

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Caracterização fenotípica, mapeamento de QTL e análise de expressão
de genes-candidatos de resistência de trigo a *Magnaporthe oryzae***

Jéssica Rosset Ferreira

Passo Fundo

2019

Jéssica Rosset Ferreira

Caracterização fenotípica, mapeamento de QTL e análise de expressão de genes-candidatos de resistência de trigo a *Magnaporthe oryzae*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Doutora em Agronomia.

Orientadora:

Dra. Carolina Cardoso Deuner

Coorientadora:

Dra. Gisele Abigail Montan Torres

Passo Fundo

2019

CIP – Catalogação na Publicação

- F383c Ferreira, Jéssica Rosset
Caracterização fenotípica, mapeamento de QTL e análise de expressão de genes-candidatos de resistência de trigo a *Magnaporthe oryzae* / Jéssica Rosset Ferreira. – 2019.
[180] f. : il. color. ; 30 cm.
- Orientadora: Profa. Dra. Carolina Cardoso Deuner.
Coorientadora: Profa. Dra. Gisele Abigail Montan Torres.
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2019.
1. Trigo – Doenças e pragas. 2. Brusone – Controle.
3. Trigo – Melhoramento genético. 4. Mapeamento cromossômico. I. Deuner, Carolina Cardoso, orientadora.
II. Torres, Gisele Abigail Montan, coorientadora. III. Título.

CDU: 633.11

ATA DE DEFESA DE TESE



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

"Caracterização fenotípica, mapeamento de QTL e análise de expressão de genes-candidatos de resistência de trigo a *Magnaporthe oryzae*"

Elaborada por

Jéssica Rosset Ferreira

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
"Doutora em Agronomia – Área de Produção e Proteção de Plantas"

Aprovada em: 02/04/2019
Pela Comissão Examinadora

Dra. Carolina Cardoso Deuner
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora

Dr. Luciano Consoli
Embrapa Trigo

Dra. Gisele-Abigail Montan Torres
Embrapa Trigo
Coorientadora

Dra. Andréia Caverzan
UPF

Dr. Luis Fernando Revers
Embrapa Uva e Vinho

Dr. Edson Campanhola Bortoluzzi
Coordenador PPGAgro

Dr. João Leodato Nunes Maciel
Embrapa Trigo

Dr. Eraldo Lourenso Zanella
Diretor da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Universidade de Passo Fundo

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Geneci, e ao meu pai, Dalmir, que não medem esforços e muitas vezes deixam as suas vontades de lado para que eu realize meus sonhos. Ao meu irmão, Henrique, pelo incentivo na caminhada acadêmica.

Em especial, ao meu primo Cristiano (*in memoriam*) que me ensinou que nada pode nos impedir de sonhar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção, pela saúde e por me guiar na caminhada.

Aos meus pais, meu porto-seguro! Agradeço por todo amor, educação, incentivo e por apoiarem minhas escolhas. Ao meu irmão, que amo tanto, muito obrigada por dividir comigo as noites de trabalho e por me incentivar nessa etapa da minha vida.

Aos meus familiares, pelo apoio na vida acadêmica. Em especial ao meu avô Genésio e minhas avós Florinda e Zule, por todo o carinho dedicado a mim.

À UPF e ao PPGAgro pela oportunidade. Aos professores do PPGAgro pelos ensinamentos e aos funcionários por sempre estarem disponíveis a ajudar. À Capes pela concessão da bolsa de doutorado Capes-Embrapa e pela bolsa de Doutorado-Sanduíche (PDSE). À Embrapa Trigo por possibilitar a realização desta pesquisa.

À minha orientadora, Dra. Carolina Cardoso Deuner, agradeço pela confiança e por sempre estar disposta a me auxiliar. Pela troca de conhecimento, pela oportunidade de participar de atividades de docência e por toda atenção durante o período do doutorado.

À minha coorientadora, Dra. Gisele Abigail Montan Torres, que acreditou em mim e permitiu que eu fizesse parte desse trabalho. Agradeço pela ajuda, ensinamentos, orientação e por ser um exemplo de profissional.

Ao pesquisador Dr. Luciano Consoli, que me apresentou o universo da pesquisa e até hoje continua me auxiliando no desenvolvimento dos trabalhos e me incentivando a buscar novos desafios.

Ao pesquisador Dr. José Maurício Cunha Fernandes, por me incentivar a participar desse projeto e pela parceria no projeto Capes-Embrapa.

Agradeço aos pesquisadores Dr. Luis Fernando Revers, Dr. João Leodato Nunes Maciel, Dr. Luciano Consoli, Dra. Andréia Caverzan e Dra. Elene Yamazaki Lau pela disponibilidade em participar da banca e pelas contribuições. Agradeço também ao Dr. Marcelo Gravina de Moraes pela disponibilidade e contribuições na defesa do projeto de Doutorado-Sanduiche e na defesa da qualificação.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia, pela amizade e por tornarem o ambiente de trabalho mais leve.

À equipe do Laboratório de Fitopatologia, pelo auxílio no início do trabalho com *M. oryzae* e pela troca de conhecimento.

Ao John Innes Centre, na pessoa do Dr. Paul Nicholson, por ter me aceito para estágio de Doutorado-Sanduiche e por proporcionar a vivência de um período de muitas experiências e de auto-conhecimento. Agradeço por toda ajuda, preocupação e atenção. Agradeço também à equipe do Dr. Paul Nicholson e do Dr. James Brown pela acolhida, pelo auxílio nas atividades do laboratório e pela convivência.

Aos colegas do PPGAgro pelos momentos compartilhados. Em especial às amigas Ana Paula Rockenbach, Victória Vieira Bertagnolli, Camila Vancini e Mônica Coelho, que vivenciaram de perto as conquistas e as angústias desse processo.

Aos amigos que estão ao meu lado há muito tempo e aos que a vida foi me presenteando ao longo do caminho. Obrigada por não fazerem da distância obstáculos, pela compreensão quando não pude dividir alguns momentos com vocês, pelo incentivo, pelo ombro amigo e por comemorarem comigo.

EPÍGRAFE

“Foi o tempo que dedicaste a tua rosa que fez a tua rosa tão importante.”

O Pequeno Príncipe - Antoine de Saint-Exupéry

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem, ou que seus planos nunca vão dar certo, ou que você nunca vai ser alguém... Se você quiser alguém em quem confiar, confie em si mesmo! Quem acredita sempre alcança!”

Renato Russo

RESUMO

Ferreira, Jéssica Rosset. Caracterização fenotípica, mapeamento de QTL e análise de expressão de genes candidatos de resistência de trigo a *Magnaporthe oryzae*. [180] f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2019.

A infecção da espiga por *Magnaporthe oryzae* é a forma mais danosa da brusone do trigo. A doença é encontrada no Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina, Bangladesh e Índia. A resistência genética é o melhor método de controle da brusone do trigo, e muitos estudos vêm sendo realizados para identificar genótipos resistentes e genes de resistência de trigo a *M. oryzae* e elucidar os mecanismos envolvidos na interação *M. oryzae*-trigo. O presente trabalho teve como objetivo geral caracterizar a resistência genética de trigo a *M. oryzae*, e objetivos específicos i) identificar as variáveis mais eficientes na discriminação de genótipos; ii) avaliar a presença da translocação 2NS/2AS em genótipos contrastantes; iii) identificar QTL de resistência a *M. oryzae* no estágio de planta adulta; e, iv) caracterizar genes-candidatos de resistência em mutantes TILLING e em análises de RNA-seq. As variáveis severidade de espiguetas brancas, área abaixo da curva de progresso da doença e proporção do peso médio do grão de espigas inoculadas em relação às controle foram eficientes na classificação de genótipos de trigo e devem ser consideradas para a caracterização da resposta de trigo a *M. oryzae*. Genótipos de trigo resistentes a *M. oryzae* que não possuem a translocação 2NS/2AS foram identificados, reforçando a necessidade de estudos visando à descoberta de outros genes e/ou QTL envolvidos na resistência. Doze QTL relacionados com a resistência e dois com a produção de grãos foram identificados. Até onde se sabe, esse é o primeiro mapeamento de QTL de resistência de trigo a *M. oryzae* realizado no mundo. Não foi observada alteração do fenótipo dos mutantes TILLING de trigo para os genes *HSP60* e *WIR1b*. Os mutantes para *Caffeic Acid O-Methyltransferase* apresentaram alteração na reação a *M. oryzae*, em planta jovem e em planta adulta. O sequenciamento dos transcriptomas de espigas de trigo em resposta à inoculação revelou as funções moleculares de ligação heme, ligação de íon ferro e atividade oxidoredutase como as mais representativas em termos GO. Exclusivamente no genótipo resistente CBFusarium ENT014, foram identificados como diferencialmente expressos 24 genes relacionados à defesa. Esses estudos permitiram a identificação de variáveis importantes para a caracterização da reação de genótipos de trigo a *M. oryzae*, de QTL de resistência e de genes diferencialmente expressos.

Palavras-chave: 1. Brusone. 2. *Pyricularia oryzae*. 3. *Triticum aestivum*. 4. Resistência genética. 5. QTL de efeito maior.

ABSTRACT

Ferreira, Jéssica Rosset. Phenotypic characterization, QTL mapping and expression analysis of wheat resistance candidate genes to *Magnaporthe oryzae*. [180] f. Thesis (Doctor in Agronomy) – University of Passo Fundo, Passo Fundo, 2019.

The infection of the head by *Magnaporthe oryzae* is the most dangerous form of wheat blast. The disease is found in Brazil, Bolivia Paraguay, Argentina, Bangladesh and India. The genetic resistance is the best control method of wheat blast. Many studies have been performed to identify wheat resistant genotypes and resistance genes to *M. oryzae* and to elucidate the mechanism involved in the *M. oryzae*-wheat interaction. The present work had as general aim to characterize the genetic resistance of wheat to *M. oryzae*. The specific aims were i) to identify the most efficient variables in the discrimination of genotypes; ii) to evaluate the presence of 2NS/2AS translocation in contrasting genotypes; iii) to identify resistance QTL to *M. oryzae* at the adult plant stage; and iv) to characterize resistance candidate genes in TILLING mutants and in RNA-seq analyses. The severity of bleached spikletes, area under the disease progress curve and proportion of the average grain weight of the inoculated spike in relation to the controls were efficient in the classification of wheat genotypes. These variables should be considered for the characterization of the wheat in response to *M. oryzae*. Wheat blast resistant lacking the 2NS/2AS translocation were identified. This reinforces the need for studies aiming at the discovery of other genes and/or QTL involved in the resistance. Twelve QTL related to resistance and two with grain production were identified. As far as is known, this is the first QTL mapping of wheat conferring resistance to *M. oryzae* in the world. No change in the phenotype of wheat TILLING mutants was observed for *HSP60* and *WIR1b* genes. The mutants for *Caffeic Acid O-Methyltransferase* presented alterations in the reaction to *M. oryzae*, in seedling and in adult plant stage. Sequencing of wheat head transcriptomes in response to inoculation revealed the molecular functions of heme binding, iron ion binding and oxidoreductase activity as the most representative in GO terms. Exclusively in the resistant genotype CBFusarium ENT014, 24 defense related genes were identified as differentially expressed. These studies allowed the identification of important variables for the characterization of the reaction of wheat genotypes to *M. oryzae*, resistance QTL and differentially expressed genes.

Key words: 1. Blast. 2. *Pyricularia oryzae*. 3. *Triticum aestivum*. 4. Genetic resistance. 5. Major QTL.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	<i>A cultura do trigo: origem e evolução</i>	16
2.2	<i>O trigo no Brasil</i>	17
2.3	<i>A brusone do trigo</i>	19
2.4	<i>Medidas de controle da brusone do trigo</i>	22
2.4.1	Controle cultural	22
2.4.2	Controle químico	23
2.4.3	Controle genético	24
2.5	<i>Identificação de genes de resistência</i>	29
3	CAPÍTULO I - Caracterização da reação de genótipos de trigo a <i>Magnaporthe oryzae</i> na fase de espigamento	33
3.1	<i>Resumo</i>	33
3.2	<i>Introdução</i>	33
3.3	<i>Material e Métodos</i>	36
3.3.1	Material vegetal	36
3.3.2	Isolados do patógeno e condições de cultivo	37
3.3.3	Inoculação com <i>Magnaporthe oryzae</i>	38
3.3.4	Análise estatística	40
3.4	<i>Resultados e Discussão</i>	40
3.5	<i>Conclusões</i>	62
4	CAPÍTULO II - Análise da presença da translocação 2NS/2AS em fontes de resistência de trigo a <i>Magnaporthe oryzae</i> no Brasil	64
4.1	<i>Resumo</i>	64
4.2	<i>Introdução</i>	64
4.3	<i>Material e Métodos</i>	67
4.3.1	Material vegetal	67
4.3.2	Extração de DNA e genotipagem	69
4.4	<i>Resultados e Discussão</i>	70
4.5	<i>Conclusões</i>	74
5	CAPÍTULO III - Identificação de QTL de trigo conferindo resistência a <i>Magnaporthe oryzae</i> em estágio de planta adulta	76

5.1	<i>Resumo</i>	76
5.2	<i>Introdução</i>	76
5.3	<i>Material e Métodos</i>	78
5.3.1	Material Vegetal	78
5.3.2	Isolados de <i>Magnaporthe oryzae</i> e inoculação	78
5.3.3	Avaliação da doença e da produção de grãos e análises estatísticas	79
5.3.4	Extração de DNA	80
5.3.5	Genotipagem	80
5.3.6	Construção do mapa de ligação e detecção de QTL	80
5.3.7	Saturação do cromossomo 2A, detecção de QTL e conversão de marcadores nas regiões dos QTL	81
5.4	<i>Resultados</i>	86
5.4.1	Fenotipagem	86
5.4.2	Construção do mapa de ligação	91
5.4.3	Saturação do cromossomo 2A, detecção de QTL e conversão de marcadores nas regiões dos QTL	94
5.5	<i>Discussão</i>	98
5.6	<i>Conclusões</i>	102
6	CAPÍTULO IV - Caracterização de genes-candidatos de resistência a <i>Magnaporthe oryzae</i> em trigo	103
6.1	<i>Resumo</i>	103
6.2	<i>Introdução</i>	103
6.3	<i>Material e Métodos</i>	106
6.3.1	Seleção de genes-candidatos e dos respectivos mutantes TILLING	106
6.3.2	Inoculação dos mutantes TILLING	108
6.3.3	Avaliação da doença e análise estatística	111
6.3.4	Inoculações com o isolado de <i>Magnaporthe oryzae</i> Py0925	112
6.3.5	Extração de RNA	113
6.3.6	Validação de genes-candidatos por RT-qPCR	114
6.3.7	Sequenciamento dos transcriptomas de BRS 209 e CBFusarium ENT014 em resposta ao isolado de <i>Magnaporthe oryzae</i> Py0925	116
6.4	<i>Resultados e Discussão</i>	117
6.5	<i>Conclusões</i>	138
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	140
8	CONCLUSÃO GERAL	144
	REFERÊNCIAS	146
	ANEXOS	177
	<i>Anexo I- Meio para cultura de isolados de <i>Magnaporthe oryzae</i></i>	<i>178</i>

1 INTRODUÇÃO

O grão de trigo (*Triticum aestivum* L.) possui alto valor nutricional e é alimento básico na dieta de 35% da população mundial. No Brasil, a produção de trigo não atende ao consumo, tornando o país dependente de importações. Sendo assim, o aumento da produção de trigo no País, tanto pela maior produtividade quanto pela expansão da área cultivada, torna-se essencial para reduzir a importação desse cereal. A região do Brasil Central apresenta alto potencial para a produção de trigo, porém uma das principais limitações para a expansão da cultura nessa região é a ocorrência da brusone do trigo, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae*.

O primeiro relato da ocorrência de brusone de trigo foi em 1985 no Brasil e, desde então, foi encontrada na Bolívia, Paraguai, Argentina, Bangladesh e Índia. Esse fungo pode infectar todos os tecidos da parte aérea da planta, porém a infecção da espiga é considerada a forma mais destrutiva da doença, por reduzir a qualidade e o rendimento dos grãos, resultando em perdas econômicas importantes. O fungo penetra na ráquis e a partir da colonização do tecido causa o bloqueio no transporte de nutrientes para a parte acima do ponto de penetração, resultando no branqueamento da espiga, principal sintoma da doença, e na redução do enchimento de grãos. Lesões de *M. oryzae* podem ser observadas em folhas e espigas de trigo e podem ser classificadas com base no seu formato e coloração. Na ráquis, o ponto de penetração, também chamado de ponto de infecção, é caracterizado por uma lesão de formato irregular e coloração negro brilhante.

Para minimizar os danos causados pela brusone de trigo a semeadura deve ser escalonada no final do período recomendado para cada região. Os fungicidas ainda não apresentam eficiência no controle da doença, principalmente quando as condições ambientais são favoráveis ao desenvolvimento do patógeno. Ainda, há dificuldades de cobertura uniforme da espiga pelos fungicidas disponíveis, e de deposição dos produtos

na ráquis, principal ponto de entrada do fungo. Além desses, métodos alternativos para o controle de brusone em trigo, como o uso de silício, estão sendo estudados.

O manejo integrado da doença é o melhor método de controle da brusone do trigo. A resistência genética é uma estratégia importante, porém poucos genótipos de trigo são relatados como resistentes/moderadamente resistentes a *M. oryzae*. Dez genes de resistência a *M. oryzae* foram identificados, mas não há relatos de que eles tenham sido utilizados em programas de melhoramento para desenvolver cultivares de trigo resistentes a *M. oryzae*. Uma associação entre a presença da translocação 2NS/2AS e a resistência de trigo à brusone foi identificada. Trabalhos de transcriptoma também vêm sendo desenvolvidos para caracterizar a resistência genética.

O patossistema *M. oryzae*-trigo é considerado relativamente recente e estudos sobre os componentes genéticos que estão envolvidos na resposta da planta hospedeira ao patógeno ainda são escassos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo geral caracterizar a resistência genética de trigo a *M. oryzae*, e objetivos específicos i) caracterizar a reação de genótipos de trigo a dois isolados de *M. oryzae* e identificar quais variáveis são as mais eficientes na discriminação dos genótipos; ii) avaliar a presença da translocação 2NS/2AS em um conjunto de genótipos de trigo caracterizados como resistentes a *M. oryzae* em condições de viveiros de brusone; iii) identificar QTL de trigo que conferem resistência a *M. oryzae* no estágio de planta adulta; e, iv) caracterizar genes-candidatos de resistência a *M. oryzae* em mutantes TILLING e em análises de RNA-seq.

Este documento é composto, além desta introdução, por uma breve revisão de literatura, onde são abordados os principais aspectos relacionados à brusone do trigo e metodologias que podem ser empregadas na caracterização de fontes e de genes/QTL de resistência de trigo. Em seguida, são apresentados, em quatro capítulos, as atividades de pesquisa desenvolvidas. No Capítulo I, é apresentada a caracterização da reação de dez genótipos de trigo inoculados na fase de espigamento com dois isolados de *M. oryzae* e a identificação de quais variáveis são as mais eficientes na discriminação dos genótipos. O Capítulo II diz respeito à avaliação da presença da translocação 2NS/2AS em quinze genótipos de trigo classificados como resistentes a *M. oryzae* em condições de viveiros

de brusone e dois genótipos suscetíveis. No Capítulo III, é apresentada a identificação de QTL de trigo que conferem resistência a *M. oryzae* no estágio de planta adulta, sendo esse, até onde se sabe, o primeiro relato mundial de QTL de resistência de trigo a *M. oryzae*. No capítulo IV, três genes-candidatos de resistência foram selecionados para serem caracterizados em mutantes TILLING submetidos à inoculação com *M. oryzae* e a validação da expressão diferencial dos genes-candidatos selecionados foi realizada. Também foram desenvolvidas análises de transcriptoma para identificação e/ou confirmação de genes envolvidos nas respostas de defesa da planta frente ao patógeno. Por fim, são apresentadas as Considerações Finais e a Conclusão Geral da tese.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A cultura do trigo: origem e evolução

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é adaptado às regiões temperadas (GUPTA et al., 2008), podendo ser cultivado em áreas com 65° latitude norte até 45° latitude sul, porém encontra dificuldade em regiões tropicais (FEDERIZZI et al., 1999). Conforme dados divulgados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2019), na safra de 2017/2018 a produção mundial de trigo foi de 763,2 milhões de toneladas, sendo o segundo cereal com maior produção de grãos. O grão de trigo possui alto valor nutricional, contendo a maioria dos nutrientes essenciais para a dieta humana, como carboidratos, proteínas, gorduras, minerais e vitaminas (PIANA; CARVALHO, 2008), tornando-o alimento básico na dieta de 35% da população mundial (VOSS-FELS et al., 2015). É utilizado principalmente como farinha para a produção de pães e outros produtos de panificação como biscoitos e massas (PEÑA, 2002).

As espécies do gênero *Triticum* possuem número básico cromossômico de sete, apresentando diferentes níveis de ploidia (diploide: $2n=2x=14$; tetraploide: $2n=4x=28$; e hexaploide: $2n=6x=42$). As espécies diploides silvestres apresentam origem monofilética, apesar de exibir grande divergência, principalmente quanto à morfologia da espiga, distribuição geografia e adaptação ambiental (PIANA; CARVALHO, 2008).

Triticum aestivum é um hexaploide, com genomas conhecidos como A, B e D, organizados em sete grupos homeólogos (GUPTA et al., 2008). Assim, a maioria dos genes em trigo estão presentes em três cópias homólogas (aproximadamente 93-96% de identidade), com função similar (SLADE et al., 2005). Com base nas sequências dos genes *plastid acetyl-CoA carboxylase (Acc-1)* e *plastid 3-phosphoglycerate kinase (Pgk-1)*, Huang et al. (2002) concluíram que *T. urartu* é o doador do genoma A, tanto das

espécies tetraploides quanto das hexaploides. No mesmo estudo, observou-se que as sequências dos genes entre *T. aestivum* e *Aegilops tauschii* são idênticas, confirmando que este último seria o doador do genoma D. A partir de estudos que avaliam a variação em sequências de nucleotídeos repetitivas, Dvorak e Zhang (1990) afirmaram que o doador do genoma B é *A. speltooides* (genoma SS que é altamente relacionado com o genoma B). Acredita-se que tenham ocorrido dois eventos de hibridização natural anteriores à origem de *T. aestivum*, o primeiro entre *T. urartu* e *Ae. speltooides* e, posteriormente, entre *T. turgidum* var. *dicoccum* (originado do cruzamento entre *T. urartu* e *Ae. speltooides*) e *Ae. tauschii* (PIANA; CARVALHO, 2008). O tamanho do genoma do trigo, a poliploidia e o alto conteúdo de DNA repetitivo (85%) foram obstáculos para o sequenciamento completo do genoma, que foi divulgado recentemente (UAUY et al., 2009; APPELS et al., 2018).

