

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE ENGENHARIA  
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

**Danilo Augusto dos Santos Pereira**

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Rhizoctonia oryzae-sativae* DO  
ARROZ EM SÃO PAULO, BRASIL, E EM META, COLÔMBIA, E POTENCIAL  
ADAPTATIVO DO PATÓGENO À *Urochloa* spp.**

**ILHA SOLTEIRA  
2015**

**DANILO AUGUSTO DOS SANTOS PEREIRA**

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Rhizoctonia oryzae-sativae* DO  
ARROZ EM SÃO PAULO, BRASIL, E EM META, COLÔMBIA, E POTENCIAL  
ADAPTATIVO DO PATÓGENO À *Urochloa* spp.**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Engenharia - UNESP – Campus de Ilha  
Solteira, para obtenção do título de Mestre  
em Agronomia.

Especialidade: Sistemas de Produção

**Orientador:** Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini

**Ilha Solteira  
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

P436e Pereira, Danilo Augusto dos Santos.  
Estrutura genética de populações de *Rhizoctonia oryzae-sativa* do arroz em São Paulo, Brasil, e em meta, Colômbia, e potencial adaptativo do patógeno à *Urochloa* spp. / Danilo Augusto dos Santos Pereira. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2015  
45 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistema de Produção, 2015

Orientador: Paulo Cezar Ceresini  
Inclui bibliografia

1. Complexo de doenças. 2. Mancha agregada da bainha. 3. Pastagem.  
4. Sistema reprodutivo. 5. Fluxo gênico. 6. *Brachiaria*.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** Estrutura genética de populações de *Rhizoctonia oryzae-sativae* do arroz, em São Paulo, Brasil, e em Meta, Colômbia, e potencial adaptativo do patógeno à *Urochloa* spp.

**AUTOR:** DANILO AUGUSTO DOS SANTOS PEREIRA

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA ,  
Área: SISTEMAS DE PRODUÇÃO, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI

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



Prof. Dr. ANTONIO DE GOES

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



Prof. Dr. DANIEL AUGUSTO SCHURT

Área de Fitopatologia / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Data da realização: 30 de março de 2015.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**DANILO AUGUSTO DOS SANTOS PEREIRA** – nascido no dia 16 de Março de 1989, na cidade de Ilha Solteira, SP. É engenheiro agrônomo pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp). Em Fevereiro de 2013, iniciou o Mestrado em Agronomia, área de Sistema de Produção na Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS), Unesp, campus de Ilha Solteira, com bolsa de estudo de Mestrado outorgada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.

À minha mãe, Zilda de Fátima Pereira dos Santos, e meu pai, José Verismar Pereira, com todo o meu amor. Por todos ensinamentos, amor, apoio e por serem meus exemplos nesta vida.

## **DEDICO**

A toda minha família por acreditarem em mim

**OFEREÇO**

## **Agradecimentos**

Ao professor Dr. Paulo Cezar Ceresini pela oportunidade, orientação, paciência e confiança. Por provar que é possível alcançar objetivos na carreira sem abrir mão de valores éticos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela bolsa de Mestrado (2013/11944-0).

Aos membros da banca, Prof. Dr. Antonio de Goes (Unesp-FCAV) e Dr. Daniel Augusto Shurt (EMBRAPA Roraima), pelas contribuições nesta dissertação.

Ao Dr. Helio Minoru Takada (APTA – Vale do Paraíba), pela colaboração no processo de amostragem na região do Vale do Paraíba.

Aos amigos Dr. Edison Chavarro Mesa e Dra. Vanina Lilián Castroagudín, pelos valiosos ensinamentos na rotina laboratorial, confiança e amizade. Vocês me mostraram que amizade não possui nacionalidade.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia Unesp – Ilha Solteira: Régis Fialho, Nadia Poloni, Adriano Dorigan, Matheus Negrisoni, Samara Campos, Mauro Pegolo, Diego Feitosa, Suellen Moreira, Giselle de Carvalho, Juliana Reges e Samanta de Oliveira. Por todo companheirismo, apoio e momentos de descontração.

Aos amigos: Bruno Alves, Fernando Hernandez, Weverton Bomfim, Leandro Bomfim, Leonardo Bomfim, Kesler André, Marcelo Buzutti, Clissia Tyrell, Seth Cartwright, Ismael da Silva, Laíza Silva, Mateus Barni, Tatiane Mendes e Camilo Carranza.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta dissertação.

## RESUMO

O complexo de manchas da bainha do arroz engloba três doenças causadas por diferentes espécies de *Rhizoctonia*: a queima-da-bainha (causada *R. solani* AG-1 IA), a mancha agregada da bainha (*R. oryzae-sativae*) e a mancha da bainha (*R. oryzae*). Distinguir os agentes causais é um passo crítico para manejá-los eficazmente. Em levantamento recente efetuado em cinco áreas de cultivo de arroz no Vale do Paraíba, Brasil, e nos Llanos na Colômbia, *R. oryzae-sativae*, o patógeno da mancha agregada da bainha, foi a espécie predominante em ambos os países. Neste estudo, nosso principal objetivo foi determinar a estrutura genética das populações de *R. oryzae-sativae* do arroz no agroecossistema da região do Vale do Paraíba e nos Llanos Colombianos. Inferiu-se sobre o fluxo gênico entre populações do patógeno, dentro e entre os países, e sobre o modo reprodutivo predominante. Nosso segundo objetivo foi determinar o potencial de duas populações brasileiras de *R. oryzae-sativae* em adaptar-se a espécies forrageiras do gênero *Urochloa*. Uma vez que essas espécies de forrageiras são cultivadas em áreas adjacentes ou em rotação com arroz, podem estar exercendo elevada pressão de seleção sobre as populações de *R. oryzae-sativae*. Análises da estrutura genética de populações foram baseadas na genotipagem de isolados de quatro populações do patógeno usando cinco marcadores microssatélites. Populações próximas e distantes apresentaram indícios de fluxo gênico. Evidências de reprodução sexuada nas populações do patógeno e a baixa fração clonal, indicaram a predominância de um sistema reprodutivo recombinante. É provável que basidiósporos desempenhem papel mais importante no ciclo da doença do que se supunha anteriormente. Isolados das duas populações brasileiras de *R. oryzae-sativae* foram patogênicos e apresentaram variação na agressividade à *Urochloa* spp., porém com baixos índices de herdabilidade, indicando adaptação ainda limitada à *Urochloa* spp..

**Palavras-chave:** Complexo de doenças. Mancha agregada da bainha. Pastagem. Sistema reprodutivo. Fluxo gênico. *Brachiaria*.



## ABSTRACT

The rice sheath-blight complex comprises three diseases caused by different *Rhizoctonia* species: sheath blight (caused by *R. solani* AG-1 IA), aggregated sheath spot (*R. oryzae-sativae*), and sheath spots (*R. oryzae*). To be able to distinguish among the causal agents is a critical step in order to manage them effectively. In a recent survey in five rice cropping areas from the Paraíba Valley region, Brazil, and from the Llanos in Colombia, *R. oryzae-sativae* (the aggregated sheath spot pathogen) was the predominant species on both countries. In this study, our primary objective was to determine the genetic structure of populations of *R. oryzae-sativae* from rice paddy fields sampled from the Paraíba Valley and the Colombian Llanos. We inferred about gene flow among populations within and between countries and the pathogen's main reproductive mode. The second objective was to infer the potential of the two Brazilian populations of *R. oryzae-sativae* to adapt and become pathogen of forage pastures of the genus *Urochloa*. Once these forage species are intensively cropped in adjacent areas or under rotation with rice, they might be exerting strong selection pressure on *R. oryzae-sativae* populations. Population structure analyses were based on genotyping fungal isolates from four populations of the pathogen using five microsatellites markers. Gene flow was detected among geographically close and distant populations. Evidences of sexual reproduction and low clonal fraction found in the populations, indicated the predominance of a mixed reproductive system. It is plausible that basidiospores play a more important role on the disease cycle than previously thought. Isolates from the two Brazilian populations of *R. oryzae-sativae* were pathogenic and varied on aggressiveness to *Urochloa* spp. However, low levels of heritability for aggressiveness were detected, indicating a yet limited adaptation to *Urochloa* spp..

**Keywords:** Disease complex. Aggregated sheath spot. Forage pastures. Reproductive system. Genetic flow. *Brachiaria*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
3.1	AMOSTRAGEM DE POPULAÇÕES, PRESERVAÇÃO E GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DO PATÓGENO.....	14
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA E IDENTIFICAÇÃO DE <i>R. ORYZAE-SATIVAE</i> .....	14
3.3	GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE <i>R. ORYZAE-SATIVAE</i> .....	14
3.4	DIVERSIDADE GENOTÍPICA, GÊNICA E DIFERENCIAÇÃO ENTRE POPULAÇÕES GEOGRÁFICAS.....	15
3.5	TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG E DESEQUILÍBRIO GAMÉTICO.....	16
3.6	COMPONENTES DE EVOLUTIBILIDADE PARA ADAPTAÇÃO FENOTÍPICA DE <i>R. ORYZAE-SATIVAE</i> DO ARROZ À <i>UROCHLOA</i> SPP..	17
3.7	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE DIFERENCIAÇÃO ENTRE AS POPULAÇÕES BRA1 E BRA2 POR CARACTERES QUANTITATIVOS ( $Q_{ST}$ ).....	19
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
4.1	ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICO-POPULACIONAL.....	19
4.2	AGRESSIVIDADE E ADAPTABILIDADE DE <i>R. ORYZAE-SATIVAE</i> À <i>UROCHLOA</i> SPP.....	20
4.3	DIFERENCIAÇÃO FENOTÍPICA ENTRE POPULAÇÕES BRA1 E BRA2....	21
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>26</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>27</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Rhizoctonia solani* AG-1 IA emergiu no início de 1990 em pastagens do gênero *Urochloa* na América do Sul, associando-se a sintomas de queima e morte de pastagens. A emergência da queima das pastagens foi relatada pela primeira vez na Colômbia, em áreas de cultivo de arroz, hospedeiro altamente suscetível, que foram substituídas por pastagens de *Urochloa* (LEE; RUSH, 1983; HASHIBA; KOBAYASHI, 1996). Além de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, *R. oryzae* e *R. oryzae-sativae* foram relatados no Brasil, constituindo o complexo de manchas e queima na cultura do arroz (AMARAL et al., 1979; NUNES; RIBEIRO; TERRES, 2004).

Conhecer a importância relativa das espécies de *Rhizoctonia* associadas ao complexo das queimas e manchas da bainha em arroz é relevante para o manejo da doença que depende, basicamente, da resistência varietal e controle químico (NUNES; RIBEIRO; TERRES, 2004).

