Tocantins, Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 33 n. 2, p. 129-136, 2007.

SOUZA, O. C.; ZIMMER, A. H.; VALLE, L. C. S.; KOLLER, W. W. **Diagnóstico de morte de pastagens de *Brachiaria brizantha* nas regiões de Araguaína, TO e Redenção, PA**. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2000. 11 p. (Documentos, 96).

STUKENBROCK, E. H.; MCDONALD, B. The origins of plant pathogens in agroecosystems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 46, p. 75-100, 2008.

SUMNER, D. R. Sclerotia formation by *Rhizoctonia* species and their survival. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (Ed.). ***Rhizoctonia* species: Taxonomy**,

Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.207-215.

THOMAS, M. B.; BLANFORD, S. Thermal biology in insect-parasite interactions. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 18, n. 7, p. 344-350, 2003.

VERZIGNASSI, J. R.; FERNANDES, C. D. **Doenças em forrageiras.** Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2001. 4 p. (Boletim de Divulgação Técnica Online, 50)

WEBER, G. F. Web-blight, a disease of beans caused by *Corticium microsclerotia*. **Phytopathology**, v. 29, p. 559-575, 1939.

YANG, X. B.; SNOW, J. P.; BERGGREN, G. T. Morphogenesis of microsclerotia and sasakii-type sclerotia in *Rhizoctonia solani*, anastomosis group 1, intraspecific groups IA and IB. **Mycological Research**, v. 93, n. 4, p. 429-434, 1989.

CAPÍTULO 2 – ETIOLOGIA DA QUEIMA DA FOLHA DA BRAQUIARIA NOS LLANOS COLOMBIANOS

RESUMO - No início dos anos 90, o fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA emergiu como um patógeno importante associado à morte de pastagens do gênero *Brachiaria* nos Llanos Colombianos. Apesar da importância desta doença emergente, ainda não há relato esclarecendo a etiologia da queima da folha da braquiária na Colômbia. Dessa forma, o objetivo principal deste estudo foi determinar, através do levantamento feito na região de maior incidência da doença na Colômbia, que patógenos do complexo de espécies *R. solani* estão associados à queima da folha da braquiária. Os resultados indicaram que *R. solani* AG-1 IA predomina como patógeno associado à queima da folha de *B. brizantha* cv. Toledo e *Brachiaria* híbrido “Mulato” nos Llanos Colombianos. Todos os 161 isolados obtidos de populações do fungo que infecta a braquiária apresentaram escleródios “tipo sasakii”. As sequências da região ITS-5.8S do rDNA de amostra destas populações foram similares à *R. solani* AG-1 IA. Esta informação é relevante para programas de melhoramento de braquiária visando seleção para resistência à doença, pois indica que a doença não é causada por um complexo de patógenos.

Palavras-chave: *Braquiária*, doenças, etiologia, *Oryza sativa*, *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, *Rhizoctonia oryzae-sativae*, *Sclerotium hydrophilum*

ETIOLOGY OF BRACHIARIA LEAF BLIGHT IN THE COLOMBIAN LLANOS

ABSTRACT - In the early '90s, the fungus *Rhizoctonia solani* has emerged as an important pathogen associated with the death of *Brachiaria* pastures in the Colombian Llanos. Despite the importance of this emerging disease, there is no report clarifying the etiology of brachiaria leaf blight in Colombia. Thus, the main objective of this study was to determine, through a survey in the region with the highest incidence of the disease in Colombia, which pathogens from the *R. solani* species complex were associated with brachiaria leaf blight. This study indicated that *R. solani* AG-1 IA predominated as the pathogen associated with the leaf blight on *B. brizantha* cv. Toledo and *Brachiaria* "Mulato" hybrid in the Colombian Llanos. All 161 isolates obtained from *Brachiaria*-infecting fungus populations presented "sasakii-type" sclerotia. The sequences from the ITS-5.8S rDNA region of a sample of these isolates were similar to *R. solani* AG-1 IA. This information is relevant to *Brachiaria* breeding programs aimed at selection for disease resistance because it indicated that the disease is not caused by a complex of pathogens.

Keywords: *Brachiaria*, diseases, etiology, rice, *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, *Rhizoctonia oryzae-sativae*, *Sclerotium hydrophilum*.

INTRODUÇÃO

No início dos anos 90, o fungo anamórfico Basidiomiceto *Rhizoctonia solani* (teleomórfase *Thanatephorus cucumeris*) emergiu como um patógeno importante associado à queima das folhas e morte de pastagens do gênero braquiária na Colômbia (CIAT, 1993; ARGEL et al., 2005). Este fungo emergiu na região dos Llanos Orientais 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 braquiária, em resposta à crescente demanda por pecuária extensiva. Também, na região dos Llanos Orientais da Colômbia, no ano 1981, relatou-se, pela primeira vez, a ocorrência da queima da bainha em arroz na Colômbia (PABÓN GUERRERO, 1994). Embora não se tenham dados precisos sobre as perdas provocadas pela queima das folhas em braquiária, a doença é considerada severa (ARGEL et al., 2005; DUARTE et al., 2007). No arroz, por exemplo, estima-se que as perdas de produção causadas pela queima da bainha podem chegar até 50% (SAVARY et al., 2000; NEERAJA et al., 2003). Os sintomas da queima das folhas da braquiária são lesões inicialmente helicoidais ou ovóides, de cor verde-acinzentada, com bordos escuros irregulares. O centro da lesão se torna branco-acinzentado circundado por uma margem marrom (Figura 2). Em casos severos, as lesões coalescem queimando as folhas.

Apesar da importância desta doença emergente, ainda não há informações esclarecendo a etiologia da queima da folha da braquiária na Colômbia. *R. solani* é uma espécie complexa, composta por diversos grupos de anastomose com elevada especificidade de hospedeiros (ADAMS, 1988; CARLING, 1996). No sul dos Estados Unidos, a braquiária é relatada como hospedeira de dois grupos de anastomose (AGs) distintos do complexo de espécies *R. solani*: o AG-1 IA e o AG-1 IB (BLACK et al., 1996). Ambos produzem escleródios em abundância no tecido doente. No primeiro artigo descrevendo a reação de espécies de braquiária à queima da folha na Colômbia, os autores provavelmente utilizaram o AG-1 IA como inóculo, pois o isolado produzia escleródios grandes, provavelmente do “tipo *sasakii*” (KELEMU et al., 1995). No Brasil,

há relato recente da associação, também, do AG-4 HGI à braquiária em Paragominas no Pará (GAINO et al., 2010). Entretanto o AG-4 HGI é considerado um patógeno essencialmente radicular, associado à morte da *Brachiaria* spp. no Brasil.

É possível que tanto o AG-1 IA quanto o AG-1 IB de *R. solani* estejam associados com a queima da folha da braquiária na Colômbia. Entretanto, ainda se desconhece qual a importância relativa de cada AG como patógeno desta forragem.

Dessa forma, o objetivo principal desta pesquisa foi determinar, através de levantamento na região de incidência da doença na Colômbia, quais patógenos do complexo de espécies *R. solani* estão associados à queima da folha da braquiária. Como objetivo secundário, para viabilizar futuros estudos sobre a origem do patógeno da queima da folha da braquiária, amostrou-se também o patógeno da queima da bainha do arroz em áreas de cultivo remanescente da cultura, adjacentes às de braquiária.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem de populações do fungo da queima da folha da braquiária e da queima da bainha do arroz na Colômbia.

Um total de 234 amostras foram coletadas no estado de Meta, na região dos Llanos Orientais, no Bioma Amazônico do nordeste da Colômbia (Figura 1), em seis localidades diferentes. Três populações simpátricas com sintoma da queima da folha/bainha foram coletadas no município de Puerto Lopez: a primeira população infectando *Brachiaria brizantha* cv. Toledo (BBT1), a segunda população infectando *Brachiaria* híbrido Mulato (BHM3) e a terceira população infectando arroz (OS5). Da mesma forma, três populações simpátricas foram coletadas no município de Villavicencio: uma população infectando *Brachiaria brizantha* cv. Toledo (BBT2), a segunda população infectando *Brachiaria* híbrido Mulato (BHM4) e uma terceira população infectando arroz (OS6) (Tabela 1). As amostras populacionais foram

coletadas nos anos 2010 – 2011, de seis a oito focos/linha de cultivo, espaçados de cerca de 10 m por foco, num total de quatro a seis linhas por campo. O objetivo foi obter cerca de 30 - 40 isolados de *Rhizoctonia solani* por população.

Isolamento de fungos das amostras de braquiária e de arroz e caracterização cultural de colônias fúngicas

Para isolar o fungo, fragmentos dos materiais infectados foram lavados com água, desinfetados com hipoclorito de sódio a 1% por 30 segundos e enxaguados em água esterilizada. Posteriormente, os fragmentos de aproximadamente 3-4 cm, obtidos de folhas infectadas, foram aderidos com fita adesiva ao lado interno da tampa de placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA), e incubados a 25°C, no escuro, durante três dias, e depois purificados em meio BDA. Escleródios do fungo produzidos em meio BDA foram transferidos para crio-tubos de 1,8 mL, contendo sílica gel esterilizada e mantidos em refrigerador a cerca de 5°C, na micoteca da UNESP, Campus de Ilha Solteira.

Para caracterização cultural das colônias fúngicas obtidas, os isolados foram cultivados em meio BDA e incubados a 25°C, no escuro, por 10 dias, quando se observou a formação plena de escleródios maduros. Documentou-se a coloração das colônias, forma, tipo e coloração de escleródios formados.

Extração de DNA e identificação molecular dos isolados.

Para confirmar as características morfológicas observadas nos diferentes grupos e determinar o agente causal da doença, foi produzido micélio fúngico 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. A identificação dos isolados coletados foi feita usando dois procedimentos. Inicialmente, utilizou-se um conjunto de dez marcadores microsatélites específicos para *R. solani* AG-1 IA (ZALA et al., 2008) usando condições

de amplificação previamente descritas pelos autores. Dos isolados para os quais se amplificou positivamente todos os marcadores microssatélites, foram selecionados 25 isolados, ao acaso, para confirmar sua identificação como *R. solani* AG-1 IA, com base no sequenciamento da região ITS-5.8S do DNA ribossomal rDNA (ITS rDNA), cuja filogenia molecular reproduz a sistemática clássica dos AGs baseada na reação de anastomose de hifas (SNEH et al., 1991; GONZALEZ et al., 2001). Os isolados que não apresentaram amplificação positiva dos loci microssatélites, foram, então, identificados com base no sequenciamento da região ITS-5.8S do rDNA. A extração do DNA do micélio fúngico liofilizado foi efetuada utilizando-se o kit Genelute (Sigma-Aldrich Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Para amplificação via reação de polimerase em cadeia (PCR) e sequenciamento da região ITS rDNA utilizou-se o par de *primers* iniciadores ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (WHITE et al., 1990). A PCR constitui-se de uma desnaturação inicial por 2 min a 96°C, seguida por 35 ciclos de desnaturação por 30 seg a 96°C, pareamento por 30 seg. a 56°C e alongação por 30 seg. a 72°C, além de uma extensão final de 5 min a 72°C. O produto da amplificação foi purificado com PCR clean-up Kit NucleoFast 96 PCR (Macherey-Nagel). Utilizou-se o sequenciamento direto do produto da PCR purificado. Para isso uma nova amplificação foi realizada em volume de 10 µL contendo 5 µL do amplicom purificado, 2 µL de *Big Dye* (Applied Biosystems), 0,3 µM do iniciador ITS4 e 2 µL de água miliQ. O mesmo procedimento foi realizado para o iniciador ITS5. A PCR de sequenciamento constitui-se de desnaturação inicial por 2 min a 95°C, seguida por 99 ciclos de desnaturação por 10 seg. a 95°C, pareamento por 5 seg. a 50°C e alongação por 4 min a 60°C. Os produtos amplificados da PCR foram sequenciados utilizando-se aparelho ABI 3730 e os dados foram analisados usando-se o programa Sequencher versão 4.8 (Genecodes).

Análise de dados moleculares

Inicialmente, observou-se amplificação positiva ou negativa para o conjunto de 10 microssatélites específicos para *R. solani* AG-1 IA (ZALA et al., 2008) amplificados de todos os isolados amostrados. Posteriormente, para a análise de sequências da região ITS-5.8 do rDNA amplificada de amostras de isolados, os cromatogramas obtidos foram alinhados e analisados usando-se o programa Sequencher versão 4.8 (Genecodes), gerando sequências de consenso em formato fasta. O alinhamento dos consensos das sequências dos isolados para cada loco foi realizado pelo programa CLUSTALW (THOMPSON et al., 1997). A identificação de diferentes haplotipos (e dos isolados que os compartilharam) foi realizada com o programa SNAP WORKBENCH (PRICE & CARBONE, 2005). Buscou-se, então, sequências similares no banco de dados do NCBI GenBank (BENSON et al., 2007), usando as ferramentas de comparação BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997) com as sequências haplotípicas experimentais obtidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após dez dias de cultivo em BDA, observaram-se diferenças na forma, cor e tamanho de escleródios dos isolados que permitiram agrupá-los em três grupos morfológicos distintos: O primeiro grupo (representado por todos os 161 isolados obtidos de populações da braquiária e 13 isolados obtidos de arroz) apresentou escleródios relativamente esféricos e maiores, “tipo sasakii” (de 1 a 6 mm de diâmetro) em culturas de micélio marrom claro, inicialmente na cor branca e depois, tornando-se marrom claro a escuro (Figura 2-A), semelhantes à *R. solani* AG-1 IA . Um segundo grupo (composto por 52 isolados obtidos de arroz) apresentou escleródios pequenos (0,5 a 2 mm), de forma irregular, e nas cores branca e marrom claro (Figura 2-B) e micélio também branco a marrom claro, semelhante aos produzidos por *R. oryzae-sativae* (teleomorfase: *Ceratobasidium oryzae-sativae*) (LANOISELET et al., 2007). Já o terceiro grupo, representado apenas por oito isolados obtidos de arroz, apresentou

escleródios redondos e pequenos (0,2 – 0,8 mm), na cor marrom escuro a preto (Figura 2-C), semelhantes à espécie *Sclerotium hydrophilum* (GUTIÉRREZ, 2007).

De todos os isolados do primeiro grupo morfológico observou-se amplificaram positiva para o conjunto de microssatélites específicos para *R. solani* AG-1 IA. Para confirmar as informações obtidas, as sequências de 25 isolados selecionados ao acaso foram comparados com sequência no GenBank. Utilizando-se a ferramenta BLAST-N, detectou-se 100% de identidade com a sequência de referência AB122135.1 de *R. solani* AG-1 IA depositada no banco de dados do NCBI. As informações moleculares que indicaram que este primeiro grupo de isolados pertence a *R. solani* AG-1 IA, confirmaram a observação baseada na caracterização morfológica dos escleródios desses isolados, predominantemente do tipo “sasakii” (YANG et al., 1989; SUMNER, 1996). Esse grupo compôs-se de todos os isolados obtidos de *Brachiaria brizantha* cv. Toledo (78 isolados), de *B.* híbrido Mulato (83 isolados) e de alguns obtidos de arroz (13 isolados). Esses resultados confirmam que *B. brizantha* cv. Toledo é hospedeira principalmente de *R. solani* AG-1 IA, como foi relatado por BLACK et al., (1996). Esta informação é relevante para programas de melhoramento de *Brachiaria* visando seleção para resistência à doença (KELEMU et al., 1995), pois indica que essa não é causada por um complexo de patógenos.

Para os grupos morfológicos dois e três (ambos do arroz), a amplificação com os marcadores microssatélites foi negativa. Portanto, foram selecionados 25 isolados do grupo morfológico dois e todos os oito isolados do grupo três para sequenciamento da região ITS-5.8S do rDNA. Utilizando a ferramenta BLAST-N, foi observado que o grupo dois apresentou 100% de identidade com a sequência de referência AB122144.1 de *R. oryzae-sativae*, depositada do NCBI. Já para as sequências da região ITS-5.8S do rDNA do grupo morfológico três, observou-se 92% de identidade com a sequência de referência FJ595944.1 de *S. hydrophilum* depositada no NCBI.

No caso do arroz, possivelmente, este é o primeiro relato de que os fungos *R. oryzae-sativae* e *S. hydrophilum* estão associados ao complexo de doenças da bainha do arroz na Colômbia. O fato de que *R. oryzae-sativae* predominou nas duas áreas de arroz amostradas nos Llanos Colombianos, representando 71% da amostra

populacional, é particularmente importante para o manejo da doença. Acreditava-se que *R. solani* AG-1 IA era o patógeno predominante em áreas de arroz. De fato, nas Américas, várias espécies de fungos dos gêneros *Rhizoctonia*, como *R. solani* AG-1 IA, *R. circinata* var. *oryzae*; *R. circinata* var. *zeae*; *R. circinata* var. *circinata* (teleomorfase: *Waitea circinata*) e *R. oryzae-sativae* e do gênero *Sclerotium*, como o *S. hydrophilum* e *S. oryzae*, estão associadas ao complexo de doenças das queimas e manchas da bainha nas regiões arroseiras da Argentina (GUTIÉRREZ, 2007), do Brasil (SOUZA et al., 2007), do Chile (MADARIAGA et al., 1999), dos EUA (LEE & RUSH, 1983; SAYLER & YANG, 2007; CHAIJUCKAM & DAVIS, 2010) e da Venezuela (MALAGUTI, 1951; CEDEÑO et al., 1996). Especificamente, *R. solani* AG-1 IA está associada com a queima da bainha, *R. circinata* var. *oryzae* com a mancha da bainha, *R. oryzae-sativae* com mancha agregada da bainha (Figura 2), *S. hydrophilum* com manchas da bainha e *S. oryzae* com podridões do caule do arroz (GUTIÉRREZ, 2007). A sobreposição de sintomas relativamente semelhantes torna difícil o diagnóstico deste complexo de doenças da bainha do arroz (CEDEÑO et al., 1996; JOHANSON et al., 1998). Como a diagnose é extremamente relevante para o estabelecimento de medidas apropriadas do manejo de doenças na cultura do arroz, recomenda-se a utilização de métodos rápidos disponíveis para detecção de patógenos baseados em reação de PCR com *primers* específicos (JOHANSON et al., 1998; PASCUAL et al., 2000; MATSUMOTO, 2002; SAYLER & YANG, 2007).