2.2 O trigo no Brasil

No Brasil, acredita-se que o trigo tenha sido introduzido com êxito no ano de 1534, na capitania de São Vicente, atual estado de São Paulo (CUNHA, 1999). Desde então, o cultivo foi difundido para outros locais do país como nos estados do Rio Grande Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais e Goiás (SOUSA; CAIERÃO, 2014). Após ser introduzido no Rio Grande do Sul, no ano de 1737, a cultura do trigo tornou-se a principal da região, fazendo do Brasil o principal produtor da América Latina e grande exportador do cereal até a primeira década de 1800 (FEDERIZZI et al., 1999). Logo após esse período, surgiram as epidemias de ferrugem que, juntamente com a abertura dos portos às nações amigas e o interesse pela produção de charque, ocasionaram o quase desaparecimento do trigo das terras brasileiras (JACOBSEN, 1999). Em 1875, o trigo voltou a ser semeado no Rio Grande do Sul, porém somente em pequenas propriedades, para consumo local (SCHEEREN et al., 2011).

O melhoramento genético de trigo no Brasil iniciou com os genótipos selecionados na Estação Experimental Alfredo Chaves, fundada em 1919 no Rio Grande do Sul, e na Estação Experimental de Ponta Grossa, fundada em 1922 no Paraná, ambas instituídas

pelo Ministério da Agricultura (CAIERÃO et al., 2014). Em 1940, o melhoramento brasileiro alcançou êxito com o lançamento da cultivar Frontana, que tinha como principais características o ciclo precoce, o porte mais baixo, a resistência ao crestamento, a resistência à germinação na espiga e principalmente a resistência à ferrugem da folha e à ferrugem linear (BACALTCHUK et al., 2008; SCHEEREN et al., 2011; SOUSA; CAIERÃO, 2014).

O desenvolvimento de cultivares produtivas e adaptadas para as diferentes regiões tritícolas promoveram progressos significativos no cultivo do cereal, porém ainda não foi alcançado todo o potencial da cultura no país. Na safra de 2018/2019, a produção de trigo no Brasil foi de 5,4 milhões de toneladas, porém o consumo foi de 11,4 milhões de toneladas, tornando o país dependente de importações (CONAB, 2019). Sendo assim, o aumento da produção de trigo no País, tanto pela maior produtividade quanto pela expansão da área cultivada, torna-se essencial para reduzir a importação desse cereal.

A região do Brasil Central apresenta alto potencial para a produção de trigo, tanto em cultivo de sequeiro como irrigado (SÓ E SILVA, 2001). Isso é possível com o desenvolvimento de genótipos adaptados às temperaturas mais altas, uma vez que a produtividade da cultura é afetada pelo excesso de calor e baixas altitudes (CORDEIRO et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2011). Alguns dos principais pontos positivos para o cultivo de trigo no Brasil Central são: proximidade dos principais consumidores de trigo no Sudeste do país, capacidade de produção do trigo pão, e possibilidade de colheita na entressafra da produção dos estados do Sul e da Argentina (ALBRECHT et al., 2007; PASINATO et al., 2018). As áreas potenciais para o aumento da produção de trigo nessa região são leste do estado de Goiás, oeste do estado da Bahia, oeste e sul do estado de Minas Gerais e, em menor proporção, sul de Goiás, norte de Minas Gerais e centro da Bahia (FARIAS et al., 2016). As limitações para a expansão da cultura nessa região estão relacionadas a estresses abióticos, como seca e calor, e a estresses bióticos, sendo que a brusone é o principal (MACIEL, 2011; PASINATO et al., 2018).

2.3 A brusone do trigo

A brusone de trigo é uma doença fúngica que impacta diretamente a produção e a qualidade dos grãos. O agente causal da brusone é o fungo *Magnaporthe oryzae* B. C. Couch (anamorfo: *Pyricularia oryzae* Cavara) (COUCH; KOHN, 2002), classificado por pesquisadores da comunidade internacional como o fungo fitopatogênico com maior importância científica e econômica (DEAN et al., 2012). A doença foi observada pela primeira vez na China, em meados de 1600, na cultura do arroz (COUCH et al., 2005) e é ainda considerada a doença de maior importância para esta cultura, tendo sido identificada em 85 países produtores (WANG et al., 2014). Além do arroz, o fungo infecta mais de 50 espécies de plantas, dentre elas aveia, cevada, azevém e trigo (GLADIEUX et al., 2018).

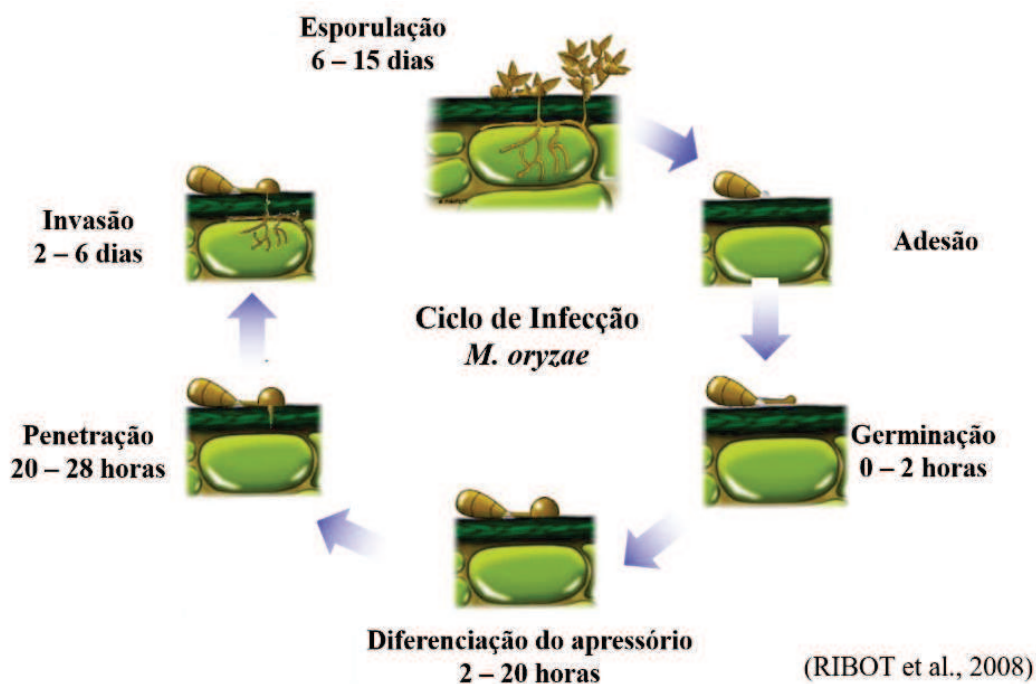
Em trigo, o primeiro relato da doença foi no ano de 1985, nos municípios de Engenheiro Beltrão, Londrina, Primeiro de Maio, Rancho Alegre, São Pedro do Ivaí e Sertãoópolis, no Paraná (IGARASHI et al., 1986). Nos anos seguintes, foi observada a ocorrência da doença no Rio Grande do Sul (PICININI; FERNANDES, 1990), no Mato Grosso do Sul (GOULART; PAIVA; MESQUITA, 1990), em São Paulo (IGARASHI, 1991), em Goiás (PRABHU; FILIPPI; CASTRO, 1992) e nas regiões do cerrado do Brasil Central (ANJOS et al., 1996). Além do Brasil, a brusone é encontrada na Bolívia, Paraguai e Argentina (KOHLI et al., 2011). Infecções esporádicas foram observadas no Uruguai, especialmente em anos quentes e úmidos (KOHLI et al., 2011). Recentemente, a doença atingiu campos em Bangladesh (MALAKER et al., 2016) e reportagens mencionam a presença de brusone na Índia, a partir da fronteira com Bangladesh (BHATTACHARYA; PAL, 2017). Os relatos de brusone em áreas distantes da América do Sul aumentam a preocupação com a dispersão da doença para as grandes regiões tritícolas do mundo.

Magnaporthe oryzae (fase sexuada) é um ascomiceto da ordem Diaporthales, ainda não observado em condições de campo, sendo produzido somente em laboratório. A forma assexuada, *Pyricularia oryzae*, é um deuteromiceto, que apresenta conídios piriformes, obclavados, de base circular e ápice fino, podendo ser hialinos a oliva-claro

com pequeno hilo na base (LAU et al., 2011). Tanto *M. oryzae* quanto *P. oryzae* podem ser empregados como o fungo causador da brusone (ZHANG et al., 2016). O principal mecanismo de disseminação é pelo ar (URASHIMA; LEITE; GALBIERI, 2007). Castroagudín et al. (2016) propuseram separar um conjunto da população do patógeno de trigo como *Pyricularia graminis-tritici*, nova espécie, juntamente com patógenos de outras *Poaceae*. Essa classificação ainda está em discussão na comunidade científica, sendo que é indicado continuar utilizando *M. oryzae/P. oryzae* para o fungo causador da brusone de trigo (CERESINI et al., 2018, 2019; CRUZ; VALENT, 2017; GLADIEUX et al., 2018; VALENT et al., 2019).

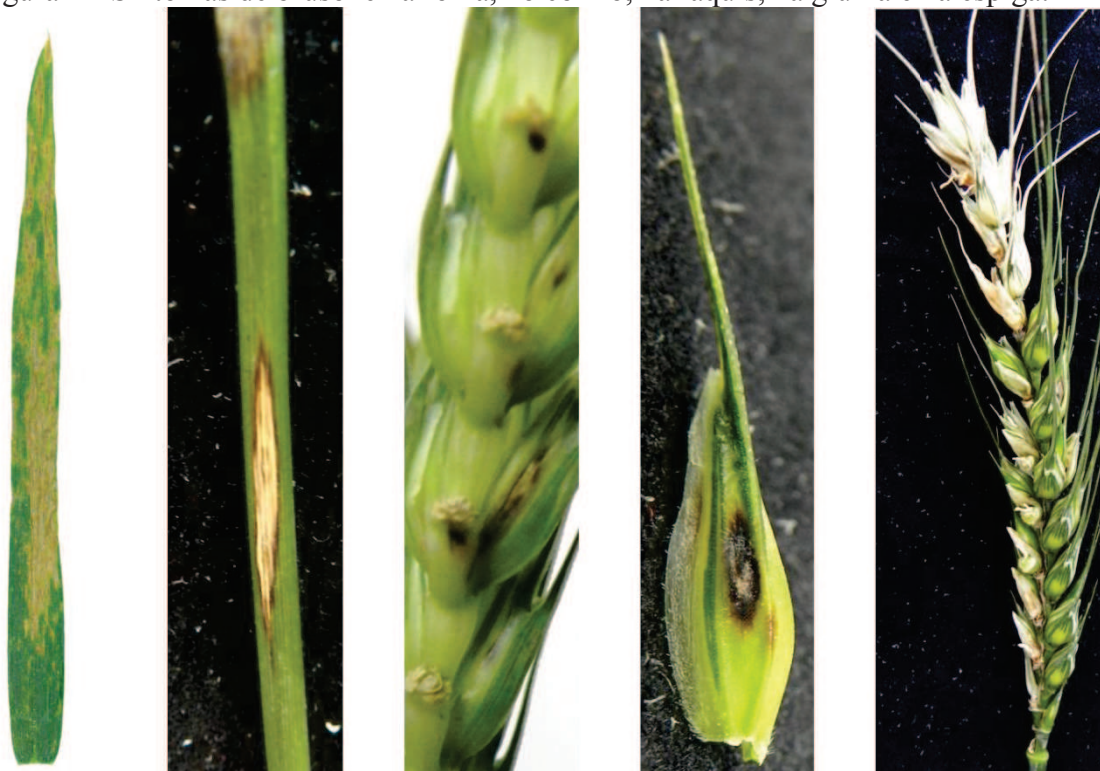
O ciclo de *M. oryzae* (Figura 1) inicia-se com a deposição e a adesão do esporo na superfície de tecidos do hospedeiro. Em condições de alta umidade ocorre a germinação do esporo e, em duas horas, o tubo germinativo está formado (TALBOT, 2003). Logo em seguida, é formado o apressório, uma célula especializada que possibilita a penetração do fungo no tecido vegetal, graças a uma pressão de turgor de aproximadamente 8 MPa (RIBOT et al., 2008). O apressório produz um “peg” de penetração que rompe a superfície da folha, e se expande formando a hifa primária, a qual procura pelos plasmodesmas na parede celular para se mover para as células vizinhas, quando então são produzidas as hifas secundárias (KANKANALA; CZYMMEK; VALENT, 2007). Após a colonização das células pelo fungo, são formadas lesões com novos conídios, completando assim o ciclo de vida do patógeno. *M. oryzae* é considerado hemibiotrófico devido a sua infecção inicial ser biotrófica e, posteriormente, necrotrófica, com a formação de hifas secundárias que matam as células hospedeiras (HORBACH et al., 2011).

Figura 1 - Ciclo de infecção de *Magnaporthe oryzae*.



As lesões causadas por *M. oryzae* podem ser observadas em folhas, colmos, bainhas e espigas (LAU et al., 2011) (Figura 2). Além disso, as sementes também podem ser infectadas e podem ser fonte de inóculo primário da doença (SILVA et al., 2009). Os sintomas que causam maiores danos são os que ocorrem na espiga. Em ráquis de espigas infectadas identifica-se o ponto de penetração do patógeno, caracterizado por uma lesão com coloração negro brilhante e formato irregular. No ponto de penetração, ocorre o estrangulamento da ráquis, o qual impede o transporte de nutrientes para a parte superior da espiga, resultando na descoloração, ou branqueamento, da espiga. Este é o sintoma mais conhecido da brusone em trigo (GOULART; SOUSA; URASHIMA, 2007). O bloqueio da passagem de nutrientes na espiga inviabiliza o enchimento dos grãos fazendo com que tanto a qualidade quanto o rendimento de grãos sejam reduzidos. Em um estudo com 20 cultivares de trigo avaliadas em dois locais, constatou-se redução de rendimento de grãos de 32,3% para a cultivar BRS 210 e de 32,9% para a cultivar Alcover (GOULART; SOUSA; URASHIMA, 2007). Dados semelhantes foram obtidos por Urashima et al. (2009), que observaram reduções de rendimento em grãos de 32,2% da cultivar BRS 208.

Figura 2 - Sintomas de brusone na folha, no colmo, na ráquis, na gluma e na espiga.



Fonte: Imagens do autor.

2.4 Medidas de controle da brusone do trigo

Para minimizar os danos causados pela brusone o manejo integrado faz-se necessário (TORRES et al., 2009). Medidas como escolha da melhor época de semeadura, aplicação de fungicidas e seleção de cultivares com maior resistência devem ser adotadas para o controle mais eficiente da doença (SANTANA et al., 2013).

2.4.1 Controle cultural

A época de semeadura interfere significativamente na incidência da doença (COELHO et al., 2016). Quando semeado no final do período recomendado, comparativamente ao início, ocorreu aumento no rendimento de grãos e no peso de mil grãos, devido à baixa incidência de brusone. Dessa forma, indica-se evitar semeaduras no início do período definido no zoneamento agrícola e realizar o escalonamento da

semeadura em diferentes datas, para que o espigamento seja também escalonado (RCBPTT, 2018a).

O manejo dos resíduos da cultura não é ponto-chave para o controle do patógeno, visto que o tempo máximo de sobrevivência de *M. oryzae* nos restos culturais de trigo é de cinco meses (PIZOLOTTO et al., 2019). Esses autores sugerem que a presença de outros hospedeiros deva ser investigada como fonte de inóculo primário (PIZOLOTTO et al., 2019). Por outro lado, métodos alternativos para o controle de brusone em trigo vêm sendo investigados, como o uso de silício (PAGANI; DIANESE; CAFÉ-FILHO, 2014; CRUZ et al., 2015).

2.4.2 Controle químico

O controle químico da doença ainda não tem o êxito almejado, pois os produtos disponíveis no mercado não apresentam eficiência quando as condições climáticas são favoráveis à ocorrência da brusone, além da alta variabilidade genética de *M. oryzae* e da alta suscetibilidade dos genótipos de trigo ao patógeno. Rocha et al. (2014), avaliando a eficiência de três fungicidas para quatro genótipos de trigo, evidenciaram que o controle da brusone foi eficiente na folha bandeira, porém não o foi nas espigas. Isso ocorre devido ao formato da espiga e à tecnologia de aplicação que dificultam uma cobertura uniforme, impedindo o depósito dos fungicidas nas ráquis, principal ponto de entrada do fungo. Pagani, Dianese e Café-Filho (2014), utilizando os mesmos ingredientes ativos que Rocha et al. (2014), porém em condições diferentes de inoculação, demonstraram controle de até 55% da severidade da doença nas espigas.

Castroagudín et al. (2015) relataram a ocorrência de resistência de *M. oryzae* à estrobilurinas, que pertencem ao grupo de fungicidas conhecidos como inibidores da quinona externa. Esses autores indicam a necessidade de se reexaminar o uso desses fungicidas para o manejo da brusone em trigo. Rios et al. (2016) sugerem que a combinação de resistência genética com o uso de fungicidas reduzem a incidência e a severidade da brusone de trigo. Segundo as Informações Técnicas para Trigo e Triticale – safra 2018, a utilização de fungicidas é economicamente inviável em anos de alta

incidência da doença (RCBPTT, 2018a). Quando a incidência for média ou baixa, a aplicação de fungicidas pode melhorar o rendimento de grãos, indicando-se que sejam utilizados os que tem mancozebe em sua formulação.

2.4.3 Controle genético

Até o momento, poucos são os relatos de genótipos resistentes a *M. oryzae*. Maciel et al. (2008) realizaram um estudo com 25 genótipos de trigo e concluíram que a maioria (aproximadamente 80%) apresentou alta suscetibilidade à doença na espiga. Apesar da alta suscetibilidade, pode-se observar que há variabilidade quanto à reação à doença. Goulart, Sousa e Urashima (2007) observaram variação da porcentagem de espigas doentes de 27% a 95% em 23 genótipos de trigo. No entanto, a alta variabilidade genética do patógeno, juntamente com a falta de conhecimento sobre genótipos de trigo superiores que apresentem resistência de amplo espectro, têm dificultado o trabalho dos melhoristas (URASHIMA et al., 2004). Cultivares como Trigo BR 18–Terená (doravante denominada de “BR 18”), BRS 394, CD 108 e TBIO Mestre são algumas das indicadas para cultivo e que apresentam resistência à brusone (RCBPTT, 2018a).

A compreensão da base genética da interação planta-patógeno contribui efetivamente para o desenvolvimento de genótipos resistentes (HE et al., 2012). O patossistema *M. oryzae*-arroz é considerado modelo para interações planta-patógeno e o estudo dessa interação é facilitada pelo fato de ambos os organismos terem o genoma sequenciado (DEAN et al., 2005; IRGSP, 2005). Há muitas lacunas de conhecimento sobre a interação *M. oryzae*-trigo, por ser uma doença relativamente recente na cultura, comparativamente à do arroz. Assim, as informações já obtidas no patossistema *M. oryzae*-arroz podem auxiliar nos estudos em trigo.

A resistência do hospedeiro é definida como a habilidade da planta em evitar ou atrasar a entrada do patógeno e o seu desenvolvimento nos tecidos (PASCHOLATI, 2011). A resistência pode ser classificada como completa ou parcial (PARLEVLIET, 1979). A resistência completa (também nomeada vertical ou qualitativa) ocorre quando o patógeno é impedido de se multiplicar e é geralmente controlada por um gene de efeito

maior. Os genes de resistência completa são considerados raça-específicos, e geralmente seguem a teoria da interação gene-a-gene de Flor (FLOR, 1971). Segundo essa teoria, cada gene de avirulência do patógeno é reconhecido por um gene de resistência do hospedeiro, resultando em resposta de hipersensibilidade. A resistência completa é considerada pouco durável por ser controlada por um gene, ou seja, qualquer mutação que ocorra no gene de avirulência do patógeno impede que ele seja reconhecido pela planta, impedindo as respostas de defesa. A resistência parcial (também nomeada horizontal ou quantitativa) é caracterizada pela redução do desenvolvimento do patógeno e, geralmente é condicionada por um conjunto de genes de efeito menor que podem estar em diferentes locos, os chamados Quantitative Trait Loci (QTL - em português, “Locos de Característica Quantitativa”). A resistência parcial é raça-não-específica e é uma importante fonte para resistência durável e de amplo espectro (HU et al., 2008).

No patossistema *M. oryzae*-arroz são observadas ambas resistências. A resistência completa é controlada por genes de efeito maior, dominantes ou recessivos, e a resistência parcial é condicionada por um conjunto de genes em diferentes locos, os QTL (WANG et al., 2014). A resistência conferida por genes R em arroz é sabidamente quebrada entre dois a três anos (WANG; VALENT, 2017). Isso ocorre principalmente devido à alta variabilidade genética e de virulência do patógeno (OU, 1980). Embora haja necessidade de desenvolvimento de cultivares que possuam resistência durável, a seleção de QTL ainda é difícil. Em arroz, aproximadamente cem genes de resistência já foram identificados e mapeados, 51% em cultivares indica, 45% em cultivares japônica e 4% em espécies silvestres (SHARMA et al., 2012; WANG et al., 2014). Estes genes foram localizados em todos os cromossomos de arroz, com exceção do cromossomo 3. Muitos dos genes de resistência são organizados em clusters, com concentração sobre os cromossomos 6, 11 e 12 (KOIDE et al., 2009). Dos genes mapeados, 35 deles já foram clonados, sendo três deles QTL (pi21, Pb1 e Pi35) (FUKUOKA et al., 2009, 2015; HAYASHI et al., 2010; SINGH et al., 2015; WANG et al., 2014; WANG; EBBOLE; WANG, 2017).