Há ausência de informação sobre a estrutura genética de populações de *R. oryzae-sativae* associadas à mancha agregada da bainha do arroz na América do Sul. Desconhece-se, também, se populações locais de *R. oryzae-sativae* associadas ao arroz, em áreas adjacentes a pastagens no estado de São Paulo, poderiam vir a se adaptar e emergir como patógeno de *Urochloa* spp.. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo geral determinar a estrutura genética de populações de *R. oryzae-sativae* do arroz no agroecossistema da região do Vale do Paraíba, São Paulo, e nos Llanos Colômbianos, em Meta, usando um conjunto de marcadores microssatélites (sequências simples repetidas = SSR). Os principais objetivos específicos foram:

- i. Determinar se as populações de *R. oryzae-sativae* são geneticamente subdivididas ou exibem fluxo gênico significativo. Baseando-se em informação, *a priori*, de que há elevado fluxo gênico entre populações de *R. oryzae-sativae* geograficamente próximas (CHAIJUCKAM et al., 2010), nossa hipótese H<sub>0</sub> é de que não há subdivisão entre populações geográficas de *R. oryzae-sativae* do arroz do Vale do Paraíba ou de Meta, na Colômbia.
- ii. Determinar se a estrutura genética do patógeno nestas duas regiões é consistente com o de uma população com modo reprodutivo recombinante. Nossa hipótese H<sub>0</sub> é que a população exibirá um sistema reprodutivo misto, caracterizado por cruzamento ao acaso e dispersão local de um número pequeno de clones. Uma

hipótese alternativa é que a população é altamente assexual apresentando uns poucos clones bem adaptados que estão amplamente distribuídos pela região.

- iii. Determinar se populações locais de *R. oryzae-sativae* do agroecossistema do Vale do Paraíba tem potencial para emergir como patógeno a *Urochloa*.

## 2 DESENVOLVIMENTO

Na América, várias espécies de fungos dos gêneros *Rhizoctonia*, como *R. solani* AG-1 IA (fase sexuada *Thanatephorus cucumeris*), *R. circinata* var. *oryzae*, *R. circinata* var. *zeae*, *R. circinata* var. *circinata* (*Waitea circinata*) e *R. oryzae-sativae* (*Ceratobasidium oryzae-sativae*), estão associadas ao complexo de doenças das queimas e manchas da bainha nas regiões arrozeiras da Argentina (GUTIÉRREZ, 2007), Brasil (PRABHU et al., 2002; COSTA-SOUZA et al., 2007), Chile (MADARIAGA; MORALES; ALVARADO, 1999), EUA (LEE; RUSH, 1983; SAYLER; YANG, 2007; CHAIJUCKAM; MICHAEL DAVIS, 2010) e Venezuela (MALAGUTI, 1951; CEDEÑO et al., 1996). Especificamente, *R. solani* AG-1 IA está associada com a queima da bainha, *R. oryzae* com a mancha da bainha e *R. oryzae-sativae* com a mancha agregada da bainha.

No Brasil, *R. solani* AG-1 IA, *R. circinata* e *R. oryzae-sativae* foram identificados, pela primeira vez, como agentes causais das doenças da bainha do arroz em lavouras de arroz no interior do estado de São Paulo em 1967 e, em seguida, no Rio Grande do Sul em 1970 (AMARAL et al., 1979; NUNES; RIBEIRO; TERRES, 2004). Com relação à importância do complexo de doenças das queimas e manchas da bainha nas regiões arrozeiras, em outros biomas tropicais fora do Brasil, são relatadas perdas de produção de até 25% causadas por *R. circinata* e *R. oryzae-sativae* em arroz (LANOISELET et al., 2001). Onde predomina a incidência da queima da bainha de *R. solani* AG-1 IA, estimam-se perdas de até 50% da produção (SAVARY et al., 2000; WILLOCQUET; FERNANDEZ; SAVARY, 2000).

Conhecer a importância relativa das espécies de *Rhizoctonia* associadas ao complexo das queimas e manchas da bainha em arroz é relevante para o manejo da doença que depende, basicamente, da resistência varietal e controle químico (NUNES; RIBEIRO; TERRES, 2004). Nosso grupo de pesquisa detectou a prevalência de *R. oryzae-sativae*, ao todo 60,5% de todos os fungos amostrados, associada ao complexo de manchas da bainha do arroz no Vale do Paraíba, São Paulo, em 2013 (PEREIRA et al., 2014). O patógeno predominou do mesmo modo em duas áreas de arroz amostradas em Meta, nos Llanos colombianos, em 2011 (representando 71,2% da amostra populacional = 52 isolados) (RAMOS MOLINA, 2012).

A ausência de informações sobre aspectos relevantes da ecologia e biologia de populações de *R. oryzae-sativae* têm contribuído para o insucesso do manejo do

complexo de manchas da bainha do arroz (CHAIJUCKAM; MICHAEL DAVIS, 2010). Sob o ponto de vista ecológico, é plausível que na ausência do cultivo do arroz, *R. oryzae-sativae* desenvolva parte do seu ciclo em outras poáceas hospedeiras amplamente cultivadas na América Latina, como as espécies de pastagens do gênero *Urochloa*, anteriormente classificadas como *Brachiaria* (LANOISELET; COTHER; ASH, 2007). A sobreposição geográfica de arroz e de pastagens do gênero *Urochloa*, tanto no Brasil quanto na Colômbia, é um fator importante que poderia levar populações locais de *R. oryzae-sativae* do arroz a adaptar-se e emergir como patógeno de *Urochloa* spp..

Observações sobre a biologia de populações de fitopatógenos do gênero *Rhizoctonia* feitas na última década sugerem que este patógeno possui alto potencial evolutivo, podendo emergir como fitopatógeno em novos hospedeiros, por apresentar sistema reprodutivo misto, que inclui a reprodução sexuada e a dispersão de clones adaptados, alto fluxo gênico e tamanho populacional e diversidade genética elevados (CIAMPI et al., 2008; BERNARDES DE ASSIS et al., 2009; GONZÁLEZ-VERA et al., 2010; PADASHT-DEHKAEI et al., 2013).

Especificamente para *R. solani* AG-1 IA, a compilação de informação sobre a estrutura genética de populações revelou aspectos importantes, e até então desconhecidos, da biologia do patógeno. Propôs-se, por exemplo, que novos genótipos de *R. solani* AG-1 IA podem ser produzidos nos eventos de recombinação que ocorrem em populações do patógeno durante o ciclo de crescimento do arroz (CIAMPI, 2008). Os novos genótipos favorecidos pela seleção natural podem aumentar em frequência, via reprodução assexuada, dentro de cada campo, espalhando-se como clones a curtas distâncias por meio de micélio ou escleródios, e por longas distâncias associados a sementes contaminadas, palha de arroz e equipamentos (PADASHT-DEHKAEI et al., 2013).

Classificado como patógeno de alto potencial evolutivo, *R. solani* AG-1 IA tem emergido em novos hospedeiros via troca ou pulo de hospedeiros (BERNARDES DE ASSIS et al., 2008; GONZÁLEZ-VERA et al., 2008). Mais recentemente, há relatos que nos Llanos orientais colombianos (RAMOS MOLINA et al., 2015) e em Rondônia (CHAVARRO MESA et al., 2014), *R. solani* AG-1 IA emergiu como importante agente causal da queima das folhas e morte de pastagens do gênero *Urochloa* (CENTRO INTEGRADO DE ATENDIMENTO AO TRABALHADOR - CIAT, 1993). Postula-se que essas populações que emergiram em *Urochloa* spp. sejam originalmente populações

que infectavam arroz (RAMOS MOLINA et al., 2015). Outro relato de troca de hospedeiros, entre poáceas, na América do Sul ocorreu na Venezuela, com populações de *R. solani* AG-1 IA de arroz, em milho (GONZÁLEZ-VERA et al., 2010).

Estudo recente sobre a estrutura genética de populações de *R. oryzae-sativae* em arroz na Califórnia, EUA, indicou equilíbrio gamético para a maioria dos marcadores microssatélites, indicando predominância do modo reprodutivo sexual e fluxo gênico elevado entre populações geográficas do patógeno. O resultado foi contra a premissa de que se predominava modo reprodutivo assexuado com dispersão do patógeno principalmente por escleródios. Os autores postularam que os basidiósporos são, provavelmente, a principal via de fluxo gênico entre populações, incluindo a curta e a longa distância (CHAIJUCKAM et al., 2010). De acordo com o modelo de risco proposto por McDonald e Linde, estas características colocam tanto *R. solani* AG-1 IA quanto *R. oryzae-sativae* entre os patógenos com maior potencial evolutivo. O manejo desses patógenos é baseado em fungicidas sistêmicos associados ao uso de genes maiores de resistência, devendo ser implementado com cuidado para evitar que tanto os caracteres que conferem resistência a fungicidas quanto virulência sejam transferidos às progênes por eventos de recombinação (MCDONALD; LINDE, 2002a; WILLI et al., 2011).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 AMOSTRAGEM DE POPULAÇÕES, PRESERVAÇÃO E GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DO PATÓGENO.**

Os isolados utilizados neste estudo foram obtidos por amostragem de populações de *R. oryzae-sativae*, agente da mancha agregada da bainha, em áreas de cultivo comercial de arroz (Tabela 1 e Figura 1). No Vale do Paraíba, em SP, foram amostradas áreas de arroz em Guaratinguetá, Pindamonhangaba, Roseira, Taubaté e Tremembé, em 2013. Foi usado o sistema de amostragem por transectos lineares compostos por seis linhas em cada área e sete a nove pontos por linha. Os isolados de Meta, Colômbia, foram amostrados no ano de 2011 em Puerto López e Villavicencio, seguindo a mesma metodologia de amostragem. O isolamento do patógeno foi efetuado em meio de cultura seletivo Ko & Hora modificado (KO; HORA, 1971), e a purificação de culturas por transferência para meio de BDA+ (batata – dextrose – ágar, Himédia, contendo 50 µg.mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol e estreptomicina).

Para preservação de culturas por longo prazo, escleródios do fungo obtidos de culturas crescidas em BDA+, por dez dias, foram transferidos para crio-tubos de 2 mL contendo sílica gel esterilizada. Isolados do patógeno foram também conservados em grãos de arroz parboilizado esterilizados, adicionados ao topo de culturas puras com três dias de idade crescidas em BDA+. O período de colonização dos grãos pelo patógeno foi de 10 dias. Os escleródios ou os grãos de arroz colonizados foram transferidos para tubos contendo sílica gel e armazenados em freezer a -20°C (BERNARDES DE ASSIS et al., 2008). Neste estudo foram utilizados 44 isolados do Vale do Paraíba e 44 isolados de Meta.

### 3.2 EXTRAÇÃO DE DNA E IDENTIFICAÇÃO DE *R. ORYZAE-SATIVAE*.

Micélio fúngico foi produzido cultivando-se os isolados em meio líquido de batata-dextrose (Himédia, contendo 50 µg.mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol e estreptomicina) por cinco dias a 25°C sob agitação a 75 rpm. A extração de DNA de micélio fúngico liofilizado por 24 h foi efetuada utilizando-se o GenElute™ *Plant Genomic DNA Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, Estados Unidos). Para confirmação da identidade dos isolados de *R. oryzae-sativae*, foi utilizado o teste diagnóstico baseando em iniciadores específicos para *R. oryzae-sativae*, *R. circinata* e *R. solani* AG-1 IA, com as mesmas condições de amplificação descritas por (JOHANSON et al., 1998; MATSUMOTO, 2002).