CONCLUSÕES

R. solani AG-1 IA predomina como patógeno associado à queima da folha de *B. brizantha* cv. Toledo e *Brachiaria* híbrido Mulato nos Llanos Colombianos.

REFERÊNCIAS

ADAMS, G. C. *Thanathephorus cucumeris (Rhizoctonia solani)*, a species complex of wide host range. In: INGRAM, D. S.; WILLIAMS, P. H. (Ed.). **Genetics of Plant Pathogenic Fungi**. London: Academic Press, v.6, 1988. p.535-552. (Advances in Plant Pathology).

ALTSCHUL, S.; MADDEN, T.; SCHAFFER, A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research** 25(17): 3389-3402, 1997.

ARGEL, P. J.; MILES, J. W.; GUIOT, J. D.; LASCANO, C. E. **Cultivar Mulato (Brachiaria híbrido CIAT 36061). Gramínea de alta producción y calidad forrajera para los trópicos**. Palmira: CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical, 2005. 24 p. (Boletim Técnico).

BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; WHEELER, D. L. GenBank. **Nucleic Acids Research** 35(suppl_1): D21-25, 2007.

BLACK, B. D.; GRIFFIN, J. L.; RUSSIN, J. S.; SNOW, J. P. Weed hosts for *Rhizoctonia solani*, causal agent for rhizoctonia foliar blight of soybean (*Glycine max*). **Weed Technology**, v. 10, p. 865-869, 1996.

CARLING, D. E. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S. M. AND DIJST, G. DORDRECHT (Ed.). **Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.37-47.

CEDEÑO, L. H.; NASS, C.; CARRERO, R.; CARDONA, R.; RODRIGUEZ, H.; ALEMÁN, L. *Rhizoctonia solani* AG-1-IA, causa principal del añublo de la vaina del arroz en Venezuela. **Fitopatología Venezolana**, v. 9, p. 6-9 1996.

CHAIJUCKAM, P.; DAVIS, R. M. Characterization of diversity among isolates of *Rhizoctonia oryzae-sativae* from California rice fields. **Plant Disease**, v. 94, p. 690-696, 2010.

CIAT. **Annual Report, Tropical Forages Program**. Cali: CIAT-Cali, Colombia, 1993. s. p. (Working Document, 166).

DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; SANHUEZA, R. M. V.; VERZIGNASSI, J. R.; KONDO, N. Etiologia da podridão do coleto de *Brachiara brizantha* em pastagens da Amazônia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 261-265, 2007.

GAINO, A. P. S. C.; BASSETO, M. A.; GASPAROTTO, L.; POLTRONIERI, L. S.; CERESINI, P. C. Phylogenetic inference reveals the complex etiology of the target and leaf spot diseases on rubber tree and other species cultivated in the Amazon. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 385-395, 2010.

GONZALEZ, D.; CARLING, D. E.; KUNINAGA, S.; VILGALYS, R.; CUBETA, M. A. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. **Mycologia**, v. 93, p. 1138-1150, 2001.

GUTIÉRREZ, S. A. *Sclerotium hydrophilum* em cultivos de arroz de Argentina. **Summa Phytopathology** v. 33:, p. 100, 2007.

HASHIBA, T.; KOBAYASHI, T. Rice diseases incited by *Rhizoctonia* species. In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S. AND DIJST, G. (Ed.). ***Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.331-340.

JOHANSON, A.; TURNER, H. C.; MCKAY, G. J.; BROWN, A. E. A PCR based method to distinguish fungi of the rice sheath-blight complex, *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae* and *R. oryzae-sativae*. **FEMS Microbiology Letters** v. 162, p. 289–294, 1998.

KELEMU, S.; MILES, J. W.; BONILLA, X. P.; BADEL, J. L. Sources of resistance in species of Brachiaria to foliar blight disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Tropical Grasslands**, v. 29, p. 257-262, 1995.

LANOISELET, V. M.; COTHER, E. J.; ASH, G. J. Aggregate sheath spot and sheath spot of rice. **Crop Protection**, v. 26, n. 6, p. 799-808, 2007.

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

MADARIAGA, R.; MORALES, X.; ALVARADO, R. *Rhizoctonia oryzae-sativae* (Sawada) Mordue, agente causal de la pudrición o mancha agregada de la vaina del arroz (*Oryza sativa* L.) en Chile. **Agricultura Técnica** v. 2, p. 77-84, 1999.

MALAGUTI, G. Mancha de la hoja envainadora del arroz causada por *Rhizoctonia solani*. **Agronomía tropical**, Maracay, v. 1, p. 71-75, 1951.

MATSUMOTO, M. Trials of direct detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG 1 and AG 2 subgroups using specifically primed PCR analysis. **Mycoscience**, v. 43, p. 185-189, 2002.

NEERAJA, C. N.; SHENOY, V. V.; REDDY, C. S.; SARMA, N. P. Isozyme polymorphism and virulence of Indian isolates of the rice sheath blight fungus. **Mycopathologia** v. 156, p. 101–108, 2003.

PABÓN GUERRERO, F. Á. **Pudrición de la vaina en arroz: manejo y control**. Barrancabermeja (Colombia): Corpoica, 1994. 2 p. (Boletim Técnico).

PASCUAL, C. B.; TODA, T.; RAYMONDO, A. D. HYAKUMACHI, M. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. **Plant Pathology**, v. 49, n. 1, p. 108-118, 2000.

PRICE, E. W.; CARBONE, I. SNAP: workbench management tool for evolutionary population genetic analysis. **Bioinformatics** 21(3): 402-404, 2005.

SAVARY, S.; WILLOCQUET, L.; ELAZEGUI, F. A.; CASTILLA, N. P.; TENG, P. S. Rice pest constraints in tropical Asia: Quantification of yield losses due to rice pests in a range of production situations. **Plant Disease**, v. 84, n. 3, p. 357-369, 2000.

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

SOUZA, E. C.; KURAMAE, E. E.; NAKATANI, A. K.; BASSETO, M. A.; PRABHU, A. S.; CERESINI, P. C. Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado ao arroz em Tocantins, Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 33 n. 2, p. 129-136, 2007.

SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. **Identification of *Rhizoctonia* species**. 1st. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1991. 133 p.

SUMNER, D.R. Sclerotia formation by *Rhizoctonia* species and their survival. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (Ed.) ***Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control***. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.207-215.

THOMPSON, J.; GIBSON, T.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** 25: 4876-4882, 1997.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (ed.). **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. Academic Press, London, England. 1990. p. 315-322.

YANG, X. B.; SNOW, J. P.; BERGGREN, G. T. Morphogenesis of microsclerotia and sasakii-type sclerotia in *Rhizoctonia solani*, anastomosis group 1, intraspecific groups IA and IB. **Mycological Research**, v. 93, n. 4, p. 429-434, 1989.

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

TABELA E FIGURA

Tabela 1. Levantamento de populações de fungos associados com à queima da folha da braquiária e da queima da bainha do arroz nos Llanos Colombianos.

Município	Hospedeiro	População	Tamanho amostral (N) ^a	Número de isolados identificados por patógeno ^b		
				<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA	<i>R. oryzae-sativae</i>	<i>Sclerotium hydrophilum</i>
Puerto López	<i>B. brizantha</i> cv Toledo	BBT1	38	38	-	-
	<i>B. Híbrido Mulato</i>	BHM3	40	40	-	-
	Arroz var. F- 50	OS5	38	2	36	-
Villavicencio	<i>B. brizantha</i> cv Toledo	BBT2	42	42	-	-
	<i>B. Híbrido Mulato</i>	BHM4	41	41	-	-
	Arroz var. Thailandia	OS6	35	11	16	8
Total				94	52	8

^a N = Tamanho amostral (número de isolados) obtido de cada população

^b Caracterização baseada no uso de caracteres morfológicos (coloração de colônia, tipo, forma e cor de esclerócios; Figura 1), em marcadores microssatélites específicos para *R. solani* AG-1 IA e no sequenciamento da região ITS 5.8S do rDNA dos isolados.



Figura 1. Localização geográfica das localidades de onde foram coletadas amostras de plantas exibindo sintomas de *Rhizoctonia* spp. em campos de braquiária e de arroz nos municípios de Villavicencio e Puerto Lopez, no Estado de Meta, Colômbia.

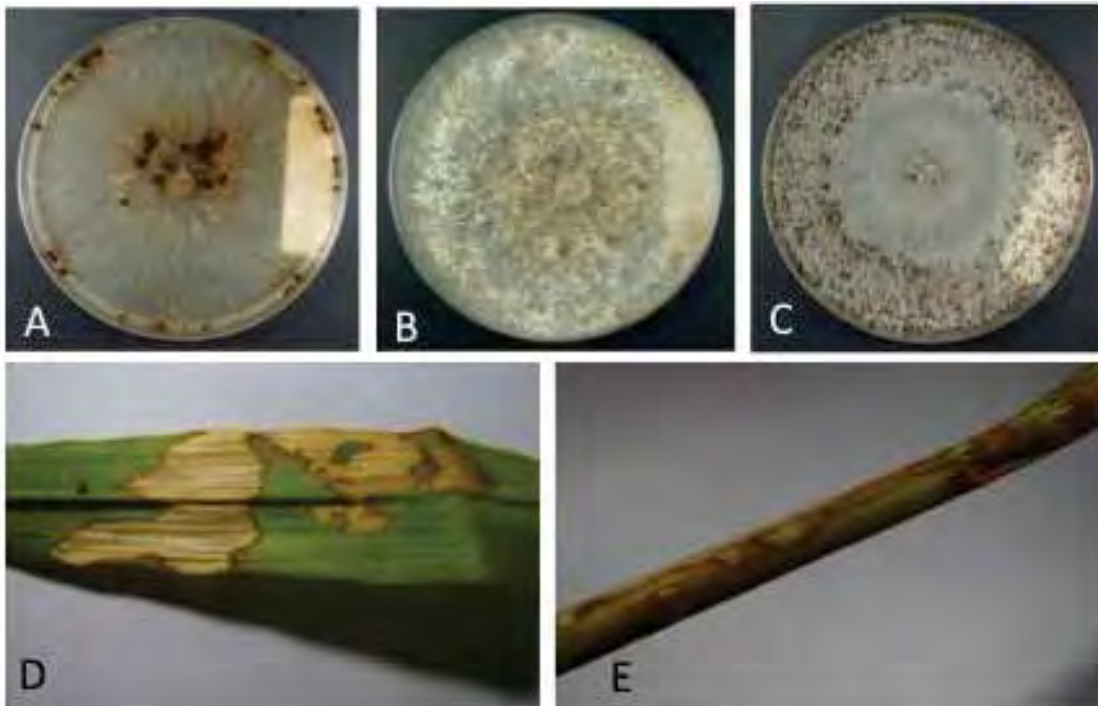


Figura 2. Diferentes formas, cores e tamanhos de esclerócios e sintomas de fungos associados à queima da folha da braquiária ou à queima e mancha da bainha do arroz.

(A) Esclerócios tipo “sasakii”, característicos do primeiro grupo de patógenos da braquiária e do arroz, identificados como *Rhizoctonia solani* AG-1 IA; (B) Esclerócios característicos de *R. oryzae-sativae*; (C) Esclerócios típicos de *Sclerotium hydrophilum*; (D) Sintomas característicos da queima da folha da braquiária associada com *R. solani* AG-1 IA; e (E) Sintomas da queima e manchas da bainha do arroz associados com a presença dos fungos *R. solani* AG-1 IA, *R. oryzae-sativae* ou *Sclerotium hydrophilum*.

CAPÍTULO 3 – ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES SIMPÁTRICAS DE *Rhizoctonia solani* AG 1 IA DA BRAQUIÁRIA E DO ARROZ NA COLÔMBIA

RESUMO - No início dos anos 90, o fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA emergiu como um patógeno importante associado à morte de pastagens do gênero braquiária na Colômbia. Os objetivos desse estudo foram: i) Determinar a diversidade genética e o sistema reprodutivo predominante de populações de *R. solani* AG-1 IA infectando *Brachiaria* spp.; ii) Estimar a magnitude do fluxo gênico entre populações regionais do patógeno na Colômbia; iii) Comparar os níveis de subdivisão entre populações de *R. solani* AG-1 IA de braquiária e de arroz; e iv) Detectar os padrões históricos de migração genética de *R. solani* entre populações Colombianas do patógeno que infectam braquiária e arroz. Para estudar a estrutura genética das populações, um total de 198 isolados de *R. solani* AG-1 IA foram coletados de campos de *B. brizantha* cv. Toledo, de *Brachiaria* híbrido Mulato e de arroz. Esses isolados foram genotipados usando dez loci microssatélites. 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. A alta fração clonal e os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg encontrados em três das quatro populações foram consistentes com efeito Wahlund associado à mistura de populações. De fato, foram observados elevados níveis de fluxo gênico entre populações de braquiária em contraste com significativa subdivisão em relação à população de arroz. Padrões históricos de migração entre populações hospedeiro-distintas indicaram a origem provável das populações atuais que infectam braquiária na Colômbia, a partir de populações que originalmente infectavam arroz.

Palavras-chave: Fluxo gênico, migração, origem de patógenos emergentes na Agricultura, sistema reprodutivo

GENETIC STRUCTURE OF SYMPATRIC POPULATIONS OF *Rhizoctonia solani* AG 1 IA FROM BRACHIARIA AND RICE IN COLOMBIA

ABSTRACT - In the early '90s, the fungus *Rhizoctonia solani* has emerged as an important pathogen associated with the death of Brachiaria pastures in the Colombian Llanos. Our goals in this study were: i) To determine the genetic diversity and predominant reproductive system of *R. solani* AG-1 IA populations infecting *Brachiaria* spp.; ii) To estimate the magnitude of gene flow between regional populations of the pathogen; iii) To compare the levels of subdivision between populations of *R. solani* AG-1 IA from brachiaria and rice; iv) To estimate the historical patterns of migration of *R. solani* between Colombian populations of the pathogen infecting brachiaria and rice. To study the population genetic structure of the pathogen, a total of 198 isolates of *R. solani* AG-1 IA were collected from fields of *B. brizantha* cv. Toledo, *Brachiaria* hybrid Mulato and from rice. These isolates were genotyped using ten microsatellite loci. A mixed mating system (which includes sexual reproduction and dispersal of adapted clones) characterized the populations of *R. solani* AG-1 IA infecting *Brachiaria*. The high clonal fraction and deviations from Hardy-Weinberg equilibrium found in three of the four populations were consistent with Wahlund effect associated with the mixing of populations. In fact, we observed high levels of gene flow between populations from brachiaria in contrast with significant subdivision with of rice-infecting population. Historical patterns of migration between different host-populations indicated that the likely source of the current populations infecting brachiaria in the Colombian was from populations that originally infected rice.

Keywords: Gene flow, migration, origins of emerging pathogens in Agriculture, reproductive mode.

INTRODUÇÃO

A emergência de populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA adaptadas à braquiária na Amazônia

No início dos anos 90, o fungo *R. solani* emergiu como um patógeno importante associado à morte de pastagens do gênero *Brachiaria* na América do Sul (CIAT, 1993). 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 braquiária, em resposta à crescente demanda por pecuária extensiva. A braquiária é uma forrageira muito importante na América Latina tropical, atingindo quase 80 milhões de hectares de cultivo (VIEIRA, 2010). No Brasil, o fungo foi descrito como um patógeno da braquiária em 1999, mas só recentemente tem sido relatado como um patógeno importante de forrageiras, atacando especificamente *B. 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).

De acordo com STUKENBROCK & MCDONALDS (2008), a alta homogeneidade associada a grande extensão de alguns agroecossistemas, é condutiva para a emergência, propagação e dispersão de fitopatógenos, resultando em populações enormes do mesmo, bem como na evolução de sua virulência. De fato, considerando-se os agrossistemas de pastagens no país, as duas principais espécies de braquiária cultivadas no Brasil (*B. brizantha* e *B. decumbens*), além de constituírem extensos monocultivos de poucas variedades, compõem-se de ecotipos apomíticos (DALL'AGNOL e SCHIFINO-WITTMANN, 2005)¹. Isto implica que essas gramíneas têm

¹ Apomixia é definida como a formação de sementes sem que ocorra fecundação e caracteriza-se como tipo de reprodução assexuada. Gramíneas forrageiras dos gêneros *Brachiaria*, *Cenchrus*, *Panicum*, *Paspalum* e *Poa* apresentam apomixia gametofítica, que é a mais amplamente distribuída entre as plantas cultivadas. Embora tenha sido detectada diversidade genética dentro de espécies apomíticas, não há variabilidade na descendência dos apomíticos (Dall'agnol e Schifino-Wittmann, 2005)

modo reprodutivo predominantemente assexuado, resultando em grande homogeneidade nas populações das pastagens implantadas. Esta uniformidade genética expõe o agroecossistema e seus componentes à enorme pressão de seleção, aumentando os riscos de emergência de novas pragas e/ou doenças que podem conduzir à eliminação de uma variedade suscetível, como relatado para *B. decumbens* na Região Amazônica (SEIFFERT, 1984).

Não há relatos históricos ou científicos explícitos indicando que a emergência de *R. solani* como patógeno de pastagens do gênero braquiária 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* como patógeno da braquiária 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 (FENILLE et al., 2002; NECHET & HALFELD-VIEIRA, 2006; SOUZA et al., 2007).

Considerando as condições favoráveis para a doença na região Amazônica, é possível que *R. solani* associado à morte da braquiária tenha o potencial para se adaptar ao agroecossistema local e se tornar uma séria ameaça à produção de forragens na Amazônia brasileira, uma vez que as variedades locais de braquiária são suscetíveis ao patógeno. A sobreposição geográfica das culturas de braquiária e de arroz numa mesma região, como se observa em Cerrados do Vale do Paraíba em São Paulo, é outro fator importante que poderia levar populações locais de *R. solani* AG-1 do arroz a adaptar-se e emergir como patógeno da braquiária.