Em trigo, nove genes de resistência a *M. oryzae* foram identificados, nomeados *Rmg1* (Rwt4) (TAKABAYASHI et al., 2002), *Rmg2* e *Rmg3* (ZHAN; MAYAMA;

TOSA, 2008), *Rmg4* e *Rmg5* (NGA; HAU; TOSA, 2009), *Rmg6* (Rwt3) (VY et al., 2014), *Rmg7* (TAGLE; CHUMA; TOSA, 2015), *Rmg8* (ANH et al., 2015) e *RmgGR119* (WANG et al., 2018). Destes, *Rmg2*, *Rmg3*, *Rmg7*, *Rmg8* e *RmgGR119* conferem resistência a isolados de *M. oryzae* de trigo. Os genes *Rmg2* e *Rmg3*, localizados nos cromossomos 7A e 6B, respectivamente, conferem resistência de planta jovem na cultivar de trigo Thatcher. O gene *Rmg7*, localizado no braço longo do cromossomo 2A da espécie de trigo tetraploide *T. dicoccum*, evidencia a importância dos acessos silvestres para incorporação de genes de resistência no trigo comum hexaploide (*T. aestivum*). *Rmg8* localiza-se no braço longo do cromossomo 2B de trigo comum. *Rmg1*, *Rmg6*, *Rmg7*, *Rmg8* e *RmgGR119* conferem resistência tanto em planta jovem quanto em espiga (ANH et al., 2015; INOUE et al., 2017; TAGLE; CHUMA; TOSA, 2015; WANG et al., 2018). Como existem relatos de que não há correlação entre a reação ao patógeno nos estádios de planta jovem, folha bandeira e espigas, a identificação de resistência de planta adulta torna-se muito importante (MACIEL et al., 2014; TORRES et al., 2015). A interação gene-a-gene já foi comprovada para: *Rmg1* - *PWT4* (HIRATA et al., 2005; TAKABAYASHI et al., 2002); *Rmg6* - *PWT3* (VY et al., 2014); *Rmg7* - *AVR-Rmg8* e *Rmg8* - *AVR-Rmg8* (ANH et al., 2018); e *RmgGR119* - *AVR-Rmg8* e *AVR-RmgGR119* (WANG et al., 2018). Além dos nove genes de resistência, o gene *RmgTd(t)*, considerado um gene de resistência oculto, foi identificado no cromossomo 7B no acesso tetraploide Tat4, conferindo resistência a culturas mutantes brancas de *M. oryzae* (CUMAGUN et al., 2014). Embora esses genes de resistência já tenham sido identificados, não há relatos de que eles venham sendo utilizados nos programas de melhoramento para o desenvolvimento de cultivares de trigo resistentes. Como alguns desses genes apresentam perfil de interação gene-a-gene, é importante que sejam utilizados em conjunto para ampliar a resistência dos genótipos.

Uma associação entre a presença da translocação 2NS/2AS e a resistência de trigo à brusone também foi identificada (CRUZ et al., 2016a). Este fragmento cromossômico (2NS), de 25 a 38 cM, oriundo de *Triticum ventricosum* (sin. *Aegilops ventricosa*), foi introduzido para o cromossomo 2AS da linhagem de trigo comum VPM1 (MAIA, 1967). Neste estudo (CRUZ et al., 2016a), foram identificados genótipos de trigo com menores

índices de brusone e que não possuem a translocação 2NS/2AS, assim como genótipos com a translocação mas apresentando suscetibilidade. Os autores sugerem que a resistência atribuída pela translocação 2NS/2AS depende da base genética da planta e/ou das condições ambientais. Assim, a identificação de novos genes de resistência continua sendo importante.

Em trabalhos realizados por Tufan et al. (2009) foi observado intensa reprogramação transcricional no estágio de planta jovem, em genótipos de trigo inoculados com *M. oryzae*. Os transcritos que tiveram suas funções anotadas foram divididos em quatro categorias, defesa celular, metabolismo da planta, transporte celular e regulação da transcrição. Em trabalho posterior, Tufan et al. (2012) investigaram a complexidade genômica da família gênica TaWIR1, que já havia sido reportada no estudo de 2009, devido a sua potencial importância em resposta à infecção do patógeno. Genes identificados como TaWIR1a, TaWIR1b e TaWIR1c foram altamente induzidos pelo isolado Br32 de *M. oryzae*. Foi observado que o silenciamento da família gênica TaWIR1 não teve efeito sob a penetração inicial de *M. oryzae* na epiderme celular, porém após o estabelecimento do sítio de infecção, o fungo teve maior crescimento dentro do tecido foliar. Esse resultado indica que esta família gênica contribuiria na resistência pós-penetração de *M. oryzae*, no movimento célula-a-célula do fungo. Ainda, considerando folhas de plantas jovens de trigo inoculadas com o patógeno observou-se que menos de 20% dos genes regulados pelo patógeno foram diferencialmente expressos entre interações hospedeiras e não-hospedeiras de trigo com *M. oryzae* (DELVENTHAL et al., 2017).

Embora os resultados obtidos em folhas de planta jovem de trigo sejam importantes, estudos vêm sendo desenvolvidos visando à resistência em planta adulta, já que a infecção da espiga por *M. oryzae* é a forma mais danosa da doença. Análises histopatológicas, bioquímicas (relacionadas com espécies reativas de oxigênio) e de expressão gênica foram realizadas em espigas de cultivares de trigo com respostas contrastantes à brusone (HA; KOOPMANN; VON TIEDEMANN, 2016). As análises de microscopia confocal mostraram que a colonização do fungo nas espiguetas foi semelhante nas duas cultivares, porém, o crescimento da hifa foi mais rápido na cultivar

suscetível. A produção de espécies reativas de oxigênio não foi alterada significativamente pela doença na cultivar suscetível Sumai 3, mas para a cultivar Milan, a produção de O₂- foi, em geral, maior do que quando comparado com o controle. O gene Chi2, envolvido na resposta de resistência das plantas, teve forte indução da expressão na cultivar resistente Milan, aos 5 dias após a inoculação.

Com objetivo de se identificar fontes de resistência a *M. oryzae* em trigo, em 2009, deu-se início a uma iniciativa denominada Wheat Blast Genes Interaction (WheatBGI), sob a coordenação da Embrapa. Entre 2010 e 2015, coleções de genótipos de trigo foram caracterizadas em campo, nos chamados viveiros de brusone, instalados em quatro locais do Brasil: Dourados-MS, Londrina-PR, Passo Fundo-RS e Planaltina-DF. Nos viveiros de brusone, as plantas são sujeitas a alta pressão de inóculo, permitindo a caracterização de resistência de amplo espectro. Dezenas de genótipos foram identificados como fontes de genes de resistência à infecção de *M. oryzae* nos viveiros. Desses, 17 com reações contrastantes em relação à doença foram selecionados para caracterização fenotípica detalhada, em condições controladas de ambiente, com o objetivo de se avaliar interações específicas entre genótipo da planta e isolado do patógeno.

Paralelamente aos estudos de fenotipagem, com o intuito de se desenvolver estudos de mapeamento genético e identificação de QTL, foi desenvolvida uma população de linhagens duplo-haploides (DH), obtidas pela técnica de cultura de micrósporos. A população denominada “população Embrapa-brusone” tem como genitores a cultivar de trigo suscetível BRS 209 (genitor feminino) e CBFusarium ENT014, um genótipo do CIMMYT (genitor masculino) que foi caracterizado como candidato-resistente a *M. oryzae* em condições de ambiente controlado e nos viveiros de brusone. Até o momento, a população conta com 132 linhagens recombinantes. Dados fenotípicos de parte das linhagens dessa população foram obtidos em resposta à inoculação do isolado Py6025 (coleção do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Trigo, número SISGEN AC50A60), em condições controladas de ambiente, no estádio de planta adulta. Os genitores e 107 linhagens duplo-haploides foram genotipados com o chip Axiom™ Wheat Breeder's Genotyping Array (Applied Biosystems®, 550524), composto por 35 mil SNPs.

Amostras de folha bandeira e de espiga dos genitores da população, inoculados com o isolado Py6025, foram coletadas 40 horas após inoculação. O RNA foi extraído e enviado para sequenciamento do transcriptoma, por meio de contratação de serviço (empresa Fasteris SA, Plan-Les-Ouates, Suíça). Essas análises foram realizadas para fins de identificação de genes-candidatos (GC) de resistência.

2.5 Identificação de genes de resistência

Para a identificação de genes de interesse podem ser adotadas, essencialmente, duas abordagens: genética direta e genética reversa. Na genética direta, identifica-se o fenótipo de interesse e, posteriormente, são investigados os genes relacionados com a característica; enquanto que na genética reversa são identificados genes de interesse e então caracteriza-se fenotipicamente indivíduos nos quais estes genes estejam alterados, para avaliar o impacto do gene no fenótipo.

O mapeamento de QTL é uma abordagem de genética direta usual (TANWEER et al., 2015). O QTL é uma região genômica contendo um ou mais genes que exibem associação estatisticamente significativa entre um marcador polimórfico e a variação de uma característica quantitativa (ST.CLAIR, 2010; SEHGAL; SINGH; RAJPAL, 2016). Para o mapeamento, é necessário selecionar genitores altamente contrastantes para a característica de interesse e promover o cruzamento entre eles para gerar uma população (JAMIL et al., 2016). Em espécies que toleram a homozigose, como o trigo, diversas populações de mapeamento podem ser desenvolvidas, derivadas do cruzamento entre genitores homozigotos (duplo-haploides, F2, linhagens endogâmicas recombinantes, retrocruzamentos). O número de indivíduos da população a serem gerados dependerá da frequência de recombinação da espécie, e do método utilizado para se desenvolver a população.

Uma vez desenvolvida a população, deve ser realizada a genotipagem dos genitores e das linhagens resultantes do cruzamento. Diversos marcadores moleculares podem ser utilizados, sendo que os *chips* com grande número de marcadores do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) são os que têm sido amplamente empregados

(WINFIELD et al., 2016; ALLEN et al., 2017). As informações dos marcadores são utilizadas para se construir o mapa genético. A fenotipagem para a característica de interesse deve ser realizada de forma detalhada e precisa para a detecção confiável de QTL.

Durante muito tempo, a detecção de QTL era restrita, devido ao baixo número de informações geradas na genotipagem. Com o avanço da biotecnologia, a genotipagem tornou-se um processo eficiente, altamente informativo e de menor custo unitário por marcador. Ao contrário da genotipagem, para a qual há grande disponibilidade de informações, dados fenotípicos de alta qualidade são escassos. Com isso, a fenotipagem substituiu a genotipagem como o principal gargalo operacional e de restrição financeira por necessitar de intensiva mão-de-obra, ser específica para cada espécie e por ser sensível ao ambiente (COBB et al., 2013). Dispondo-se de dados de genotipagem e de fenotipagem da população, é realizado o mapeamento de QTL com o auxílio de programas computacionais, sendo que a utilização de cada programa depende do tipo de população de mapeamento e do método de análise estatística utilizado (GUPTA; KULWAL; MIR, 2013). Programas como R/qtl (BROMAN et al., 2003), QTL IciMapping (MENG et al., 2015), e GenStat (VSN INTERNATIONAL, 2015) podem ser utilizados no mapeamento de QTL. A variação fenotípica de uma dada característica controlada por um determinado QTL pode variar de 1 a 100%. QTL responsáveis por 20% ou mais da variação fenotípica são considerados de efeito maior (ST.CLAIR, 2010).

Os primeiros estudos de QTL de resistência de arroz a *M. oryzae* foram realizados no início dos anos 90 como, por exemplo, a identificação de 10 QTL relacionados com a resistência durável na cultivar Moroberekan (WANG et al., 1994). Desde então, aproximadamente 350 QTL de resistência foram mapeados (MIAH et al., 2013). Em trigo, nenhum QTL de resistência a *M. oryzae* foi, até o presente momento, mapeado (DEVANNA; SHARMA, 2018).

A abordagem dos GC, genética reversa, é um método promissor. Para geneticistas moleculares, GC são genes com polimorfismos moleculares geneticamente ligados a QTL, ou estatisticamente associados com a variação da característica que está sendo

estudada (PFLIEGER; LEFEBVRE; CAUSSE, 2001). GC podem ser identificados através de análises de expressão diferencial, ou com base em análises *in silico* (MARONE et al., 2013; HU et al., 2008). Em etapas subsequentes, os GC podem ser mapeados, e sua função pode ser estudada pela produção de plantas transgênicas ou caracterização de mutantes. Essa abordagem foi aplicada com sucesso em experimentos que buscavam identificar QTL controlando concentração de proteína e amido no grão de milho (GOLDMAN; ROCHEFORD; DUDLEY, 1993), e genes envolvidos na rota de síntese de flavona de milho com o fenótipo de resposta de defesa da planta à *Helicoverpa zea* associados com um QTL de resistência (BYRNE et al., 1996).

Tanto as informações geradas pelo mapeamento de QTL quanto pelas análises de expressão diferencial podem ser utilizadas na estratégia dos GC. Utilizando a abordagem de genes-candidatos, quatro genes que podem influenciar na interação de arroz com *M. oryzae* ou com *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* foram caracterizados (HU et al., 2008). Cinco GC de resistência codificando oxalato oxidase, desidrina, PR1, quitinase e proteína 14-3-3, respondem por 60,3% da variação da severidade de brusone em folhas, e estão colocalizados com um QTL de resistência (LIU et al., 2004). A função dos GC de resistência pode ser confirmada por análises de superexpressão/supressão dos genes avaliados, ou pela análise de mutantes.

Tendo em vista as dificuldades encontradas com o genoma do trigo devido à formação dos grupos homólogos, o acesso a populações TILLING (*Targeting Induced Local Lesions In Genomes*), possibilita o estudo funcional de genes de importância econômica. O TILLING é uma abordagem de genética reversa que combina mutagênese química (principalmente via Etil Metano Sulfonato – EMS) com *screening* de alto rendimento das mutações. A técnica de TILLING tem sido utilizada para a caracterização de genes em diferentes espécies, como amendoim, arroz, pera, tomate e trigo (KNOLL et al., 2011; PIRON et al., 2010; SESTILI et al., 2010; SUZUKI et al., 2008; TRIQUES et al., 2007). O trigo é especialmente adequado para o TILLING devido à elevada densidade de mutação tolerada por poliploides (SLADE et al., 2012; UAUY et al., 2009; WANG et al., 2012). Ainda não há relatos da utilização de TILLING para o estudo de genes de resistência de trigo a *M. oryzae*.

Genes de resistência identificados podem ser utilizados por programas de melhoramento na piramidação de genes e na seleção assistida por marcadores moleculares (SAM). Quando genes são pirimidados num determinado genótipo observa-se maior nível de resistência ampla. Estratégias como estas diminuem o tempo utilizado para o desenvolvimento de uma nova cultivar, e podem servir de objeto de estudo para o desenvolvimento de genótipos transgênicos. Utilizando a piramidação de genes juntamente com a SAM, foi desenvolvido um genótipo de arroz resistente a *M. oryzae* contendo os genes *Pil+Piz+Pita*. Este genótipo de arroz apresentou resistência em dois viveiros de brusone, locais onde a planta hospedeira é cultivada em condições que favoreçam a alta pressão de inóculo do patógeno estudado, o que é indicativo de resistência ampla (HITTALMANI et al., 2000).

3 CAPÍTULO I - Caracterização da reação de genótipos de trigo a *Magnaporthe oryzae* na fase de espigamento

3.1 Resumo

A brusone é considerada uma ameaça para a produção de trigo em função dos efeitos sobre a produção de grãos. O objetivo do presente estudo foi caracterizar a reação de dez genótipos de trigo a dois isolados de *M. oryzae* e identificar quais variáveis promovem maior discriminação dos genótipos de trigo. As inoculações foram realizadas na fase de espigamento do trigo com os isolados Py0925 e Py11021 de *M. oryzae*. Foram avaliados o tipo de lesão predominante na espiga (TLP) e a severidade de espiguetas com lesão (SEL) aos 5, 7 e 9 dias após a inoculação (DAI). A severidade de espiguetas brancas (SEB) foi avaliada aos 5, 7, 9, 16, 23, 30, 37, 40 e 45 DAI e com esses dados foi estimada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Também foi avaliado o número total de pontos de infecção nos dois lados da ráquis (PIR) e as proporções de número de grãos por espiga (NGE), de grãos normais, de grãos enrugados, de grãos não-desenvolvidos e de peso médio do grão (PMG) de espigas inoculadas em relação às controle. Como resultado, os genótipos CBFusarium ENT014 e CPAC 07434 apresentaram menor SEB e maior PMG. Não foi observada diferença significativa na proporção de NGE entre genótipos resistentes e suscetíveis, mas sim na classificação dos grãos em normais, enrugados e não-desenvolvidos, o que refletiu na diferença significativa na proporção de PMG entre os genótipos. Poucos genótipos apresentaram reação específica a um determinado isolado de *M. oryzae*, sendo que Py11021 promoveu maiores SEB aos 9 DAI e AACPD. As variáveis relacionadas ao branqueamento e à proporção de PMG foram eficientes na discriminação dos genótipos de trigo, ao contrário das variáveis TLP e SEL. Outros estudos devem ser desenvolvidos para entender a influência dos pontos de infecção na reação à doença. Essas informações podem ser utilizadas para a otimização do tempo na avaliação e maior eficiência na caracterização de genótipos de trigo quanto à reação à brusone.

Palavras-chave: 1. Brusone. 2. Fenotipagem. 3. Resistência genética. 4. Severidade. 5. Produção de grãos.

3.2 Introdução

A brusone do trigo, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae* (B.C. Couch e L.M. Kohn, anamorfo *Pyricularia oryzae*), é encontrada no Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina, Bangladesh e Índia (KOHLI et al., 2011; MALAKER et al., 2016; BHATTACHARYA; PAL, 2017). O fungo infecta a ráquis e a colonização desse tecido impede o transporte de nutrientes para a parte superior ao ponto de penetração, causando o branqueamento da espiga, principal sintoma da brusone, e prejudicando o enchimento

de grãos. Em espigas de trigo doentes, o ponto de penetração do patógeno na ráquis, comumente denominado de ‘ponto de infecção’, pode ser identificado pela presença de uma lesão de coloração negra e de formato irregular. Há variabilidade de reação à doença, porém, grande parte dos genótipos são classificados como suscetíveis. Além disso, a variabilidade genética do patógeno e o número restrito de genótipos resistentes têm dificultado o desenvolvimento de cultivares com resistência (URASHIMA et al., 2004).

A eficiência no desenvolvimento de cultivares com resistência a longo prazo está relacionada com a disponibilidade, a diversidade e o tipo de resistência genética do hospedeiro, com a natureza e diversidade de virulência na população do patógeno, com a metodologia de fenotipagem e com o ambiente de seleção para se caracterizar a resistência (CRUZ; VALENT, 2017). As avaliações da reação de genótipos de trigo podem ser conduzidas tanto a campo quanto em condições controladas de ambiente. Inoculações em ambiente controlado têm a vantagem de possibilitar caracterização detalhada do fenótipo, reduzindo a influência da fenologia da planta hospedeira, das variáveis climáticas e de outros patógenos sobre o desenvolvimento da doença.

Trabalhos relatam que, para determinados isolados, existe correspondência de reação da planta de trigo à brusone nos estádios de planta jovem e de planta adulta (INOUE et al., 2017; WANG et al., 2018). Por outro lado, estudos demonstram baixa ou nenhuma correlação na reação da planta hospedeira entre as duas fases de desenvolvimento (CRUZ et al., 2012; MACIEL et al., 2014). Arruda et al. (2005) observaram que genótipos suscetíveis na fase de planta jovem apresentam o mesmo padrão de reação em planta adulta. Porém, plantas jovens com reação de resistência, nem sempre apresentam o mesmo fenótipo em planta adulta. Os autores sugerem que os genótipos que apresentarem suscetibilidade à brusone no estágio de planta jovem poderiam ser descartados das análises em planta adulta. Porém, os materiais que forem resistentes na fase vegetativa deveriam ser avaliados na fase reprodutiva para melhor caracterização. Pesquisas com plantas jovens permitem a avaliação em tempo reduzido de um grande número de genótipos utilizando-se de pouco espaço. No entanto, como não há correlação de reação da planta entre as duas fases de desenvolvimento, as avaliações

na fase de espigamento são mais importantes para a caracterização de genótipos, já que a infecção na espiga é considerada a forma mais danosa da brusone do trigo.

Cruz et al. (2016b) propuseram um protocolo de inoculação para padronizar os testes da reação de genótipos de trigo à inoculação com *M. oryzae*. Este protocolo indica que as plantas sejam cultivadas em casa-de-vegetação ou câmaras de crescimento até o estágio fenológico (EF) 10 da escala de Feekes (LARGE, 1954), fase de emborrachamento – ainda sem a emergência da espiga, que corresponde aos EF 43 a 45 da escala de Zadoks (ZADOKS; CHANG; KONZAK, 1974). Outros trabalhos do mesmo grupo (CRUZ et al., 2016a) apontam que inoculações realizadas na fase de espigamento seriam uma melhor opção, uma vez que a espiga estaria completamente exposta ao inóculo. Inoculações de planta adulta com *M. oryzae* também foram realizadas entre os EF 61 e 70 da escala de Zadoks (ZADOKS; CHANG; KONZAK, 1974), que corresponde a início da antese e início do desenvolvimento do grão leitoso, respectivamente (HA; KOOPMANN; VON TIEDEMANN, 2015; MACIEL et al., 2008).