### 3.3 GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE *R. ORYZAE-SATIVAE*.

Para responder às questões sobre o modo reprodutivo e a diferenciação genética entre populações do patógeno, isolados de *R. oryzae-sativae* foram genotipados usando cinco marcadores codominantes do tipo microssatélite (SSR) (CHAIJUCKAM et al., 2010). Todos os *primers* (iniciadores) *forward* (senso) foram sintetizados para conter uma cauda de sequência 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3' (M13F). Cada loco SSR foi marcado com fluorescência adicionando-se, na reação da polimerase em cadeia (PCR), um iniciador extra contendo sequência semelhante ao primer M13F e marcado com um dos fluoróforos: 6-FAM, NED, VIC ou PET (Life Technologies, EUA) (SCHUELKE, 2000). As reações de PCR foram realizadas separadamente para cada loco 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 0,5 µM do M13F marcado com fluoróforo, 1 unidade de Taq



polimerase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, Estados Unidos). Para todos os conjuntos de *primers* as amplificações incluíram uma desnaturação inicial por 3 min a 94°C, seguida por 30 ciclos de desnaturação por 35 seg. a 95°C, pareamento por 30 seg. a 55°C e alongação por 40 seg. a 72°C, além de uma extensão final de 8 min a 72°C. Para detecção por análise de fragmentos usou-se GeneScan 500 Liz como marcador de tamanho, e as amostras foram processadas em analisador genético de DNA ABI 3700 (Applied Biosystems, Grand Island, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante. As análises de fragmentos de DNA foram efetuadas na empresa Macrogen Inc. (Coréia do Sul). Os isolados COS11COL\_OS5\_C17 e COSVP\_GTD6 foram inclusos como controle para garantir a reprodutibilidade dos resultados. A identificação dos alelos para cada marcador foi efetuada usando o programa Geneious (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia).

### 3.4 DIVERSIDADE GENOTÍPICA, GÊNICA E DIFERENCIAÇÃO ENTRE POPULAÇÕES GEOGRÁFICAS.

Genótipos multiloci foram determinados usando-se o programa GENODIVE (MEIRMANS; VAN TIENDEREN, 2004). Isolados com o mesmo genótipo multiloci foram considerados como clones. Os seguintes índices de diversidade genotípica foram determinados: i) número de genótipos por população; ii) fração clonal, calculado como  $1 - (\text{número de genótipos diferentes}) / (\text{número total de alelos})$ ; iii) diversidade genotípica de Stoddart ( $G_o$ ) (STODDART; TAYLOR, 1988) e (iv) equitatividade (ZHAN; PETTWAY; MCDONALD, 2003). Testou-se a significância estatística das diferenças em diversidade genotípica entre pares de populações usando *bootstrap* (reamostragem com substituição), onde indivíduos de cada população foram reamostrados e os índices de diversidade foram recalculados e comparados após cada rodada, em 1.000 permutações (MANLY, 1991).

Para as análises posteriores foram usados dados corrigidos para clones, incluindo apenas um indivíduo de cada genótipo multiloci microssatélite por população. Foram determinadas: i) Diversidade genética de Nei ( $H_s$ ), estimada como  $n/(n-1) * (1 - \sum p_i^2)$ , onde  $p_i$  é a frequência observada do alelo  $i$  (NEI, 1978); ii) Frequência observada de heterozigotos dentro das populações ( $H_o$ ) (NEI, 1987) iii) Riqueza alélica, estimada pela média do número de alelos por loco (EL MOUSADIK; PETIT, 1996) usando rarefação (HURLBERT, 1971), como descrito por Petit et al. (PETIT; EL MOUSADIK; PONS, 1998). Para testar se grupos de populações diferiam

quanto à diversidade gênica e à riqueza alélica, foi usado o programa FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). Valores de  $p$  para significância das diferenças observadas entre pares de média foram obtidos por 1.000 permutações usando *bootstrap*.

O grau de subdivisão populacional e a distribuição de diversidade gênica entre populações regionais simpátricas de *R. oryzae-sativae* do arroz no Vale do Paraíba, Brasil, e na Colômbia foram avaliados com base em índices de fixação par-a-par (estatística  $\Phi_{ST}$ , análoga ao  $F_{ST}$ ). A significância dos índices de fixação foi testada por meio de uma abordagem não paramétrica com 1.023 permutações usando o programa ARLEQUIN versão 3.11 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005).

### 3.5 TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG E DESEQUILÍBRIO GAMÉTICO.

Visando acessar a contribuição relativa da recombinação para a estrutura genética das populações de *R. oryzae-sativae* do arroz, foram investigadas associações dentro e entre os locos usando testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e associações multilocos, respectivamente. Para o teste de EHW, que examina a associação aleatória de alelos dentro de cada loco, testando o ajuste das frequências esperadas sob EHW (HARTL; CLARK, 1997) para cada população, foi empregado um teste análogo ao teste exato de Fisher (GUO; THOMPSON, 1992). Valores de  $p$  foram obtidos usando abordagem de MCMC, gerando uma distribuição exata de probabilidade não enviesada por alelos raros ou tamanho amostral reduzido (RAYMOND; ROUSSET, 1995), implementado em ARLEQUIN versão 3.11 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005). Foi também calculado o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ), segundo Weir e Cockerman (1984), para verificar se havia déficit ou excesso significativo de heterozigotos, em relação às expectativas no EHW, e os respectivos valores de  $p$  baseando-se em 1.000 permutações, ambos implementados em ARLEQUIN 3.11 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005).

As associações entre locos foram examinadas usando como teste de desequilíbrio gamético o teste exato de Fisher (GARNIER-GERE; DILLMANN, 1992), baseado em algoritmo MCMC, com 1.000 aleatorizações, usando o programa GENEPOP versão 3.4 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Dois locos foram considerados em desequilíbrio gamético, ou desequilíbrio de ligação, quando valores de  $p$  foram iguais ou inferiores a 0,05, após correção de Bonferroni para múltiplas comparações. Igualmente, foi calculado o Índice de Associação ( $I_A$ ) para cada população (MAYNARD

et al., 1993), uma medida tradicional de desequilíbrio de ligação multilocos. As medidas foram testadas para significância com 1.000 aleatorizações e fixando dados perdidos, usando o programa MULTILOCUS versão 1.3 (AGAPOW; BURT, 2001), testando-se a hipótese nula de completa panmixia (isto é, nenhuma ligação entre pares de locos).

### 3.6 COMPONENTES DE EVOLUTIBILIDADE PARA ADAPTAÇÃO FENOTÍPICA DE *R. ORYZAE-SATIVAE* DO ARROZ À *UROCHLOA* SPP..

Para este estudo, foram selecionados, ao acaso, 12 genótipos diferentes da população BRA1 de *R. oryzae-sativae* e 12 genótipos diferentes da população BRA2. Foram utilizados três genótipos do hospedeiro: *U. brizantha* cv. Marandu, *U. brizantha* cv. BRS Piatã e *U. ruziziensis*. Um genótipo de arroz cv. Esmeralda foi utilizado como controle positivo, ou seja, hospedeiro suscetível a *R. oryzae-sativae*. Cada um dos hospedeiros foi semeado em copos plásticos contendo vermiculita e um grama da fórmula 15-15-20 (NPK). Após a germinação, deixou-se uma planta por copo. Cada um dos hospedeiros foi inoculado com os 24 genótipos do patógeno, além da inclusão de um tratamento testemunha sem inoculação do patógeno, totalizando 25 tratamentos. Devido ao número elevado de parcelas experimentais por hospedeiro (N = 250), foram conduzidos experimentos distintos para cada um dos quatro hospedeiros testados. Cada experimento foi delineado de forma inteiramente casualizada, com dez repetições. Cada um dos experimentos foi repetido uma vez.

Para a produção do inóculo, grãos de arroz parboilizado e esterilizados foram transferidos para placas de Petri contendo colônias dos isolados de *R. oryzae-sativae* em meio BDA, com sete dias de crescimento. Os grãos de arroz foram mantidos nas placas por cinco dias, a temperatura de 25°C, para que fossem colonizados pelo micélio fúngico. A inoculação foi realizada aos 23 dias após a emergência de *Urochloa* spp. e aos 30 dias do arroz. O inóculo consistiu de um grão de arroz colonizado, o qual foi posicionado na base da última ou penúltima folha, e mantido no interior de um pequeno cone de papel. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara-úmida, em casa de vegetação com temperatura diurna de 30°C ( $\pm 3^\circ\text{C}$ ) e noturna de 25°C ( $\pm 3^\circ\text{C}$ ). Grãos de arroz esterilizados e não colonizados constituíram o tratamento testemunha.

A avaliação dos sintomas de doença foi realizada seis dias após a inoculação dos hospedeiros, fotografando-se uma folha inoculada de cada tratamento, e

determinando-se a área foliar doente com auxílio do software de análise de imagens Assess (LAMARI, 2002).

Nesta etapa do estudo foram determinados: i) o efeito de duas populações do patógeno em três genótipos de *Urochloa* quanto a patogenicidade de *R. oryzae-sativae* do arroz aos hospedeiros; ii) os componentes evolutibilidade (isto é, uma medida do potencial adaptativo) do fungo para adaptar-se à *Urochloa*. A análise de variância (teste *F*) foi efetuada usando-se o procedimento estatístico PROC MIXED implementado no programa SAS (SAS\_INSTITUTE, 2008), analisando-se o efeito de isolados dentro de populações e o efeito de populações.

Para análise do efeito de populações do patógeno sobre os componentes de evolutibilidade para patogenicidade a cada hospedeiro, a variância explicada pelo fator isolados dentro de cada população foi interpretada como variância genética ( $V_G$ ) e o erro experimental foi considerado como variância ambiental ( $V_E$ ). A variância fenotípica foi calculada como  $V_P = V_G + V_E$ . Os componentes de variância foram determinados por procedimento estatístico implementado no programa R. As variâncias obtidas foram padronizadas pelo quadrado da média da agressividade dos genótipos do patógeno dentro de cada população ( $m_i^2$ ,  $i = 1 \dots n$  genótipos), onde:  $V_G/m_i^2 = I_{Gi}$ ;  $V_E/m_i^2 = I_{Ei}$ ; e  $V_P/m_i^2 = I_{Pi}$ , sendo então consideradas medidas de evolutibilidade ou de resposta à seleção (HOULE, 1992). A herdabilidade para o caráter agressividade do patógeno foi calculada como a razão entre a variância genotípica ( $I_G$ ) e a variância fenotípica ( $I_P$ ), ambas padronizadas ( $I_P = I_G + I_E$ ). O intervalo de confiança a 95% para as estimativas de herdabilidade foram calculados por meio de análise de *bootstrap* ordinário ou não-paramétrico (EFRON; TIBSHIRANI, 1993; DAVISON; HINKLEY, 1997), baseada em 999 reamostragens de dados originais, onde em cada reamostragem obteve-se os componentes de variâncias e as respectivas herdabilidades. O *bootstrap* foi implementado no ambiente R (R\_DEVELOPMENT\_CORE\_TEAM, 2008), onde utilizou-se os pacotes da distribuição base e o pacote "lme4" (BATES; MAECHLER, 2010), para obter os componentes de variância do modelo misto considerado.

### 3.7 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE DIFERENCIAÇÃO ENTRE AS POPULAÇÕES BRA1 E BRA2 POR CARACTERES QUANTITATIVOS ( $Q_{ST}$ ).