Queima das folhas e morte da braquiária: Uma doença de etiologia complexa

A doença ocorre em reboleiras e causa queima das folhas e morte das touceiras de braquiária (SOUZA et al., 2000; VALÉRIO et al., 2000; ARGEL et al., 2005). Embora as perdas não tenham sido quantificadas com exatidão, foram relatadas perdas elevadas pela queima das folhas em braquiária, tanto no Brasil quanto na Colômbia

(ARGEL et al., 2005; DUARTE et al., 2007). Ainda não há relato esclarecendo a etiologia da doença. De fato, o fungo anamórfico *R. solani*, cuja telemorfase é o basidiomiceto *Thanatephorus cucumeris*, é uma espécie complexa, composta por diversos grupos de anastomose (AGs) (CARLING, 1996). Segundo BLACK et al. (1996), braquiária é hospedeira de dois AGs distintos de *R. solani*: o AG-1 IA e o AG-1 IB. Ambos produzem escleródios em abundância no tecido doente. Entretanto, o AG-1 IA produz escleródios maiores, “tipo *sasakii*” (de 1 a 6 mm de diâmetro), e que, geralmente, não são dispersos pelo ar (YANG et al., 1989; SUMNER, 1996). Em contraste, o AG-1 IB produz microescleródios, o que permite ao patógeno dispersão aérea (WEBER, 1939; GALINDO et al., 1983).

No primeiro artigo descrevendo a reação de espécies de braquiária à queima da folha na Colômbia, publicado por KELEMU et al. (1995), os autores provavelmente utilizaram o AG-1 IA como inóculo, pois o isolado produzia escleródios grandes, provavelmente do “tipo *sasakii*”. No Brasil, os artigos que relatam a ocorrência da doença em pastagens da Amazônia não especificam qual/quais AGs estavam associados de fato à braquiária (VERZIGNASSI & FERNANDES, 2001; DUARTE et al., 2007). Recentemente, GAINO et al. (2010) relataram a associação do AG-4 HGI à braquiária em Paragominas no Pará. Levantamento efetuado por nosso grupo de pesquisa indicou que apenas *R. solani* AG-1 IA estava associado com a queima da folha e morte da braquiária nos Llanos Colombianos (Ramos, capítulo 2 desta Tese).

Aspectos da biologia e do potencial evolutivo de Rhizoctonia solani AG-1

R. solani AG-1 IA é considerado patógeno importante, afetando uma ampla gama de culturas hospedeiras de importância mundial (JONES & BELMAR, 1989; PASCUAL et al., 2000). Na América do Sul o AG-1 IA causa queima da bainha no arroz (BOLKAN & RIBEIRO, 1985; CEDEÑO et al., 1996; SOUZA et al., 2007), folha bandeada e queima da bainha no milho, doença que aparentemente está restrita à Venezuela (CARDONA et al., 1999; PERDOMO et al., 2007), queima foliar da soja

(FENILLE et al., 2002), e mela no feijão caupi (NECHET & HALFELD-VIEIRA, 2006). Embora o subgrupo AG-1 IA de *R. solani* esteja associado com uma ampla gama de hospedeiros, estudos recentes indicam que populações simpátricas de isolados que infectam Poaceas e Fabaceas, representam dois grupos-irmãos filogeneticamente bem definidos e que, provavelmente, a seleção para especialização a hospedeiros deve ter conduzido a divergência observada entre populações (CIAMPI et al., 2005; BERNARDES DE ASSIS et al., 2008). A ecologia da sobrevivência e da dispersão de *R. solani* AG-1 associado às Poaceas tem sido amplamente estudada. No geral, *R. solani* AG-1 IA sobrevive como micélio e escleródios em sementes e no solo, onde ciclos recorrentes de infecção aumentam o inoculo no solo (OGOSHI, 1987), enquanto o uso e compartilhamento de equipamentos entre áreas de cultivo distintas forem práticas comuns, seu papel na dispersão de inoculo entre campos ou cultivos contíguos deve ser importante. A dispersão de inoculo associado com plantas invasoras pode ter também um papel importante na disseminação do patógeno entre cultivos distintos (BLACK et al., 1996).

Embora a formação de basidiósporos tenha sido observada em campos de arroz inundado, em vários países (ONIKI et al., 1986; JONES & BELMAR, 1989; HASHIBA & KOBAYASHI, 1996; NAITO, 2006), o papel dos esporos sexuais no ciclo da doença não era totalmente compreendido até recentemente. Assim, em termos de sistema reprodutivo, considerava-se o paradigma de que o modo reprodutivo do fungo era hospedeiro-dependente. Dessa forma, *R. solani* AG-1 IA foi considerado um fungo assexual nas Poaceas, com micélio e escleródios como as principais fontes de inoculo (OGOSHI, 1987; KOBAYASHI et al., 1997), enquanto que nas Fabaceas postulava-se um sistema reprodutivo sexual, com predominância de basidiósporos de *T. cucumeris* no ciclo da doença (JONES & BELMAR, 1989; FENILLE et al., 2002). Entretanto, evidências genético-populacionais em populações de *R. solani* AG-1 IA adaptadas a Poaceas na China, Índia, América do Sul (Venezuela) e nos EUA (Texas e Louisiana) desafiaram este paradigma da assexualidade para o patógeno da queima da bainha em Poaceas. O resultado desses estudos são consistentes com um modo reprodutivo

variando de estritamente recombinante, com predomínio de reprodução sexuada, a um modo misto, que inclui eventos de recombinação seguidos de expansão clonal durante a estação de cultivo (ROSEWICH et al., 1999; LINDE et al., 2005; BERNARDES DE ASSIS et al., 2008 e 2009; GONZÁLEZ-VERA et al., 2010). As evidências indicam que basidiósporos constituem parte importante da história de vida do fungo que contribuem para a diversidade genética de populações de campo de *R. solani* AG-1 IA.

Objetivos

Neste trabalho foram abordadas as seguintes questões: De onde as populações de *R. solani* AG-1 IA adaptadas à braquiária se originaram? Qual é a relação entre as populações do patógeno adaptadas à braquiária e ao arroz, na Colômbia? As populações de *R. solani* AG-1 IA adaptadas à braquiária e ao arroz são geneticamente diferenciadas? Para responder a estas questões, foi determinado o nível de similaridade genética histórica e contemporânea entre as populações do patógeno adaptadas à braquiária, e aquelas adaptadas ao arroz cultivados em simpatria na mesma região geográfica. De forma mais específica, objetiva-se:

- i. Determinar a diversidade gênica e genotípica de populações simpátricas de *Rhizoctonia solani* grupo de anastomose 1 IA (AG-1 IA) infectando duas espécies de braquiária (*Brachiaria brizantha* cv. Toledo e *Brachiaria* híbrido Mulato) de importância econômica no estado de Meta, na Colômbia.
- ii. Analisar a estrutura genética de populações de *R. solani* AG-1 IA infectando *Brachiaria* spp., buscando evidências de recombinação sexual.
- iii. Comparar o nível de subdivisão entre populações de simpátricas de *R. solani* AG-1 IA que infectam braquiária e população do patógeno que tradicionalmente infecta arroz.

- iv. Detectar os padrões históricos de migração genética de *R. solani* entre populações Colombianas do patógeno que infectam braquiária e arroz, buscando testar hipótese sobre a origem das populações atuais que infectam braquiária.

Hipóteses

- i. Populações de *R. solani* AG-1 IA de braquiária (*Brachiaria brizantha* cv. Toledo e *Brachiaria* híbrido Mulato) são geneticamente iguais.
- ii. Populações de *R. solani* AG-1 IA de braquiária (*Brachiaria brizantha* cv. Toledo e *Brachiaria* híbrido Mulato) são sexualmente recombinantes em estrutura.
- iii. Populações de *R. solani* AG-1 IA que infectam braquiária e arroz são geneticamente homogêneas, ou seja, não há diferenças entre as populações do patógeno isoladas dos dois hospedeiros distintos e que essas populações não são hospedeiro-especializados.
- iv. As populações de *R. solani* AG-1 IA que atualmente infectam braquiária se originaram através de migração histórica oriunda de populações adaptadas ao arroz.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem e isolamento de populações de Rhizoctonia solani AG-1 IA de braquiária e do arroz na Colômbia

As amostras populacionais de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA foram coletadas nos anos de 2010 e 2011, no estado de Meta, no Bioma Amazônico do nordeste da Colômbia (Figura 1), em duas localidades diferentes, compreendendo um total de 198 isolados do fungo. Duas populações simpátricas de *R. solani* AG-1 IA foram coletadas no município de Puerto López: a primeira população infectando *Brachiaria brizantha* cv. Toledo (BBT1), e a segunda população infectando *Brachiaria* híbrido Mulato (BHM3).

Outras três populações simpátricas de *R. solani* AG-1 IA foram coletadas no município de Villavicencio: uma população infectando *Brachiaria brizantha* cv. Toledo (BBT2), a segunda população infectando *Brachiaria* híbrido Mulato (BHM4), e uma terceira população infectando arroz (OS5). Amostras de plantas infectadas, com sintomas de queima da folha da braquiária ou de queima da bainha do arroz, foram coletadas de seis a oito focos/linha de cultivo (espaçados de cerca de 10 m por foco) num total de cinco linhas por campo. O objetivo foi obter cerca de 30 - 40 isolados por população.

Para isolar o fungo, fragmentos dos materiais infectados foram lavados com água, desinfetados com hipoclorito de sódio a 1% por 30 segundos e enxaguados em água esterilizada. Posteriormente, os fragmentos de aproximadamente 3 – 4 cm obtidos de folhas infectadas foram aderidos com fita adesiva ao lado interno da tampa de placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA), e incubados a 25°C, no escuro, durante três dias, e depois purificados em meio BDA. Os isolamentos foram realizados no laboratório de Fitopatologia da “Universidad de los Llanos” – Unillanos. As populações do patógeno foram geo-referenciadas (Tabela 2). Escleródios do fungo produzidos após dez dias de cultivo em meio BDA foram transferidos para crio-tubos de 1,8 mL contendo sílica gel esterilizada e mantidos em refrigerador a 5°C.

Produção de micélio fúngico, extração de DNA e identificação do grupamento de anastomose 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 da Sigma-Aldrich Brasil, seguindo as instruções do fabricante. A identificação dos isolados foi efetuada usando dois procedimentos. Primeiramente, utilizou-se uma sequência de dez marcadores microssatélites específicos para amplificação seletiva de *R. solani* AG-1 IA (ZALA, et al., 2008). Todos os isolados amplificaram positivamente aos marcadores utilizados. Para confirmar os resultados obtidos, isolados selecionados ao acaso foram sequenciados

por amplificação seletiva de parte da região 5.8S do DNA ribossomal do fungo usando um par de iniciadores específicos para *R. solani* (MATSUMOTO, 2002).

Genotipagem de isolados de *R. solani* AG-1 IA

Para responder às questões apresentadas anteriormente sobre diversidade gênica e genotípica, modo reprodutivo predominante, fluxo gênico e nível de diferenciação genética entre populações do patógeno, os dados foram analisados no programa GeneMapper 3.7 (ABI). Essa análise de fragmentos através de eletroforese capilar é uma técnica amplamente empregada na pesquisa genética. A técnica baseia-se na determinação do tamanho de fragmentos amplificados por PCR, utilizando *primers* marcados com fluorescência, por comparação com um marcador de tamanho conhecido. O uso de diferentes fluorescências permite a análise de vários fragmentos (locus) ao mesmo tempo. Para a obtenção dos dados, isolados de *R. solani* AG-1 IA foram genotipados usando dez marcadores co-dominantes do tipo microssatélite, SSR, representando dez loci de polimorfismo conhecido, descritos previamente (ZALA et al., 2008). Os iniciadores para cada locus foram marcados com fluorescência e reações da polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas separadamente para cada locus SSR em volume de 20 µL. Cada reação era composta de 5 µL de DNA genômico (a uma concentração final de 5 a 15 ng), 2 µL de tampão 10x, 0,4 mM de dNTPs, 0,3 µM de cada iniciador e 1 unidade de *Taq* polimerase. Para todos os conjuntos de *primers* as amplificações incluíram uma desnaturação inicial por 2 min a 96°C, seguida por 35 ciclos de desnaturação por 30 seg. a 96°C, pareamento por 30 seg. a 56°C e elongação por 30 seg. a 72°C, além de uma extensão final de 5 min a 72°C. Os produtos de PCR amplificados foram separados em sequenciador ABI 3700 usando GeneScan 500 Liz como marcador de tamanho (ambos fornecidos pela ABI - Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante.

Análise da estrutura genético-populacional contemporânea

Em todas as análises, assumiu-se *R. solani* AG-1 IA como um heterocário ou um diplóide funcional. Todos os dados gerados foram consistentes com essa suposição. Devido à complexidade envolvendo a definição de população em fungos, considerou-se como uma população um grupo de indivíduos coletados de uma mesma localidade, numa mesma época, como definido para populações de fungos (ANDERSON & KOHN, 1995).

Diversidade genotípica

O genótipo multiloci SSR para cada isolado do patógeno foi determinado usando o programa GenoType (MEIRMANS & VAN TIENDEREN, 2004). Isolados exibindo o mesmo genótipo multiloci SSR foram considerados membros da mesma linhagem clonal. Vários índices de diversidade genotípica foram determinados: (a) número de genótipos por população; (b) genótipos população-específicos; (c) a fração clonal, ou porcentagem de isolados originados por reprodução assexuada, calculada por $1 - (\text{número de genótipos distintos}) / (\text{número total de isolados})$ (ZHAN et al., 2003). Essas medidas foram calculadas pelo programa GenoDive (MEIRMANS & VAN TIENDEREN, 2004). Testou-se a significância estatística das diferenças em diversidade genotípica entre pares de populações usando *bootstrap* (re-amostragem com substituição), onde indivíduos de cada população foram re-amostrados e os índices de diversidade foram recalculados e comparados após cada rodada (MANLY, 1991), em 1.000 permutações, com sub-amostragens para equiparar ao tamanho da menor população (GRUNWALD et al., 2003).

Diversidade gênica e riqueza alélica

Para estas análises, foram utilizados os dados corrigidos para clones, nos quais foram incluídos apenas um indivíduo de cada genótipo multiloci microsatélite por

população. A diversidade gênica de Nei (H_E) foi estimada como $n/(n-1) \cdot (1 - \sum p_i^2)$, onde n é o tamanho da amostra e p_i é a frequência observada do alelo i^o (NEI, 1978; NEI, 1987).

A riqueza alélica foi estimada para cada população de *R. solani* AG-1 IA, como o número médio de alelos por locus (EL MOUSADIK & PETIT, 1996) por rarefação, abordagem que utiliza a frequência de alelos em um locus particular, para estimar o número de alelos que poderiam ocorrer nesse locus, em amostras menores de indivíduos, padronizando a medida pela população de menor tamanho e definido após a eliminação dos clones, mantendo apenas os genótipos únicos (correção de clones).

Para testar se grupos de populações diferiam quanto à diversidade gênica e à riqueza alélica, foi utilizado o programa FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). Valores de P para significância de comparações de pares de média foram obtidos por 1.000 permutações.

Diferenciação genética entre populações do patógeno

O grau de subdivisão populacional e a distribuição de diversidade gênica entre populações regionais simpátricas de *R. solani* AG-1 IA adaptadas à braquiária e ao arroz foi avaliado usando contraste baseado em análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992; WEIR, 1996). Uma série de contrastes hierárquicos foram testadas, definindo-se dois grupos de populações: (a) Populações simpátricas regionais de *R. solani* AG-1 IA adaptadas à braquiária na Colômbia; (b) População simpátrica de *R. solani* AG-1 IA adaptadas ao arroz. A AMOVA foi conduzida subdividindo os componentes de variância em: entre grupos de populações hospedeiro-distintas; entre populações dentro de grupos, dentro de populações e dentro de indivíduos. A significância dos índices de fixação (estatística Φ_{ST} , análoga à estatística F_{ST} de Wright, baseada no número de alelos diferentes para locus microssatélites), foi testada através de uma abordagem não paramétrica (EXCOFFIER et al., 1992), com 1.000 permutações usando o programa ARLEQUIN versão 3.11 (EXCOFFIER et al.,

2005). Com o objetivo de quantificar a diferenciação entre populações hospedeiras e regionais simpátricas de *R. solani* AG-1 IA da braquiária e do arroz, foram calculados índices de fixação (F_{ST}) par-a-par. A distribuição nula da estatística F_{ST} para pares de populações, sob a hipótese de não-diferenciação entre elas, foi obtida permutando haplótipos entre as populações do par, usando ARLEQUIN versão 3.11. A diferenciação genética entre pares de populações foi considerada significativa quando a probabilidade (P) foi inferior a 5 % ao nível nominal.

Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e de desequilíbrio gamético

Visando acessar a contribuição relativa da recombinação para a estrutura genética das populações de *R. solani* AG-1 IA, foram investigadas associações dentro e entre os loci através dos testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e associações multiloci, respectivamente. O teste de EHW, examina a associação aleatória de alelos dentro de cada locus testando o ajuste das frequências esperadas sob EHW (HARTL & CLARK, 1997) para cada população. Foi empregado um teste análogo ao teste exato de Fisher (GUO & THOMPSON, 1992). Valores de P foram obtidos usando o método de cadeias Markov Monte Carlo (MCMC), gerando uma distribuição exata de probabilidade não enviesada por alelos raros ou tamanho amostral reduzido, implementado em ARLEQUIN versão 3.11 (EXCOFFIER et al., 2005). Para cada população, calculou-se o coeficiente de endogamia (F_{IS}) médio entre todos os loci (WEIR & COCKERMAN, 1984), para verificar se houve déficit ou excesso significativo de heterozigotos (em relação às expectativas no EHW), baseado em 1.000 permutações e implementado em ARLEQUIN 3.11. Dentro de cada população, para loci que desviaram significativamente do EHW, determinou-se se a causa provável dos desvios estava associada com o excesso de homozigotos devido à presença de alelos nulos. A frequência de alelos nulos por locus foi determinada utilizando-se o software CERVUS versão 3.0.3 (MARSHALL et al., 1998). As associações entre loci foram examinadas usando dois testes de desequilíbrio gamético: (a) A proporção de pares de loci em desequilíbrio gamético, determinada pelo teste exato de Fisher (GARNIER-GERE & DILLMANN,

1992), baseado em algoritmo MCMC, com 1.000 aleatorizações, usando o programa GENEPOP versão 3.4 (RAYMOND & ROUSSET, 1995). Dois loci foram considerados em desequilíbrio gamético, ou desequilíbrio de ligação, quando valores de P foram iguais ou inferiores a 0,05 após ajuste de Bonferroni para múltiplas comparações (BONFERRONI, 1935). (b) O índice de associação multiloci (r_D) para cada população (MAYNARD SMITH et al., 1993), uma medida tradicional de desequilíbrio de ligação multiloci corrigida pelo número total de loci. As medidas de r_D foram testadas para significância com 1.000 aleatorizações usando-se o programa MULTILOCUS versão 1.3 (AGAPOW & BURT, 2001). Testou-se a hipótese nula de completa panmixia, ou seja, de nenhuma ligação entre pares de loci, dentro de cada população.