Em estudo anterior a esse trabalho (FERREIRA et al., 2016a), a reação de genótipos de trigo à inoculação de *M. oryzae* foi avaliada considerando-se em detalhe os estádios da emergência das espigas à abertura das anteras, EF entre 50 e 68, da escala de Zadoks et al. (1974), e que compõem a fase globalmente denominada de “espigamento” (do inglês, *heading*). Observou-se que a fase entre os EF 60 e 68 da escala de Zadoks et al. (1974) é menos informativa para avaliação da reação de genótipos de trigo à brusone, e que a inoculação de genótipos de trigo na fase de espigamento (anterior à visualização das anteras/antese) permite maior discriminação dos sintomas de branqueamento (FERREIRA et al., 2016a). Em doze horas após a inoculação (HAI) com *M. oryzae*, conídios e hifas do patógeno foram observados nas anteras, nos estigmas, nos estiletes e nas páleas de espigas de trigo (HA, KOOPMANN e VON TIEDEMANN, 2016). Conídios de *F. graminearum* germinaram predominantemente nas anteras e nos estiletes de plantas de trigo inoculadas, considerando o mesmo intervalo de tempo, sugerindo que *M. oryzae* não dependeria necessariamente das anteras para causar infecção, como é o caso do agente causal da giberela (HA; KOOPMANN; VON TIEDEMANN, 2016). Como é possível se observar o desenvolvimento do patógeno nas páleas, e sendo a fase

de espigamento mais informativa para a avaliação de genótipos de trigo, o EF 58 da escala de Zadoks (ZADOKS; CHANG; KONZAK, 1974) é considerado indicado para as avaliações de espigas de trigo inoculadas com *M. oryzae*.

Após o primeiro relato da ocorrência da brusone do trigo, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos, buscando-se identificar fontes de resistência ao patógeno. Sob a coordenação da Embrapa Trigo, em 2009, foi implementada uma iniciativa denominada *Wheat Blast Genes Interaction* (WheatBGIn), na qual um dos objetivos foi identificar fontes de resistência a *M. oryzae* (TORRES et al., 2015). Uma coleção de 196 genótipos, de relevância para os programas de melhoramento no Brasil, foi avaliada por três anos em viveiros de brusone instalados em Dourados-MS, em Londrina-PR, e em Planaltina-DF, sob condições naturais de infecção. Oito foram selecionados para estudos detalhados de fenotipagem.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar a reação de dez genótipos de trigo a dois isolados de *M. oryzae* e identificar quais variáveis são as mais eficientes na discriminação dos genótipos de trigo.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Material vegetal

No projeto WheatBGIn, 36 genótipos de trigo foram identificados com incidência de brusone significativamente inferior à apresentada pela cultivar BR 18, referência de moderada resistência, entre as cultivares indicadas para cultivo no Brasil. Entre esses materiais, oito deles foram selecionados para o desenvolvimento deste experimento (Tabela 1). A escolha dos oito genótipos foi baseada em estudos preliminares, com critérios de semelhança quanto ao ciclo de desenvolvimento e de variabilidade fenotípica da reação à doença, quando submetidos à inoculação em condições controladas de ambiente. As cultivares Anahuac 75 e BRS 209 foram adicionadas ao conjunto como controles de suscetibilidade ao patógeno (Tabela 1) (URASHIMA; KATO, 1994; BRUNETTA et al., 2005). Os genótipos de trigo são provenientes do Banco Ativo de

Germoplasma (BAG) da Embrapa Trigo ou dos programas de melhoramento conduzidos na Embrapa.

Tabela 1 - Genótipos de trigo selecionados para a caracterização da reação à inoculação com *Magnaporthe oryzae*.

Genótipo de trigo	Código BAG Embrapa Trigo	Genealogia	Ano de lançamento	País de origem	Reação à brusone
Anahuac 75	BGT00443	II-12300//Lerma-Rojo-64/II-8156/3/Norteno-67	1975	México	S
BRS 209	BGT14405	Jupateco 73/Embrapa 16	2002	Brasil	S
BRS 229	BGT14408	Embrapa 27*3//BR 35/Buck Poncho	2004	Brasil	R
BRS Angico	BGT01454	PF87107/2*IAC13	2002	Brasil	R
CBFusarium ENT014	BGT15263	sem informação	-	México	R
CPAC 07340	BGT20389	CPAC96306/CPAC9985	-	Brasil	R
CPAC 07434	BGT20388	Taurum/BRS 254	-	Brasil	R
Embrapa 27	BGT03372	PF83743/5/PF83182/4/CNT 10*4//Lagoa Vermelha*5/Agatha/3/Londrina*4/Agent//Londrina*3/Nyu Bay	1994	Brasil	R
PF 909	BGT11109	PF83743/PF82252//PF84433/BR 35	-	Brasil	R
Trigo BR 18-Terena*	BGT13539	sem informação	1986	Brasil	R

R = Resistente; S = Suscetível. *Doravante denominada de BR 18.

Os dez genótipos foram semeados e mantidos em casa-de-vegetação. Quando as plantas atingiram a fase de espigamento, no EF 58 da escala de Zadoks (ZADOKS; CHANG; KONZAK, 1974), que corresponde à emergência completa da espiga, foram transferidas para câmara com ambiente climatizado, onde foram submetidas à inoculação.

3.3.2 Isolados do patógeno e condições de cultivo

Os genótipos de trigo foram inoculados com os isolados de *M. oryzae* Py0925 e Py11021 provenientes da coleção de isolados do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Trigo (SISGEN AC50A60). O isolado Py0925 foi obtido de espiga da cultivar de trigo Embrapa 22, coletada em 2009, na cidade de Perdizes-MG. O isolado Py11021

foi obtido de ráquis do genótipo de trigo PF 909 (BGT11109), coletado no ano de 2011, em Londrina-PR. Um terceiro isolado, Py6025, obtido de folhas da cultivar de trigo BRS 208, coletada em 2006, em Coromandel-MG, estava previsto de ser incluído nas análises. Porém, estudos preliminares revelaram a redução na agressividade deste isolado, a níveis não comparáveis aos anteriormente observados.

O preparo do inóculo foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Trigo. Os isolados foram cultivados em meio de aveia (60 gramas de aveia, 12 gramas ágar, q.s.p. 1 litro de água) durante 10 a 14 dias, com temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ e regime de 12h de luz branca fluorescente. Os conídios foram suspensos em água de osmose reversa com Tween 80 (2 gotas para 1 L de água) e a concentração da suspensão foi ajustada para 2×10^5 conídios/mL.

3.3.3 Inoculação com *Magnaporthe oryzae*

A espiga do colmo principal de cada planta foi utilizada nas inoculações. Os dois lados da espiga foram aspergidos com solução de água de osmose reversa e Tween 80 (condição controle) ou com a suspensão de esporos (condição inoculada). Cada espiga foi considerada uma repetição, sendo que foram realizadas sete repetições para cada tratamento. Quinze minutos após a inoculação, as plantas foram submetidas a ambiente com 15 horas de escuro, sob temperatura de 28°C e 24 horas de saturação de umidade. Passadas 24 horas da inoculação, as plantas foram mantidas durante seis dias, com temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 horas de luz e nebulização de água durante 2 minutos, a cada 30 minutos. Aos sete dias após a inoculação (DAI), as plantas foram transferidas para casa-de-vegetação ainda sob condições de manutenção de alta temperatura ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Foi avaliado o tipo de lesão na espiga (TLP) conforme a classificação descrita por Torres et al. (2015) (Figura 1). Foram também avaliadas a severidade de espiguetas com lesão (SEL) aos 5, 7 e 9 DAI e a severidade de espiguetas brancas (SEB) a partir do aparecimento dos sintomas até o total branqueamento ou maturação fisiológica das espigas. As avaliações de SEB foram coletadas aos 5, 7, 9, 16, 23, 30, 37, 44 e 47 DAI. Considerando os dados de SEB foi calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso da

Doença (AACPD). Ao fim do experimento, as espigas foram colhidas e trilhadas individualmente. Foi contado o número de pontos de infecção nos dois lados da ráquis (PIR), o número de grãos por espiga, considerando as classes de grãos normais, grãos enrugados e grãos não-desenvolvidos, e foi estimado o peso médio do grão (em mg) de espigas controle e inoculadas. Com esses dados foram calculadas as proporções de número de grãos por espiga (NGE), de grãos normais, de grãos enrugados, de grãos não-desenvolvidos (Figura 2) e de peso médio do grão (PMG) de espigas inoculadas em relação às controle.

Figura 1 - Classificação dos tipos de lesão de brusone na espiga descrita por Torres et al. (2015).

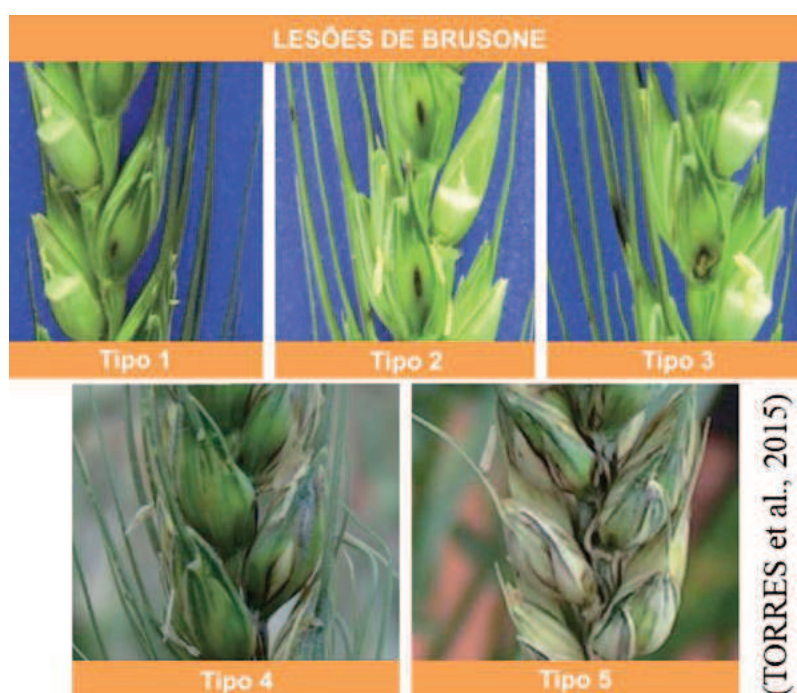


Figura 2 - Classificação dos tipos de grãos de trigo em normal, enrugado e não-desenvolvido.



Fonte: Imagem do autor

3.3.4 Análise estatística

Os efeitos do genótipo, do isolado e da interação genótipo x isolado sobre as variáveis SEL aos 5, 7 e 9 DAI, SEB aos 7, 9 e 16 DAI, AACPD, PIR, NGE e PMG foram estimados utilizando o algoritmo de máxima verossimilhança restrita (REML). Para atender os pressupostos de normalidade dos resíduos, homocedasticidade e independência dos erros, os dados de SEL aos 5 DAI e proporção de NGE foram transformados pelo método de Box-Cox; os dados de SEL aos 7 e 9 DAI, SEB aos 7, 9 e 16 DAI, AACPD e proporção de PMG foram transformados com o arco seno da raiz quadrada, e os dados de PIR foram transformados com raiz quadrada. Análises de correlação entre as variáveis foram realizadas. Para verificar a similaridade dos genótipos, em relação às variáveis analisadas, foi realizada Análise de Componentes Principais (ACP). Além disso, utilizou-se um método não hierárquico para a determinação das classes, com a soma de quadrados entre grupos, e um dendrograma foi construído, com uma matriz de similaridade euclidiana, com base no método de associação média. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa GenStat 18th Edition (VSN INTERNATIONAL, 2015).

3.4 Resultados e Discussão

Todos os genótipos de trigo apresentaram mais de um tipo de lesão numa mesma espiga inoculada. Esse tipo de reação é denominado de mesotético e é comumente observado em inoculações de genótipos de trigo com *M. oryzae* (Torres et al., 2015). Dessa forma, foi considerado o tipo de lesão predominante, ou seja, o tipo que apresentava maior frequência de ocorrência na espiga (TLP) (Tabela 2, Figura 3). Além da espiga, há relatos de reação mesotética em folhas de plantas jovens de trigo (URASHIMA et al., 2004). Somente CBFusarium ENT014 e CPAC 07340 apresentaram o mesmo TLP para os dois isolados do patógeno, e em todos os intervalos de tempo de avaliação (Tabela 2). Não foi possível observar um padrão de TLP para os genótipos suscetíveis e para os resistentes.

Figura 3 - Tipos de lesão em espigas de trigo inoculadas com *Magnaporthe oryzae*.



Fonte: Imagens do autor.

Tabela 2 - Tipo de lesão predominante em espigas de genótipos de trigo inoculados com os isolados de *Magnaporthe oryzae* Py0925 e Py11021, aos cinco, aos sete e aos nove dias após a inoculação.

Genótipo de trigo	Py0925			Py11021		
	TLP 5DAI	TLP 7DAI	TLP 9DAI	TLP 5DAI	TLP 7DAI	TLP 9DAI
Anahuac 75	1	5	6	0	2	6
BRS 209	5	5	6	4	5	6
BRS 229	2	2	4	4	4	4
BRS Angico	4	4	4	4	4	5
CBFusarium ENT014	2	2	2	2	2	2
CPAC 07340	4	4	4	4	4	4
CPAC 07434	2	3	4	0	2	4
Embrapa 27	2	4	4	4	4	5
PF 909	3	4	4	0	2	6
Trigo BR 18-Terena	4	5	6	0	2	6

TLP = tipo de lesão predominante, DAI = dias após a inoculação. 0 a 6 = tipos de lesão segundo Torres et al. (2015).

Em arroz, as lesões causadas por *M. oryzae* são comumente avaliadas em folhas de planta jovem, classificadas em tipos de 0 a 5, sendo que geralmente é observado um tipo de lesão por genótipo (BONMAN; DE DIOS; KHIN, 1986; VALENT; FARRALL; CHUMLEY, 1991). Os genótipos são considerados resistentes ou suscetíveis com base no tipo de lesão observado. Em trigo, as classes de 0 a 5 também foram definidas para

avaliações em planta jovem (TAKABAYASHI et al., 2002; URASHIMA; IGARASHI; KATO, 1993). Torres et al. (2015) propuseram adicionar o tipo 6 de lesão, e apresentam imagens dos diferentes tipos de lesão em folha bandeira e em espiga de trigo, que não haviam sido anteriormente descritos para esses tecidos.

Urashima, Igarashi e Kato (1993) determinaram que genótipos que apresentassem lesões do tipo 0, 1 e 2 seriam considerados resistentes, enquanto que os que apresentassem lesões do tipo 3 e 4 seriam considerados suscetíveis, quando avaliados aos 6 DAI em planta jovem. Ao comparar essa classificação com os resultados deste trabalho, somente o genótipo CBFusarium ENT014 poderia ser classificado como resistente, ao longo de todas as avaliações. Anahuac 75 apresentou padrão de TLP semelhante à BR 18, para as avaliações com ambos os isolados. Porém, Anahuac 75 é uma cultivar suscetível e BR 18 é considerada resistente a *M. oryzae* em condições de campo. O tipo de lesão 3 somente foi predominante nas linhagens PF 909 aos 5 DAI e CPAC 07434 aos 7 DAI. Da mesma forma, o tipo de lesão 1 foi observado somente na cultivar Anahuac 75 aos 5 DAI. Como houve dificuldade em se encontrar um padrão de TLP entre os genótipos suscetíveis e resistentes, essa característica não seria indicada para a avaliação da reação de espigas de genótipos de trigo inoculados com *M. oryzae*.

A SEL, assim como o TLP, foi avaliada aos 5, 7 e 9 DAI (Tabela 3). Aos 5 e 7 DAI todos os genótipos foram avaliados, enquanto que aos 9 DAI as cultivares de trigo BRS 209 inoculada com os dois isolados, Anahuac 75 inoculada com Py0925, e BR 18 e PF 909 inoculados com Py11021 já apresentavam branqueamento total da espiga e, portanto, não puderam ser avaliados quanto à presença de lesões nas espiguetas (Tabela 3). Para os três intervalos de avaliação de SEL, observou-se alta influência do genótipo de trigo e ausência de influência do isolado de *M. oryzae* (Tabela 4). Há efeito significativo da interação genótipo x isolado aos 5 e 7 DAI (Tabela 4). Aos 5 DAI, Anahuac 75, BRS 229, CPAC 07340, Embrapa 27 e Trigo BR 18-Terena apresentaram diferença significativa entre os isolados avaliados (Tabela 5). O mesmo ocorreu para CPAC 07340, Embrapa 27 e PF 909 aos 7 DAI, e CPAC 07434 aos 9 DAI (Tabela 5).

Tabela 3 - Média da severidade de espiguetas com lesão avaliada nos genótipos de trigo aos cinco, aos sete e aos nove dias após a inoculação com *Magnaporthe oryzae*.

Genótipos	SEL_5DAI		SEL_7DAI		SEL_9DAI	
	Py0925	Py11021	Py0925	Py11021	Py0925	Py11021
Anahuac 75	37,5	77,8	62,8	86,3	SA	11,8
BRS 209	71,4	68,5	9,5	30,4	SA	SA
BRS 229	24,1	60,4	64,3	77,9	41,2	50,3
BRS Angico	71,0	49,1	78,9	81,7	43,1	49,4
CBFusarium ENT014	38,8	43,6	71,4	60,3	70,9	73,7
CPAC 07340	87,8	37,2	94,6	56,7	69,2	47,5
CPAC 07434	75,9	87,4	84,5	93,0	82,0	92,6
Embrapa 27	80,6	33,2	91,4	69,2	48,7	50,0
PF 909	80,0	91,0	77,0	98,0	44,3	SA
Trigo BR 18-Terena	62,2	85,8	79,3	95,6	39,1	SA

SEL= severidade de espiguetas com lesão (expressa em porcentagem), SA= sem avaliação. Valores sem transformação.

Tabela 4 - Análise do modelo linear misto para efeitos fixos do genótipo de trigo, do isolado de *Magnaporthe oryzae* e da interação genótipo x isolado sobre o parâmetro de severidade de espiguetas com lesão, avaliada aos cinco, aos sete e aos nove dias após a inoculação.

Fonte de variação	GL	SEL_5DAI	SEL_7DAI	SEL_9DAI
Genótipo	9(8)	6,50***	4,26***	7,99***
Isolado	1(1)	0,05	0,53	0,76
Genótipo x Isolado	9(5)	7,96***	4,68***	1,71

GL = graus de liberdade, SEL = severidade de espiguetas com lesão, DAI = dias após a inoculação.

Números entre parênteses representam os graus de liberdade para SEL_9DAI. A diferença significativa entre as amostras é identificada por *** = $p \leq 0,001$.

Tabela 5 - Análise da interação entre dez genótipos de trigo e dois isolados de *Magnaporthe oryzae* para severidade de espiguetas com lesão aos cinco, aos sete e aos nove dias após a inoculação.

	i1	i2	i1	i2	i1	i2	i1	i2	i1	i2	i1	i2	i1	i2	i1	i2	i1	i2	i1	i2	
	A75	A75	B18	B18	209	209	229	229	Ang	Ang	434	434	340	340	CBF	CBF	E27	E27	909	909	
i1 A75	-																				
i2 A75	5	-																			
i1 B18			-																		
i2 B18	5 7		5	-																	
i1 209	5 7	7	7	7	-																
i2 209	5	7		7		-															
i1 229		5	5	5 7	5 7	5	-														
i2 229				5 7	7		5	-													
i1 Ang	5				7		5		-												
i2 Ang		5		5	7	7	5			-											
i1 434	5	9			7	7	5 9	9	9	5 9	-										
i2 434	5 7	9	5 9		5 7	5 7	5 7 9	5 7 9	5 9	5 9	9	-									
i1 340	5 7	9	5		7	7	5 7 9	5 7	9	5		9	-								
i2 340		5 7	7	5 7	5 7	5			5 7	7	5 7 9	5 7 9	5 7	-							
i1 CBF		5 9		5 7	5 7	5		9	5 9		5	5 7 9	5 7	9	-						
i2 CBF		5 7 9		5 7	5 7			9	9	5 9	7 9	5 7	5 7 9	5 7	9		-				
i1 E27	5 7		5		7	7	5 7	5		5		9	9		5 7	5 7	5 7 9	-			
i2 E27		5 9	5	5 7	5 7	5		5	5		5 9	5 7 9	5 7					5 7	-		
i1 909	5			7	7		5			5		9	7 9	7 9	5	5 9	5 9	7	5	-	
i2 909	5 7	7	5 7		7	5 7	5 7	5 7	7	5 7	7				5 7	5 7	5 7		5 7	7	-

i1 = Py0925, i2 = Py11021, A75 = Anahuac 75, B18 = Trigo BR 18-Terena, 209 = BRS 209, 229 = BRS 229, Ang = BRS Angico, 434 = CPAC 07434, 340 = CPAC 07340, CBF = CBFusarium ENT014, E27 = Embrapa 27, 909 = PF 909.

A diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras é identificada pelos números 5, 7, 9 representando as avaliações aos 5, 7, 9 dias após a inoculação, respectivamente.

Para aumentar a acurácia das avaliações, sugere-se que seja calculada a severidade real, contando-se o número de espiguetas com sintomas em relação ao total de espiguetas (TORRES et al., 2015), como foi aplicado nesse estudo. Essa metodologia também é adotada na quantificação de giberela em espigas de trigo (GROTH; OZMON; BUSCH, 1999). Anahuac 75, que é suscetível, apresentou SEL semelhante à de BRS 229 e de CBFusarium ENT014 que são considerados resistentes ao patógeno. Devido a essa semelhança, SEL não permite a diferenciação entre os genótipos resistentes e suscetíveis, visto que esses podem apresentar a mesma porcentagem de espiguetas com lesão, mas com variações quanto ao tipo de lesão e quanto ao branqueamento da espiga.

Os dados de SEB aos 5 DAI não foram analisados individualmente porque poucas espigas apresentavam espiguetas brancas. As avaliações aos 7, 9 e 16 DAI foram selecionadas para análise individual, além da AACPD que foi calculada com as avaliações desde 5 até 44 DAI (Tabela 6). Aos 7 e aos 9 DAI, observou-se influência altamente significativa do genótipo, do isolado e da interação genótipo x isolado (Tabela 7). Há efeito significativo do genótipo para os dados de SEB_16 DAI e de AACPD. O isolado teve efeito significativo a 5% sobre a AACPD, mas não houve efeito da interação genótipo x isolado, nem para SEB_16DAI nem para AACPD (Tabela 7).