O nível de diferenciação populacional em caracteres quantitativos (i.e.  $Q_{ST}$ , que é análogo ao  $F_{ST}$ ) foi estimado com base em componentes de variância genética aditiva “entre” e “dentro de” populações, como descrito por Zhan et al. (2005), em estudo conduzido com a espécie haplóide de fungo fitopatogênico *Mycosphaerella graminicola*. Para espécies diplóides, ou organismos dicarióticos como *R. oryzae-sativae*, i.e. contendo dois núcleos independentes em cada célula, o nível de diferenciação populacional em caracteres quantitativos é expresso por:  $Q_{ST} = d_{AP}^2 / (d_{AP}^2 + 2d_{WP}^2)$ , onde:  $d_{AP}^2$  é a variância genética aditiva entre populações em cada condição estudada, e  $d_{WP}^2$  a variância genética aditiva dentro de populações. Os valores de  $Q_{ST}$  e o intervalo de confiança a 95% para as estimativas de  $Q_{ST}$  foram calculados por meio de análise de *bootstrap* implementado no ambiente R (R\_DEVELOPMENT\_CORE\_TEAM, 2008), com 999 reamostragens. Os valores de  $F_{ST}$  entre populações, bem como o intervalo de confiança a 95% para a estimativa baseado em *bootstrap* com 999 reamostragens, foram determinados usando-se o programa GENODIVE (MEIRMANS; VAN TIENDEREN, 2004). Comparou-se os padrões de variação genética ( $F_{ST}$ ) em marcadores microssatélites, com variação em caracteres quantitativos ( $Q_{ST}$ ) para inferir sobre a importância do efeito do processo de seleção natural atuando sobre as populações BRA1 e BRA2 de *R. oryzae-sativae* de arroz, utilizadas neste estudo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICO-POPULACIONAL.

Todos os cinco marcadores foram polimórficos, com exceção do marcador P36 que foi monomórfico para a população COL\_OS6. Ao todo, 14 alelos foram amplificados, com variação de dois (P02, P07 e P33) a até cinco alelos (P20) por marcador, e média de 2,8 alelos por loco (Tabela 2). O marcador P37, foi excluído de nosso estudo pois não produziu produtos de PCR, mesmo após inúmeras tentativas de otimização das condições de amplificação.

Dentre os 88 isolados analisados, distinguiram-se 68 genótipos multilocos (Tabela 3). A fração clonal foi a mesma, tanto para as populações amostradas no

Brasil, quanto na Colômbia, com 22% de clones. Ao todo foram compartilhados oito genótipos entre as duas populações colombianas e sete genótipos entre as duas brasileiras, com compartilhamento de cinco genótipos entre o Brasil e a Colômbia. Não foi constatada diferença significativa entre as populações quanto à diversidade genotípica e à equitatividade. As populações brasileiras tiveram os maiores valores para a riqueza alélica, enquanto a população COL\_OS6 apresentou o menor valor. Observou-se diferenças significativas entre populações quanto à heterozigosidade esperada ( $H_s$ , ou diversidade genética de Nei). A população BRA1 apresentou a maior heterozigosidade esperada ( $H_s = 0,49$ ), diferindo significativamente da população COL\_OS6, com a menor heterozigosidade ( $H_s = 0,40$ ).

As duas populações brasileiras apresentaram os cinco locos em EWH (Tabela 4). Por sua vez, nas duas populações da Colômbia (COL\_OS5 e COL\_OS6), detectou-se desvio significativo em dois e um loco, respectivamente. A população COL\_OS6 apresentou ainda valor significativo para o coeficiente de endogamia  $F_{IS}$  (0,28,  $p = 0,02$ ). As demais populações apresentaram  $F_{IS}$  positivo, porém não significativamente diferente de zero. O índice multilocos de desequilíbrio gamético foi significativo apenas para a população BRA2, com um par de locos em desequilíbrio. A variação genética entre populações medida pelo índice geral de fixação  $\Phi_{ST}$  foi de 0,055 ( $p \leq 0,05$ ). Não se detectou diferenciação genética entre dois pares de populações: BRA2 *versus* COL\_OS6 e BRA1 *versus* BRA2 (Tabela 5). Já entre as populações geneticamente diferenciadas, BRA2 e COL\_OS6 foi o par com maior nível de diferenciação ( $\Phi_{ST} = 0,105$ ,  $p = 0,001$ ).

#### 4.2 AGRESSIVIDADE E ADAPTABILIDADE DE *R. ORYZAE-SATIVAE* À *UROCHLOA* SPP..

Foram observados níveis baixos e estatisticamente semelhantes de agressividade para ambas as populações do patógeno, em duas variedades de *Urochloa* spp. e em arroz (Tabela 6, Figura 2). Por sua vez, o grupo de isolado da população BRA2 apresentou, em média, maior agressividade à *U. brizantha* cv. Marandu que os da população BRA1. Em *Urochloa*, a agressividade dos isolados variou entre 1% e 7% de área foliar infectada, enquanto em arroz a variação foi de 4,5% a 14,5%. Detectaram-se diferenças significativas entre isolados do patógeno dentro de populações nos quatro hospedeiros analisados. Entretanto, a variância ambiental estimada foi relativamente maior que a variância genética para agressividade em

ambas as populações de *R. oryzae-sativae* inoculadas tanto em *Urochloa* quanto em arroz (Figura 3). Isso refletiu em valores de herdabilidade para agressividade à *Urochloa* inferiores a 0,4 (Figura 3). Apenas a população BRA2 do patógeno, quando inoculada em *U. ruziziensis*, apresentou valor médio de herdabilidade para agressividade de 0,5 (com variação de  $\pm 0,05$ ).

#### 4.3 DIFERENCIAÇÃO FENOTÍPICA ENTRE POPULAÇÕES BRA1 E BRA2.

Os valores de  $F_{ST}$  entre as populações BRA1 e BRA2 foram significativamente inferiores aos de  $Q_{ST}$  em *U. brizantha* cv. Marandu, *U. brizantha* cv. Piatã e em arroz cv. Esmeralda. Não houve diferença significativa entre os valores de  $F_{ST}$  e  $Q_{ST}$  entre as populações de isolados inoculados em *U. ruziziensis* (Figura 4).

## 5 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo da estrutura genética de populações de *R. oryzae-sativae* do arroz no Brasil e na Colômbia. A hipótese nula apresentada foi a de que não há subdivisão entre populações geográficas de *R. oryzae-sativae* do arroz no Vale do Paraíba ou nos Llanos colombianos, em Meta. Em contraste, testou-se a hipótese alternativa de que as populações geograficamente distantes eram geneticamente diferenciadas, uma vez que há relatos de correlação entre distância geográfica e genética na estruturação de populações de *R. oryzae-sativae* e também de *R. solani* AG-1 IA (TAHERI; GNANAMANICKAM; HOFTE, 2007; BERNARDES DE ASSIS et al., 2009; CHAIJUCKAM; MICHAEL DAVIS, 2010).

De fato, nenhuma diferenciação genética entre as duas populações brasileiras foi observada, além de compartilharem genótipos do patógeno. Desde a década de 50 do século passado, o cultivo de arroz na região do Vale do Rio Paraíba do Sul é feito em várzeas usando um sistema de canais e diques que interligam os diferentes campos de arroz (PAES JUNIOR; SIMÕES, 2006). O fluxo contínuo de água do sistema de irrigação desviada do Rio Paraíba do Sul para campos individuais de arroz pode ter facilitado a dispersão de escleródios flutuantes e, conseqüentemente, favorecido o fluxo gênico e genotípico entre essas duas populações. Fenômeno semelhante de dispersão de *R. solani* AG-1 IA entre áreas irrigadas de arroz separadas por distâncias de 58 a 250 km foi detectado em populações do patógeno amostradas ao longo da bacia do Rio Yangtzé na China (BERNARDES DE ASSIS et

al., 2009). Escleródios de *Rhizoctonia* são hidrofóbicos e no início do cultivo, quando as áreas são inundadas, aqueles depositados no solo flutuam, sendo dispersos pela água, e quando atingem uma planta de arroz, germinam próximos à lâmina de água, infectando as bainhas e iniciam novo ciclo da doença (MILLER; WEBSTER, 2001). Contudo, foi detectada diferenciação genética entre as duas populações colombianas do patógeno, que estão distantes cerca de 90 km uma da outra. O cultivo de duas variedades distintas de arroz (em sistemas ecológicos distintos de cultivo) pode ter levado à diferenciação local das populações do patógeno. Na realidade, a população de *R. oryzae-sativae* amostrada em Puerto López (COL\_OS5) proveio de cultivo predominante de variedade de arroz F-50 adaptada a condição de sequeiro enquanto em Villavicencio (COL\_OS6) foi amostrada de variedade de arroz Thailandia, adaptada a condições de inundação.

Da mesma forma, o maior valor de  $\Phi_{ST}$  detectado refletiu diferenças de adaptação ecológica entre a população brasileira (BRA2) e a colombiana (COL\_OS5) de *R. oryzae-sativae*, porém não se observou diferenciação genética significativa entre as populações BRA2 e COL\_OS6, ambas de condição de cultivo inundado. A ausência de diferenciação entre esse par de populações geograficamente distantes, aproximadamente 4.300 km, é bastante peculiar. Poderia se especular que, historicamente, um evento de intercâmbio de sementes de arroz tenha facilitado a dispersão involuntária do patógeno a longas distâncias (entre países), uma vez que *R. oryzae-sativae* pode infectar sementes (GUO et al., 2006). Devido à grande importância da dispersão do patógeno por sementes contaminadas, medidas mais severas de fiscalização do intercâmbio de sementes entre países devem ser tomadas, além da utilização de técnicas de tratamento de sementes com fungicidas para controlar o patógeno (NUNES; RIBEIRO; TERRES, 2004). Como fluxo gênico implica no estabelecimento dos indivíduos migrantes na população receptora, poderia-se, portanto, considerar que as duas populações de *R. oryzae-sativae* que trocaram material genético no passado se adaptaram de maneira semelhante aos distintos agroecossistemas, mantendo, assim, a similaridade genética entre as duas populações (HARTL; CLARK, 1997). Eventualmente as populações BRA2 e COL\_OS6 poderiam se diferenciar por efeito de deriva genética ou por seleção natural (HARTL; CLARK, 1997).

Acerca da agressividade das populações de *R. oryzae-sativae* oriundas do arroz à *Urochloa* spp., foram observados, em média, baixos níveis de doença. A



agressividade média dos isolados variou entre 1% de área foliar infectada para a população BRA1 em *U. brizantha* cv. Piatã e 7% para a população BRA2 em *U. brizantha* cv. Marandu, indicando processo ainda inicial de troca de hospedeiros, com adaptação patogênica incipiente (KOHN, 2005). Embora com baixas taxas de agressividade, foram observados sintomas da doença na base das folhas de todas as variedades de *Urochloa* (Figura 5). Dessa maneira, na ausência de plantas de arroz, *R. oryzae-sativae* poderia infectar pastagens de *Urochloa* e permanecer na área de cultivo, mantendo os níveis de inóculo para as próximas culturas de arroz (WILLOCQUET; FERNANDEZ; SAVARY, 2000).