Teste para mistura populacional ou estrutura oculta de populações

Desvios do EHW e desequilíbrio gamético observados em algumas populações de *R. solani* AG-1 IA poderiam ser causados pelo efeito Wahlund, por exemplo, quando há mistura de genótipos nas populações. Para determinar se algum indivíduo na amostra representa um imigrante em relação à sua população geográfica de referência, foi utilizado o programa STRUCTURE v.2.2 (PRITCHARD et al., 2000). Foram realizadas dez corridas com um período de aquecimento de 10.000 gerações e simulações de MCMC de 100.000 interações a cada corrida. Os parâmetros foram fixados usando cinco grupos ($K = 5$ populações), um modelo com mistura, e valores de F_{ST} previamente calculados com ARLEQUIN 3.11.

Migração histórica

Para as estimativas das taxas de migração histórica entre as populações de *R. solani*, foi empregado o método da máxima verossimilhança, baseado na teoria coalescente, como proposto por BEERLI & FELSENSTEIN (2001). Este método permite estimar o tamanho efetivo das populações ou teta (θ), que para diplóides é igual a $4Ne\mu$, onde Ne = tamanho efetivo da população e μ = taxa de mutação de cada loco,

além das taxas de migração histórica assimétrica ($M = 4Nm$, onde Nm é o número de migrantes por geração) entre pares de populações, podendo indicar a provável rota migratória do patógeno na Colômbia. A migração histórica entre populações foi estimada com MIGRATE versão 3.0.3 (BEERLI & FELSENSTEIN, 2001). Testes de razão entre verossimilhanças (TRV) foram usados para se testar a hipótese de M simétricos. O TRV implementado em MIGRATE compara a máxima verossimilhança das estimativas da taxa de migração M com a verossimilhança quando se restringe M ao mesmo valor da média das estimativas para o par de populações. Se $P \leq 0,05$ para um TRV particular, rejeita-se a hipótese H_0 e aceita-se a hipótese alternativa de que os valores não são iguais (i.e., assimétricos).

RESULTADOS

Diversidade genética e genotípica

Setenta e sete genótipos multiloci distintos foram encontrados entre os 198 isolados analisados (Tabela 3). Embora a maioria dos genótipos multiloci tenha sido principalmente sítio-específicos (58 em 77), 19 foram compartilhados entre campos de braquiária ou de arroz. O genótipo 9 foi compartilhado apenas entre populações de *B. brizantha* cv. Toledo, assim como os genótipos 26, 29 e 34 foram unicamente compartilhados entre as populações de *Brachiaria* híbrido Mulato. Os genótipos 4 e 16 estiveram presentes nas duas populações distintas de braquiária, e somente os genótipos 13 e 35 foram compartilhados por populações de braquiária e de arroz (Anexo 1). O número efetivo de genótipos, uma medida da diversidade genotípica, foi maior nas populações de *Brachiaria* híbrido Mulato, populações BHM3 e BHM4, que apresentaram diversidade genotípica $G_0 = 9,52$ e $12,45$, respectivamente, cujos valores foram significativamente diferentes aos das demais populações. A fração clonal variou de 0,51, na população de *Brachiaria* híbrido Mulato (BHM4) a 0,76 na população de *B. brizantha* cv. Toledo (BBT1). Já a equitatividade variou de 0,21, na população OS5, a 0,62 na população BHM4. No geral, encontrou-se genótipos distribuídos em proporções

desuniformes na população de arroz, enquanto que uma distribuição mais equitativa de genótipos foi detectada nas populações de *Brachiaria* híbrido Mulato. A heterozigosidade esperada, H_E , diversidade genética de Nei, variou de 0,44 a 0,55 entre populações. Todas as populações oriundas de braquiária apresentaram significativamente as maiores H_E , enquanto a população de arroz teve a menor heterozigosidade. A riqueza alélica média das cinco populações em conjunto foi de 3,21. Não houve diferença significativa na riqueza alélica de todas as populações originadas da braquiária. Entretanto, as populações BHM3 e BHM4 apresentaram maior riqueza alélica que a população OS5 obtida de arroz ($RA = 2,72$).

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e desequilíbrio gamético

Dos dez marcadores moleculares microssatélites utilizados nesse estudo, oito foram considerados polimórficos, e três a seis loci estavam em EHW nas populações de *R. solani* AG-1 IA de braquiária e de arroz (Tabela 4). Os desvios significativos observados do EHW por locus, especialmente nas populações BBT1, BHM3 e BHM4, foi baseado, principalmente, em excesso de homozigotos, provavelmente devido à presença de alelos nulos (Tabela 5). Entretanto, não se detectou endogamia em quaisquer das populações, uma vez que os coeficientes F_{IS} médios por população não foram significativamente diferentes de zero (Tabela 4). Já a proporção de pares de loci em desequilíbrio gamético variou de 0,04 (BBT1) a 0,50 (BHM3) (Tabela 4).

Diferenciação genética entre populações hospedeiro-específicas e entre populações de R. solani AG-1 IA da braquiária

Observou-se um índice de fixação (F_{CT} *Brachiaria* vs. arroz) igual a 0,11 ($P \leq 0,05$), indicando um nível relativamente baixo de diferenciação entre os dois grupos de populações hospedeiro-distintas de *R. solani* AG-1 IA da braquiária e do arroz. Por sua vez, a comparação entre pares de populações indicou não haver diferenças entre as

quatro populações de *R. solani* AG-1 IA da braquiária, enquanto que todas foram distintas da população simpátrica de arroz (Tabela 6).

Teste para mistura populacional ou estrutura oculta de populações

No geral, 40% de mistura foi detectada nas populações simpátricas de *R. solani* AG-1 IA da braquiária, correspondendo a 25 genótipos que poderiam ter sido atribuído a mais de uma população ou a uma população distinta de sua população referência (Figura 3). A quantidade de mistura variou entre 30, população BHM4, e 56%, população BBT1. Nenhum genótipo foi encontrado em mistura na população de *R. solani* AG-1 IA que infecta o arroz. Entretanto, a população BBT1 apresentou dois genótipos em mistura, atribuído à população do arroz, e a população BHM3 apresentou um.

Migração histórica

O parâmetro populacional teta (θ), foi usado como uma medida relativa de tamanho efetivo das populações. A estimativa do tamanho populacional da população de *R. solani* AG-1 IA que infecta a braquiária foi significativamente maior que a da população simpátrica que infecta o arroz, $\theta_{Brachiaria} = 0,99$ (IC95% = 0,90 a 1,09) e $\theta_{Arroz} = 0,66$ (IC95% = 0,55 a 0,78) (Figura 4). Observou-se alta assimetria nas taxas de migração histórica entre populações de hospedeiros distintos. A taxa de migração da população de *R. solani* AG-1 IA que infecta o arroz em direção à população da braquiária ($4Nm_{Arroz \rightarrow Brachiaria} = 1,77$) foi significativamente maior, teste de razão entre as verossimilhanças significativo ($P \leq 0,001$) para assimetria das estimativas de migração entre o par de populações, do que a migração na direção oposta ($4Nm_{Brachiaria \rightarrow Arroz} = 0,93$) (Figura 4).

DISCUSSÃO

Este estudo representa a primeira análise detalhada de genética de populações do patógeno da queima da folha e morte da braquiária na Colômbia. A amostragem de populações foi efetuada no estado do Meta, na Colômbia, região onde se constatou um grande número de focos da doença, especialmente onde se encontram as maiores áreas dedicadas à pastagem de gado de corte. Foram testadas as hipóteses de que populações geográficas de *R. solani* AG-1 IA da braquiária e de arroz são geneticamente homogêneas, portanto não-subdivididas ou diferenciadas (Tabela 6).

Enquanto detectou-se fluxo gênico entre todas as populações de *R. solani* AG-1 IA da braquiária (Tabela 6), todas estas populações diferenciaram-se da população obtida de arroz. O número baixo de genótipos em mistura compartilhado entre as populações hospedeiro distintas, três em 77, forneceu evidência extra de dispersão limitada do patógeno entre hospedeiros, sustentando a hipótese alternativa de fluxo gênico restrito entre estas populações. Isolamento geográfico não parece ser a causa mais provável dessa diferenciação genética, uma vez que a distância entre os pontos de amostragem não foi superior a 120 km.

Entretanto, muito embora estas populações hospedeiro-específicas apresentaram subdivisão, esta subdivisão genética foi intermediária, indicando a probabilidade de que, historicamente, as populações de braquiária e de arroz compartilharam migrantes ou que tiveram um ancestral de origem comum. De fato, há evidência para migração histórica assimétrica entre as populações simpátricas de *R. solani* AG-1 IA do arroz e da braquiária, sugerindo troca histórica de migrantes e emergência de subdivisão apenas recentemente. Comparando-se a troca de migrantes entre populações, a população simpátrica de *R. solani* AG-1 IA do arroz contribuiu duas vezes mais migrantes para a população da braquiária.

Dessa forma, é provável que a população da braquiária é derivada de uma população de *R. solani* AG-1 IA que infecta o arroz. O mecanismo mais provável para a emergência da queima da folha da braquiária é via troca de hospedeiro

(STUKENBROCK & MCDONALD, 2008). Adaptação ecológica incipiente, que da população adaptada ao arroz ou da população adaptada à braquiária pode explicar os níveis contemporâneos de divergência genética observados ainda relativamente baixos (HUYSE et al., 2005; KOHN, 2005). Embora não haja informação sobre a resposta diferencial de arroz e braquiária às populações de *R. solani* AG-1 IA, é plausível que as populações do patógeno adaptadas à braquiária apresentem algum nível de especialização. Fenômeno semelhante de emergência de populações hospedeiro-específicas de *R. solani* AG-1 IA que infectam o milho e o arroz foi detectado na Venezuela. As populações de milho, consideradas mais recentes, embora apresentassem subdivisão genética em relação às populações de arroz (onde a estatística R_{ST} , análoga à estatística F_{ST} de Wright, foi $R_{ST} = 0,13$ a $0,17$), historicamente compartilharam cerca de dois migrantes por geração, e postulou-se sua origem de populações originalmente do arroz na mesma região, via troca de hospedeiro (GONZÁLEZ-VERA et al., 2010).

Até que este estudo fosse desenvolvido, não havia qualquer informação sobre o sistema reprodutivo predominante de *R. solani* AG-1 IA em braquiária. Mundialmente, evidências baseadas em genética de populações do fungo *R. solani* AG-1 IA infectando arroz, milho ou soja indicaram a ocorrência de reprodução sexual e uma estrutura populacional mista, que inclui tanto a reprodução sexual como a dispersão local de clones, ou essencialmente recombinante (ROSEWICH et al., 1999; LINDE et al., 2005; CIAMPI et al., 2008; BERNARDES DE ASSIS et al., 2009; GONZÁLEZ-VERA et al., 2010). Os prognósticos para um organismo sexualmente recombinante são: elevada diversidade genotípica, reduzida clonalidade, marcadores moleculares neutros seguindo as proporções esperadas de EHW e equilíbrio gamético (MILGROOM, 1996; MCDONALD & LINDE, 2002).

A maioria das populações apresenta uma fração clonal elevada, com 37,5 a 75% dos marcadores, apresentando proporções esperadas em EHW. A maior fração clonal observada foi de 73 % na população BBT1 (Tabela 4). Desvios significativos do EHW para a maioria dos loci foram detectados nas populações BBT1, BMH3 e BHM4 de *R.*

solani AG-1 IA da braquiária (Tabela 4). As populações BHM3 e BHM4 apresentaram o maior número de pares de loci em desequilíbrio gamético.

De forma geral, poder-se-ia se afirmar que a estrutura genética de três das quatro populações de *R. solani* AG-1 IA infectando braquiária na Colômbia seria essencialmente clonal, talvez representando clones bem sucedidos para infectar braquiária ou combinações de genes favoráveis originados por reprodução sexuada (XU, 2005). Entretanto, uma estrutura populacional muito diferente foi observada para a população BBT2, que apresentou a maioria dos loci em EHW e baixo desequilíbrio gamético. Estes são indícios de recombinação e, provavelmente, de um sistema reprodutivo recombinante na população do patógeno.

Buscou-se, então, investigar as causas para os desvios de EHW e desequilíbrio gamético detectado em três das quatro populações do patógeno associado à braquiária. Uma primeira causa plausível para o desequilíbrio observado seria a ocorrência de endogamia (acasalamento preferencial) (HARTL & CLARK, 1997; TAYLOR et al., 1999). Entretanto, não se detectou endogamia nestas populações, cujos coeficientes de endogamia F_{IS} foram não significativos. Uma segunda explicação para os desequilíbrios observados pode ser atribuída às consequências do efeito Wahlund resultante da mistura entre populações (HARTL & CLARK, 1997; PRITCHARD et al., 2000), uma vez que as populações de *R. solani* AG-1 IA de braquiária na Colômbia exibiram um amplo fluxo gênico. De fato, a hipótese simples de mistura entre populações não pode ser rejeitada para nenhuma das populações (Figura 3).

Conclui-se assim, que o sinal de assexualidade ou de sistema reprodutivo clonal está associado com aspectos demográficos que moldaram as populações do patógeno, especialmente a mistura entre populações sob elevado fluxo gênico. Assim, sugere-se que um sistema reprodutivo misto para o patógeno, incluindo a reprodução sexuada e a dispersão de clones adaptados, caracterizou as populações de *R. solani* AG-1 IA que infectam a braquiária.

CONCLUSÕES

As populações de *R. solani* AG-1 IA infectando a braquiária na Colômbia são geneticamente homogêneas e não subdivididas. Nem as distâncias geográficas, nem os diferentes cultivares parecem desempenhar um papel significativo na subdivisão populacional entre populações de *R. solani* AG-1 IA infectando braquiária.

Adaptações específicas para o arroz e/ou braquiária podem ter diminuído o fluxo de genes entre as populações dos dois hospedeiros distintos.

A população de *R. solani* AG-1 IA, adaptada à braquiária, possivelmente teve origem, via troca de hospedeiro, de populações simpátricas do patógeno originalmente adaptadas ao arroz.

A maioria das populações de *R. solani* AG-1 IA adaptadas à braquiária tem um sistema reprodutivo misto.

REFERÊNCIAS

AGAPOW, P. M.; BURT, A. Indices of multilocus linkage disequilibrium. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, n. 1-2, p. 101-102, 2001.

ANDERSON, J. B.; KOHN, L. M. Clonality in soilborne, plant-pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, n. 1, p. 369-391, 1995.

ARGEL, P. J.; MILES, J. W.; GUIOT, J. D.; LASCANO, C. E. **Cultivar Mulato (*Brachiaria* híbrido CIAT 36061). Gramínea de alta producción y calidad forrajera para los trópicos**. Palmira: CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical, 2005. 24 p. (Boletim Técnico).

BEERLI, P.; FELSENSTEIN, J. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 98, n. 8, p. 4563-4568, 2001.

BERNARDES DE ASSIS, J.; PEYER, P.; RUSH, M.C.; ZALA, M.; MCDONALD, B.A.; CERESINI, P.C. Divergence between sympatric rice- and soybean-infecting populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA. **Phytopathology**, v. 98, n. 12, p. 1326-1333, 2008.

BERNARDES, DE ASSIS. J.; STORARI, M.; ZALA, M.; WANG, W.; JIANG, D.; SHIDONG, L.; JIN, M.; MCDONALD, B.A.; CERESINI, P.C. Genetic structure of populations of the rice-infecting pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from China. **Phytopathology**, v. 99, n. 9, p. 1090-1099, 2009.

BLACK, B.D.; GRIFFIN, J.L.; RUSSIN, J.S.; SNOW, J.P. Weed hosts for *Rhizoctonia solani*, causal agent for rhizoctonia foliar blight of soybean (*Glycine max*). **Weed Technology**, v. 10, p. 865-869, 1996.

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

BONFERRONI, C. E. Il calcolo delle assicurazioni su gruppi di teste. In: (Ed.). **Studi in onore del professore Salvatore Ortu Carboni**. Rome, Italy, 1935. p.13-60.

CARDONA, R.; RODRÍGUEZ, H.; NASS, H. Mancha bandeada en maíz causada por *Rhizoctonia solani* en el estado Portuguesa, Venezuela. **Fitopatología Venezolana**, v. 12, n. 2, p. 32-33, 1999.

CARLING, D. E. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S. M. AND DIJST, G. DORDRECHT (Ed.). **Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.37-47.

CEDEÑO, L. H.; NASS, C.; CARRERO, R.; CARDONA, R.; RODRIGUEZ, H.; ALEMÁN, L. *Rhizoctonia solani* AG-1-IA, causa principal del añublo de la vaina del arroz en Venezuela. **Fitopatología Venezolana**, v. 9, p. 6-9 1996.

CIAMPI, M. B.; FENILLE., R. C.; MEYER., M. C.; SOUZA., N. L.; KURAMAE., E. E.; CERESINI., P. C. Intraspecific evolution of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA associated with soybean and rice in Brazil based on polymorphisms at the ITS-5.8S rDNA operon. **European Journal of Plant Pathology**, v. 113, n. 2, p. 183-196, 2005.

CIAMPI, M. B.; MEYER, M. C.; COSTA, M. J. N.; ZALA, M.; MCDONALD, B. A.; CERESINI P. C. Genetic structure of populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA from soybean in Brazil. **Phytopathology**, v. 98, n. 8, p. 932-941, 2008.

CIAT. **Annual Report, Tropical Forages Program**. Cali: CIAT-Cali, Colombia, 1993. s. p. (Working Document, 166).

DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 11, n. 2, p. 127-133, 2005.

DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; SANHUEZA, R. M. V.; VERZIGNASSI, J. R.; KONDO, N. Etiologia da podridão do coleto de *Brachiara brizantha* em pastagens da Amazônia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 261-265, 2007.

EL MOUSADIK, A.; PETIT, R. J. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, n. 7, p. 832-839, 1996.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 1, p. 47-50, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

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

GAINO, A. P. S. C.; BASSETO, M. A.; GASPAROTTO, L.; POLTRONIERI, L. S.; CERESINI, P. C. Phylogenetic inference reveals the complex etiology of the target and leaf spot diseases on rubber tree and other species cultivated in the Amazon. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 385-395, 2010.

GALINDO, J. J.; ABAWI, G. S.; THURSTON, H. D.; GALVEZ, G. Source of inoculum and development of bean web blight in Costa Rica. **Plant Disease** v. 67, p. 1016-1021, 1983.

GARNIER-GERE, P.; DILLMANN, C. A computer program for testing pairwise linkage disequilibria in subdivided populations. **Journal of Heredity**, v. 83, p. 239, 1992.

GONZÁLEZ-VERA, A. D.; BERNARDES-DE-ASSIS, J.; ZALA, M.; MCDONALD, B. A.; CORREA-VICTORIA, F.; GRATEROL-MATUTE, E. J.; CERESINI, P. C. Divergence between sympatric rice- and maize-infecting populations of *Rhizoctonia solani* AG 1 IA from Latin America. **Phytopathology**, v. 100, n. 2, p. 172-182, 2010.

GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity** v. 86, n. 6, p. 485-486, 1995.

GRUNWALD, N. J.; GOODWIN, S. B.; MILGROOM, M. G.; FRY, W. E. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. **Phytopathology**, v. 93, n. 6, p. 738-746, 2003.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, p. 361-372, 1992.

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

HASHIBA, T.; KOBAYASHI, T. Rice diseases incited by *Rhizoctonia* species. In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S. AND DIJST, G. DORDRECHT (Ed.). ***Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.331-340.

HUYSE, T.; POULIN, R.; THERON, A. Speciation in parasites: a population genetics approach. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 10, p. 469-475, 2005.

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

KELEMU, S.; MILES, J. W.; BONILLA, X. P.; BADEL, J. L. Sources of resistance in species of *Brachiaria* to foliar blight disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Tropical Grasslands**, v. 29, p. 257-262, 1995.

KOBAYASHI, T.; MEW, T. W.; HASHIBA, T. Relationship between incidence of rice sheath blight and primary inoculum in the Philippines: Mycelia in plant debris and sclerotia. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 63, p. 324-327, 1997.

KOHN, L. M. Mechanisms of fungal speciation. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, n. 1, p. 279-308, 2005.

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

LINDE, C. C.; ZALA, M.; PAULRAJ, R. S. D.; MCDONALD, B. A.; GNANAMANICKAM, S. S. Population structure of the rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from India. **European Journal of Plant Pathology**, v. 112, p. 113-121, 2005.

MANLY, B. F. J. **Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in Biology**. 2. London: Chapman & Hall / CRC, 1991. 399 p.

MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUK, L. E. B.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 639-655, 1998.

MATSUMOTO, M. Trials of direct detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG 1 and AG 2 subgroups using specifically primed PCR analysis. **Mycoscience**, v. 43, p. 185-189, 2002.

MAYNARD SMITH, J.; SMITH, N.H.; O'ROURKE, M.; SPRATT, B. G. How clonal are bacteria? . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 4384–4388, 1993.

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

MEIRMANS, P. G.; VAN TIENDEREN, P. H. GenoType and GenoDive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 4, p. 792-794, 2004.

MILGROOM, M. G. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 457-477, 1996.

NAITO, S. Ecological studies on teleomorphic and anamorphic stages in *Rhizoctonia* fungi. **Journal of General Plant Pathology**, v. 72, n. 6, p. 400-403, 2006.

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.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 538-590, 1978.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.

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.

ONIKI, M.; OGOSHI, A.; ARAKI, T. Development of the perfect state of *Rhizoctonia solani* Kühn AG-1. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 52, p. 169-74, 1986.

PASCUAL, C. B.; TODA, T.; RAYMONDO, A. D. HYAKUMACHI, M. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. **Plant Pathology**, v. 49, n. 1, p. 108-118, 2000.

PERDOMO, R.; HERNÁNDEZ, A.; GONZÁLES, A.; PINEDA, J.; ALEZONES, J. 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.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, n. 3, p. 248-249, 1995.

ROSEWICH, U. L. PETTWAY, R. E.; MCDONALD, B. A.; KISTLER, H. C. High levels of gene flow and heterozygote excess characterize *Rhizoctonia solani* AG-1 IA

(*Thanatephorus cucumeris*) from Texas. **Fungal Genetics and Biology**, v. 28, n. 3, p. 148-159, 1999.

SEIFFERT, N. F. **Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria***. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 1984. 83 p. (Circular Técnica, 1).

SOUZA, O. C.; ZIMMER, A. H.; VALLE, L. C. S.; KOLLER, W. W. **Diagnóstico de morte de pastagens de *Brachiaria brizantha* nas regiões de Araguaína, TO e Redenção, PA**. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2000. 11 p. (Documentos, 96).

SOUZA, E. C.; KURAMAE, E. E.; NAKATANI, A. K.; BASSETO, M. A.; PRABHU, A. S.; CERESINI, P. C. Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado ao arroz em Tocantins, Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 33 n. 2, p. 129-136, 2007.

STUKENBROCK, E. H.; MCDONALD, B. A. The origins of plant pathogens in agroecosystems. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, n. 1, p. 75-100, 2008.

SUMNER, D. R. Sclerotia formation by *Rhizoctonia* species and their survival. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (Ed.) ***Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control***. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.207-215.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; FISHER, M. C. The evolution of asexual fungi: Reproduction, Speciation and Classification. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, n. 1, p. 197-246, 1999.

VALÉRIO, J. R.; SOUZA, O. C.; VIEIRA, J. M.; CORRÊA, E. S. **Diagnóstico de morte de pastagens nas regiões central e norte do Estado de Mato Grosso**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2000. 10

VIEIRA, C. Colombia investiga forrajes contra el cambio climático, TERRANOVA, 2010. procurado no site <http://www.ips.org/TV/cop16/colombia-investiga-forrajes-contra-el-cambio-climatico/> (17 fevereiro de 2012)

VERZIGNASSI, J. R.; FERNANDES, C. D. **Doenças em forrageiras**. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2001. 2 p. (Divulgação Técnica, 50).

WEBER, G. F. Web-blight, a disease of beans caused by *Corticium microsclerotia*. **Phytopathology**, v. 29, p. 559-575, 1939.

WEIR, B. S. **Genetic Data Analysis**. 2. Sunderland: Sinauer, 1996. 445 p.

WEIR, B. S.; COCKERMAN, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358-1370, 1984.

XU, J. Cost of interacting with sexual partners in a facultative sexual microbe. **Genetics**, v. 171, n. 4, p. 1597-1604, 2005.

YANG, X. B.; SNOW, J. P.; BERGGREN, G. T. Morphogenesis of microsclerotia and sasakii-type sclerotia in *Rhizoctonia solani*, anastomosis group 1, intraspecific groups IA and IB. **Mycological Research**, v. 93, n. 4, p. 429-434, 1989.

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

ZHAN, J.; PETTWAY, R. E.; MCDONALD, B. A. The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, n. 3, p. 286-297, 2003.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 2. Populações simpátricas de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA de braquiária e de arroz amostradas em Meta, Colômbia, usadas nesse estudo.

Município	Distrito	Isolados N ^a	População	Coordenadas geográficas	Hospedeiro	Ano de coleta
Puerto López	Puerto López	38	BBT1	4°07'13,40 N 72°49'52,99 W	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Toledo	2010
	La bonga	40	BHM3	4°13'35,45 N 72°28'58,36 W	<i>Brachiaria</i> Híbrido Mulato	2010
Villavicencio	El alcaravan	42	BBT2	4°05'12,14 N 73°19'06,21W	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Toledo	2011
	La libertad	41	BHM4	4°03'25,17 N 73°27'45,38 W	<i>Brachiaria</i> Híbrido Mulato	2010
	Pompeya	37	OS5	4°02'26,64 N 73°21'15,76 W	Arroz variedade Thailandia	2011

^a N = Tamanho amostral (número de isolados) de cada população

Tabela 3. Medidas de diversidade genotípica e gênica em populações simpátricas de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA da braquiária e do arroz no Estado de Meta na Colômbia.

População	Tamanho amostral (N)	Número de genótipos	Genótipos sitio-específicos e compartilhados ^a	Diversidade genotípica (G_o) ^b	Fração clonal	Equitatividade ^{bc}	Diversidade gênica (H_E) ^{de}	Riqueza alélica (RA) ^{ef}
BBT1	38	9	7(2)	3,72 bc	0,76	0,41 b	0,54 a	3,00 ab
BBT2	42	15	12(3)	5,51 b	0,64	0,37 b	0,52 a	3,18 ab
BHM3	40	18	12(6)	9,52 a	0,55	0,53 a	0,55 a	3,47 a
BHM4	41	20	14(6)	12,45 a	0,51	0,62 a	0,55 a	3,68 a
OS5	37	15	13(2)	3,22 c	0,59	0,21 c	0,44 b	2,72 b
Total	198	77	58(19)		0,61			3,21

^a Número de genótipos compartilhados com outras populações são exibidos entre parênteses.

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

^c Um valor de equitatividade igual a 1,0 indica que todos os genótipos tiveram frequências idênticas na população.

^d H_E = diversidade gênica de Nei (ou heterozigidade), calculada como média entre todos os loci e corrigida pelo tamanho amostral (NEI, 1978)

^e As comparações entre médias da diversidade gênica de Nei e da riqueza alélica foram efetuadas utilizando-se o programa FSTAT versão 2.9.3.2. (GOUDET, 1995) baseado em 1.000 permutações; médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ($P \geq 0,05$).

^f Calculado de acordo com EL MOUSADIK & PETIT (1996).

Tabela 4. Testes para associação aleatória de alelos dentro de cada locus e entre pares de loci em populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA da braquiária e do arroz na Colômbia.

População	2N corrigido para clones	Número de loci em EHW ^a	F_{IS} população-específico ^b	Valor de P para F_{IS}	r_D ^c	Valor de P para r_D	Número e proporção de pares de loci em desequilíbrio gamético ^d
BBT1	18	4 em 8	0,07	0,29	0,36	0,001	1/28 0,04
BBT2	30	6 em 8	-0,02	0,56	0,33	0,001	3/28 0,11
BHM3	36	3 em 8	-0,12	0,89	0,43	0,001	13/28 0,46
BHM4	40	4 em 8	-0,08	0,86	0,31	0,001	14/28 0,50
OS5	30	5 em 8	0,09	0,20	0,09	0,001	3/28 0,11
Total	154						

^a Teste análogo ao teste exato de Fisher (GUO & THOMPSON, 1992). Valores de P obtidos usando o método de cadeias Markov Monte Carlo (MCMC), gerando uma distribuição exata de probabilidade não enviesada por alelos raros ou tamanho amostral reduzido, implementado em ARLEQUIN versão 3.11 (EXCOFFIER et al., 2005), a $P \leq 0,05$, após ajuste de Bonferroni para múltiplas comparações (BONFERRONI, 1935);

^b Índice de endogamia (F_{IS}) e respectivo valor de P determinados usando-se o programa ARLEQUIN versão 3.11.

^c r_D é um índice de desequilíbrio multiloci. Valores de significância determinados pelo programa MULTILOCUS versão 1.3 (AGAPOW & BURT, 2001), testando-se a hipótese nula de completa panmixia (ou seja, de nenhuma ligação entre pares de loci), com base em 1.000 aleatorizações.

^d Teste exato de Fisher (GARNIER-GERE & DILLMANN, 1992), usando o programa GENEPOP versão 3.4 (RAYMOND & ROUSSET, 1995), a $P \leq 0,05$, após ajuste de BONFERRONI (1935) para múltiplas comparações.

Tabela 5. Número de alelos, diversidade de genes (heterozigidade observada e esperada), desvio das proporções do EHW e frequência de alelos nulos associados a oito marcadores poliformicos microssatélites presentes para genotipagem de populações simpátricas de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA da braquiária e do arroz no estado de Meta, na Colômbia.

População	Marcadores	2N ^a	Número de alelos	Diversidade gênica por locus		Desvio das proporções do EHW ^c	Razão para o desvio do EHW ^d	Frequência de alelos nulos ^e
				H _O	H _E ^b			
BBT1	TC01	20	4	0,556	0,464	NS		-0,160
	TC02	20	3	0,222	0,627	NS		0,501
	TC03	20	4	0,778	0,660	NS		-0,137
	TC05	20	5	0,778	0,719	NS		-0,081
	TC06	20	3	0,333	0,660	*	Hom-ex	0,236
	TC07	20	4	0,500	0,666	**	Hom-ex	0,143
	TC11	20	5	0,000	0,784	***	Hom-ex	1,000
	TC12	20	4	1,000	0,738	*	Het-ex	-0,202
BBT2	TC01	30	4	0,667	0,526	NS		-0,174
	TC02	30	4	0,400	0,641	NS		0,242
	TC03	28	4	0,643	0,704	NS		0,025
	TC05	28	5	0,857	0,735	NS		-0,111
	TC06	30	3	0,200	0,559	**	Hom-ex	0,501
	TC07	30	4	0,933	0,697	NS		-0,175
	TC11	30	5	0,267	0,694	***	Hom-ex	0,456
	TC12	30	3	0,867	0,687	NS		-0,138
BHM3	TC01	36	4	0,611	0,492	NS		-0,159
	TC02	36	4	0,389	0,649	**	Hom-ex	0,252
	TC03	36	4	0,889	0,689	*	Het-ex	-0,162
	TC05	36	5	0,944	0,727	NS		-0,177
	TC06	36	3	0,556	0,679	***	Hom-ex	0,079
	TC07	36	5	0,833	0,778	NS		-0,047
	TC11	36	7	0,278	0,846	***	Hom-ex	0,497
	TC12	36	3	1,000	0,646	**	Het-ex	-0,251
BHM4	TC01	40	5	0,500	0,432	NS		-0,126
	TC02	40	4	0,650	0,706	*	Hom-ex	0,024
	TC03	40	5	0,850	0,755	*	Het-ex	-0,075
	TC05	40	5	0,850	0,732	NS		-0,107
	TC06	40	4	0,550	0,712	***	Hom-ex	0,116
	TC07	40	5	0,900	0,753	NS		-0,105
	TC11	40	7	0,250	0,786	***	Hom-ex	0,508
	TC12	40	3	0,800	0,629	NS		-0,146
OS5	TC01	30	2	0,267	0,239	NS		-0,067
	TC02	30	3	0,733	0,559	NS		-0,168
	TC03	28	3	0,714	0,622	NS		-0,097
	TC05	30	4	0,667	0,729	NS		0,042
	TC06	30	3	0,200	0,508	*	Hom-ex	0,444
	TC07	30	4	0,667	0,738	NS		0,028
	TC11	26	3	0,077	0,335	*	Hom-ex	0,614
	TC12	30	4	0,467	0,697	**	Hom-ex	0,205

^a 2N é o tamanho da amostra de alelos corrigida para clones, para este fungo dicariótico.

^b $H_E = n/(n-1) * (1 - \sum p_i^2)$, onde n é o tamanho da amostra e p_i é a frequência observada do alelo i^o .

^c Os desvios das proporções do EHW foram determinados usando teste análogo ao teste exato de Fisher (Guo e Thompson, 1992) implementado no programa ARLEQUIN versão 3.11 (EXCOFFIER et al., 2005), a $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***) e ^{NS} = não significativo, após ajuste de Bonferroni para múltiplas comparações (BONFERRONI, 1935);

^d *Hom-ex* indica loci desviando do equilíbrio de Hardy–Weinberg devido ao excesso de homozigoto e *Het-ex* ao excesso de heterozigotos.

^e As frequências de alelos nulos para cada locus foram determinadas usando o programa Cervus versão 3.0.3 (MARSHALL et al., 1998).

Tabela 6. Medidas de diferenciação entre populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA da braquiária e do arroz na Colômbia, baseadas em F_{ST}^a .

	BBT1	BBT2	BHM3	BHM4
BBT1	-			
BBT2	-0,009 ^{ns}	-		
BHM3	-0,003 ^{ns}	0,021 ^{ns}	-	
BHM4	0,007 ^{ns}	0,014 ^{ns}	-0,004 ^{ns}	-
OS5	0,083 [*]	0,139 ^{***}	0,073 ^{**}	0,081 ^{***}

Índice de fixação (F_{CT} *Brachiaria* vs. arroz) = 0,11 ($P \leq 0,05$),

^a Distâncias medidas com base no número de alelos diferentes entre dois haplótipos.

Significância dos valores foi testada usando abordagem não-paramétrica (EXCOFFIER et al., 1992), com base em 1.000 permutações.

* = $P \leq 0,05$, ** = $P \leq 0,01$, *** = $P \leq 0,001$ e ns = não significativos.