Tabela 6 - Média da severidade de espiguetas brancas avaliada nos genótipos de trigo aos sete, aos nove e aos dezesseis dias após a inoculação com *Magnaporthe oryzae* e a AACPD.

Genótipos	SEB_7DAI		SEB_9DAI		SEB_16DAI		AACPD	
	Py0925	Py11021	Py0925	Py11021	Py0925	Py11021	Py0925	Py11021
Anahuac 75	49,5	0,0	100,0	98,3	100,0	100,0	4349,0	4242,4
BRS 209	98,6	94,4	100,0	100,0	100,0	100,0	4631,5	4438,8
BRS 229	0,0	0,0	15,5	38,8	84,3	94,5	3737,2	3936,2
BRS Angico	11,7	3,6	62,0	57,1	100,0	97,9	4102,2	4049,3
CBFusarium ENT014	0,0	0,0	0,0	0,0	18,8	2,2	2789,9	2562,5
CPAC 07340	0,0	0,0	25,4	28,7	66,6	80,5	3566,2	3752,1
CPAC 07434	0,0	0,0	0,0	16,3	63,1	50,5	3281,0	3367,7
Embrapa 27	6,3	0,8	44,4	67,5	100,0	100,0	4012,3	4105,2
PF 909	10,0	0,0	30,2	100,0	98,1	100,0	3942,9	4250,0
Trigo BR 18-Terena	16,3	0,0	92,5	100,0	100,0	100,0	4249,1	4250,0

SEB= severidade de espiguetas brancas. Valores sem transformação.

Tabela 7 - Análise do modelo linear misto para efeitos fixos do genótipo de trigo, do isolado de *Magnaporthe oryzae* e da interação genótipo x isolado sobre os parâmetros de severidade de espiguetas brancas e de área abaixo da curva de progresso da doença.

Fonte de variação	GL	SEB_7DAI	SEB_9DAI	SEB_16DAI	AACPD
Genótipo	9	63,97***	51,36***	43,75***	57,95***
Isolado	1	18,28***	14,95***	0,00	4,79*
Genótipo x Isolado	9	4,55***	4,32***	1,17	1,52

GL = graus de liberdade, SEB = severidade de espiguetas brancas, DAI = dias após a inoculação, AACPD = Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença.

A diferença significativa entre as amostras é identificada por *** $p \leq 0,001$ e * $p \leq 0,05$.

Para determinar o grau de severidade da doença, pode ser utilizado notas (ARRUDA et al., 2005) ou escala diagramática (MACIEL et al., 2013), porém a avaliação da severidade real da doença permite maior precisão dos dados. O mesmo método foi adotado por Rocha et al. (2014) para avaliar a eficiência de fungicidas no controle da brusone do trigo. Quando inoculados com os dois isolados de *M. oryzae*, somente as médias dos genótipos Anahuac 75, PF 909 e BR 18 diferiram aos 7 DAI; BRS 229 e PF 909, aos 9 DAI; CPAC 07340 e CBFusarium ENT014 aos 16 DAI; e CPAC 07434 e CBFusarium ENT014 para AACPD (Tabela 8).

Tabela 8 - Análise da interação entre dez genótipos de trigo e dois isolados de *Magnaporthe oryzae* para severidade de espiguetas brancas aos cinco, aos sete e aos dezesseis dias após a inoculação e para Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença.

	i1 A75	i2 A75	i1 B18	i2 B18	i1 209	i2 209	i1 229	i2 229	i1 Ang	i2 Ang	i1 434	i2 434	i1 340	i2 340	i1 CBF	i2 CBF	i1 E27	i2 E27	i1 909	i2 909	
i1 A75	-																				
i2 A75	7	-																			
i1 B18	7	7	-																		
i2 B18	7		7	-																	
i1 209	7	7 a	7 a	7 a	-																
i2 209	7	7	7	7		-															
i1 229	7 9 ◊ a	9 ◊ a	7 9 ◊ a	9 ◊ a	7 9 ◊ a	7 9 ◊ a	-														
i2 229	7 9 a	9	7 9 a	9 a	7 9 a	7 9 a	9	-													
i1 Ang	7 9	9	9	9	7 9 a	7 9	9 ◊ a		-												
i2 Ang	7 9	9	9	9	7 9 a	7 9 a	9 a	9		-											
i1 434	7 9 ◊ a	9 ◊ a	7 9 ◊ a	9 ◊ a	7 9 ◊ a	7 9 ◊ a	◊ a	9 ◊ a	9 ◊ a	9 ◊ a	-										
i2 434	7 9 ◊ a	9 ◊ a	7 9 ◊ a	9 ◊ a	7 9 ◊ a	7 9 ◊ a	◊ a	9 ◊ a	9 ◊ a	9 ◊ a	a	-									
i1 340	7 9 ◊ a	9 ◊ a	7 9 ◊ a	9 ◊ a	7 9 ◊ a	7 9 ◊ a	◊	◊ a	9 ◊ a	9 ◊ a	9 a		-								
i2 340	7 9 ◊ a	9 ◊ a	7 9 ◊ a	9 ◊ a	7 9 ◊ a	7 9 ◊ a			9 ◊ a	9	9 ◊ a	◊ a	◊	-							
i1 CBF	7 9 ◊ a	9 ◊ a	7 9 ◊ a	9 ◊ a	7 9 ◊ a	7 9 ◊ a	◊ a	9 ◊ a	9 ◊ a	9 ◊ a	◊ a	◊ a	9 ◊ a	9 ◊ a	-						
i2 CBF	7 9 ◊ a	9 ◊ a	7 9 ◊ a	9 ◊ a	7 9 ◊ a	7 9 ◊ a	◊ a	9 ◊ a	9 ◊ a	9 ◊ a	◊	◊ a	9 ◊ a	9 ◊ a	◊ a	-					
i1 E27	7 9	9	9	9	7 9 a	7 9 a	9 ◊				9 ◊ a	9 ◊ a	◊ a	◊	9 ◊ a	9 ◊ a	-				
i2 E27	7 9	9	7 9	9	7 9 a	7 9 a	9 ◊ a	9			9 ◊ a	9 ◊ a	9 ◊ a	9 ◊ a	9 ◊ a	9 ◊ a		-			
i1 909	7 9 a	7 9	9	7 9	7 9 a	7 9 a	7	7	9	9	7 9 ◊ a	7 ◊ a	7 ◊ a	7	7 9 ◊ a	7 9 ◊ a			9	-	
i2 909	7		7		7 a	7	9 ◊ a	9 a	9	9	9 ◊ a	9 ◊ a	9 ◊ a	9 ◊ a	9 ◊ a	9 ◊ a	9	9	7 9	-	

i1 = Py0925, i2 = Py11021, A75 = Anahuac 75, B18 = Trigo BR 18-Terena, 209 = BRS 209, 229 = BRS 229, Ang = BRS Angico, 434 = CPAC 07434, 340 = CPAC 07340, CBF = CBFusarium ENT014, E27 = Embrapa 27, 909 = PF 909.

Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras indicada pelos caracteres '7', '9', e '◊', representando as avaliações aos 7, aos 9, e aos 16 dias após a inoculação, respectivamente, e 'a' para AACPD.

A cultivar Anahuac 75, de origem mexicana, é considerada altamente suscetível a *M. oryzae* (URASHIMA; KATO, 1994). BRS 209 também já havia sido avaliada como uma das mais suscetíveis à doença aos 10 DAI (PRESTES et al., 2007). No presente estudo, BRS 209 apresentou-se mais suscetível do que Anahuac 75, considerando os dois isolados (Tabela 6), porém a diferença quanto à SEB somente foi significativa aos 7 DAI, para ambos os isolados (Tabela 8). BR 18 e BRS 229 são relatados como moderadamente resistentes/resistentes a *M. oryzae* (GOULART; SOUSA; URASHIMA, 2007; TORRES et al., 2009). Considerando os dados de SEB_9DAI, SEB_16DAI e AACPD, BR 18 não diferiu significativamente nem de Anahuac 75 nem de BRS 209 (Tabela 8). Em estudo conduzido sob condições controladas, BR 18 foi considerado resistente em estágio de planta jovem, mas em estágio de planta adulta foi considerado suscetível (ARRUDA et al., 2005). A reação desta cultivar ao patógeno é, portanto, específica para os isolados utilizados nos diferentes estudos, ou para as condições de inoculação, visto que a campo, desde o seu lançamento em 1986, a cultivar continua sendo indicada para cultivo na região do Brasil Central (RCBPTT, 2018). Considerando a AACPD, BRS 229 apresentou valores semelhantes aos de BRS Angico, CPAC 07340, Embrapa 27 e PF 909 (Tabela 6; Tabela 8). Os genótipos CBFusarium ENT014 e CPAC 07434 destacaram-se dos demais por apresentarem as menores SEB e AACPD (Tabela 6).

O ponto de infecção, local por onde o fungo penetra na ráquis de trigo, não é uma característica muito investigada nos estudos que buscam o entendimento da relação *M. oryzae*-trigo. Acreditava-se que para cada espiga com sintomas da doença haveria um ponto de infecção na ráquis, e que a posição desse ponto ao longo da ráquis definiria quanto da espiga seria afetada. Consequentemente, a posição do ponto teria efeito sobre a produção de grãos. Porém, em 2004, já havia relatos de que em anos de ataques severos da doença, poderiam ser observados mais de um ponto de infecção na ráquis de espigas infectadas (Toledo, 2004). Recentemente, outros autores também relataram que em alguns genótipos pode-se observar mais de um PIR (CERESINI et al., 2019; FERREIRA et al., 2016b). Nos experimentos conduzidos nesse estudo, foi contado o número total de PIR nos dois lados das ráquis de espigas inoculadas com *M. oryzae* (Tabela 9). Observou-

se efeito altamente significativo do genótipo de trigo, do isolado de *M. oryzae* e da interação genótipo x isolado (Tabela 10). Há efeito do isolado para CBFusarium ENT014, CPAC 07340, Embrapa 27, PF 909 e BR 18 (Tabela 11). Independentemente do isolado, Anahuac 75 não diferiu significativamente de BRS 209, assim como BRS 229 não diferiu de CPAC 07340 (Tabela 11).

Tabela 9 - Média do total de número de pontos de infecção na ráquis de dez genótipos de trigo inoculados com os isolados de *Magnaporthe oryzae* Py0925 e Py11021.

Genótipos de trigo	PIR	
	Py0925	Py11021
Anahuac 75	5	3
BRS 209	5	7
BRS 229	26	18
BRS Angico	22	13
CBFusarium ENT014	59	34
CPAC 07340	28	20
CPAC 07434	54	46
Embrapa 27	45	6
PF 909	32	15
Trigo BR 18-Terena	15	6

PIR = Númro de pontos de infecção na ráquis. Valores sem transformação.

Tabela 10 - Análise do modelo linear misto para efeitos fixos do genótipo de trigo, do isolado de *Magnaporthe oryzae* e da interação genótipo x isolado para número de pontos de infecção na ráquis.

Fonte de variação	GL	PIR
Genótipo	9	31,52***
Isolado	1	46,65***
Genótipo x Isolado	9	5,18***

GL = graus de liberdade, PIR = número de pontos de infecção na ráquis. A diferença significativa entre as amostras é identificada por *** = $p \leq 0,001$

Tabela 11 - Análise da interação entre dez genótipos de trigo e dois isolados de *Magnaporthe oryzae* para número de pontos de infecção na ráquis.

	i1 A75	i2 A75	i1 B18	i2 B18	i1 209	i2 209	i1 229	i2 229	i1 Ang	i2 Ang	i1 434	i2 434	i1 340	i2 340	i1 CBF	i2 CBF	i1 E27	i2 E27	i1 909	i2 909	
i1 A75	-																				
i2 A75		-																			
i1 B18	*	*	-																		
i2 B18			*	-																	
i1 209			*		-																
i2 209			*			-															
i1 229	*	*		*	*	*	-														
i2 229	*	*		*	*	*		-													
i1 Ang	*	*		*	*	*			-												
i2 Ang	*	*		*	*	*	*			-											
i1 434	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-										
i2 434	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		-									
i1 340	*	*	*	*	*	*				*	*	*	-								
i2 340	*	*		*	*	*					*	*	*	-							
i1 CBF	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			*	*	-						
i2 CBF	*	*	*	*	*	*		*		*	*			*	*	-					
i1 E27	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			*	*					-		
i2 E27			*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		-	
i1 909	*	*	*	*	*	*		*		*	*			*	*	*	*	*	*		-
i2 909	*	*		*	*	*					*	*	*		*	*	*	*	*	*	-

i1 = Py0925, i2 = Py11021, A75 = Anahuac 75, B18 = Trigo BR 18-Terena, 209 = BRS 209, 229 = BRS 229, Ang = BRS Angico, 434 = CPAC 07434, 340 = CPAC 07340, CBF = CBFusarium ENT014, E27 = Embrapa 27, 909 = PF 909.

Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras indicada pelo caractere *.

A amplitude de variação, para os dez genótipos de trigo avaliados no experimento com os dois isolados de *M. oryzae*, foi de 3 a 59 pontos de infecção nos dois lados da ráquis (Tabela 9). Na cultivar Embrapa 27, entre os dois isolados foi observada alta variação do número de PIR. Em algumas repetições das cultivares Anahuac 75 e BRS 209, nenhum PIR foi identificado. Anahuac 75 e BRS 209 apresentaram os menores PIR, enquanto que CBFusarium ENT014 e CPAC 07434 apresentam as maiores quantidades de PIR (Tabela 9). Por outro lado, ao se analisar a SEB, Anahuac 75 e BRS 209 apresentaram maior branqueamento da espiga do que CBFusarium ENT014 e CPAC 07434. Genótipos com menor número de PIR foram os mais suscetíveis à doença (com maior branqueamento), enquanto que aqueles com maior número de PIR apresentaram as menores SEB, o que indica uma relação inversa entre as duas variáveis. Mais estudos devem ser realizados para se verificar a importância dos PIR na reação de genótipos de trigo a *M. oryzae*.

Dados da proporção do número de grãos por espiga (NGE) e do peso médio do grão (PMG) de espigas inoculadas em relação às controle também foram analisados (Tabela 12). Houve efeito altamente significativo para genótipo, isolado e interação genótipo x isolado, para ambas as variáveis (Tabela 13).

Tabela 12 - Proporção do número de grãos por espiga e do peso médio do grão de espigas inoculadas com os isolados de *Magnaporthe oryzae* Py0925 e Py11021, em relação às espigas controle.

Genótipo	NGE		PMG	
	Py0925	Py11021	Py0925	Py11021
Anahuac 75	97,8	87,2	6,1	4,2
BRS 209	93,9	153,5	4,8	3,4
BRS 229	82,2	120,2	6,4	16,4
BRS Angico	98,7	91,7	11,1	6,2
CBFusarium ENT014	89,0	89,8	41,1	94,1
CPAC 07340	91,4	103,3	25,0	15,9
CPAC 07434	118,2	120,0	39,1	26,6
Embrapa 27	92,8	81,8	9,6	4,1
PF 909	72,0	133,5	13,0	3,2
Trigo BR 18-Terena	99,1	77,5	2,7	1,8

NGE = proporção do número de grãos por espiga de espigas inoculadas em relação às controle (em porcentagem),
PMG = proporção do peso médio do grão de espigas inoculadas em relação às controle (em porcentagem).

Tabela 13 - Análise do modelo linear misto para efeitos fixos do genótipo de trigo, do isolado de *Magnaporthe oryzae* e da interação genótipo x isolado sobre os parâmetros de proporção do número de grãos por espiga e do peso médio do grão de espigas inoculadas em relação às controle.

Fonte de variação	GL	NGE	PMG
Genótipo	9	3,38***	24,12***
Isolado	1	10,25**	12,17***
Genótipo x Isolado	9	5,71***	3,58***

GL = graus de liberdade, NGE = proporção do número de grãos por espiga de espigas inoculadas em relação às controle, PMG = proporção do peso médio do grão de espigas inoculadas em relação às controle. A diferença significativa entre as amostras é identificada por *** $p \leq 0,001$ e ** $p \leq 0,01$.

A NGE produzida por BRS 209 inoculada com o isolado Py11021 difere de todos os genótipos inoculados com ambos os isolados, exceto de PF 909 inoculado com Py11021 (Tabela 14). O genótipo Anahuac 75 não apresentou diferença significativa quanto à NGE em relação aos genótipos resistentes BRS Angico, CBFusarium ENT014, CPAC 07340, e Embrapa 27, indicando que a inoculação não alterou significativamente o número de grãos produzidos pelos genótipos (Tabela 14). Dessa forma observa-se o número total de grãos produzidos por espiga é dependente do potencial de rendimento de cada genótipo de trigo e que a NGE foi uma variável não sofreu influência da inoculação com o patógeno.

Tabela 14 - Análise da interação entre dez genótipos de trigo e dois isolados de *Magnaporthe oryzae* quanto à proporção do número total de grãos por espiga e quanto à proporção do peso médio do grão de espigas inoculadas em relação às controle.

	i1 A75	i2 A75	i1 B18	i2 B18	i1 209	i2 209	i1 229	i2 229	i1 Ang	i2 Ang	i1 434	i2 434	i1 340	i2 340	i1 CBF	i2 CBF	i1 E27	i2 E27	i1 909	i2 909
i1 A75	-																			
i2 A75		-																		
i1 B18			-																	
i2 B18	n p	p	n	-																
i1 209			p	p	-															
i2 209	n	n	n p	n p	n	-														
i1 229			n p	p		n	-													
i2 229	n p	n p	n p	n p	n p	n p	n p	-												
i1 Ang	p	p	p	n p	p	n p		n	-											
i2 Ang			p	p		n		n p		-										
i1 434	p	n p	p	n p	n p	n p	n p		p	n p	-									
i2 434	n p	n p	n p	n p	n p	n p	n p		n	n p		-								
i1 340	p	p	p	p	p	n p	p	n		p	n	n	-							
i2 340			p	n p		n p	n	p			p	p	p	-						
i1 CBF	p	p	p	p	p	n p	p	n p	p	p	n	n		p	-					
i2 CBF	p	p	p	p	p	n p	p	n p	p	p	n	n p	p	p		-				
i1 E27	p	p	p	p		n p		n			n p	n	p		p	p	-			
i2 E27			n	p		n		n p	p		n p	n p	p	n	p	p	p	-		
i1 909	n p	n p	n p	p	n	n p		n	n	n	n p	n	n p	n	n p	n p	n	p	-	
i2 909	n	n	n	n p	n		n	p	n p	n	n p	p	n p	n p	n p	n p	n p	n	n p	-

i1 = Py0925, i2 = Py11021, A75 = Anahuac 75, B18 = Trigo BR 18-Terena, 209 = BRS 209, 229 = BRS 229, Ang = BRS Angico, 434 = CPAC 07434, 340 = CPAC 07340, CBF = CBFusarium ENT014, E27 = Embrapa 27, 909 = PF 909.

Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras indicada por 'n' e 'p', representando as avaliações de proporção do número total de grãos por espiga e quanto à proporção do peso médio do grão de espigas inoculadas em relação às controles, respectivamente.

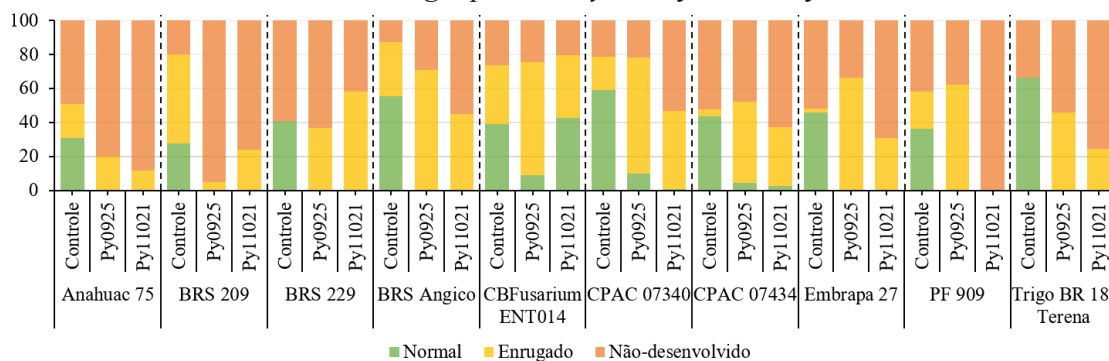
Os grãos, quando a espiga é infectada por *M. oryzae*, são enrugados, pequenos, deformados e com baixo peso específico (GOULART; SOUSA; URASHIMA, 2007). Grãos produzidos pelas espigas dos tratamentos controle e inoculado foram classificados em grãos normais, grãos enrugados e grãos não-desenvolvidos (Figura 4). Observou-se que, por mais que a NGE foi semelhante entre a maioria dos genótipos, houve diferença entre a quantidade de cada tipo de grão produzidos pelos genótipos avaliados (Figura 5).

Figura 4 - Grãos produzidos por espigas da linhagem de trigo CPAC 07340, classificados em normal, enrugado e não-desenvolvido, nas condições controle e inoculada com o isolado de *Magnaporthe oryzae* Py0925.



Fonte: Imagens do autor.

Figura 5 - Propoção de grãos produzidos por espigas de dez genótipos de trigo, classificados em normal, enrugado e não-desenvolvido, nas condições controle e inoculada com os isolados de *Magnaporthe oryzae* Py0925 e Py11021.



As condições de inoculação interferiram na produção de grãos de plantas do tratamento controle, visto que alguns genótipos de trigo apresentaram até 59% de grãos não-desenvolvidos em espigas não-inoculadas (Figura 5). Indica-se que esses genótipos sejam caracterizados quanto à produção de grãos, em viveiros de brusone de trigo, sob condições naturais de infecção. A avaliação anterior a esse trabalho, que determinou a escolha desses materiais para serem caracterizados sob condições controladas de ambiente, foi realizada em viveiros de brusone. No entanto, a avaliação foi restrita ao branqueamento dos genótipos sem se considerar variáveis para análise da produção de grãos sob condições de alta pressão de inóculo.