Sobre a adaptabilidade das duas populações de *R. oryzae-sativae* à *Urochloa*, estimada por meio de medidas de evolutibilidade para o caráter, observou-se baixos valores de herdabilidade para agressividade. Adicionalmente, os valores para a variação ambiental foram superiores aos valores da variação genética em *U. brizantha* cv. Marandu e *U. brizantha* cv. Piatã, indicando maior efeito de plasticidade fenotípica na variação da agressividade das duas populações de *R. oryzae-sativae* (DYBDAHL; KANE, 2005). Entretanto, valor de  $h^2$  considerado moderado (WILLI et al., 2011) foi observado para a herdabilidade média da população BRA2 ( $h^2 = 0,5 \pm 0,05$ ), quando inoculada em *U. ruziziensis*. Logo, a agressividade dessa população do patógeno possui base genética, o que permitiria a transferência dessas características às progênes de *R. oryzae-sativae*, gerando risco de emergência do patógeno adaptado à *Urochloa*.

No Vale do Paraíba, o agroecossistema predominante de cultivo de arroz é constituído por ambientes homogêneos, grandes áreas com um mesmo genótipo de hospedeiro e muitas vezes sucessão da cultura do arroz por pastagens de *Urochloa* (DEVIDE, 2013). Esse modelo de paisagem ecológica apresenta características que acelerariam o potencial evolutivo de fitopatógenos, geralmente pelo favorecimento de genótipos do patógeno mais especializados, neste caso, à *Urochloa* spp. (MCDONALD, 2014). Monitoramento e detecção prévia de patógenos recém emergidos são medidas preventivas que ajudariam a evitar prejuízos com eventos de emergência de novas doenças de plantas (STUKENBROCK; MCDONALD, 2008).

Quanto à natureza predominante da pressão de seleção nas populações avaliadas de *R. oryzae-sativae*, os valores de  $F_{ST}$  foram comparados aos valores obtidos de  $Q_{ST}$ . O índice  $Q_{ST}$  mede a diferenciação entre populações para caracteres quantitativos. Logo, ao se comparar os valores de  $F_{ST}$  e  $Q_{ST}$  três cenários são

possíveis: i) Valores de  $Q_{ST}$  estatisticamente iguais aos de  $F_{ST}$  indicam a ocorrência de neutralidade; ii) Valores de  $Q_{ST}$  superiores aos de  $F_{ST}$  indicam seleção diversificadora para a agressividade à *Urochloa*, enquanto valores de  $Q_{ST}$  menores aos de  $F_{ST}$  indicam que a seleção atuante sobre o patógeno seria predominantemente estabilizadora (YANG; YEH; YANCHUK, 1996; MERILÄ; CRNOKRAK, 2001; ZHAN et al., 2005; STEFANSSON; MCDONALD; WILLI, 2014). No presente estudo aceitamos a hipótese de evolução neutra para agressividade na comparação entre os níveis de divergência das populações quando inoculadas em *U. ruziziensis*, pois os valores de  $F_{ST}$  e  $Q_{ST}$  foram significativamente similares. Todavia, a correspondência significativa entre os índices  $Q_{ST}$  e  $F_{ST}$  não indica, necessariamente, ausência de seleção, mas também que os efeitos da seleção sobre o caráter avaliado não podem ser separados daqueles causados pela deriva genética (MERILÄ; CRNOKRAK, 2001; ZHAN et al., 2005). Por sua vez, foi observado indício de seleção diversificadora sobre as populações do patógeno quanto à agressividade em *U. brizantha* cv. Marandu, *U. brizantha* cv. Piatã e em arroz cv. Esmeralda, hospedeiro de origem das populações de *R. oryzae-sativae*. O predomínio de seleção diversificadora para a agressividade provavelmente indica maior capacidade de adaptação de genótipos do patógeno aos hospedeiros, sugerindo a seleção de fenótipos extremos de *R. oryzae-sativae* nestes hospedeiros (ZHAN et al., 2002).

Foi testada também a hipótese de que as populações exibiriam um sistema reprodutivo misto, caracterizado por recombinação, por cruzamentos sexual ao acaso, e dispersão local de um número pequeno de clones do patógeno. A evidência de equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio gamético entre pares de locos das populações utilizadas no presente estudo são indícios de reprodução sexual ocorrendo tanto nas populações do Vale do Paraíba, quanto de COL\_OS5, em Meta. Associando-se à fração clonal média de 22%, temos indicação da ocorrência de um sistema reprodutivo misto em três das quatro populações. Apenas para a população COL\_OS6 detectou-se índice de endogamia positivo e significativo, indicando que o desvio do EHW observado na população foi devido a excesso de homozigotos (TAYLOR; JACOBSON; FISHER, 1999). Para esta população, em especial, o excesso de homozigotos decorreu da condição monomórfica de um único marcador em particular (P36), condição típica de populações recém fundadas (HARTL; CLARK, 1997).

Sob o ponto de vista do ciclo biológico, *R. oryzae-sativae* é considerado um patógeno monocíclico, pois infecções secundárias são limitadas, e escleródios são os inóculos iniciais da doença em novos cultivos de arroz (MILLER; WEBSTER, 2001). Entretanto, a formação de basidiósporos pela fase sexuada *Ceratobasidium oryzae-sativae* foi descrita na Califórnia (GUNNELL; WEBSTER, 1987). Evidência recente baseada em análises genético-populacionais sugere que a fase sexuada possui maior importância para o desenvolvimento da doença do que assumido anteriormente (CHAIJUCKAM et al., 2010). Muito embora a fase sexuada do patógeno não tenha sido descrita no Brasil ou na Colômbia, as evidências genético-populacionais obtidas em nosso estudo indicam a importância dos basidiósporos de *C. oryzae-sativae* contribuindo para o ciclo biológico do patógeno nos respectivos agroecossistemas do arroz.

As populações avaliadas no presente estudo apresentaram alta diversidade genotípica, associação entre reprodução sexuada e geração de clones e baixa diferenciação entre populações próximas e também distantes. Segundo o modelo de risco proposto por MCDONALD; LINDE (2002b), as populações de *R. oryzae-sativae* estariam classificadas como de alto potencial de risco evolutivo, o que deveria ser considerado ao se conduzir programas de melhoramento de variedades de arroz.

A diversidade genética encontrada nessas populações de *R. oryzae-sativae*, intrinsecamente associada ao seu potencial evolutivo, pode resultar em variação quantitativa para adaptação a novos hospedeiros. Para evitar que eventual mudança de hospedeiro do arroz para *Urochloa* spp. venha a se efetivar, seria recomendado que a rotação destas espécies de forrageiras com o arroz fosse minimizada e incluísse outras espécies filogeneticamente mais distantes. A gama de hospedeiros de *R. oryzae-sativae* parece ser ainda restrita não incluindo, por exemplo, fabáceas como a soja (CHAVARRO MESA et al., 2014).

Variação quantitativa na redução da sensibilidade a fungicidas também poderia ocorrer nessas populações do patógeno. Resistência a fungicidas em *Rhizoctonia* do arroz já foi relatada e representa uma preocupação para o manejo, especialmente da queima-da-bainha causada por *R. solani* AG-1 IA (CASTROAGUDIN et al., 2013). No Brasil, não existem fungicidas registrados para manejo químico da mancha agregada do arroz, sendo o manejo da doença feito de forma indireta, uma vez que o alvo do controle é a queima (*R. solani* AG-1 IA) ou a mancha da bainha (*R. oryzae*) (AGROFIT, 2014). Como os fungicidas recomendados para o controle de *R. solani* e *R. oryzae*

são considerados de grupos de médio a alto risco para desenvolvimento de resistência (estrobirulinas e triazóis), a utilização destes fungicidas em larga escala nas áreas de arroz exigiria a adoção de estratégias anti-resistência (AGROFIT, 2014; MCDONALD; LINDE, 2002b).

## **6 CONCLUSÃO**

As populações de *R. oryzae-sativae* apresentam sistema reprodutivo misto.

Populações geograficamente próximas ou distantes apresentaram fluxo gênico, provavelmente por intercâmbio de sementes infectadas de arroz, entre países.

As duas populações de *R. oryzae-sativae* do Brasil apresentaram patogenicidade e variação na agressividade a *Urochloa* spp., porém com baixos índices de herdabilidade indicando ainda, baixa adaptação à *Urochloa* spp..

## REFERÊNCIAS

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

AGROFIT: sistema de agrotóxicos fitossanitários. Brasília: MAPA - Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. [s.n.]. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 10 jan. 2015.

AMARAL, R. E. M.; ISSA, E.; SOUZA, D. M.; MALAVOLTA, V. M. A.; LEITE, L. C.; JESUS, L. M. Estudos sobre a queima das bainhas do arroz *Oryza sativa* L. . **Arquivos do Instituto Biológico**, Descalvado, v. 46, n. 1, p. 55-62, 1979.

BATES, D.; MAECHLER, M. **lme4**: linear mixed-effects models using Eigen and S4 classes: R package version 0.999375-34. R-project. [s.l.: s.n.], 2014. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=lme4>>. Acesso em: 1 dec. 2014.

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**, Minneapolis, 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**, Minneapolis, v. 99, n. 9, p. 1090-1099, 2009.

CASTROAGUDIN, V. L.; FISER, S.; CARTWRIGHT, R. D.; WAMISHE, Y.; CORRELL, J. C. Evaluation of *Rhizoctonia solani* AG 1 - IA and *Rhizoctonia* species for resistance to Qol fungicides. **Phytopathology**, Minneapolis, v. 103, n. 2, p. 212-P, 2013.

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**, Caracas, v. 9, n. 1, p. 6-9 1996.

CHAIJUCKAM, P.; BAEK, J.; GREER, C. A.; WEBSTER, R. K.; DAVIS, R. M. Population structure of *Rhizoctonia oryzae-sativae* in California rice fields. **Phytopathology**, Minneapolis, v. 100, n. 5, p. 502-510, 2010.

CHAIJUCKAM, P.; MICHAEL DAVIS, R. Characterization of diversity among isolates of *Rhizoctonia oryzae-sativae* from California rice fields. **Plant Disease**, Minneapolis, v. 94, n. 6, p. 690-696, 2010.

CHAVARRO MESA, E.; PEREIRA, D. A. S.; SCHURT, D. A.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; CERESINI, P. C. A etiologia complexa de doenças causadas por fungos do gênero *Rhizoctonia* em *Brachiaria* e em culturas simpátricas de arroz, feijão-caupi ou soja na Amazônia, nos Cerrados Brasileiros e no Vale do Paraíba. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 47., 2014, Londrina. **Anais...** Londrina: Sociedade Brasileira de Fitopatologia- SBF, 2014.

CIAMPI, M. B. **Diversidade genética e estrutura de populações de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA no Brasil**. 2008. 68 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, 2008.

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**, Minneapolis, v. 98, n. 8, p. 932-941, 2008.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL- CIAT. **Annual report, tropical forages program**. Palmira: CIAT, 1993. (Working document, 166).

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

DAVISON, A. C.; HINKLEY, D. V. **Bootstrap methods and their application**. New York: Cambridge University Press, 1997. 243 p.

DEVIDE, A. C. P. D. **História ambiental do Vale do Paraíba**. 2013. 22 f. Tese (Doutorado) - Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro- UFRRJ, Rio de Janeiro, 2013.

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

EFRON, B.; TIBSHIRANI, R. **An introduction to the bootstrap**. New York: Chapman & Hall, 1993. 456 p.

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**, Stuttgart, 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**, Auckland, v. 1, n. 2, p. 47-50, 2005.