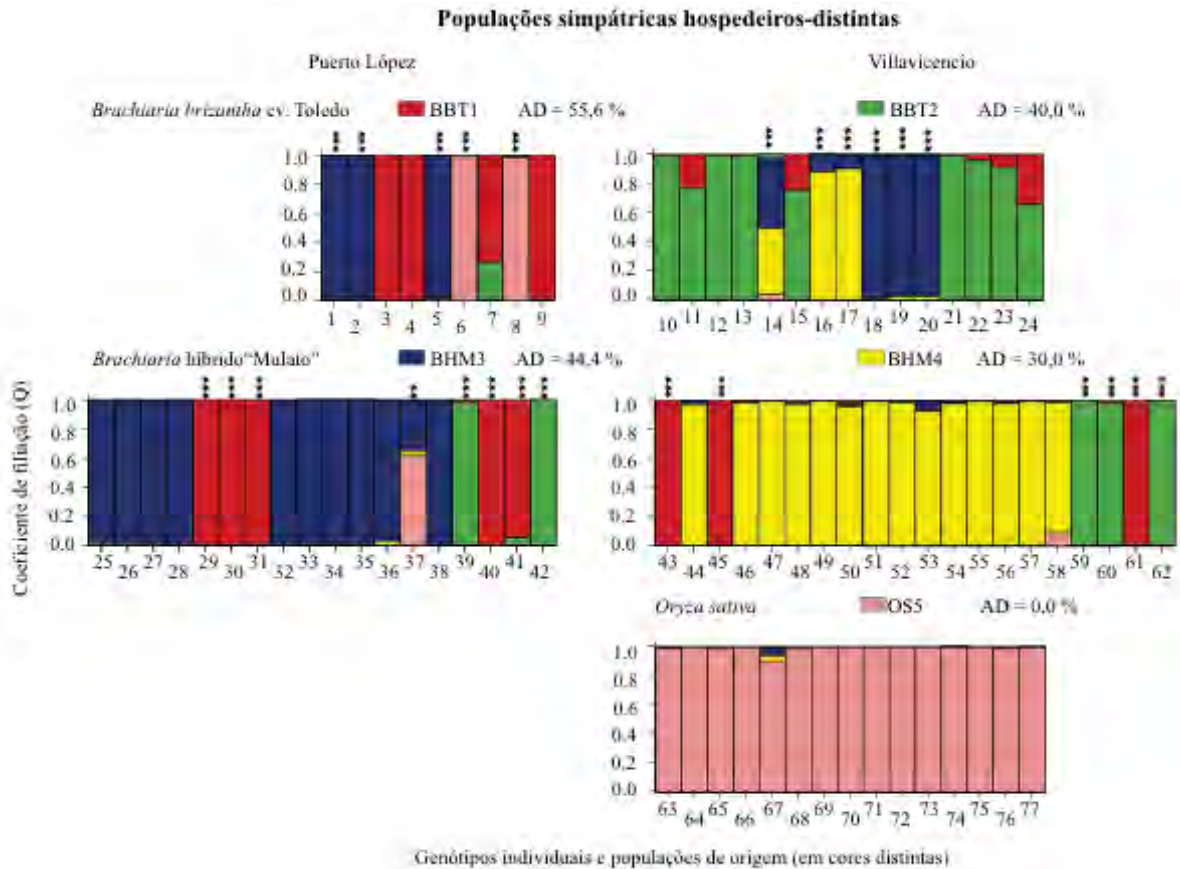


Figura 3. Coeficientes de filiação Q para genótipos multiloci microssatélites de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA amostrados de campos da braquiária em Meta, na Colômbia.

Grupos de indivíduos baseados em populações definidas *a priori* são representados por diferentes cores. Cada barra vertical representa um genótipo multiloci. Cada cor representa o grupo ancestral mais provável do qual o genótipo foi derivado. Grupos com indivíduos com múltiplas cores têm genótipos misturados com relação à população previamente definida. A dimensão da barra indica o coeficiente de filiação (Q) para com as populações de cores distintas. Mistura estatisticamente significativa para um genótipo multiloci individual é marcada com um asterisco no topo do indivíduo a $P \leq 0,01$ (**) e $P \leq 0,001$ (***)

Estimativas de parâmetros demográficos

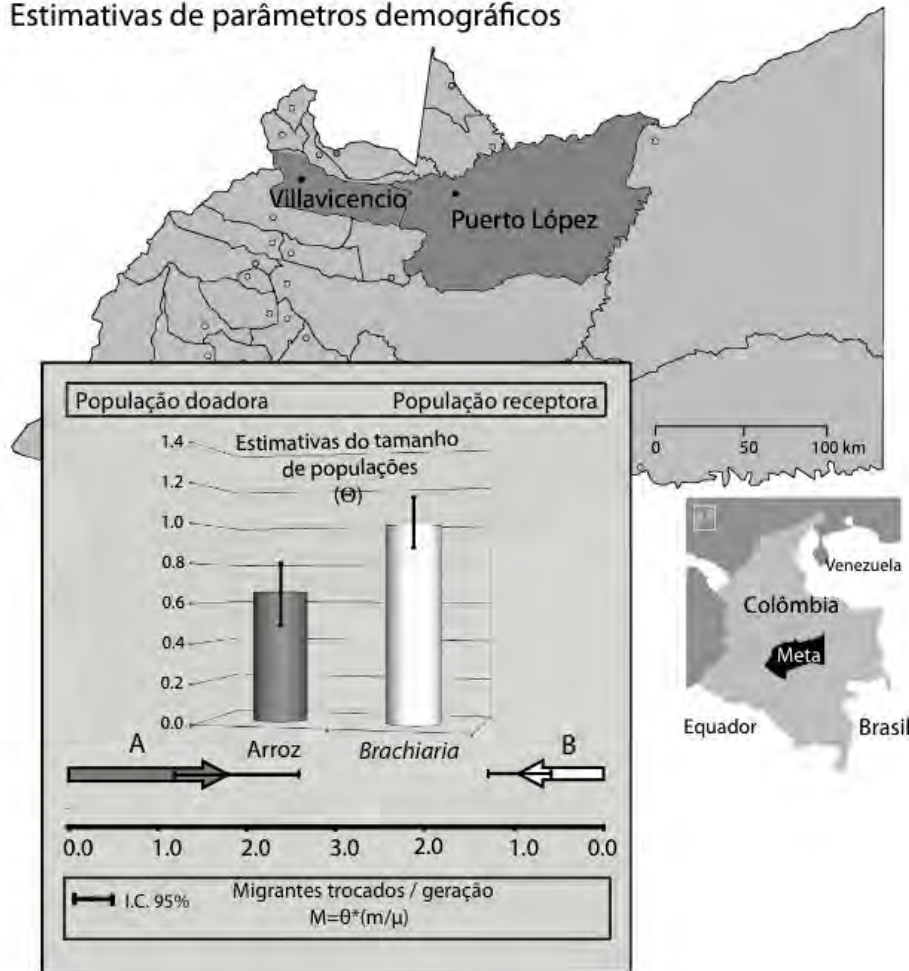


Figura 4. Estimativas de parâmetros demográficos da divergência entre populações simpátricas de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA que infectam arroz e braquiária na Colômbia

Valores de θ representam uma medida do tamanho efetivo da população, para diplóides $\theta = 4N_e\mu$, onde N_e = tamanho efetivo da população e taxa de μ = mutação para cada locus. A taxa de migração M entre populações hospedeiras foi estimada usando um modelo de isolamento com migração implementado em MIGRATE v.3.0.3. Modelo de migração com a máxima verossimilhança [$\ln(L) = 142,46$] entre 10 replicações independentes. Todos os valores de Q e M são significativamente diferentes de zero, baseando-se em testes de razão de verossimilhanças (TRV). Taxas de migração seguidas por letras distintas são significativamente diferentes, baseando-se em TRV (original $P \leq 0,05$, reduzido para $P \leq 0,01$ após ajuste de Bonferroni para múltiplas comparações). Estimativas dos parâmetros estão com intervalo de confiança (I.C) a 95% indicados por barras verticais para Q ou horizontais para M .

CAPÍTULO 4 – POTENCIAL ADAPTATIVO DE *Rhizoctonia solani* AG-1 IA E *R. oryzae-sativae* DA BRAQUIÁRIA E DO ARROZ AO ESTRESSE TÉRMICO²

RESUMO - Muitos fitopatógenos que apresentam uma ampla distribuição geográfica, tais como *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, estão mais predispostos a experimentar estresse devido a mudanças ambientais extremas. O objetivo desse estudo foi determinar o efeito do estresse térmico na evolutibilidade, i.e., medidas de resposta à seleção, para crescimento micelial de populações hospedeiro-distintas de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA infectando braquiária (BBT1) ou arroz (OS2), e uma população de *R. oryzae-sativae* do arroz (OS3). As populações foram submetidas a temperatura ótima e de estresse, 25°C e 35°C respectivamente. Baseando-se em medidas do crescimento micelial, estimou-se os coeficientes de variância genotípica (I_G), variância ambiental (I_E) e herdabilidade no sentido amplo (h^2). A populações de *R. solani* AG-1 IA da braquiária apresentara pouca diminuição do crescimento micelial quando submetidas a temperatura de 35°C, e um aumento no crescimento micelial foi observado na população de *R. oryzae-sativae* do arroz, contrário ao observado para a população de *R. solani* AG-1 IA do arroz. Os valores da variância ambiental (I_E) aumentaram com o aumento da temperatura, fazendo com que a herdabilidade diminuísse, principalmente na população de *R. solani* da braquiária. Já na população de *R. oryzae-sativae* do arroz a herdabilidade diminuiu 36,6%. Dessa maneira, a herdabilidade apresenta alta diminuição para crescimento micelial sob condições de estresse, sendo menos influenciada na população de *R. oryzae-sativae* do arroz, indicando que esse patógeno têm alto potencial de adaptação a temperatura de 35°C.

Palavras chaves: Estresse de temperatura, evolutibilidade, variância genética.

² Manuscrito submetido ao periódico Tropical Plant Pathology para avaliação e futura publicação.

THE ADAPTIVE POTENCIAL OF *Rhizoctonia solani* AG-1 IA AND *R. oryzae-sativae* FROM BRACHIARIA AND RICE UNDER HEAT STRESS

ABSTRACT - Many plant pathogens that have a wide geographical distribution, such as *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, are more prompt to experience stress due to extreme environmental changes. In this experiment, the interest was to determine the effects of the heat stress on the evolvability, i.e., measures of response to selection, for mycelial growth in two host distinct populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA infecting either brachiaria (BBT1) or rice (OS2) and a rice-infecting population of *R. oryzae-sativae* (OS3). The populations were submitted to optimal and stress growth temperatures, 25°C and 35°C respectively. Based on mycelial growth measures, estimates of genotypic variance (I_G), environmental variance (I_E) and the broad sense heritability (h^2) were determined. The populations of *R. solani* AG-1 IA infecting brachiaria presented little reduction in mycelial growth when subjected to temperature of 35 ° C, and an increase in mycelial growth was observed in population of *R. oryzae-sativae* infecting rice, contrary to that observed in population of *R. solani* IA infecting rice. The environmental variance (I_E) increased at higher temperature causing a decrease in heritability, particularly in populations of *R. solani* infecting brachiaria. Thus, the heritability has a high reduction for mycelial growth under heat stress, being less affected in *R. oryzae-sativae* from rice, indicating that the pathogen has high potential for adaptation to a temperature of 35°C.

Keywords: Environmental stress, evolvability, phenotypic variance

INTRODUÇÃO

No início dos anos 90, o fungo basidiomiceto *Thanatephorus cucumeris* (com *Rhizoctonia solani* em sua fase anamórfica) emergiu como um patógeno importante associado à queima da folha e a morte das pastagens do gênero braquiária na América do Sul, especialmente no Brasil e na Colômbia (CIAT, 1993; VERZIGNASSI & FERNANDES, 2001). A braquiária é hospedeira de dois grupos de anastomoses (AGs) distintos de *R. solani*: o AG-1 IA e o AG-1 IB (BLACK et al., 1996). Ambos produzem escleródios em abundância no tecido doente. Os AGs são unidades taxonômicas correspondentes a espécies filogenéticas e/ou biológicas do complexo de espécies denominado de *R. solani* (OGOSHI, 1996; GONZALEZ et al., 2001).

Artigos que relatam a ocorrência de *R. solani* em pastagens no Brasil (VERZIGNASSI & FERNANDES, 2001; DUARTE et al., 2007) e na Colômbia (KELEMU et al., 1995) não especificam qual/quais AGs estavam associados, de fato, a braquiária. Recentemente, (GAINO et al., 2010) relataram a associação do AG-4 HGI a braquiária em Paragominas no Pará. Entretanto, levantamento efetuado na Colômbia por nosso grupo de pesquisa indicou que apenas o AG-1 IA estava associado com a queima da folha e morte da braquiária (Ramos, capítulo 2 desta Tese) e confirma observação de (BLACK et al., 1996). *R. solani* AG-1 IA tem distribuição mundial como patógeno necrotrófico habitante do solo infectando Poáceas e Fabáceas em regiões de clima tropical e subtropical causando, principalmente, a queima da bainha no arroz (JONES & BELMAR, 1989; HASHIBA & KOBAYASHI, 1996; RODRIGUES et al., 2003; NUNES et al., 2004). Além da associação recente à braquiária, nas Américas há também relatos anteriores da emergência de *R. solani* AG-1 IA como patógeno da mela da soja (JONES & BELMAR, 1989; FENILLE et al., 2002 e 2003) e da mancha bandeada do milho (CARDONA et al., 1999).

Observações sobre a biologia de populações de *R. solani* AG-1 IA feitas na última década, sugerem que este patógeno tem um alto potencial evolutivo (CIAMPI et al., 2008; BERNARDES-DE-ASSIS et al., 2009; GONZÁLEZ-VERA et al., 2010). De fato, eventos de especialização de hospedeiro moldaram a história evolutiva de *R. solani*

AG-1 IA, especialmente nas Américas. Há evidências para a emergência de populações especializadas de *R. solani* AG-1 IA, via troca, do arroz para o milho (GONZÁLEZ-VERA et al., 2010), e salto de hospedeiros, do arroz para a soja (BERNARDES DE ASSIS et al., 2008). Embora ainda não se conheça a origem das populações de *R. solani* AG-1 IA que atacam a braquiária, é possível que tenham emergido de populações que originalmente infectavam o arroz (Ramos, capítulo 3 desta Tese).

Neste trabalho, o principal foco foi determinar o potencial adaptativo de *R. solani* AG-1 IA da braquiária e do arroz ao estresse térmico. Muitos fitopatógenos que apresentam uma ampla distribuição geográfica como *R. solani* AG-1 IA, experimentam extremas flutuações de temperatura em seus habitats. Inclusive, num mesmo habitat, a temperatura pode mudar drasticamente entre as estações, como resultado de mudanças climáticas. Para sobreviver a essas flutuações climáticas, esses organismos desenvolveram a habilidade para constantemente regular seus valores fenotípicos, segundo as adaptações térmicas específicas (ZHAN & MCDONALD, 2011). A temperatura pode afetar significativamente o desenvolvimento epidêmico resultando, a longo prazo, em coevolução hospedeiro – patógeno (MITCHELL et al., 2005; BLANFORD et al., 2003). De acordo com (BUWALDA et al., 1998) e (RODRIGUES et al., 2008), muitos outros organismos, incluindo fitopatógenos, podem crescer e tolerar altas flutuações térmicas em diversos ambientes.

Para espécies do complexo *Rhizoctonia* spp. o crescimento micelial é um importante componente adaptativo, uma vez que os danos às plantas resultam, principalmente, da infecção por hifas assexuais (LEHTONEN et al., 2008). O rápido crescimento micelial característico de *Rhizoctonia* spp. lhe confere alta habilidade de competição saprofítica (MENZIES, 1970). Condições de estresse térmico, por sua vez, podem afetar a membrana celular do micélio, interferindo em processos bioquímicos e na formação de ácidos nucléicos e proteínas (BORKOW & GABBAY, 2005). Um estudo, empírico baseado na análise do crescimento micelial do fungo, permitiria inferir sobre o potencial adaptativo do mesmo a estresse térmico. Por sua vez, para a determinação do potencial adaptativo de um organismo ao estresse térmico, recomenda-se a análise de medidas de herdabilidade e de evolutibilidade. Ambas estimativas predizem resposta à seleção (HOULE, 1992; WILLI et al., 2006).

Dessa forma, este estudo teve como objetivos: (i) determinar se populações de *R. solani* AG-1 IA associadas à braquiária e ao arroz, respondem de forma semelhante ao estresse de temperatura elevada; (ii) testar o efeito do estresse de temperatura elevada sobre a variância genética e a herdabilidade para crescimento micelial de populações de *R. solani* AG-1 IA, obtidas da braquiária e do arroz. Neste estudo incluiu-se, também, uma população simpátrica de *R. oryzae-sativae*, associada exclusivamente à mancha agregada do arroz, para comparar parâmetros de evolutibilidade para adaptação ao estresse térmico entre espécies diferentes de *Rhizoctonia*. A questão principal que se busca responder é: O estresse imposto por aumento de temperatura influencia, de forma semelhante, o potencial adaptativo de *Rhizoctonia* spp. que atacam braquiária e/ou arroz?

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de Rhizoctonia solani AG-1 IA de braquiária e do arroz e de R. oryzae-sativae do arroz na Colômbia

As amostras de populações de isolados de *Rhizoctonia* spp. foram obtidas em 2010 em áreas de cultivo de braquiária e de arroz, no estado de Meta, no Bioma Amazônico do nordeste da Colômbia (Figura 5). Essas duas amostras de populações simpátricas de *R. solani* AG-1 IA foram coletadas no município de Puerto Lopez: a primeira infectando *Brachiaria brizantha* cv. Toledo (BBT1) com sintoma de queima da folha e a segunda população infectando arroz (OS2) com sintoma de queima da bainha. Os isolados de *R. solani* AG-1 IA foram genotipados por nosso grupo de pesquisa, com 10 marcadores microssatélites altamente polimórficos (ZALA et al., 2008), como descrito no capítulo 3 desta tese. De cada uma dessas duas populações, foram selecionados, ao acaso, doze isolados geneticamente distintos. Uma terceira amostra de doze isolados obtida no município de Villavicencio foi coletada de arroz com sintomas de mancha agregada para se obter uma população do fungo *R. oryzae-sativae* (OS3). Descrição detalhada das populações é apresentada nas Tabelas 1 e 2 dos capítulos 2 e 3 desta tese.

Cada isolado, conservado em sílica gel, foi propagado e transferido para placas de *Petri* contendo 15 mL de meio BDA (18,5 g de caldo batata-dextrose, 15 g de agar, suplementado com 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cloranfenicol e de estreptomicina). Foram efetuadas duas séries de repicagens para a reativação das culturas. Logo após, procedeu-se o preparo de inóculo para os experimentos. Discos de micélio de 6 mm de diâmetro foram cortados da margem de colônias com crescimento micelial ativo e cada disco foi transferido para o centro de cada placa de *Petri*.