Anahuac 75, BRS Angico, CBFusarium ENT014, CPAC 07340 e Embrapa 27 não apresentaram diferença significativa em relação à NGE. Porém, ao se analisar os tipos de grão produzidos por cada genótipo foi notada diferença entre as classes. Por exemplo, a cultivar Anahuac 75 produziu, em média, na condição controle, 31% de grãos normais, 20% de grãos enrugados e 49% de grãos não-desenvolvidos, enquanto que na condição inoculada não produziu grãos normais, e 16% foram grãos enrugados e 84%, grãos não-desenvolvidos. Anahuac 75 não apresentou diferença significativa quanto à NGE dos genótipos BRS Angico e CBFusarium ENT014 (Tabela 14), mas houve diferença nos tipos de grão produzidos por esses genótipos (Figura 5) Os genótipos Anahuac 75, BRS 209, BRS 229, BRS Angico, Embrapa 27, PF 909 e BR 18 não produziram grãos normais na condição inoculada. Por outro lado, CBFusarium ENT014, CPAC 07434 e CPAC 07340, produziram grãos normais, ainda que em número reduzido. Quando inoculado com o isolado Py11021, CBFusarium ENT014 produziu praticamente o mesmo número de grãos, de cada um dos tipos considerados, que na condição controle.

A brusone do trigo afeta diretamente o enchimento, e conseqüentemente o peso dos grãos. Os danos à produção causados por *M. oryzae* podem chegar a 100% (KOHLI et al., 2011). Goulart, Sousa e Urashima (2007) relataram danos, em peso de grãos, de 63% em relação a espigas sadias. Embora haja pouca diferença entre os genótipos quando avaliado a NGE, diferenças observadas quanto aos tipos de grãos produzidos refletem diferenças na proporção de PMG. Para essa característica, foi observado grande variação entre os genótipos (Tabela 14). Somente os genótipos BRS 229, CPAC 07340, Embrapa

27 e PF 909 diferiram entre si quando inoculados com os isolados Py0925 e Py11021 (Tabela 14). CBFusarium ENT014 e CPAC 07434 apresentaram os melhores valores de PMG, sendo que as espigas inoculadas produziram em média 68 e 33%, respectivamente, em relação às controle (Tabela 12). Esses genótipos podem ser alternativas para a produção de grãos em locais de alta incidência da doença.

As análises de correlação apontaram que as variáveis SEL_5DAI e NGE não estão associadas a nenhuma das outras variáveis avaliadas (Tabela 15). Essas variáveis podem ser excluídas de análises futuras. A SEL_7DAI e SEL_9DAI foram negativamente correlacionadas com SEB_7DAI e SEB_9DAI, respectivamente, isso porque à medida em que as espiguetas se tornavam brancas, diminuía proporcionalmente o número de espiguetas com lesão, visto não ser mais possível a identificação de lesões em tecido morto (Tabela 15).

A SEB_7DAI apresentou associação positiva fraca com SEB_9DAI e AACPD, e negativa com PIR (Tabela 15). Os dados de branqueamento e de AACPD estão positivamente correlacionados, sendo que ocorre aumento da correlação com o aumento do tempo após inoculação (sete, nove e 16 DAI) (Tabela 15). Aos 9 DAI, foram identificados genótipos com comportamento intermediário, apresentando espiguetas brancas, mas não em sua totalidade. Já aos 16 DAI, a maioria dos genótipos apresentavam completo branqueamento da espiga. Assim, indica-se que, para se diminuir o número de avaliações, seja avaliada a SEB somente aos 7, aos 9 e aos 16 DAI. Ainda, se não for possível fazer as três avaliações, há duas alternativas possíveis: a) caso o objetivo do trabalho seja classificar os genótipos em mais de duas classes (suscetível, intermediário e resistente), indica-se a coleta dos dados aos 9 DAI; enquanto que, b) caso o objetivo seja separar os resistentes do grupo de suscetíveis com intermediários, a coleta dos dados de branqueamento deverá ser feita aos 16 DAI. Uma vez que a AACPD apresentou associação significativa com a SEB, pode ser desconsiderada em análises futuras. Especificamente para o grupo dos 10 genótipos considerados nesse trabalho, foi a avaliação de branqueamento aos 16 DAI que apresentou maior correlação com AACPD e PMG.

PIR apresentou correlação negativa com SEB e AACPD, indicando que quanto menor a severidade da doença, maior o número de PIR. Estudos devem ser realizados para entender a importância dessa característica na reação de resistência do trigo a *M. oryzae*. Sugere-se que sejam utilizadas outras metodologias, como análises histopatológicas, para verificar se o ponto de infecção corresponde à entrada do patógeno na ráquis, e para se analisar o porquê de genótipos como Anahuac 75 e BRS 209 apresentarem rápido branqueamento das espigas, com poucos PIR, ou mesmo, em alguns casos, não apresentarem ponto de infecção.

A PMG apresentou correlação negativa forte com os dados de SEB_9DAI, SEB_16DAI e AACPD, e correlação positiva fraca com PIR. O atraso no branqueamento dos genótipos permite melhor enchimento dos grãos. Observou-se que, genótipos como CBFusarium ENT014 e CPAC 07434 restringem o desenvolvimento do patógeno, impedindo que ele cause o estrangulamento da ráquis, o que resultou no desenvolvimento de grãos normais e enrugados. A partir dessas observações, poderia ser avaliado se plantas de ciclo mais curto e com maior resistência à doença produzem maior quantidade de grãos normais. Para experimentos de inoculação em ambiente controlado, indica-se que sejam priorizadas avaliações de branqueamento das espigas, de PIR e de proporção de PMG, e não de lesões.

Tabela 15 - Análise de correlação entre as características fenotípicas avaliadas em dez genótipos de trigo submetidos à inoculação com os isolados de *Magnaporthe oryzae* Py0925 e Py11021.

	SEL_5DAI	SEL_7DAI	SEL_9DAI	SEB_7DAI	SEB_9DAI	SEB_16DAI	AACPD	PIR	NGE	PMG
SEL_5DAI	-									
SEL_7DAI	0,36 ns	-								
SEL_9DAI	-0,04 ns	0,36 ns	-							
SEB_7DAI	0,01 ns	-0,89 ***	-0,55 *	-						
SEB_9DAI	0,22 ns	-0,27 ns	-0,96 ***	0,53 *	-					
SEB_16DAI	0,17 ns	-0,09 ns	-0,72 ***	0,33 ns	0,77 ***	-				
AACPD	0,18 ns	-0,26 ns	-0,83 ***	0,51 *	0,88 ***	0,94 ***	-			
PIR	0,14 ns	0,41 ns	0,85 ***	-0,47 *	-0,85 ***	-0,66 **	-0,80 ***	-		
NGE	0,25 ns	-0,24 ns	-0,10 ns	0,33 ns	0,16 ns	0,06 ns	0,09 ns	-0,01 ns	-	
PMG	-0,14 ns	0,04 ns	0,66 **	-0,29 ns	-0,70 ***	-0,93 ***	-0,83 ***	0,58 **	-0,05 ns	-

SEL = severidade de espiguetas com lesão, SEB = severidade de espiguetas brancas, DAI = dias após a inoculação, AACPD = área abaixo da curva de progresso da doença, PIR = número de pontos de infecção na ráquis, NGE = proporção do número de grãos por espiga de espigas inoculadas em relação às controle, PMG= proporção do peso médio do grão de espigas inoculadas em relação às controle, ns = não significativo. A diferença significativa entre as amostras é identificada por *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$ e * $p \leq 0,05$.

Para as características de SEL não se observou diferença significativa entre os isolados (Tabela 14). Aos 7 DAI, o isolado Py0925 foi mais agressivo, porém aos 9 DAI e considerando a AACPD o isolado Py11021 foi mais agressivo (Tabela 14). Py0925 foi coletado em 2009 e Py11021 foi coletado em 2011. Há relatos de que isolados mais recentes seriam mais agressivos (CRUZ et al., 2016a). B-71, isolado de *M. oryzae* obtido em 2012, foi capaz de causar a morte quase completa de espigas de cultivares de trigo que haviam sido consideradas resistentes quando inoculadas com o isolado T-25, obtido em 1988 (CRUZ et al., 2016a). Por outro lado, os genótipos inoculados com Py11021 apresentaram maiores NGE e PMG.

Tabela 16 - Médias, por isolado, das características avaliadas em dez genótipos de trigo inoculados com os isolados de *Magnaporthe oryzae* Py0925 e Py11021.

Característica	Py0925	Py11021	
SEL_5DAI	62,93	63,40	ns
SEL_7DAI	68,76	72,31	ns
SEL_9DAI	39,27	31,64	ns
SEB_7DAI	19,24	9,88	***
SEB_9DAI	47,00	60,68	***
SEB_16DAI	83,09	82,55	ns
AACPD	3866,13	3895,43	*
PIR	29,04	16,73	***
NGE	94	100	***
PMG	16	18	***

SEL = severidade de espiguetas com lesão (em porcentagem), SEB = severidade de espiguetas brancas(em porcentagem), DAI = dias após a inoculação AACPD = área abaixo da curva de progresso da doença, PIR = número de pontos de infecção na ráquis, NGE = proporção do número de grãos por espiga de espigas inoculadas em relação às controle (em porcentagem), PMG= proporção do peso médio do grão de espigas inoculadas em relação às controle (em porcentagem), ns = não significativo. Valores sem transformação. A diferença significativa entre os isolados é identificada por *** $p \leq 0,001$ e * $p \leq 0,05$.

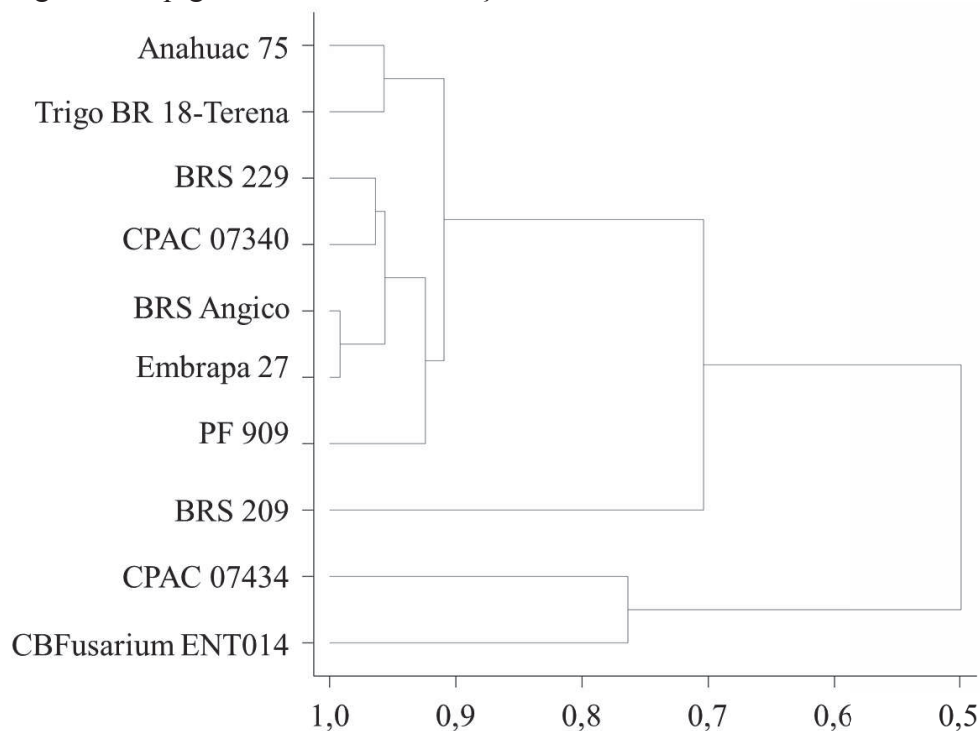
Para a ACP, a determinação das classes e o dendograma, todas as variáveis foram utilizadas, com exceção de SEL_7DAI e SEL_9DAI, pois para alguns dos genótipos havia repetições apresentando branqueamento, impossibilitando a identificação da presença de lesões nas espiguetas. A ACP permitiu a identificação de três grupos, o primeiro com os genótipos CBFusarium ENT014 e CPAC 07434, resistentes; o segundo

A classificação em grupos foi confirmada pelo método não hierárquico, que permitiu a separação dos genótipos em três classes (Tabela 17). Os genótipos estão agrupados da mesma forma como o predito anteriormente pela ACP. Com o dendograma construído com uma matriz de similaridade euclidiana, com base no método de associação média, nota-se algumas pequenas diferenças em relação às duas análises anteriores. O grupo dos genótipos resistentes, CBFusarium ENT014 e CPAC 07434, assim como o grupo de genótipos intermediários, BRS 229, BRS Angico, CPAC 07340, Embrapa 27 e PF 909. É possível notar que BRS 229 e CPAC 07340 e BRS Angico e Embrapa 27 são muito semelhantes. Um terceiro grupo é formado por Anahuac 75 e Trigo BR 18-Terena, considerados suscetíveis (Figura 7). A cultivar BRS 209 apresenta-se como um genótipo externo ao grupo dos suscetíveis e dos intermediários. Isso pode ser devido ao fato dela apresentar uma velocidade de branqueamento maior do que os outros genótipos ou também devido ao método de agrupamento utilizado. Reunindo todas as análises, pode-se concluir que no grupo de dez genótipos de trigo avaliados nesse estudo, são identificadas 3 classes de reação à brusone.

Tabela 17 - Classificação dos dez genótipos de trigo, inoculados com os isolados de *Magnaporthe oryzae* Py0925 e Py11021, em três classes, através do método de agrupamento não hierárquico, considerando as variáveis severidade de espiguetas com lesão aos cinco dias após a inoculação, severidade de espiguetas brancas aos sete, nove e dezesseis dias após a inoculação, área abaixo da curva de progresso da doença, número de pontos de infecção na ráquis, proporção do número de grãos por espiga e do peso médio do grão de espigas inoculadas em relação às controle.

Genótipos	Classes
CPAC 07434	1
CBFusarium ENT014	1
BRS 229	2
BRS Angico	2
CPAC 07340	2
Embrapa 27	2
PF 909	2
Anahuac 75	3
Trigo BR 18-Terena	3
BRS 209	3

Figura 7 - Dendograma construído com uma matriz de similaridade euclidiana, com base no método de associação média, considerando as variáveis severidade de espiguetas com lesão aos cinco dias após a inoculação, severidade de espiguetas brancas aos sete, nove e dezesseis dias após a inoculação, área abaixo da curva de progresso da doença, número de pontos de infecção na ráquis, proporção do número de grãos por espiga e do peso médio do grão de espigas inoculadas em relação às controle.



3.5 Conclusões

Esse experimento proporcionou o entendimento da influência de diferentes variáveis na caracterização da reação de dez genótipos de trigo a dois isolados de *M. oryzae*, e a identificação de genótipos com resistência em condição de inoculação em ambiente controlado. As análises de tipo de lesão predominante e de severidade de espiguetas com lesão não são informativas para discriminar as respostas dos genótipos de trigo à brusone. A severidade de espiguetas brancas aos 7, 9 e 16 dias após a inoculação e a proporção do peso médio do grão de espigas inoculadas em relação às controle são importantes para a avaliação da reação dos genótipos. A área abaixo da curva de progresso da doença pode ser desconsiderada quando não houver a possibilidade de se fazer várias avaliações ao longo do tempo. O número de grãos por espiga produzidos pelos genótipos

de trigo não sofreu interferência da inoculação, porém tanto o tipo de grãos e quanto o peso médio do grão foram dependentes da inoculação.

Os genótipos CBFusarium ENT014 e CPAC 07434 apresentaram a menor severidade de espiguetas brancas e a maior proporção de peso médio do grão de espigas inoculadas em relação às controle, sendo classificados como resistentes. Os genótipos Anahuac 75, BRS 209 e Trigo BR 18-Terena, para as condições de avaliação desse estudo, foram classificados como suscetíveis. Os genótipos BRS 229, BRS Angico, CPAC 07340, Embrapa 27 e PF 909 não apresentaram as menores severidade de espiguetas brancas, nem as maiores proporções de peso médio do grão, sendo classificados como intermediários. Outros estudos devem ser desenvolvidos para se entender a influência dos pontos de infecção na reação à doença. Para as variáveis severidade de espiguetas com lesão aos 5, 7 e 9 dias após a inoculação, e severidade de espiguetas brancas aos 16 dias após a inoculação, não houve diferença significativa entre os isolados. O isolado de *M. oryzae* Py11021 promoveu maior branqueamento das espigas, considerando dados aos 9 dias após a inoculação, e área abaixo da curva de progresso da doença, do que o isolado Py0925. No entanto, os genótipos inoculados com Py11021 apresentaram maior proporção tanto do número de grãos por espiga quanto do peso médio do grão de espigas inoculadas em relação às controle. As informações geradas neste estudo podem ser utilizadas em trabalhos futuros para a otimização do tempo na avaliação de sintomas, e para obtenção de maior eficiência na caracterização de genótipos de trigo quanto à reação à brusone.

4 CAPÍTULO II - Análise da presença da translocação 2NS/2AS em fontes de resistência de trigo a *Magnaporthe oryzae* no Brasil

4.1 Resumo

Em trigo, a busca por fontes de resistência a *Magnaporthe oryzae*, fungo causador da brusone, tem sido constante desde o primeiro relato mundial da doença. Já são conhecidos dez genes de resistência de trigo a *M. oryzae*, sendo que cinco deles mostraram-se efetivos contra isolados obtidos de plantas de trigo. Além desses genes, foi evidenciada a existência de correlação entre a resistência de determinados genótipos de trigo a *M. oryzae* e a presença da translocação cromossômica 2NS/2AS. O objetivo desse trabalho foi avaliar a presença da translocação 2NS/2AS, associada à resistência à brusone em 15 genótipos de trigo resistentes à doença em condições de viveiro no Brasil. A presença da translocação foi analisada utilizando iniciadores de domínio público, que amplificam um fragmento de 259 pares de bases. A linhagem VPM1 e a cultivar Thatcher foram utilizadas, respectivamente, como controles positivo e negativo da presença da translocação nas reações de PCR. As duas cultivares suscetíveis, Anahuac 75 e BRS 209, não possuem a translocação. Entre os 15 genótipos resistentes analisados, somente CBFusarium ENT014 e CPAC 07434 a possuem. Entre as cultivares resistentes que não possuem a translocação, estão Trigo BR 18-Terena e BRS 229 que são exemplos de resistência durável à brusone no Brasil. Essas cultivares são reportadas na literatura como moderadamente resistentes e/ou resistentes a *M. oryzae*. BR 18 é, ainda em 2019, indicada para cultivo em regiões onde ocorre a brusone. Esse trabalho abre novas perspectivas de exploração de fontes de resistência a *M. oryzae*, além da translocação 2NS/2AS. A identificação de materiais resistentes que não possuem a translocação 2NS/2AS reforça a necessidade de estudos visando à descoberta de outros genes e/ou de QTL que sejam efetivos para as condições brasileiras, onde a brusone é endêmica.

Palavras-chave: 1. Brusone. 2. *Pyricularia oryzae*. 3. Resistência durável.

4.2 Introdução

A brusone do trigo é causada por *Magnaporthe oryzae* (B.C. Couch e L.M. Kohn, anamorfo *Pyricularia oryzae*), que apresenta ampla variabilidade genética e também é um importante patógeno do arroz. A primeira ocorrência mundial de brusone em espigas de trigo foi descrita no Brasil, no estado do Paraná (IGARASHI et al., 1986). Após 30 anos de seu relato, a doença já foi registrada em todas as regiões tritícolas do Brasil, além da Bolívia, do Paraguai e da Argentina (KOHLI et al., 2011). Em fevereiro de 2016, a brusone de trigo foi registrada em Bangladesh, na Ásia, atingindo aproximadamente 15% da área cultivada com a cultura (MALAKER et al., 2016). Em 2017, a doença foi reportada em campos da Índia, a

partir da fronteira com Bangladesh (BHATTACHARYA; PAL, 2017). A produção de trigo na Ásia em 2017/2018 foi de 335 milhões de toneladas de trigo, e a Índia foi o segundo maior produtor de trigo no mundo, com 98 milhões de toneladas (FAO, 2019), sendo assim, a expansão da brusone para esta área afetaria a produção mundial de trigo.

A busca por fontes de resistência ao patógeno tem sido uma constante das pesquisas desenvolvidas no Brasil. A maioria das cultivares de trigo analisadas até meados dos anos 2000 mostrou alta suscetibilidade. Apesar disso, vários são os trabalhos que indicam a existência de variabilidade genética quanto à reação de genótipos de trigo (COELHO et al., 2016; MACIEL et al., 2014; PRESTES et al., 2007; URASHIMA et al., 2004; URASHIMA; KATO, 1994). Estudos genéticos apontam que a brusone do trigo segue uma relação gene-a-gene (ANH et al., 2015). Entre 2002 e 2018, dez genes foram identificados por determinarem a resistência de trigo a isolados de *M. oryzae*: *Rmg1* (TAKABAYASHI et al., 2002), *Rmg2* e *Rmg3* (ZHAN; MAYAMA; TOSA, 2008), *Rmg4* e *Rmg5* (NGA; HAU; TOSA, 2009), *Rmg6* (VY et al., 2014), *Rmg7* (TAGLE; CHUMA; TOSA, 2015), *Rmg8* (ANH et al., 2015), *RmgGR119* (WANG et al., 2018) e o gene de resistência oculto *RmgTd(t)* (CUMAGUN et al., 2014). Cinco deles, *Rmg2*, *Rmg3*, *Rmg7*, *Rmg8* e *RmgGR119*, mostraram-se efetivos contra isolados obtidos de plantas de trigo, tanto em planta jovem quanto em planta adulta.

Além desses genes que conferem resistência a isolados específicos, foi evidenciada existência de correlação entre a resistência de determinados genótipos de trigo a *M. oryzae* e a presença de uma translocação cromossômica (2NS/2AS) proveniente de *Triticum ventricosum* (sinônimo *Aegilops ventricosa*) (CRUZ et al., 2016a). Um total de 418 cultivares de trigo foram caracterizadas em inoculação com *M. oryzae*, considerando cultivares de inverno, de primavera e linhagens quase-isogênicas e parte dos materiais foram testados também em condições de campo na Bolívia. Em ambos os experimentos, foram observadas menores incidências de brusone em genótipos portadores da translocação 2NS/2AS (CRUZ et al., 2016a). Nesse mesmo trabalho, observou-se que nem todos os genótipos de trigo portadores da translocação 2NS/2AS apresentaram redução significativa da severidade de brusone na espiga, sugerindo que o *background* genético e/ou o ambiente podem influenciar a expressão da resistência conferida por essa translocação.