GARNIER-GERE, P.; DILLMANN, C. A computer program for testing pairwise linkage disequilibria in subdivided populations. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 83, n. 4, 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**, Minneapolis, v. 100, n. 2, p. 172-182, 2010.

GONZÁLEZ-VERA, A. D.; BERNARDES DE ASSIS, J.; ZALA, M.; MCDONALD, B. A.; CERESINI, P. C. Population genetics of the rice- and maize-infecting pathogen *Rhizoctonia solani* AG 1-IA from Venezuela. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RHIZOCTONIA, 4., 2008, Berlin. **Proceedings...** Berlin: Alemanha, 2008. p. 51.

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

GUNNELL, P. S.; WEBSTER, R. K. *Ceratobasidium oryzae-sativae* sp. nov., the teleomorph of *Rhizoctonia oryzae-sativae* and *Ceratobasidium setariae* comb. nov., the probable teleomorph of *Rhizoctonia fumigata* comb. nov. **Mycologia**, Stanford, n. 79, n. 4 p. 731-736, 1987.

GUO, Q.; KAMIO, A.; SHARMA, B. S.; SAGARA, Y.; ARAKAWA, M.; INAGAKI, K. Survival and subsequent dispersal of rice sclerotial disease fungi, *Rhizoctonia oryzae* and *Rhizoctonia oryzae-sativae*, in paddy fields. **Plant Disease**, Minneapolis, v. 90, n. 3, p. 615-622, 2006.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics**, Arlington, v. 48, n. 2, p. 361-372, 1992.

GUTIÉRREZ, S. A. *Sclerotium hydrophilum* em cultivos de arroz de Argentina. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 100, 2007.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. 3rd. Sunderland: Sinauer Associates, 1997.

HOULE, D. Comparing evolvability and variability of quantitative traits. **Genetics**, Bethesda, v. 130, n. 1, p. 195-204, 1992.

HURLBERT, S. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. **Ecology**, Ithaca, v. 52, p. 577–586, 1971.

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**, Delft, v. 162, n. 2, p. 289-294, 1998.

KO, W.; HORA, F. A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology**, Minneapolis, v. 11, n. 61, p. 707-710, 1971.

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

LAMARI, L. **Assess**: image analysis software for plant disease quantification. [S.I.]: The American Phytopathological Society- APS, 2002. 144 p.

LANOISELET, V. M.; ASH, G. J.; COTHER, E. J.; PRIEST, M. J.; WATSON, A. First report of *Waitea circinata* causing sheath spot and *Rhizoctonia oryzae-sativae* causing aggregate sheath spot on rice in south-eastern Australia. **Australasian Plant Pathology**, New South Wales, v. 30, n. 4, p. 369-370, 2001.

LANOISELET, V. M.; COTHER, E. J.; ASH, G. J. Aggregate sheath spot and sheath spot of rice. **Crop Protection**, Amsterdã, v. 21, n. 26, p. 799-808, 2007.

LEE, F. N.; RUSH, M. C. Rice sheath blight: a major rice disease. **Plant Disease**, Minneapolis, 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 Tecnica**, Chillán, v. 2, n. 2, p. 77-84, 1999.

MALAGUTI, G. Mancha de la hoja envainadora del arroz causada por *Rhizoctonia solani*. **Agronomia Tropical**, Bogotá, v. 1, n. 3, p. 71-75, 1951.

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

MATSUMOTO, M. Trials of direct detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG 1 and AG 2 subgroups using specifically primed PCR analysis. **Mycoscience**, Tokyo, v. 43, n. 4, p. 185-189, 2002.



MAYNARD, S. 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**, Washington, v. 90, n. 5, p. 4384–4388, 1993.

MCDONALD, B. A. Using dynamic diversity to achieve durable disease resistance in agricultural ecosystems. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 39, n. 3, p. 191-196, 2014.

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

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, Wageningen, v. 124, n. 2, p. 163-180, 2002b.

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

MERILÄ, J.; CRNOKRAK, P. Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. **Journal of Evolutionary Biology**, Malden, v. 14, n. 6, p. 892-903, 2001.

MILLER, T. C.; WEBSTER, R. K. Soil sampling techniques for determining the effect of cultural practices on *Rhizoctonia oryzae-sativae* inoculum in rice field soils. **Plant Disease**, Minneapolis, v. 81, n. 85, p. 967-972, 2001.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a number of individuals. **Genetics**, Bethesda, v. 89, n. 5, p. 538-590, 1978.

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

NUNES, C. D.; RIBEIRO, A. S.; TERRES, A. L. Principais doenças do arroz irrigado e seu controle. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. (Ed.). **Arroz irrigado no sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. cap. 5, p.579-633.

PADASHT-DEHKAEI, F.; CERESINI, P. C.; ZALA, M.; OKHOVVAT, S. M.; NIKKHAH, M. J.; MCDONALD, B. A. Population genetic evidence that basidiospores play an important role in the disease cycle of rice-infecting populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA in Iran. **Plant Pathology**, Minneapolis, v. 62, n. 1, p. 49-58, 2013.

PAES JUNIOR, N. S.; SIMÕES, S. J. C. Evolução espacial de áreas irrigadas com base em sensoriamento remoto o Médio Vale do Paraíba do Sul, Sudeste do Brasil. **Revista Ambiente & Água**, Taubaté, v. 1, n. 2, p. 72-83, 2006.

PEREIRA, D. A. S.; CHAVARRO MESA, E.; RAMOS, M. L. M.; TAKADA, H. M.; CERESINI, P. C. Estrutura de populações de *Rhizoctonia oryzae-sativae* do arroz em São Paulo, Brasil e Meta, Colômbia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 47., 2014, Londrina. **Anais...** Londrina: Sociedade Brasileira de Fitopatologia- SBF, 2014.

PETIT, R. J.; EL MOUSADIK, A.; PONS, O. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. **Conservation Biology**, Malden, v. 12, n. 4, p. 844-855, 1998.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; SILVA, G. B.; SANTOS, G. R. Resistência de cultivares de arroz a *Rhizoctonia solani* e *Rhizoctonia oryzae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 5, p. 589-595, 2002.

R\_DEVELOPMENT\_CORE\_TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2008. 2673 p.

RAMOS MOLINA, L. M.; CHAVARRO MESA, E.; PEREIRA, D. A. D. S.; SILVA HERRERA, M. D. R.; PEREZ BARRAGAN, A. Y.; CERESINI, P. C. Amplo levantamento de fungos associados à queima da folha de *Urochloa* nos Llanos Colombianos indica predominância de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, 2015. Submetido.

RAMOS MOLINA, L. M. ***Rhizoctonia solani* AG-1: estrutura genética, etiologia e evolutibilidade nos agroecossistemas *Brachiaria* spp. e arroz na Colômbia**. 2012. 81 f. Tese (Doutorado)- Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Estadual Paulista- UNESP, Jaboticabal, 2012.

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

SAS\_INSTITUTE. **SAS - Version 9.1.3**. Cary: SAS Institute. 2008. 325 p.

SAVARY, S.; WILLOCQUET, L.; ELAZEGUI, F. A.; TENG, P. S.; VAN DU, P.; ZHU, D.; TANG, Q.; HUANG, S.; LIN, X.; SINGH, H. M.; SRIVASTAVA, R. K. Rice pest constraints in tropical Asia: Characterization of injury profiles in relation to production situations. **Plant Disease**, Minneapolis, v. 84, n. 3, p. 341-356, 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**, Minneapolis, v. 91, n. 3, p. 1663-1668, 2007.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 233-234, 2000.

STEFANSSON, T. S.; MCDONALD, B. A.; WILLI, Y. The influence of genetic drift and selection on quantitative traits in a plant pathogenic fungus. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 11, p. e112523, 2014.

STODDART, J. A.; TAYLOR, J. F. Genotype diversity: estimation and prediction in samples. **Genetics**, Bethesda, v. 118, n. 3, p. 705-711, 1988.

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

TAHERI, P.; GNANAMANICKAM, S.; HOFTE, M. Characterization, genetic structure, and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. associated with rice sheath diseases in India. **Phytopathology**, Minneapolis, v. 97, n. 3, p. 373-383, 2007.

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

WEIR, B. S.; COCKERMAN, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Malden, v. 38, n. 4, p. 1358-1370, 1984.

WILLI, Y.; FRANK, A.; HEINZELMANN, R.; KÄLIN, A.; SPALINGER, L.; CERESINI, P. C. The adaptive potential of a plant pathogenic fungus, *Rhizoctonia solani* AG-3, under heat and fungicide stress. **Genetica**, Malden, v. 139, n. 7, p. 903-908, 2011.

WILLOCQUET, L.; FERNANDEZ, L.; SAVARY, S. Effect of various crop establishment methods practised by Asian farmers on epidemics of rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. **Plant Pathology**, Minneapolis, v. 49, n. 3, p. 346-354, 2000.

YANG, R. C.; YEH, F. C.; YANCHUK, A. D. A comparison of isozyme and quantitative genetic variation in *Pinus contorta* spp. *latifolia* by  $F_{ST}$ . **Genetics**, Malden, v. 142, n. 5, p. 1045-1052, 1996.

ZHAN, J.; LINDE, C. C.; JÜRGENS, T.; MERZ, U.; STEINEBRUNNER, F.; MCDONALD, B. A. Variation for neutral markers is correlated with variation for

quantitative traits in the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. **Molecular Ecology**, Malden, v. 14, n. 9, p. 2683-2693, 2005.

ZHAN, J.; MUNDT, C. C.; HOFFER, M. E.; MCDONALD, B. A. Local adaptation and effect of host genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in a plant pathosystem. **Journal of Evolutionary Biology**, Malden, v. 15, n. 3, p. 634-647, 2002.

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**, Madison, v. 38, n. 3, p. 286-297, 2003.

**Tabela 1-** Populações de *R. oryzae-sativae* de arroz amostradas em São Paulo, Brasil e Meta, Colômbia.

Países, estados e municípios	Hospedeiro	População	Isolados genotipados	Ano de coleta
<b>Brasil</b>				
São Paulo				
Pindamonhangaba	Arroz cv. Puitá	BRA1	21	2013
Guaratinguetá	Arroz cv. Puitá Arroz cv. EPAGRI 117			2013
Taubaté	Arroz cv. Puitá	BRA2	23	2013
Tremembé	Arroz cv. Puitá			2013
Roseira	Arroz cv. EPAGRI 117			2013
<b>Colômbia</b>				
Meta				
Puerto López	Arroz cv. F-50	COL_OS5	26	2011
Villavicencio	Arroz cv. Thailandia	COL_OS6	18	2011

Fonte: Elaboração do próprio autor.

**Tabela 2-** Primers microssatélites utilizados no presente estudo.

Locos	Sequência do primer (5'-3')	Motif	Tamanho de fragmento dos produtos amplificados (pb)	Nº de alelos
P02	F: ACGTCGTCGAGGAATTCTGT R: ACGTGGAACCCCAGACATAG	TG	136 – 140	2
P07	F: CGCTGACTTTGGTGAGCATA R: AAAACAACCGATCCAGTGCT	CT	175 – 177	2
P20	F: CACAGGGTGACTACGGCAAC R: GTAGCTCCCTCCATAGCCG	GGC	90 – 114	5
P33	F: CGTGTCTCGTACGTCTGCAT R: GCTGACAGGGCTATCATTGG	CCGC	187 – 202	2
P36	F: TACCCTTTGGGTTTGAGACG R: TGCTGGTTATTCTCTGCACG	CG	177 – 181	3

Fonte: Elaboração do próprio autor

**TABELA 3-** Medidas de diversidade genotípica e gênica em populações de *Rhizoctonia oryzae-sativae* da Colômbia e do Brasil.