Medida do efeito do estresse térmico sobre o crescimento micelial

Para determinar o efeito do estresse térmico sobre o crescimento micelial do fungo, discos de micélio com 6 mm de diâmetro foram transferidos para placas contendo 20 mL de meio BDA (suplementado com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloranfenicol e estreptomicina) e as culturas incubadas, no escuro, às temperaturas de 25° e 35°C, sendo consideradas temperaturas ótimas e de estresse para *R. solani* AG-1 IA (SOUZA et al., 2007). A avaliação do crescimento micelial foi feita através da medida do diâmetro das colônias, após 24 h de incubação.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (3 x 2): três populações do patógeno, duas populações de *R. solani* AG-1 IA, sendo uma da braquiária (BBT1) e outra do arroz (OS2) e uma de *R. oryzae-sativae* do arroz (OS3); e duas condições de temperatura (25°C e 35°C), com dez repetições. Cada população foi constituída por 12 isolados do fungo. Os dados obtidos de crescimento micelial (x) foram transformados em logaritmo ($x+1$). Foram analisados os efeitos de populações, isolados dentro de cada população, temperatura, e as interações isolado x temperatura e populações x temperatura. O efeito de isolados foi considerado como efeito aleatório e o da temperatura como efeito fixo. foi utilizada a análise de variância para modelos mixtos no programa SAS (2008). Posteriormente, analisou-se o efeito da temperatura sobre o crescimento micelial do fungo e sobre

componentes de variância e de evolutibilidade. Médias de crescimento micelial do fungo para cada população e em diferentes temperaturas foram comparadas pelo teste de SNK (Student-Newman-Keuls). Para análise do efeito da temperatura sobre os componentes de variância, a variância apresentada pelos isolados dentro de cada população foi interpretada como variância genética (V_G), o erro experimental foi considerado como variância ambiental (V_E), e a variância fenotípica (V_P) como o resultado da soma das variâncias genética e ambiental. As variâncias foram padronizadas pelo quadrado da média do crescimento em cada temperatura, passando a ser designadas por I_G , I_E e I_P e consideradas medidas de evolutibilidade ou de resposta à seleção (HOULE, 1992). A herdabilidade (h^2) foi calculada como a razão entre a variância genotípica (I_G) e a variância fenotípica padronizada ($I_P = I_G + I_E$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito significativo dos fatores população e isolados dentro de populações indicou que houve diferenças entre as populações e entre isolados de *Rhizoctonia*, provavelmente atribuídas à variação genética para crescimento micelial entre genótipos do patógeno dentro de cada população (Tabela 7 e 8). A interação população x temperatura apresentou efeito altamente significativo indicando que as populações de *Rhizoctonia* spp. apresentam comportamentos diferentes em função do hospedeiro de origem e das condições de temperatura. Dessa forma, o aumento da temperatura de 25 para 35°C, promoveu diminuição altamente significativa na taxa de crescimento micelial dos isolados de *R. solani* AG-1 IA da braquiária (BBT1) e do arroz (OS2). O contrário aconteceu com a população de *R. oryzae-sativae* do arroz (OS3), que apresentou um aumento altamente significativo de crescimento com o aumento da temperatura (Tabela 7 e 8). A interação isolado x temperatura não foi significativa para as populações de *Rhizoctonia* spp. indicando que os isolados, dentro de cada população, apresentaram crescimento micelial semelhante, diminuindo ou aumentando de forma semelhante quando a temperatura aumentou de 25 a 35°C (Tabela 7). O coeficiente de variação

observado no experimento foi relativamente baixo (9,67%), indicando que houve precisão no desenvolvimento do trabalho.

A 25°C todas as populações de *Rhizoctonia* diferiram significativamente quanto ao crescimento micelial ($P \leq 0,01$ pelo teste de SNK, Tabela 8), sendo que a população BBT1 apresentou o maior crescimento, seguida, em ordem decrescente, pelas populações OS2 e OS3. Comportamento semelhante foi observado quando o fungo foi submetido à temperatura de 35°C, onde as populações de BBT1 apresentaram maior crescimento em relação às populações de arroz. Isto indica que *R. solani* AG-1 IA da população BBT1, provavelmente é mais adaptada, em termos de desenvolvimento vegetativo, a temperaturas mais elevadas que *R. solani* AG-1 IA e *R. oryzae-sativae*, presentes nas populações de arroz. De fato, a população OS2 teve o crescimento micelial médio diminuído em cerca de 40% (Tabela 8). Observou-se que isolados de *R. solani* AG-1 IA das populações BBT1 e OS2 apresentaram comportamentos semelhantes aos descritos por (SOUZA et al., 2007) que afirmam que a temperatura ótima para o crescimento micelial dos isolados padrões de *R. solani* AG-1 IA é 25°C. No geral, a temperatura de 35°C pode ser considerada como fator de estresse principalmente para as populações de *R. solani* AG-1 IA do arroz, porém a população BBT1 pareceu ser mais adaptada a esta condição de estresse térmico. Fato contrário foi observado na população de *R. oryzae-sativae* do arroz que mostrou ter melhor crescimento micelial quando a temperatura aumentou de 25°C para 35°C.

A respeito do efeito do estresse térmico sobre as medidas de evolutividade do patógeno, observou-se que o aumento da temperatura promoveu pequenas mudanças da variância genética padronizada (I_G) nas populações de *Rhizoctonia* spp. Maiores mudanças foram observadas na variância ambiental (I_E) para crescimento micelial, que aumentou em todas as populações, principalmente em OS2. Como consequência a essas mudanças, a herdabilidade de senso amplo (h^2) diminuiu em todas as populações quando submetidas à condição de estresse térmico. Além disso, as mudanças nas medidas de variância genética (I_G) e de herdabilidade (h^2) observadas na população de *R. oryzae-sativae* do arroz foram menores quando comparada com às observadas nas populações de *R. solani* AG-1 IA.

Esses resultados confirmam as observações de (WILLI et al., 2011) onde os autores estudaram a adaptabilidade de uma população de *R. solani* AG-3 da batata sob condições desfavoráveis de temperatura. Quando *R. solani* AG-3 foi submetida à condições de estresse, houve também diminuição na herdabilidade para crescimento micelial, em virtude do aumento da variância ambiental.

(HOFFMANN & MERILÄ, 1999) sugeriram que as mudanças na herdabilidade sob condições de estresse são difíceis de prever, porque múltiplos componentes de variância podem mudar simultaneamente além dos efeitos serem população-dependente. Contudo, sob as condições de estresse térmico deste estudo, houve aumento da variância ambiental (I_E) para crescimento micelial na temperatura de estresse nas três populações de *Rhizoctonia* spp., com um efeito negativo sob a herdabilidade. Isto está de acordo com o segundo grupo de hipóteses de (HOFFMANN e MERILÄ, 1999) que prevê diminuição na herdabilidade porque o estresse aumenta a variância ambiental ou porque os organismos, sob condições de restrição à nutrição, por exemplo, não atingem o seu potencial genético.

CONCLUSÕES

As populações de *R. solani* AG-1 IA. apresentam comportamentos diferentes quanto à capacidade de adaptação ao estresse térmico, em função do hospedeiro de origem. Dessa forma, *R. solani* AG-1 IA que infecta braquiária apresentou maior capacidade de adaptabilidade a estresse térmico, em relação à população de *R. solani* AG-1 IA que infecta o arroz.

A população de *R. oryzae-sativae* que infecta o arroz, apresenta maior crescimento micelial na temperatura de estresse térmico (35°C).

REFERÊNCIAS

BERNARDES DE ASSIS, J.; PEYER, P.; RUSH, M. C.; ZALA, M.; MCDONALD, B. A.; CERESINI, P. C. Divergence between sympatric rice- and soybean-infecting populations

of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA. **Phytopathology**, v. 98, n. 12, p. 1326-1333, 2008.

BERNARDES-DE-ASSIS, J.; STORARI, M.; ZALA, M.; WANG, W.; JIANG, D.; SHIDONG, L.; JIN, M.; MCDONALD, B. A.; CERESINI, P. C. Genetic structure of populations of the rice-infecting pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from China. **Phytopathology**, v. 99, n. 9, p. 1090-1099, 2009.

BLACK, B. D.; GRIFFIN, J. L.; RUSSIN, J. S.; SNOW, J. P. Weed hosts for *Rhizoctonia solani*, causal agent for rhizoctonia foliar blight of soybean (*Glycine max*). **Weed Technology**, v. 10, p. 865-869, 1996.

BLANFORD, S.; THOMAS, M. B.; PUGH, C.; PELL, J. K. Temperature checks the Red Queen? Resistance and virulence in a fluctuating environment **Ecology Letters**, v. 6, p. 2–5, 2003.

BORKOW, G.; GABBAY, J. Copper as a biocidal tool. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 18, p. 2163-2175, 2005.

BUWALDA, F.; EVELEENS, B.; WERTWIJN, R. Ornamental crops tolerate large temperature fluctuations: a potential for more efficient greenhouse heating strategies. **Acta of Horticulture**, v. 515, p. 141–150, 1998.

CARDONA, R.; RODRÍGUEZ, H.; NASS, H. Mancha bandeada en maíz causada por *Rhizoctonia solani* en el estado Portuguesa, Venezuela. **Fitopatología Venezolana**, v. 12, n. 2, p. 32-33, 1999.

CIAMPI, M. B.; MEYER, M. C.; COSTA, M. J. N.; ZALA, M.; MCDONALD, B. A.; CERESINI, P. C. Genetic structure of populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA from soybean in Brazil. **Phytopathology**, v. 98, n. 8, p. 932-941, 2008.

CIAT. **Annual Report, Tropical Forages Program**. Cali: CIAT-Cali, Colombia, 1993. s. p. (Working Document, 166)

DUARTE, M. D. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; SANHUEZA, R. M. V.; VERZIGNASSI, J. R.; KONDO, N. 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.; CIAMPI, M. B.; KURAMAE, E. E.; SOUZA, N. L. Identification of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil by rDNA-ITS sequences. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 413-419, 2003.

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

GAINO, A. P. D. S. D. C.; BASSETO, M. A.; GASPAROTTO, L.; POLTRONIERI, L. S.; CERESINI, P. C. Phylogenetic inference reveals the complex etiology of the target and leaf spot diseases on rubber tree and other species cultivated in the Amazon. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 385-395, 2010.

GONZALEZ, D.; CARLING, D. E.; KUNINAGA, S.; VILGALYS, R.; CUBETA, M. A. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. **Mycologia**, v. 93, p. 1138-1150, 2001.

GONZÁLEZ-VERA, A. D.; BERNARDES-DE-ASSIS, J.; ZALA, M.; MCDONALD, B. A.; CORREA-VICTORIA, F.; GRATEROL-MATUTE, E. J.; CERESINI, P. C. Divergence between sympatric rice- and maize-infecting populations of *Rhizoctonia solani* AG 1 IA from Latin America. **Phytopathology**, v. 100, n. 2, p. 172-182, 2010.

HASHIBA, T.; KOBAYASHI, T. Rice diseases incited by *Rhizoctonia* species. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S. e DIJST, G. (Ed.). ***Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.331-340.

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

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

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

KELEMU, S.; MILES, J. W.; BONILLA, X. P.; BADEL, J. L. Sources of resistance in species of Brachiaria to foliar blight disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Tropical Grasslands**, v. 29, p. 257-262, 1995.

LEHTONEN, M. J.; AHVENNIEMI, P.; WILSON, P. S.; GERMAN-KINNARI, M.; VALKONEN, J. P. T. Biological diversity of *Rhizoctonia solani* (AG-3) in a northern potato-cultivation environment in Finland. **Plant Pathology**, v. 57, n. 1, p. 141-151, 2008.

MENZIES, J. D. The first century of *Rhizoctonia solani*. In: PARMETER, J. R. (Ed.). ***Rhizoctonia solani: Biology and pathology***. Berkeley: University of California Press, 1970. p.69-92.

MITCHELL, S. E.; ROGERS, E. S.; LITTLE, T. J.; READ, A. F. Host–parasite and genotype-by-environment interactions: temperature modifies potential for selection by a sterilizing pathogen. **Evolution**, v. 59, n. 1, p. 70-80, 2005.

NUNES, C. D.; RIBEIRO, A. S.; TERRES, A. L. Principais doenças do arroz irrigado e seu controle. In: GOMES, A. S. e MAGALHAES-JUNIOR, A. M. (Ed.). **Arroz irrigado no sul do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p.579-633

OGOSHI, A. *The genus Rhizoctonia*. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S. e DIJST, G. (Ed.). ***Rhizoctonia species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control***. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.1-9.

RODRIGUES, D.; IVANOVA, N.; HE, Z.; HUEBNER, M.; ZHOU, J.; TIEDJE, J. Architecture of thermal adaptation in an *Exiguobacterium sibiricum* strain isolated from 3

million year old permafrost: A genome and transcriptome approach. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 547, 2008.

RODRIGUES, F. A.; VALE, F. X. R.; DATNOFF, L. E.; PRABHU, A. S.; KORNDORFER, G. H. Effect of rice growth stages and silicon on sheath blight development. **Phytopathology** v. 93, p. 256-261, 2003.

SOUZA, E.C.; KURAMAE, E. E.; NAKATANI, A. K.; BASSETO, M. A.; PRABHU, A. S.; CERESINI, P. C. Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado ao arroz em Tocantins, Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 33 n. 2, p. 129-136, 2007.

VERZIGNASSI, J. R.; FERNANDES, C. D. **Doenças em forrageiras**. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2001. 2 p. (Divulgação Técnica, 50)

WILLI, Y.; FRANK, A.; HEINZELMANN, R.; KÄLIN, A.; SPALINGER, L.; CERESINI, P. The adaptive potential of a plant pathogenic fungus, *Rhizoctonia solani* AG-3, under heat and fungicide stress. **Genetica**, v. 139, n. 7, p. 1-6, 2011.

WILLI, Y.; VAN BUSKIRK, J.; HOFFMANN, A. A. Limits to the adaptive potential of small populations. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematic** v. 37, p. 433–458, 2006.

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

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

TABELAS E FIGURA

Tabela 7. Modelo linear geral testando os efeitos de população, isolados e temperatura e suas interações sobre o crescimento micelial *in vitro* dos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* AG-1 IA da braquiária e do arroz e *R. oryzae-sativae* do arroz.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	F calculado
População	2	7,3629	3,6814	29,70***
Isolado (População)	33	4,0900	0,1239	4,55***
Temperatura	1	7,6019	7,6019	278,90***
População x Temperatura	2	9,022	4,511	165,50***
Temperatura x Isolado (População)	33	0,8994	0,0272	1,31 ^{ns}
Coeficiente de Variação % (CV)		9,67		

Significativo pelo teste *F* a $P \leq 0.001$ (***) e não significativo (^{ns}).

Tabela 8. Efeito da temperatura sobre o crescimento micelial *in vitro* e sobre os componentes de evolutibilidade em populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA da braquiária (BBT1) e do arroz (OS2) e em populações de *R. oryzae-sativae* do arroz (OS3).

População	Crescimento micelial ¹ (mm.dia ⁻¹)		Componentes de Evolutibilidade ²							
			Variância Genética I_G		Variância Ambiental I_E		Variância Fenotípica I_P		Herdabilidade h^2	
	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C
BBT1	4,88 A a	3,37 A b	0,0038	0,0019	0,0074	0,0118	0,0113	0,0137	0,341	0,136
OS2	4,65 B a	2,74 C b	0,0015	0,0024	0,0065	0,0236	0,0080	0,0260	0,189	0,093
OS3	2,73 C b	3,14 B a	0,0025	0,0020	0,0037	0,0059	0,0062	0,0080	0,410	0,256

¹ Médias seguidas de letras distintas, minúscula na linha e maiúscula na coluna, diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,01$).

² Os componentes de evolutibilidade I_G , I_E , I_P e h^2 correspondem a medidas de variância genética (V_G), ambiental (V_E), fenotípica (V_P) e de herdabilidade (h^2) padronizadas pelo quadrado da média do crescimento na respectiva temperatura.

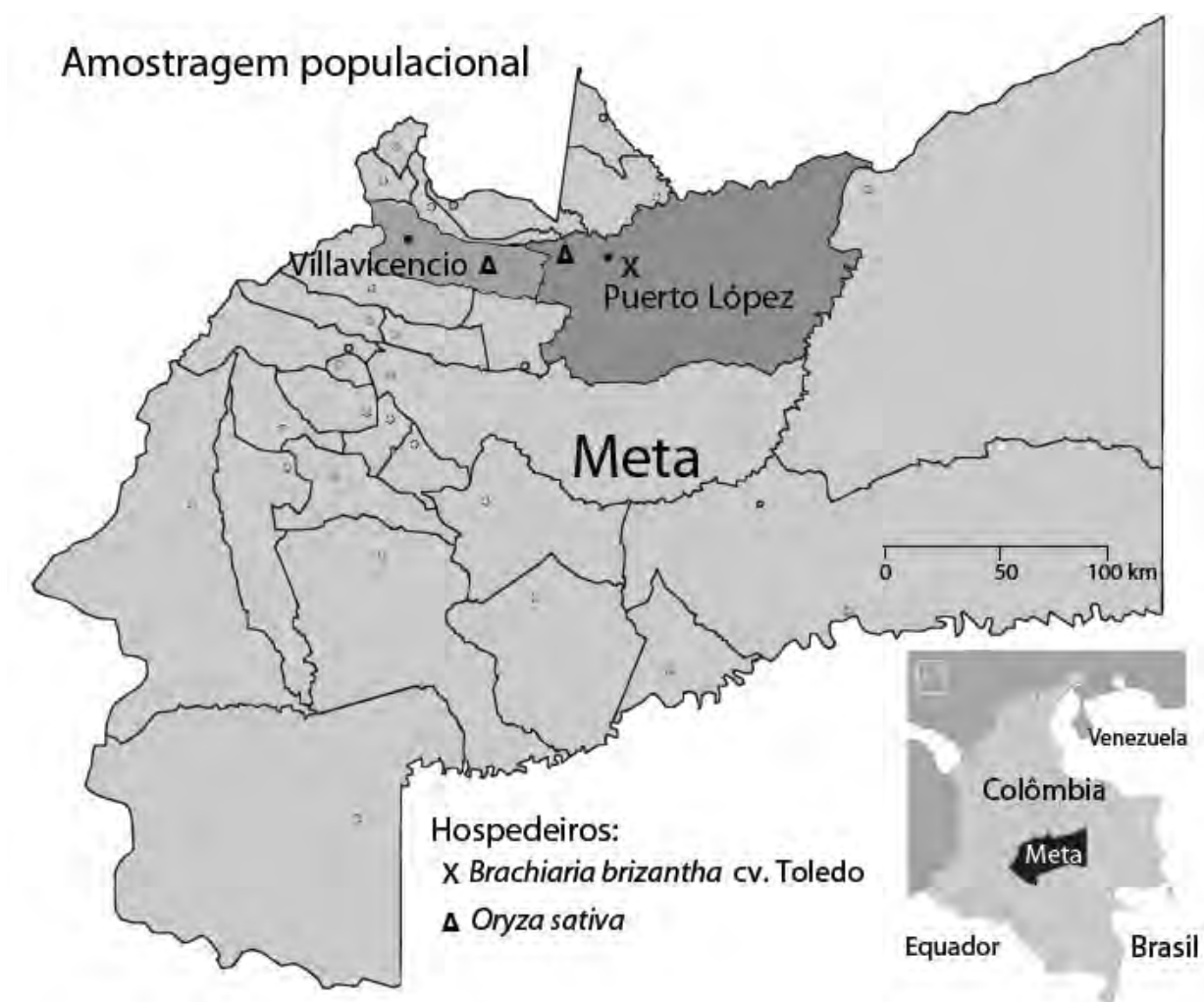


Figura 5. Localização geográfica das localidades de onde foram coletadas amostras de *Rhizoctonia* spp. em campos de braquiária e de arroz nos municípios de Villavicencio e Puerto López, no Estado de Meta, Colômbia.