A translocação 2NS/2AS (BARIANA; MCINTOSH, 1993), de 25 a 38 cM, foi inicialmente introgridida de *T. ventricosum* ($2n = 4x = 28$) no híbrido interespecífico ‘VPM1’ (MAIA, 1967) e possui um *cluster* de genes de resistência de trigo à ferrugem estriada (*Yr17*, para *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*), à ferrugem da folha (*Lr37*, para *Puccinia triticina*) e à ferrugem do colmo (*Sr38*, para *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*). Posteriormente, foi identificada nessa translocação a presença dos genes de resistência *Cre5* e *Rkn3* para os nematoides *Heterodera avenae* (JAHIER et al., 2001) e *Meloidogyne* spp. (WILLIAMSON et al., 2013), respectivamente. Helguera et al. (2003) desenvolveram iniciadores, de domínio público, para a seleção desse *cluster* de genes (*Yr17-Lr37-Sr38*) nos programas de melhoramento genético de trigo.

No Brasil, uma coleção de genótipos que tiveram relevância para os programas de melhoramento genético de trigo foi caracterizada quanto à reação à brusone, visando à identificação de genes de resistência a *M. oryzae*, especificamente no estágio de planta adulta. Esta coleção foi denominada de Wheat BGI_n, para *Wheat Blast Genes Interaction*. Durante três anos e em três locais onde a brusone é endêmica (Dourados – MS, Londrina - PR e Planaltina - DFe), 196 genótipos de trigo foram avaliados em viveiros de brusone sob condições naturais de infecção. Com base nessas avaliações, 15 genótipos identificados como resistentes foram selecionados para estudos mais detalhados de fenotipagem quanto à resposta à infecção por dois isolados de *M. oryzae*, e de caracterização molecular. A média da incidência de brusone nos genótipos resistentes selecionados a campo foi de 2,1%, diferindo estatisticamente dos genótipos suscetíveis Anahuac 75 e BRS 209, cuja incidência foi de 9,9% (comunicação pessoal Gisele Torres, 2019).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença da translocação 2NS/2AS em um conjunto de 17 genótipos de trigo, anteriormente fenotipados quanto à reação à brusone em condições de viveiros no Brasil.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Material vegetal

Para análise da presença da translocação 2NS/2AS, inicialmente foram testados seis genótipos conhecidamente portadores da translocação, como controles positivos da reação de PCR, e um como controle negativo (Tabela 1). Os genótipos pertencem ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Trigo. Após a verificação dos genótipos controle, foram selecionados quinze genótipos de trigo, caracterizados previamente como resistentes à doença em viveiros de brusone, para análise da presença da translocação 2NS/2AS (Tabela 2). As cultivares, Anahuac 75 e BRS 209, consideradas suscetíveis a *M. oryzae* também foram incluídas nas análises (Tabela 2).

Tabela 1 - Genótipos de trigo analisados como controles da translocação 2NS/2AS nas reações de PCR.

Genótipo	Código BAG Embrapa Trigo	Genealogia	Ano de lançamento	País de origem	Translocação 2NS/2AS
Arche ^a	BGT00484	Tribute, FRA/VS-73644-9-4-1	1989	França	presente
Eureka ^a	BGT03451	Mironovskaya-808/Maris-Huntsman/3/VPM-1/Moisson(R-1-5-2)//Courtot – 1991	1991	França	presente
Hyak ^b	BGT04292	VPM-1/Moisson-421//2*Tyee	1988	EUA	presente
Madsen ^b	BGT05725	VPM-1/Moisson-951//2*Hill-81	1988	EUA	presente
Renan ^a	BGT12239	Mironovskaya-808/Maris-Huntsman/3/VPM-1/Moisson//9*Courtot	1989	França	presente
Thatcher ^c	BGT13324	Marquis/(Tr.dr.)Iumillo//(hn-3001)Marquis/Kanred – 1934	1934	EUA	ausente
VPM 1-1-1-2 R4 ^{b,c}	BGT13964	Ae.ve./Tr.ca.//3*Marne	1967	França	presente

^a Robert, Abelard e Dedryver (1999)

^b Helguera et al. (2003)

^c Bulos, Echarte e Sala (2006)

Tabela 2 - Genótipos de trigo selecionados para análise da presença da translocação 2NS/2AS.

Genótipo de trigo	Código BAG Embrapa Trigo	Genealogia	Ano de lançamento	País de origem	Reação à brusone em viveiro
Anahuac 75	BGT00443	II-12300//Lerma-Rojo-64/II-8156/3/Norteno-67	1975	México	suscetível
Bet Dagan 131	BGT01227	Pitic-62(SIB)/Florence-Aurore	1970	Islândia	resistente
BRS 209	BGT14405	Jupateco 73/Embrapa 16	2002	Brasil	suscetível
BRS 229	BGT14408	Embrapa 27*3//BR 35/Buck Poncho	2004	Brasil	resistente
BRS Angico	BGT01454	PF 87107/2*IAC 13	2002	Brasil	resistente
CBFusarium ENT014	BGT15263	sem informação	-	México	resistente
CPAC 07340	BGT20389	CPAC 96306/CPAC 9985	-	Brasil	resistente
CPAC 07434	BGT20388	Taurum/BRS 254	-	Brasil	resistente
Embrapa 27	BGT03372	PF 83743/5/PF 83182/4/CNT 10*4//Lagoa Vermelha*5/Agatha/3/Londrina*4/Agent//Londrina*3/Nyu Bay	1994	Brasil	resistente
Huanca	BGT04275	Frocor/3/McMurachy/Kentana//Yaqui-50/4/Maria-Escobar/MN-2698/5/Maria-Escobar	1973	Peru	resistente
PF 020450	BGT16243	FL 72185A-A2-C1/Embrapa 40//CEP 24	-	Brasil	resistente
PF 909	BGT11109	PF 83743/PF 82252//PF 84433/BR 35	-	Brasil	resistente
Safira	BGT15079	PF 9099 /OR-1//Granito	2003	Brasil	resistente
Shanghai	BGT15211	(M)Yangmai-1	1978	China	resistente
Thatcher	BGT13324	Marquis/Iumillo(durum)//Marquis/Kanred	1934	EUA	resistente
Trigo BR 18-Terena*	BGT13539	sem informação	1986	Brasil	resistente
Trigo Chapéu	BGT13588	sem informação	-	-	resistente

*Doravante denominada de BR 18

4.3.2 Extração de DNA e genotipagem

Sementes de todos os genótipos foram incubadas em papel para germinação durante 9 dias. Folhas foram coletadas e o DNA genômico foi isolado com protocolo de extração baseado no método CTAB (SAGHAI-MAROOF et al., 1984). A qualidade e a quantidade de DNA foram estimadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

Para a detecção da presença da translocação 2NS/2AS foram empregados os iniciadores de domínio público VENTRIUP (5'AGGGGCTACTGACCAAGGCT3') e LN2 (5'TGCAGCTACAGCAGTATGTACACAAA3'), específicos para identificação da translocação, cujo produto é um fragmento de 259 pares de bases (pb) (HELGUERA et al., 2003). As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram preparadas num volume final de 10 µL contendo concentrações finais de 1X do tampão de reação, 2,5 mM de MgCl₂, 0,35 mM de cada dNTP, 0,2 uM de cada iniciador, 0,5 U de Taq polimerase (RBC Bioscience, #RT011C) e 100 ng de DNA genômico.

A amplificação foi realizada em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®, 4339386) com as condições de desnaturação inicial a 94oC por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94oC por 45 segundos, anelamento a 65oC por 30 segundos e extensão a 72oC por 60 segundos, seguida de extensão final a 72oC por 7 minutos. Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. O marcador de peso molecular de 50 pb (50 bp DNA Ladder, Invitrogen, 10416-014) foi utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados.

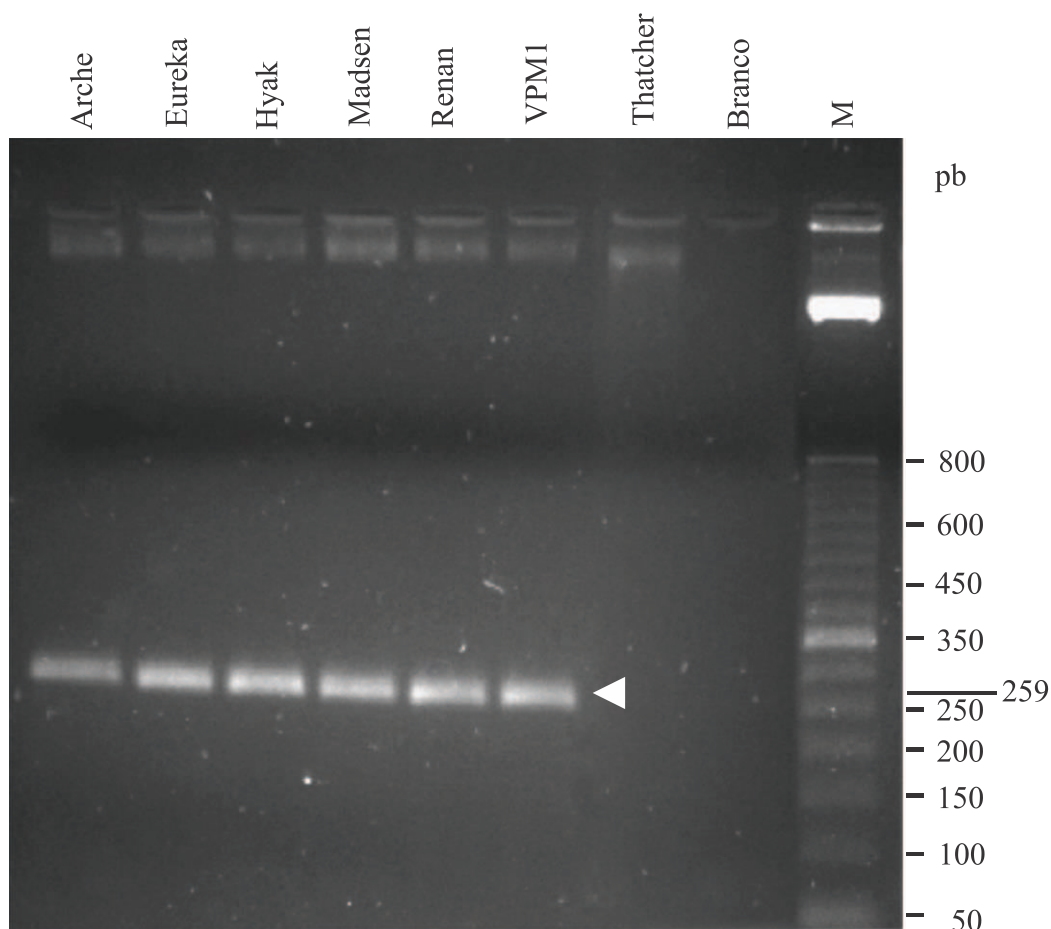
Primeiramente, foram testados os genótipos controles para verificar a eficiência dos iniciadores. Posteriormente, os 17 genótipos de trigo foram analisados empregando-se o genótipo VPM1 (acesso VPM 1-1-1-2 R4, BGT13964) como controle positivo da presença da translocação 2NS/2AS e a cultivar Thatcher como controle negativo das

reações de amplificação. Em todas as avaliações, foi incluída reação de PCR sem adição de DNA (identificada como “branco”), de modo a se verificar a presença de contaminantes.

4.4 Resultados e Discussão

Os genótipos de trigo analisados nesse trabalho, reportados na literatura como portadores da translocação 2NS/2AS, apresentaram amplificação do fragmento de 259 pb, utilizando-se os iniciadores de domínio público VENTRIUP e LN2 (Figura 1). Tanto VPM1 quanto Thatcher revelaram-se bons controles das PCR.

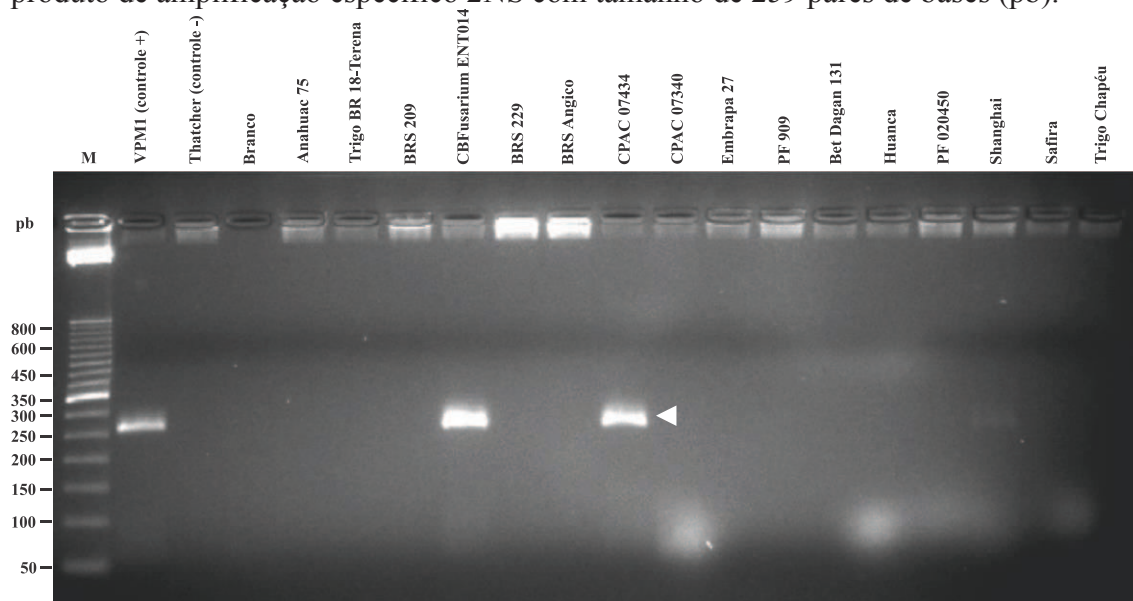
Figura 1 - Produto da amplificação com os iniciadores VENTRIUP e LN2 de genótipos de trigo reportados na literatura como possuindo ou não a translocação 2NS/2AS. Branco, PCR realizada sem adição de DNA. M, marcador de peso molecular. A seta branca indica produto de amplificação específico 2NS com tamanho de 259 pares de bases (pb).



Fonte: Imagem do autor

As duas cultivares suscetíveis a *M. oryzae*, Anahuac 75 e BRS 209, não apresentam a translocação 2NS/2AS (Figura 2). Anahuac 75 é uma cultivar oriunda do Cimmyt (SOUSA; CAIERÃO, 2014) e seu cultivo foi de grande expressão na década de 1980 e início dos anos 1990, no Brasil. Desde o primeiro relato de brusone (IGARASHI et al., 1986), Anahuac 75 é referenciada como altamente suscetível ao agente causal da doença. Trabalhos com inoculações apontaram sua suscetibilidade a um grande número de isolados de *M. oryzae* (URASHIMA et al., 2004). Em experimentos realizados sob condições controladas de ambiente, Anahuac 75 apresentou, além da suscetibilidade da espiga, uma alta suscetibilidade das folhas à infecção por *M. oryzae* (TORRES et al., 2015). BRS 209 é cultivar de trigo desenvolvida pela Embrapa Soja em trabalho conjunto com a Embrapa Trigo (SOUSA; CAIERÃO, 2014), relatada como suscetível à brusone desde seu lançamento (BRUNETTA et al., 2005). Prestes et al. (2007), avaliando a severidade de brusone em espigas de 100 genótipos de trigo, sob condições de inoculação, classificaram BRS 209 entre as mais suscetíveis à doença, com média de 51% de severidade aos 10 dias após a inoculação.

Figura 2 - Produto de amplificação com os iniciadores VENTRIUP e LN2, em 15 genótipos de trigo resistentes e em duas cultivares suscetíveis a *M. oryzae* em viveiros de brusone. As cultivares VPM1 e Thatcher foram empregadas como controles positivo e negativo, respectivamente, da presença da translocação 2NS/2AS. Branco, reação de PCR realizada sem adição de DNA. M, marcador de peso molecular. A seta branca indica produto de amplificação específico 2NS com tamanho de 259 pares de bases (pb).



Fonte: Imagem do autor

Trigo Chapéu, que não possui a translocação, foi cultivado no Brasil e não há informação segura sobre sua origem ou sobre a instituição que o desenvolveu. Acredita-se que foi um genótipo introduzido do exterior, cultivado no Rio Grande do Sul para uso em artesanato (SOUSA; CAIERÃO, 2014). Cinco (33%) dos genótipos resistentes avaliados foram obtidos de outros países: Bet Dagan 131, CBFusarium ENT014, Huanca, Shanghai e Thatcher (Tabela 2). Thatcher, além de ter sido identificada como resistente, é o controle negativo da reação de PCR (BULOS; ECHARTE; SALA, 2006). Thatcher foi uma das primeiras cultivares de trigo desenvolvidas especificamente para resistência à ferrugem do colmo (VANEGAS; GARVIN; KOLMER, 2008). Foi nesta cultivar que foram identificados os dois primeiros genes de resistência a isolados de *M. oryzae* obtidos de trigo, em estágio de planta jovem (ZHAN; MAYAMA; TOSA, 2008).

CBFusarium ENT014 é um genótipo pertencente ao bloco de cruzamento (*crossing block*, CB) do Cimmyt (VAN GINKEL et al., 2002). Blocos de cruzamento são coleções elite do programa de melhoramento que servem para avaliações em múltiplos ambientes. Genótipos de cada grupo carregam genes específicos para um determinado ambiente. Neste caso, o conjunto dos acessos “CBFusarium” refere-se a genótipos avaliados quanto à reação à giberela, doença causada por *Fusarium* spp.. Uma vez caracterizado como resistente, CBFusarium ENT014 foi empregado como genitor masculino de uma população de linhagens duplo-haploides, desenvolvida no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, para estudos de mapeamento de QTL de resistência à brusone. Entre os 15 genótipos identificados como resistentes ao patógeno em experimentos realizados no Brasil (Tabela 2), somente CBFusarium ENT014 e CPAC 07434 apresentaram produto de amplificação com o uso do marcador VENTRIUP/LN2 (Figura 2).

Entre os nove genótipos de trigo brasileiros avaliados quanto à presença da translocação 2NS/2AS, havia quatro linhagens, CPAC 07340, CPAC 07434, PF 020450 e PF 909, e cinco cultivares, BR 18, BRS 229, BRS Angico, Embrapa 27 e Safira. Entre as linhagens de trigo, CPAC 07340 e CPAC 07434 foram desenvolvidas especificamente para a região do Cerrado brasileiro, porém somente CPAC 07434 possui o marcador VENTRIUP/LN2. E, entre as cultivares, nenhuma possui a translocação 2NS. Destes

materiais, BRS 229 foi desenvolvida pela Embrapa Soja; BRS Angico e Embrapa 27 foram desenvolvidas pela Embrapa Trigo; e Safira foi desenvolvida pela OR Melhoramento de Sementes Ltda. (SOUSA; CAIERÃO, 2014). , BR 18 , desenvolvida a partir de uma linhagem de criada pelo Cimmyt, é uma introdução realizada pela Embrapa Trigo e, posteriormente, foi introduzida na Embrapa Agropecuária Oeste. A cultivar BR 18, foi indicada para cultivo no Mato Grosso do Sul e no Paraná, tendo posteriormente o cultivo estendido para São Paulo e Rio Grande do Sul (SOUSA, 2002). Desde seu lançamento, foi caracterizada como moderadamente resistente a *M. oryzae* em condições de campo, embora não possua a translocação 2NS/2AS.

BR 18 e BRS 229 são reportadas como moderadamente resistentes (TORRES et al., 2009) e/ou resistentes a *M. oryzae* (RCBPTT, 2011; 2018b). BR 18, desde seu lançamento em 1986 até a safra 2019, integra o grupo de cultivares de trigo indicadas para cultivo no Brasil central, e BRS 229 foi indicada para cultivo no estado do Paraná a partir de 2004 (BRUNETTA et al., 2006), devido à resistência às principais doenças fúngicas, entre outras características.

Embrapa 27 foi frequentemente empregada na década de 1990 para cruzamentos no Brasil (SOUSA; CAIERÃO, 2014), sendo importante na composição de cultivares da OR Melhoramento de Sementes Ltda. e da Biotrigo Genética Ltda. (CAIERÃO et al., 2014). Essa cultivar foi caracterizada quanto à reação à inoculação de 18 isolados de *M. oryzae*, em estágio de planta jovem, e foi classificada entre os genótipos que apresentaram as menores médias de severidade da doença em folhas (CRUZ et al., 2010). No presente trabalho, Embrapa 27 foi identificada como resistente no estágio de planta adulta, considerando-se a doença em espigas.