População	Tamanho Amostral (N)	Número de genótipos	Genótipos sítio-específicos <sup>a</sup>	Diversidade genotípica de Stoddart ( $G_0$ ) <sup>b, c</sup>	Fração clonal	Equitatividade <sup>d</sup>	Riqueza alélica <sup>c, e</sup>	Ho <sup>c, f</sup>	Hs <sup>c, g</sup>
<b>Colômbia</b>									
COL_OS5	26	18	13 (5)	14,69 a	0,30	0,816	2,38 ab	0,43 a	0,46 ab
COL_OS6	18	16	9 (7)	14,72 a	0,11	0,920	2,00 b	0,29 b	0,40 b
Total na Colômbia	44	34	26 (8)		0,22				
<b>Brasil</b>									
BRA1	21	17	13 (4)	12,60 a	0,19	0,741	2,59 a	0,40 ab	0,49 a
BRA2	23	17	12 (5)	14,29 a	0,26	0,841	2,58 a	0,46 a	0,47 ab
Total no Brasil	44	34	27 (7)		0,22				
Total geral	88	68			0,22				

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

<sup>b</sup> Diversidade genotípica de Stoddart, calculada segundo Stoddart e Taylor (1988)

<sup>c</sup> Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes ( $p \geq 0,05$ ), segundo teste de *bootstrap* entre pares de populações, para diferenças em índices de diversidade clonal, com 1.000 permutações, usando sub-amostragens para equiparar ao tamanho da menor população

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

<sup>e</sup> As comparações entre médias da riqueza alélica (com rarefação, baseando-se numa amostra de 13 indivíduos diplóides), frequência observada de heterozigotos e diversidade genética de Nei 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 ( $P \geq 0,05$ )

<sup>f</sup> Frequência observada de heterozigotos dentro das populações

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

Fonte: Elaboração do próprio autor

**TABELA 4-** Testes para associação aleatória de alelos em cada loco e entre pares de locos nas populações de *Rhizoctonia oryzae-sativae* na Colômbia e Brasil.

População	2N corrigido para clones	Número de locos em EHW <sup>a</sup>	$F_{is}$ <sup>b</sup>	$p$	$I_A$ <sup>c</sup>	$p$	Número e proporção de pares de locos em desequilíbrio gamético <sup>d</sup>	
<b>Colômbia</b>								
COL_OS5	36	3/5	0,06	0,32	-0,02	0,69	0/10	0,00
COL_OS6	32	3/4 <sup>e</sup>	0,28	<b>0,02</b>	0,05	0,11	0/6 <sup>e</sup>	0,00
<b>Brasil</b>								
BRA1	34	5/5	0,18	0,05	0,00	0,47	0/10	0,00
BRA2	34	5/5	0,02	0,46	0,08	<b>0,02</b>	1/10	0,10

<sup>a</sup>Teste de EHW executado de acordo com um teste exato 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, a  $p \leq 0,05$ , após ajuste de Bonferroni para múltiplas comparações (BONFERRONI, 1935)

<sup>b</sup> Índice de endogamia ( $F_{is}$ ) e respectivo valor de  $p$  determinados usando-se o programa ARLEQUIN versão 3.11

<sup>c</sup>  $I_A$  é um índice de desequilíbrio multilocos. Valores de significância determinados pelo programa MULTILOCUS versão 1.3 (Agapow, 2001), testando-se a hipótese nula de completa panmixia (ou seja, de nenhuma ligação entre pares de locos), com base em 1.000 aleatorizações

<sup>d</sup> Teste exato de Fisher (GARNIER-GERE; DILLMANN, 1992), usando o programa GENEPOP versão 3.4 (Disponível online do Laboratoire de Genetique et Environment, Montpellier, France), a  $p \leq 0,05$ , após ajuste de Bonferroni (1935) para múltiplas comparações

<sup>e</sup> Loco P36 foi monomórfico

Fonte: Elaboração do próprio autor



**TABELA 5-** Medidas de diferenciação entre populações de *Rhizoctonia oryzae-sativae* da Colômbia e do Brasil, baseadas em  $F_{ST}$ <sup>a</sup>.

População	COL_OS5	COL_OS6	BRA1
COL_OS5	-		
COL_OS6	0.075	-	
BRA1	0.054	0.057	-
BRA2	0.105	<b>0.006</b> <sup>b</sup>	<b>0.021</b> <sup>b</sup>

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

<sup>b</sup> Valores não-significativos ( $p \leq 0,05$ ), testado usando abordagem não-paramétrica (EXCOFFIER et al., 1992), com base em 1.023 permutações

Fonte: Elaboração do próprio autor

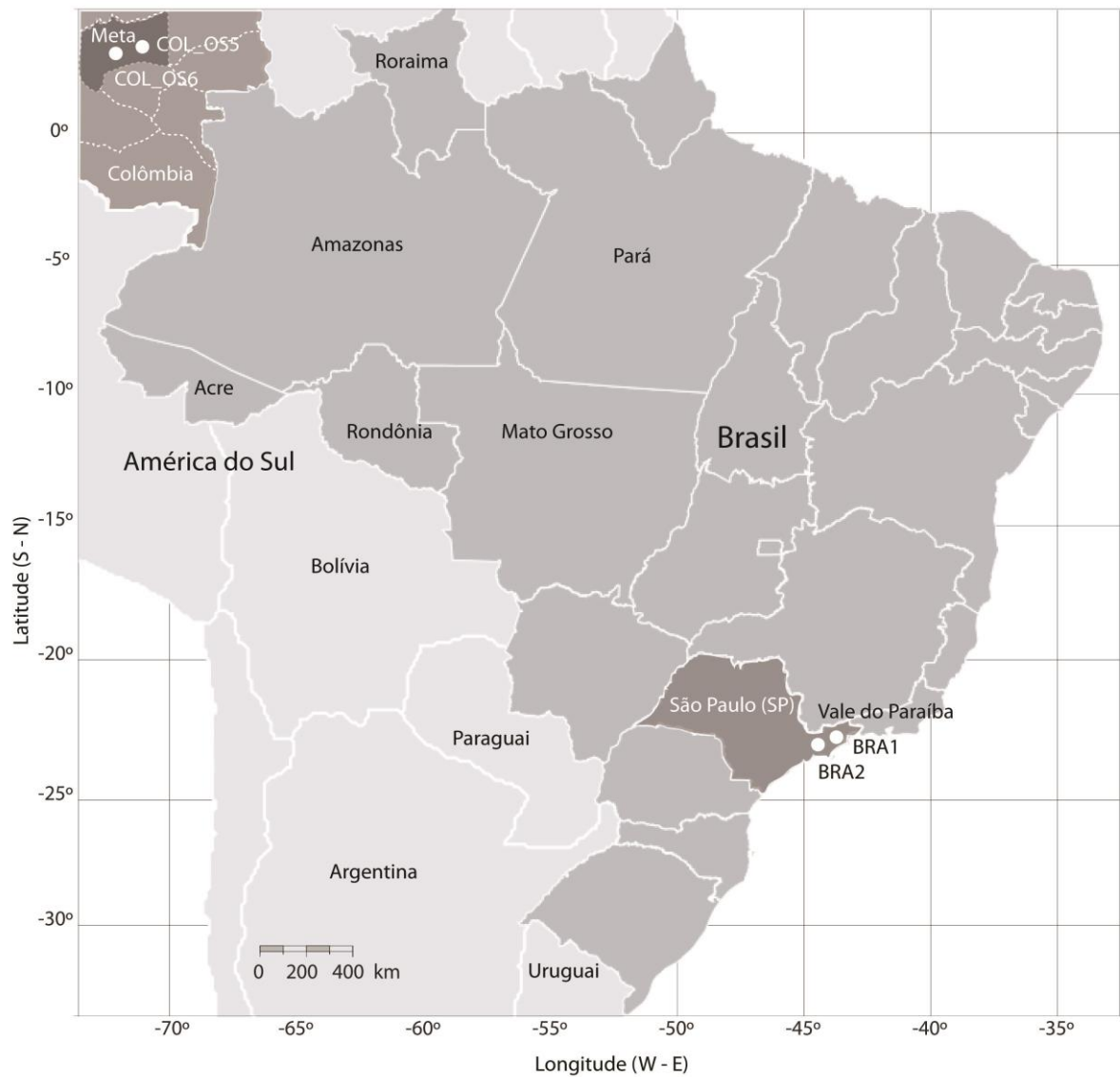
**TABELA 6-** Modelo linear geral para teste dos efeitos de população e isolado (dentro de população) para agressividade de *R. oryzae-sativae* em três genótipos de *Urochloa* spp. e em arroz.

	Fonte	GL	QM	F calculado	p
<i>U. brizantha</i> cv. Marandu	População	1	75.51	3.28	0.083 <sup>NS</sup>
	Isolado (População)	22	23.02	4.62	<0.0001 <sup>***</sup>
	Erro	207	4.98		
<i>U. brizantha</i> cv. Piatã	População	1	31.65	2.39	0.136 <sup>NS</sup>
	Isolado (População)	22	13.22	3.09	<0.0001 <sup>***</sup>
	Erro	207	4.28		
<i>U. ruziziensis</i>	População	1	1.67	0.10	0.756 <sup>NS</sup>
	Isolado (População)	22	16.91	5.54	<0.0001 <sup>***</sup>
	Erro	207	3.05		
Arroz cv. Esmeralda	População	1	317.56	4.43	0.0471 <sup>*</sup>
	Isolado (População)	22	71.76	3.20	<0.0001 <sup>***</sup>
	Erro	207	22.39		

<sup>\*\*\*</sup>Significativo pelo teste *F* a  $p \leq 0.001$  e não significativo (NS). O experimento foi repetido uma vez, reproduzindo os mesmos padrões de diferenças detectados neste experimento.