ANEXO

Anexo 1. Genotipagem de 198 isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA associada à braquiária e ao arroz na Colômbia baseada em dez loci microssatélites.*

População	Clone	Isolado	TC 01	TC 02	TC 03	TC 05	TC 6	TC 7	TC 10	TC 11	TC 12	TC 17
1	1	BBT1_A1	108114	184184	268274	240249	221227	146146	150150	212212	154157	168168
1	2	BBT1_A2	108114	184184	268274	240240	221227	146146	150150	212212	154157	168168
1	3	BBT1_A3	114114	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
1	2	BBT1_A4	108114	184184	268274	240240	221227	146146	150150	212212	154157	168168
1	4	BBT1_A6	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
1	5	BBT1_B7	108114	184184	268268	240240	221227	146146	150150	212212	154157	168168
1	1	BBT1_B8	108114	184184	268274	240249	221227	146146	150150	212212	154157	168168
1	6	BBT1_B9	114114	178184	268268	246252	227227	142149	150150	202202	145149	168168
1	4	BBT1_B10	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
1	2	BBT1_B11	108114	184184	268274	240240	221227	146146	150150	212212	154157	168168
1	7	BBT1_B12	114114	181181	268274	240252	224224	??	150150	242242	145154	168168
1	4	BBT1_C13	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
1	4	BBT1_C14	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
1	4	BBT1_C15	114117	181181	270274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168

1	2	BBT1_C16	108114	184184	268274	240240	221227	146146	150150	212212	154157	168168
1	4	BBT1_C17	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
1	2	BBT1_C18	108114	184184	268274	240240	221227	146146	150150	212212	154157	168168
1	1	BBT1_C19	108114	184184	268274	240249	221227	146146	150150	212212	154157	168168
1	4	BBT1_D20	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
1	4	BBT1_D21	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
1	2	BBT1_D22	108114	184184	268274	240240	221227	146146	150150	212212	154157	168168
1	2	BBT1_D23	108114	184184	268274	240240	221227	146146	150150	212212	154157	168168
1	5	BBT1_D24	108114	184184	268268	240240	221227	146146	150150	212212	154157	168168
1	8	BBT1_D25	114114	178184	268274	246252	227227	146146	150150	202202	145149	168168
1	4	BBT1_E26	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
1	9	BBT1_E27	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	242242	154157	168168
1	2	BBT1_E28	108114	184184	268274	240240	221227	146146	150150	212212	154157	168168
1	2	BBT1_E29	108114	184184	268274	240240	221227	146146	150150	212212	154157	168168
1	4	BBT1_E30	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
1	4	BBT1_E31	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
1	4	BBT1_E32	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
1	4	BBT1_E33	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
1	4	BBT1_E34	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168

1	2	BBT1_E36	108114	184184	268274	240240	221227	146146	150150	212212	154157	168168
1	2	BBT1_E37	108114	184184	268274	240240	221227	146146	150150	212212	154157	168168
1	5	BBT1_E38	108114	184184	268268	240240	221227	146146	150150	212212	154157	168168
1	2	BBT1_E39	108114	184184	268274	240240	221227	146146	150150	212212	154157	168168
1	2	BBT1_E40	108114	184184	268274	240240	221227	146146	150150	212212	154157	168168
2	10	BBT2_A1	114114	181184	271271	240252	224224	142146	150150	242242	145154	168168
2	9	BBT2_A2	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	242242	154157	168168
2	9	BBT2_A3	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	242242	154157	168168
2	11	BBT2_A4	114114	181181	271271	240252	224224	142146	150150	242242	145154	168168
2	12	BBT2_A5	114129	181187	271292	240246	224224	142146	150150	222222	145157	168168
2	11	BBT2_A6	114114	181181	271271	240252	224224	142146	150150	242242	145154	168168
2	13	BBT2_A7	114114	178184	268274	240252	221227	142146	150150	202298	145157	168168
2	9	BBT2_A8	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	242242	154157	168168
2	9	BBT2_A9	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	242242	154157	168168
2	14	BBT2_B10	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	202242	154157	168168
2	9	BBT2_B11	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	242242	154157	168168
2	11	BBT2_B12	114114	181181	271271	240252	224224	142146	150150	242242	145154	168168
2	9	BBT2_B13	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	242242	154157	168168
2	9	BBT2_B14	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	242242	154157	168168

2	11	BBT2_B15	114114	181181	271271	240252	224224	142146	150150	242242	145154	168168
2	15	BBT2_B16	108114	178184	268268	246258	221221	146158	150150	212298	145145	168168
2	11	BBT2_B17	114114	181181	271271	240252	224224	142146	150150	242242	145154	168168
2	16	BBT2_C18	108114	178184	268268	246258	221221	146158	150150	202298	145145	168168
2	17	BBT2_C19	108114	184184	268274	240249	221227	142146	150150	212212	154157	168168
2	17	BBT2_C20	108114	184184	268274	240249	221227	142146	150150	212212	154157	168168
2	17	BBT2_C21	108114	184184	268274	240249	221227	142146	150150	212212	154157	168168
2	17	BBT2_C22	108114	184184	268274	240249	221227	142146	150150	212212	154157	168168
2	17	BBT2_C23	108114	184184	268274	240249	221227	142146	150150	212212	154157	168168
2	17	BBT2_C24	108114	184184	268274	240249	221227	142146	150150	212212	154157	168168
2	18	BBT2_C25	108114	184184	??	240240	221221	146146	150150	212212	154157	168168
2	17	BBT2_D27	108114	184184	268274	240249	221227	142146	150150	212212	154157	168168
2	19	BBT2_D28	108114	184184	268268	??	221227	142146	150150	212212	154157	168168
2	17	BBT2_D29	108114	184184	268274	240249	??	142146	150150	212212	154157	168168
2	17	BBT2_D30	108114	184184	268274	240249	221227	142146	150150	212212	154157	168168
2	17	BBT2_D31	108114	184184	268274	240249	221227	142146	150150	212212	154157	168168
2	20	BBT2_D32	114114	181181	268271	240252	224224	142146	150150	242242	145154	168168
2	21	BBT2_E33	114117	181181	271274	240252	224224	142149	150150	242242	145154	168168
2	22	BBT2_E34	114114	178181	271274	240258	224224	142149	150150	242242	154157	168168

2	23	BBT2_E35	114117	181181	271274	258258	224224	142149	150150	242242	154157	168168
2	9	BBT2_E36	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	242242	154157	168168
2	17	BBT2_E37	108114	184184	268274	240249	221227	142146	150150	212212	154157	168168
2	17	BBT2_E38	108114	184184	268274	240249	221227	142146	150150	212212	154157	168168
2	11	BBT2_F39	114114	181181	271271	240252	224224	142146	150150	242242	145154	168168
2	9	BBT2_F40	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	242242	154157	168168
2	9	BBT2_F41	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	242242	154157	168168
2	11	BBT2_F42	114114	181181	271271	240252	224224	142146	150150	242242	145154	168168
2	11	BBT2_F43	114114	181181	271271	240252	224224	142146	150150	242242	145154	168168
3	24	BHM3_A1	114114	178184	268268	240252	221227	142146	150150	202298	145157	168168
3	25	BHM3_A2	114114	178184	268274	240252	221227	146146	150150	202298	145157	168168
3	13	BHM3_A3	114114	178184	268274	240252	221227	142146	150150	202298	145157	168168
3	13	BHM3_A4	114114	178184	268274	240252	221227	142146	150150	202298	145157	168168
3	26	BHM3_A5	108114	184184	268274	246249	221227	155158	150150	212212	145157	168168
3	4	BHM3_A6	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
3	4	BHM3_A7	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
3	13	BHM3_A8	114114	178184	268274	240252	221227	142146	150150	202202	145157	168168
3	4	BHM3_A9	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
3	27	BHM3_A10	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	222237	154157	168168

3	28	BHM3_B11	114117	181181	271274	240258	224224	149155	150150	237237	154157	168168
3	29	BHM3_B12	114114	178184	268274	240240	221227	146155	150150	202202	145157	168168
3	30	BHM3_B13	108114	184184	268274	240249	221227	155158	150150	212212	145157	168168
3	31	BHM3_B14	108114	184184	268274	240249	221227	146155	150150	212212	145157	168168
3	32	BHM3_B15	108114	184184	268274	246249	221227	155155	150150	212212	145157	168168
3	28	BHM3_B16	114117	181181	271274	240258	224224	149155	150150	237237	154157	168168
3	28	BHM3_B17	114117	181181	271274	240258	224224	149155	150150	237237	154157	168168
3	13	BHM3_B18	114114	178184	268274	240252	221227	142146	150150	202298	145157	168168
3	13	BHM3_B19	114114	178184	268274	240252	221227	142146	150150	202298	145157	168168
3	13	BHM3_B20	114114	178184	268274	240252	221227	142146	150150	202298	145157	168168
3	13	BHM3_B21	114114	178184	268274	240252	221227	142146	150150	202298	145157	168168
3	13	BHM3_B22	114114	178184	268274	240252	221227	142146	150150	202202	145157	168168
3	33	BHM3_C23	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	202298	145157	168168
3	34	BHM3_C24	114114	181184	271274	240246	227227	155155	150150	207207	145157	168168
3	34	BHM3_C25	114114	181184	271274	240246	227227	155155	150150	207207	145157	168168
3	28	BHM3_C26	114117	181181	271274	240258	224224	149155	150150	237237	154157	168168
3	4	BHM3_C27	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
3	35	BHM3_C28	108114	184184	268274	240249	221227	155158	150150	212212	154157	168168
3	33	BHM3_C29	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	202298	145157	168168

3	4	BHM3_C30	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
3	33	BHM3_D31	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	202298	145157	168168
3	36	BHM3_D32	114114	181181	271271	240252	224224	146155	150150	242242	145154	168168
3	33	BHM3_D33	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	202298	145157	168168
3	37	BHM3_D34	114117	181181	271274	240258	224224	142155	150150	237237	154157	168168
3	38	BHM3_D35	114117	181181	271274	240258	224224	149155	150150	242242	154157	168168
3	36	BHM3_D36	114114	181181	271271	240252	??	146155	150150	242242	145154	168168
3	4	BHM3_D37	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
3	26	BHM3_D38	108114	184184	268274	246249	221227	155158	150150	212212	145157	168168
3	4	BHM3_D39	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
3	39	BHM3_D40	114129	181187	271292	240246	224224	146158	150150	222222	145157	168168
4	4	BHM4_A1	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
4	40	BHM4_A2	108114	184184	268274	246246	221227	155158	150150	212212	145157	168168
4	41	BHM4_A3	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154154	168168
4	42	BHM4_A4	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	212212	145157	168168
4	33	BHM4_A5	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	202298	145157	168168
4	43	BHM4_A6	105114	181184	265271	240249	218224	146155	150150	212212	145154	168168
4	33	BHM4_A7	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	202298	145157	168168
4	33	BHM4_A8	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	202298	145157	168168

4	44	BHM4_A9	114114	178178	268268	252258	221221	142146	150150	202202	145145	168168
4	45	BHM4_A10	105114	181184	265271	240240	218224	146155	150150	212212	145154	168168
4	46	BHM4_A11	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	202212	145145	168168
4	43	BHM4_A12	105114	181184	265271	240249	218224	146155	150150	212212	145154	168168
4	47	BHM4_A13	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	202212	145157	168168
4	47	BHM4_A14	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	202212	145157	168168
4	26	BHM4_B15	108114	184184	268274	246249	221227	155158	150150	212212	145157	168168
4	47	BHM4_B16	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	202212	145157	168168
4	33	BHM4_B17	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	202298	145157	168168
4	33	BHM4_B18	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	202298	145157	168168
4	13	BHM4_B19	114114	178184	268274	240252	221227	142146	150150	212212	145157	168168
4	44	BHM4_B20	114114	178178	268268	252258	221221	142146	150150	202202	145145	168168
4	13	BHM4_B21	114114	178184	268274	240252	221227	142146	150150	202298	145157	168168
4	47	BHM4_B22	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	202212	145157	168168
4	47	BHM4_B23	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	202212	145157	168168
4	42	BHM4_B24	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	212212	145157	168168
4	42	BHM4_B25	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	212212	145157	168168
4	33	BHM4_B26	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	202298	145157	168168
4	26	BHM4_B27	108114	184184	268274	246249	221227	155158	150150	212212	145157	168168

4	33	BHM4_C28	114114	178184	268274	240252	221227	146158	150150	202298	145157	168168
4	4	BHM4_C29	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
4	48	BHM4_C30	114114	178184	265271	240249	221227	146158	150150	202300	145157	168168
4	4	BHM4_C31	114117	181181	271274	240258	224224	142149	150150	237237	154157	168168
4	49	BHM4_C32	114114	178184	268274	240252	221227	146146	150150	212212	145157	168168
4	16	BHM4_C33	108114	178184	268268	246258	221221	146158	150150	202298	145145	168168
4	50	BHM4_C34	114114	181184	271271	240246	227227	155158	150150	207207	145157	168168
4	51	BHM4_C35	114129	181187	271292	240246	224224	146146	150150	222222	145157	168168
4	52	BHM4_D36	114114	181181	271274	240252	224224	142146	150150	242242	145154	168168
4	51	BHM4_D37	114129	181187	271292	240246	224224	146146	150150	222222	145157	168168
4	51	BHM4_D38	114129	181187	271292	240246	224224	146146	150150	222222	145157	168168
4	28	BHM4_D39	114117	181181	271274	240258	224224	149155	150150	237237	154157	168168
4	51	BHM4_D40	114129	181187	271292	240246	224224	146146	150150	222222	145157	168168
4	53	BHM4_D41	114129	181187	271292	240240	224224	146158	150150	222222	145157	168168
5	34	COL_A5_1	114114	181184	271274	240246	227227	146155	150150	207207	145157	168168
5	54	COL_C1_2	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168
5	54	B_1_1	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168
5	54	B_3_1	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168
5	34	B_4_1	114114	181184	271274	240246	227227	??	150150	207207	145157	168168

5	54	B_5_1	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168
5	54	C_1_1	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168
5	55	C_2_1	114114	178184	268274	240252	221227	149155	150150	202202	145157	168168
5	54	C_3_1	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168
5	54	C_4_1	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168
5	54	C_5_1	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168
5	54	D_1_1	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168
5	54	D_2_1	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168
5	54	D_3_1	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168
5	54	D_4_1	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168
5	54	D_5_1	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168
5	54	E_1_1	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168
5	54	E_2_1	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168
5	54	E_3_1	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168
5	56	E_4_1	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	149149	168168
5	54	F_1_1	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168
5	54	F_2_1	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168
5	13	F_3_1	114114	178184	268274	240252	221227	142146	150150	??	145157	168168
5	57	F_4_1	114114	181184	??	240246	227227	146155	150150	207207	149157	168168

5	54	F_5_1	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168
5	58	OS5_C20	114117	178184	271274	246246	224224	155155	150150	202202	145145	168168
5	59	OS6_B11	114114	184184	274274	246246	227227	142142	150150	??	145154	168168
5	60	OS6_B12	114114	184184	274274	240246	227227	142146	150150	202202	145154	168168
5	61	OS6_C17	114114	178184	268274	258258	227227	142142	150150	202202	149149	168168
5	62	OS6_C18	114114	178184	268274	252258	227227	142142	150150	202202	149149	168168
5	62	OS6_C19	114114	178184	268274	252258	227227	142142	150150	202202	149149	168168
5	63	OS6_D27	114114	178184	268268	252258	227227	155155	150150	202202	149149	168168
5	62	OS6_D28	114114	178184	268274	252258	227227	142142	150150	202202	149149	168168
5	64	OS6_D29	114114	184184	274274	240246	227227	149155	150150	202202	145154	168168
5	65	OS6_D30	114117	178178	268271	246258	221224	149155	150150	202222	149149	168168
5	66	OS6_D33	114114	178184	268274	252258	227227	146155	150150	202202	149149	168168
5	54	OS6_E37	114117	178184	271274	246246	224224	149155	150150	202202	145145	168168

As populações numeradas de 1 a 5 representam os seguintes códigos e hospedeiros de origem: (1) BBT1, (2) BBT2, (3) BHM3, (4) BHM4, de *Brachiaria* spp. e (5) OS5, arroz. Descrição mais detalhada das populações é apresentada nas Tabela 1 e 2.

Os códigos TC01 a TC17 correspondem aos mesmos microssatélites descritos por ZALA et al. (2008). Cada loci é composto por dois alelos, representado por unidades numéricas de 3 casas. Por exemplo, para um isolado particular,

seu genótipo multiloci é definido pelo conjunto de dez loci microssatélites e deve ser lido da seguinte forma: TC01, genótipo heterozigoto 108/114, ... TC17, genótipo homozigoto 168/168.

O código do genótipo foi definido usando-se os programas GenoType / GenoDive (MEIRMANS e VAN TIENDEREN, 2004). Isolados com o mesmo código representam o mesmo genótipo.

?? Indica dados perdidos para o locus.