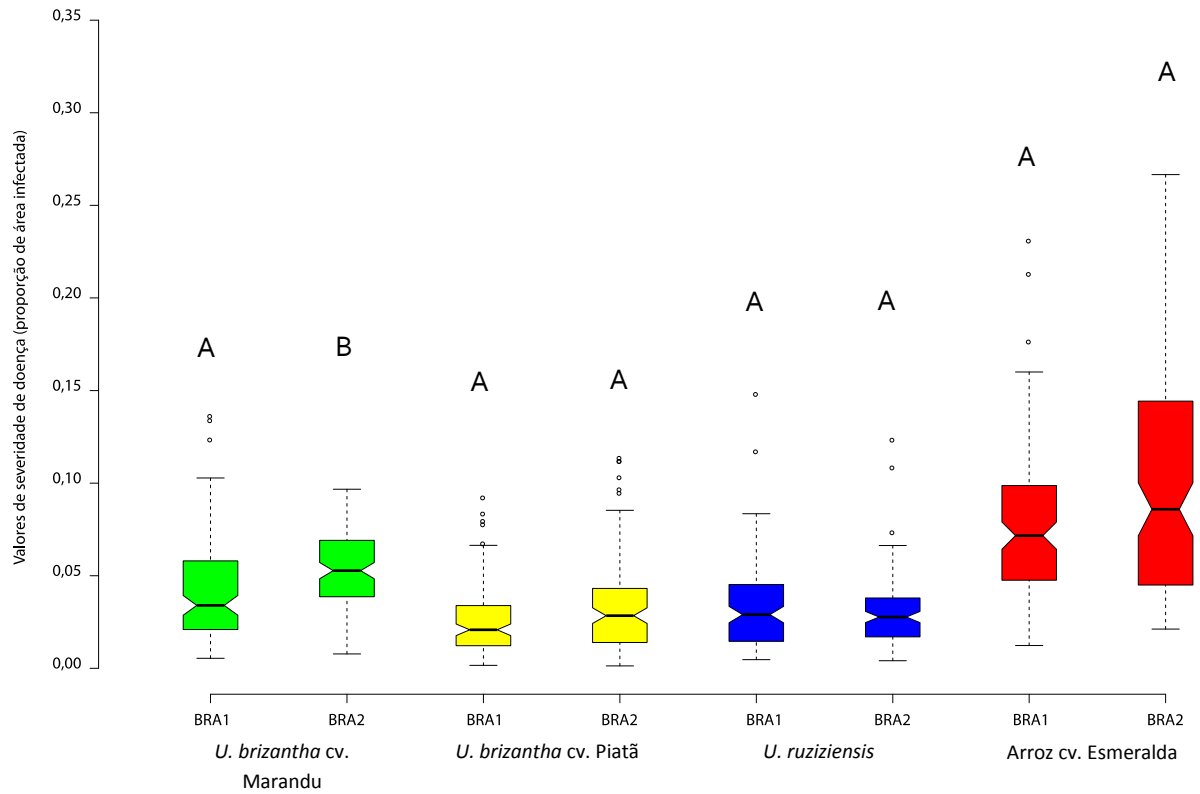
Fonte: Elaboração do próprio autor

**FIGURA 1-** Populações geográficas de *Rhizoctonia oryzae-sativae* de arroz amostrados nos Llanos da Colombianos (Departamento de Meta, Colombia) ou no Vale do Paraíba (São Paulo, Brazil). A latitude (sul-norte) e longitude (oeste-leste) são indicados no mapa.



Fonte: Elaboração do próprio autor

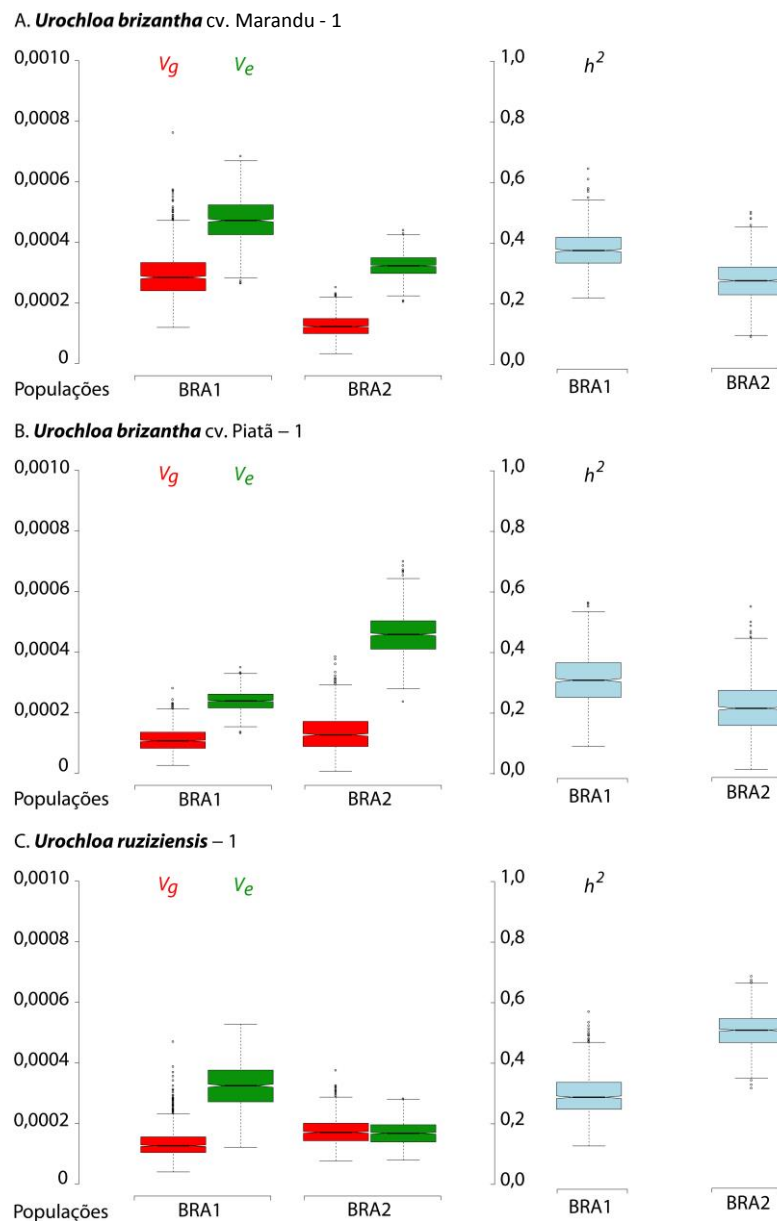
**FIGURA 2-** Agressividade das populações BRA1 e BRA2 de *Rhizoctonia oryzae-sativae* em três cultivares de *Urochloa* spp. e arroz cv. Esmeralda. Médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes por contrastes de médias de grupos de isolados a  $p \leq 0.05$ .

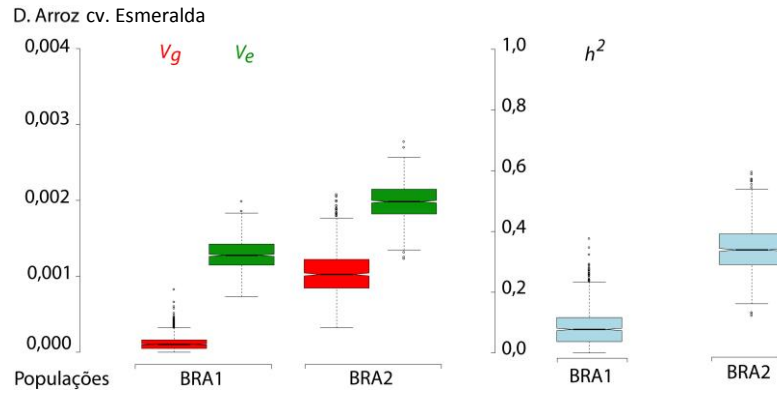


Fonte: Elaboração do próprio autor

**FIGURA 3-** Componentes de evolutibilidade ( $V_g$  = variância genética,  $V_e$  = variância ambiental, ambas padronizadas) e herdabilidade  $h^2$  para agressividade à *U. brizantha* cv. Marandu, *U. brizantha* cv. Piatã, *U. ruziziensis* e arroz cv. Esmeralda, como resposta a duas populações de *R. oryzae-sativae* obtidas de arroz no Vale do Paraíba, SP. \*

\* Os diagramas de caixas (*boxplots*) contêm a linha da mediana aproximadamente em seu centro e 50% dos dados (entre os quartis 25 e 75%) gerados por *bootstrap* considerando 999 reamostragem. As barras verticais indicam os valores máximos e mínimos observados e os círculos os valores atípicos. O entalhe marca o intervalo de confiança de 95% para as medianas. Se os entalhes de dois diagramas não se sobrepõem, podemos assumir no (nível de significância de 0,05) que as medianas são diferentes.

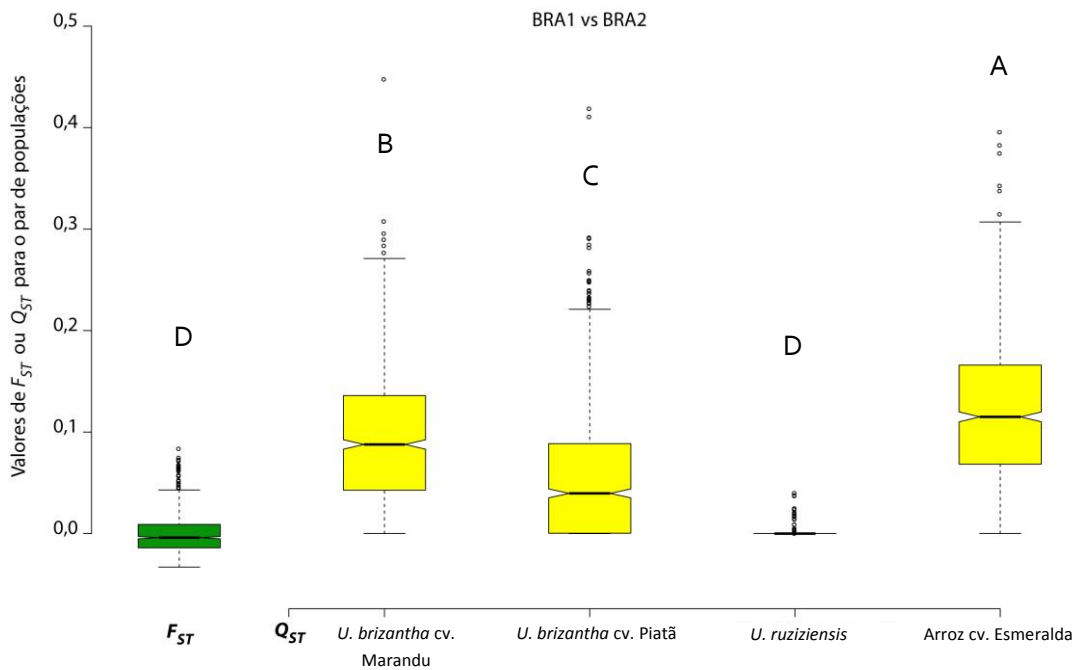




Fonte: Elaboração do próprio autor

**FIGURA 4-** . Contraste entre  $F_{ST}$  e valores de  $Q_{ST}$  das populações BRA1 e BRA2 para agressividade de *Rhizoctonia oryzae-sativae* à *Urochloa brizantha* cv. Marandu, *U. brizantha* cv. Piatã, *U. ruziziensis* e arroz cv. Esmeralda. \*

\* Os diagramas de caixas (*boxplots*) contém a linha da mediana aproximadamente em seu centro e 50% dos dados (entre os quartís 25 e 75%) gerados por *bootstrap* considerando 999 reamostragem. As barras verticais indicam os valores máximos e mínimos observados e os círculos os valores atípicos. O entalhe marca o intervalo de confiança de 95% para as medianas. Se os entalhes de dois diagramas não se sobrepõem, podemos assumir que as medianas são diferentes (nível de significância de 0,05).



Fonte: Elaboração do próprio autor

**FIGURA 5-** Sintomas de *Rhizoctonia oryzae-sativae* em (A) *Urochloa brizantha* cv. Marandu; (B) *U. brizantha* cv. BRS Piatã; (C) *U. ruziziensis*; (D) arroz cv. Esmeralda.



Fonte: Elaboração do próprio autor