BRS Angico (linhagem PF 960198) foi indicada para cultivo no Rio Grande do Sul em 2002 e para Santa Catarina (DEL DUCA et al., 2005) e Paraná (SÓ E SILVA et al., 2005). Até então, BRS Angico não havia sido identificada como fonte de resistência à brusone (RCBPTT, 2008; RCCSBPTT, 2005; RCSBPTT, 2007). Safira (linhagem ORL 98204) é cultivar desenvolvida em cotitularidade da OR Melhoramento e da Biotrigo. Desde o seu primeiro relato em 2005 (RCCSBPTT, 2005), até 2018 (RCBPTT, 2018a),

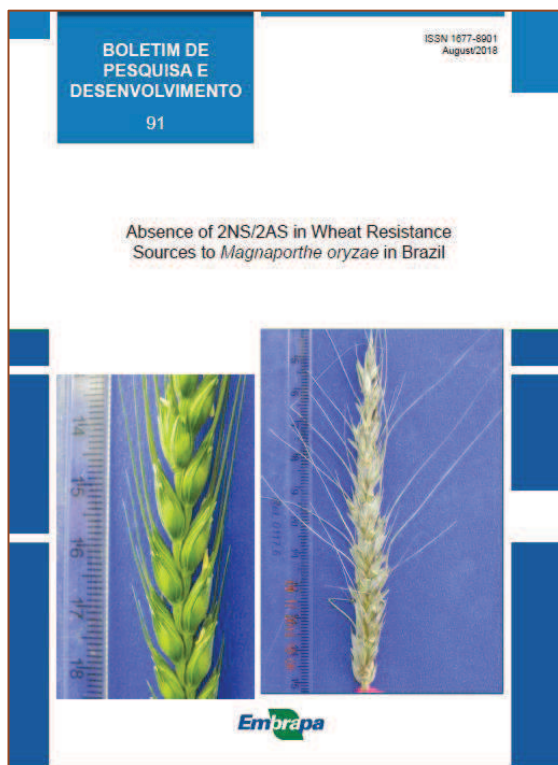
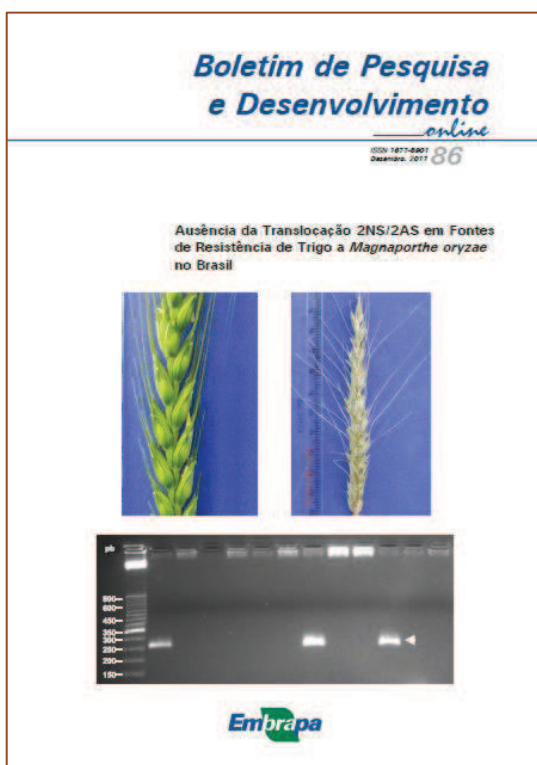
incluindo as safras de 2007 a 2018, não constava informação sobre a reação dessa cultivar à brusone. Como BRS Angico, este é o primeiro relato em que Safira é identificada como fonte de resistência à brusone.

Os resultados deste trabalho concordam com os obtidos por Cruz et al. (2016a), apontando que a relação da translocação 2NS/2AS com a resistência a *M. oryzae* é genótipo-dependente. Esses autores avaliaram tanto genótipos com a translocação como genótipos sem a translocação 2NS/2AS quanto à reação à brusone, observando que genótipos portadores da translocação apresentavam menores índices da doença. Pizolotto et al. (2017), com conjunto restrito de vinte e um genótipos de trigo, todos portadores da translocação 2NS/2AS, observou ampla variabilidade de reação à doença. Esses dados indicam que o simples fato da presença do segmento cromossomal 2NS/2AS no genoma não necessariamente significa resistência de espiga ao patógeno. Estudos mais aprofundados serão necessários para que seja avaliada a contribuição da referida translocação à reação de resistência observada nos dois genótipos, CBFusarium ENT014 e CPAC 07434, nas condições de cultivo de trigo no Brasil.

4.5 Conclusões

Esse trabalho abre novas perspectivas de exploração de fontes de resistência a *M. oryzae*, além da translocação 2NS/2AS, e que se mostram efetivas a campo nas condições brasileiras, pois, dos 15 genótipos de trigo resistentes a *M. oryzae* considerados, somente dois genótipos possuem a translocação. Entre os demais 13 genótipos resistentes, sem a translocação 2NS/2AS, estão duas das mais importantes fontes de resistência durável à brusone, no Brasil: BR 18 e BRS 229. A identificação de materiais resistentes que não possuem a translocação 2NS/2AS reforça a necessidade de estudos visando à descoberta de outros genes e QTL, assim como a elucidação dos mecanismos de resistência envolvidos, que sejam efetivos para as condições brasileiras, onde a brusone é endêmica.

- O capítulo II foi publicado como Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa, nas versões em português e em inglês.



5 CAPÍTULO III - Identificação de QTL de trigo conferindo resistência a *Magnaporthe oryzae* em estágio de planta adulta

5.1 Resumo

A infecção de espigas por *Magnaporthe oryzae* é um fator limitante para a produção de trigo em regiões tropicais e subtropicais. O objetivo do presente estudo foi identificar QTL de trigo conferindo resistência a *M. oryzae* em estágio de planta adulta. Uma população duplo-haploide de trigo foi desenvolvida a partir do cruzamento entre os genótipos BRS 209 (suscetível) e CBFusarium ENT014 (resistente), e inoculada com dois isolados do patógeno, no espigamento. As variáveis avaliadas foram: tipo de lesão predominante (TLP) aos 5 dias após a inoculação (DAI), severidade de espiguetas com lesão (SEL) aos 5 DAI, severidade de espiguetas brancas (SEB) aos 5, 7, 9, 16, 23, 30, 37 e 44 DAI, número de pontos de infecção nos dois lados da ráquis (PIR) e proporção do peso médio do grão entre espigas inoculadas e controle (PMG). A partir dos dados de SEB foi estimada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). A genotipagem foi realizada com o Axiom® Wheat Breeder's Genotyping Array. O mapa de ligação com 107 linhagens DH foi construído com 5.388 marcadores moleculares e o mapeamento de intervalo composto inclusivo foi utilizado para detectar QTL. Quatorze QTL foram mapeados, sendo 12 deles no cromossomo 2A. Os QTL identificados no 2A estão distantes do marcador VENTRIUP/LN2, utilizado para identificar a presença da translocação 2NS/2AS. Dois QTL alocados no cromossomo 2A explicaram, em média, 84,0% da variação fenotípica para a SEB_9DAI. QTL identificados nos cromossomos 5B e 7B explicaram, cada um, 11,8% da variação fenotípica. Quatro QTL relacionados com PIR foram mapeados, reforçando ser esta uma característica herdável e importante para a fenotipagem da resistência de trigo à brusone. Os marcadores SSR e KASP desenvolvidos, alocados nas regiões dos QTL, podem ser utilizados, no futuro, para o desenvolvimento de cultivares de trigo resistentes a *M. oryzae*.

Palavras-chave: 1. *Triticum aestivum*. 2. População Embrapa-Brusone. 3. QTL de efeito maior. 4. Translocação 2NS/2AS. 5. Espigamento.

5.2 Introdução

Magnaporthe oryzae B. C. Couch e L.M. Kohn (anamorfo *Pyricularia oryzae* Cavara), agente causal da brusone, foi considerado pela comunidade internacional de fitopatologistas, o patógeno de maior importância científica e econômica (DEAN et al., 2012). A brusone foi observada, pela primeira vez, em arroz, há mais de três séculos, e sendo ainda considerada a doença mais importante dessa cultura (SRIVASTAVA et al., 2017). A brusone do trigo foi reportada pela primeira vez no estado do Paraná, Brasil, em 1985 (IGARASHI et al., 1986) e, em seguida, na Bolívia, Paraguai e Argentina (KOHLI

et al., 2011). Durante 30 anos, a brusone do trigo foi restrita à América do Sul. Em 2016, a doença foi reportada em Bangladesh, Ásia (MALAKER et al., 2016) e, um ano mais tarde, foi encontrada em campos de trigo da Índia, próximos à fronteira com Bangladesh (BHATTACHARYA; PAL, 2017).

A resistência genética do hospedeiro é uma das alternativas para o controle da brusone. A brusone de trigo é considerada uma doença relativamente nova e, até o momento, nove genes de resistência a isolados de *M. oryzae* (TAKABAYASHI et al., 2002; ZHAN; MAYAMA; TOSA, 2008; NGA; HAU; TOSA, 2009; VY et al., 2014; ANH et al., 2015; TAGLE; CHUMA; TOSA, 2015; WANG et al., 2018) e um gene de resistência oculto *RmgTd(t)* (CUMAGUN et al., 2014) foram identificados. Cinco deles, *Rmg1* (HIRATA et al., 2005), *Rmg6* (VY et al., 2014), *Rmg7* e *Rmg8* (ANH et al., 2018) e *RmgGR119* (WANG et al., 2018), seguem o conceito gene-a-gene e conferem resistência no estágio de planta adulta (ANH et al., 2015; INOUE et al., 2017; WANG et al., 2018). A fenotipagem da doença na espiga é muito importante, uma vez que não há correlação entre a reação do genótipo nos estádios de planta jovem e de planta adulta (MACIEL et al., 2014; TORRES et al., 2015). Um estudo recente relatou associação entre a presença da translocação 2NS/2AS de *Triticum ventricosum* (sinônimo *Aegilops ventricosa*) e a resistência de genótipos de trigo a *M. oryzae* (CRUZ et al., 2016a). No entanto, em alguns genótipos essa associação não ocorre, sugerindo que outros componentes, tais como diferentes bases genéticas e/ou condições ambientais, influenciam na resistência.

A resistência em arroz, conferida por genes de efeito maior, contra *M. oryzae* é documentada como sendo quebrada em um curto espaço de tempo, entre dois e três anos após a liberação de uma cultivar, principalmente devido à alta variabilidade genética e de virulência do patógeno (OU, 1980; WANG; VALENT, 2017). Por outro lado, a resistência durável e de amplo espectro, muitas vezes conferida por vários genes de efeito menor, é mediada por *Quantitative Trait Loci* (QTL). Em arroz, o primeiro estudo de QTL de resistência a *M. oryzae* foi publicado em 1994 e, desde então, mais de 350 QTL de resistência foram mapeados (WANG et al., 1994; MIAH et al., 2013). Três deles, *pi21*, *Pb1* e *Pi35*, foram clonados (FUKUOKA et al., 2009, 2015; HAYASHI et al., 2010). A

combinação de *pi21* com genes de efeito maior foi efetiva na supressão de sintomas em folhas de arroz infectadas com *M. oryzae* (YASUDA et al., 2015). Até o desenvolvimento do presente estudo, não havia relatos da identificação de QTL de resistência de trigo a *M. oryzae* (DEVANNA; SHARMA, 2018). O objetivo desse trabalho foi identificar QTL de trigo que conferem resistência a *M. oryzae* no estágio de planta adulta.

5.3 Material e Métodos

5.3.1 Material Vegetal

Uma população duplo-haploide (DH) de trigo, obtida através de cultura de micrósporos, nomeada Embrapa-brusone, foi desenvolvida a partir do cruzamento entre a cultivar BRS 209 (genitor feminino) e o genótipo CBFusarium ENT014 (genitor masculino). BRS 209 é uma cultivar desenvolvida pela Embrapa Trigo, altamente suscetível à brusone, enquanto que CBFusarium ENT014 é uma linhagem do CIMMYT que foi caracterizada como resistente em condições de ambiente controlado e em viveiros de brusone de trigo no Brasil. Os genitores e as linhagens DH da população foram semeados e mantidos em câmaras de crescimento (sob condições controladas) até a fase de espigamento. Quando as plantas atingiram o estágio fenológico 58 da escala de Zadoks (ZADOKS; CHANG; KONZAK, 1974), foram inoculadas com dois isolados de *M. oryzae*.

5.3.2 Isolados de *Magnaporthe oryzae* e inoculação

Os isolados de *M. oryzae* Py6025 (i1) e Py0925 (i2) são provenientes do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Trigo (SISGEN AC50A60). O isolado monospórico Py6025 foi obtido em 2006, de folha da cultivar BRS 208, coletada em Coromandel, Minas Gerais. Py0925 foi obtido em 2009, de espiga da cultivar Embrapa 22, coletada em Perdizes, Minas Gerais. Os isolados foram cultivados em meio de aveia (60 gramas de aveia, 12 gramas de ágar, q.s.p. 1 litro de água) durante 10 a 14 dias, em 24±2°C e 12 horas de luz branca fluorescente. A suspensão de conídios foi preparada com

água de osmose reversa com Tween 80 (2 gotas por L de água de osmose reversa) e a concentração foi ajustada para 2×10^5 conídios/mL.

Os dados fenotípicos dos genitores (BRS 209 e CBFusarium ENT 014) e de 58 a 85 linhagens DH em resposta à inoculação com *M. oryzae* foram obtidos em condições de ambiente controlado. A inoculação foi realizada borrifando a suspensão de esporos nos dois lados da espiga, com volume de aproximadamente 1,5 mL por espiga. O tratamento controle foi realizado utilizando-se solução de água de osmose reversa com Tween 80. Cada espiga foi considerada uma repetição, com cinco repetições por tratamento. Após a inoculação, as plantas foram submetidas ao escuro na temperatura de 28°C por 15 horas, a fim de fornecer condições ideais para a infecção do fungo. A umidade (aproximadamente 98%) foi mantida durante as primeiras 24 horas após a inoculação. As plantas permaneceram em câmara de ambiente controlado por mais seis dias, sob temperatura de 26°C e fotoperíodo de 12 horas, sendo, então, transferidas para casa-de-vegetação ($26 \pm 2^\circ\text{C}$).

5.3.3 Avaliação da doença e da produção de grãos e análises estatísticas

Para ambos os isolados foram consideradas as variáveis: tipo de lesão predominante (TLP) aos 5 dias após a inoculação (DAI), severidade de espiguetas com lesão (SEL) aos 5 DAI, e severidade de espiguetas brancas (SEB) aos 5, 7, 9, 16, 23, 30, 37 e 44 DAI. Considerando os dados de SEB, a área abaixo da curva de progresso da doença foi estimada. Ao fim do experimento, as espigas foram colhidas e trilhadas individualmente. O número de pontos de infecção nos dois lados da ráquis (PIR) foi contado. A proporção do peso médio do grão (PMG) entre espigas inoculadas e não-inoculadas foi estimada. O número de grãos por espiga não foi considerado como uma variável válida, uma vez que não foi encontrada diferença significativa entre os genitores nas condições controle e inoculada (dados no Capítulo I). Os dados de SEL_5DAI, AACPD e PMG foram transformados com o arcosseno da raiz quadrada, para atender os pressupostos da normalidade dos resíduos, homocedasticidade e independência dos erros. As variáveis foram analisadas separadamente, utilizando o programa QTL IciMapping

versão 4.1 (MENG et al., 2015; WANG et al., 2016) com a função AOV. A correlação entre as variáveis, para cada isolado, foi calculada.

5.3.4 Extração de DNA

Amostras de folhas dos genitores e das 107 linhagens DH foram coletadas e o DNA genômico foi isolado utilizando-se protocolo baseado no método CTAB, com pequenas modificações (SAGHAI-MAROOF et al., 1984). A concentração de DNA foi estimada utilizando-se Quant-iT PicoGreen® dsDNA Reagent (Invitrogen®, P7581) e a qualidade foi verificada por eletroforese, em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

5.3.5 Genotipagem

A genotipagem foi realizada com o Axiom® Wheat Breeder's Genotyping Array (Applied Biosystems®, 550524), pela empresa Affymetrix, Inc. (Santa Clara, CA, Estados Unidos), utilizando o sistema Affymetrix GeneTitan®, de acordo com os procedimentos descritos pela Affymetrix (Axiom® 2.0 Assay Manual). A chamada de alelos foi realizada com o programa Affymetrix Genotyping Console (http://www.affymetrix.com/products_services/software/specific/genotyping_console_software.affx), seguindo o Axiom Best Practices Genotyping.

5.3.6 Construção do mapa de ligação e detecção de QTL

A construção do mapa de ligação e as análises de QTL foram realizadas com o programa QTL IciMapping versão 4.1 (MENG et al., 2015; WANG et al., 2016). A função de mapeamento de Kosambi foi utilizada para gerar as distâncias genéticas entre os marcadores (KOSAMBI, 1943). Marcadores geneticamente redundantes foram removidos do mapa, utilizando a função BIN. Em uma primeira fase, um mapa foi construído utilizando marcadores do *chip* de 35K, sem dados perdidos, apresentando somente alelos do tipo AA ou BB, e com distorção de segregação significativa (teste χ^2 ,

$P < 0,0001$). Marcadores mapeados no mesmo grupo de ligação de três populações de trigo descritas por Winfield et al. (2016) foram utilizados como âncoras. Para esse primeiro mapa, chamado de mapa esqueleto, os grupos de ligação foram criados com valor de LOD=6,0. Os marcadores foram ordenados utilizando o algoritmo RECORD e o *rippling* foi realizado com o critério SAD e janela de 5. Em uma segunda fase, marcadores com 10% de dados perdidos, considerando “*no calling*” no *chip* 35K e com distorção de segregação significativa (teste χ^2 , $P < 0,001$) foram adicionados ao mapa. Os parâmetros para criar os grupos de ligação foram os mesmos descritos anteriormente para construir o mapa esqueleto.

O mapeamento de QTL foi realizado utilizando as seguintes variáveis: TLP_5DAI, SEL_5DAI, SEB_7DAI, SEB_9DAI, AACPD, PIR e PMG, para ambos os isolados. As variáveis foram analisadas como uma característica única. As análises de QTL foram realizadas com o mapeamento de intervalo composto inclusivo. O comando “*Deletion*” foi utilizado para acomodar fenótipos faltantes. O limite de LOD 3,0 foi utilizado para detectar QTL significativos, com máximo *step size* de 1,0 cM ao longo do genoma.

5.3.7 Saturação do cromossomo 2A, detecção de QTL e conversão de marcadores nas regiões dos QTL

Após o mapeamento, grande número de QTL foi identificado no cromossomo 2A. Optou-se por saturar esse cromossomo utilizando o marcador para a translocação 2NS/2AS VENTRIUP/LN2, nove marcadores SSR descritos na literatura (Tabela 1) e quatro marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) do Axiom® Wheat HD Genotyping Array (Tabela 2).

Tabela 1 - Marcadores SSR utilizados para saturar o cromossomo 2A de trigo.

Marcador	Iniciador <i>Forward</i>	Iniciador <i>Reverse</i>	Fluoróforo
barc212 ^{a,c}	GGCAACTGGAGTGATATAAATACCG	CAGGAAGGGAGGAGAACAGAGG	NED
wmc181 ^{b,c}	TCCTTGACCCCTTGCACTAACT	ATGGTTGGGAGCACTAGCTTGG	FAM
wms294 ^{b,d}	GGATTGGAGTTAAGAGAGAACCG	GCAGAGTGATCAATGCCAGA	NED
wms296 ^{b,d}	AATTCAACCTACCAATCTCTG	GCCTAATAAACTGAAAACGAG	PET
wms311 ^{b,d}	TCACGTGGAAGACGCTCC	CTACGTGCACCACCATTTTG	VIC
wms382 ^{b,d}	GTCAGATAACGCCGTCCAAT	CTACGTGCACCACCATTTTG	FAM
wms497 ^{b,d}	GTAGTGAAGACAAGGGCATT	CCGAAAGTTGGGTGATATAC	NED
wms512 ^{b,d}	AGCCACCATCAGCAAAAATT	GAACATGAGCAGTTTGGCAC	VIC
wms558 ^{a,d}	GGGATTGCATATGAGACAACG	TGCCATGGTTGTAGTAGCCA	PET

^a Iniciador *Reverse* contém a cauda M13 na extremidade 5'.

^b Iniciador *Forward* contém a cauda M13 na extremidade 5'.

^c Somers, Isaac e Edwards (2004).

^d Röder et al. (1998).

Tabela 2 - Marcadores KASP do Axiom® Wheat Genotyping Array utilizados para saturar o cromossomo 2A de trigo.

Marcador ^a	FAM	VIC	Iniciador Comum	Cr
BS00086365	CGGTCAATCTCCATCCCTTCT	CGGTCAATCTCCATCCCTTCC	CGTCTTCATCTTTTGAGACTACTGTTGAT	2A
BS00022150	GCAACAAACTGCAATACTGACGGA	GCAACAAACTGCAATACTGACGGT	GTCTTTCTCCTGGAGACGAACTGAT	2A
BS00089310	CGCCGGAGCCACAATCCA	CTCGCCGGAGCCACAATCCT	GGAGAAACAAGGTGGATGCGAACAA	2A
BS00097307	GCCAGCAGTAGCGAGCATTCT	GCCAGCAGTAGCGAGCATTCA	TCTGCGACTTGTTGATATGGTTCAGATTT	2A

Cr = Cromossomo.

^a Iniciadores presentes no conjunto de marcadores KASP da base de dados <http://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/CerealsDB>.

Os iniciadores VENTRIUP (5'-AGGGGCTACTGACCAAGGCT-3') e LN2 (5'-TGCAGCTACAGCAGTATGTACACAAAA-3') (HELGUERA et al., 2003), foram utilizados para verificar a presença da translocação 2NS/2AS. A PCR foi realizada em um sistema de três iniciadores (SCHUELKE, 2000), com 100 ng de DNA genômico, e concentração final de 1X tampão, 2,50 mM MgCl₂, 0,35 mM de cada dNTP, 0,02 µM do iniciador VENTRIUP com a cauda M13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'), 0,20 µM do iniciador LN2, 0,20 µM do iniciador M13 marcado com o fluoróforo FAM e 0,50 U de RealTaq DNA polimerase (RBCBioscience, RT011C), em um volume final de 10 µL. A amplificação foi realizada em termociclador Veriti® 384-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®, 4388444) com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 30 ciclos de amplificação incluindo desnaturação inicial a 94°C por 45 segundos, anelamento a 66°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos, e então, 7 minutos de extensão final a 72°C. Após a amplificação, as reações foram diluídas, misturadas com Hi-Di® Formamide (Applied Biosystems®, 4311320) e ao padrão de tamanho GeneScan 500 LIZ dye Size Standard (Applied Biosystems®, 4322682), desnaturadas e submetidas à eletroforese capilar na plataforma ABI 3130xl Genetic Analyzer, contendo uma matriz capilar de 36 centímetros com polímero POP7. O programa GeneMapper® v3.5 (Applied Biosystems®) foi usado para determinar o tamanho do fragmento.

Os marcadores SSR (Tabela 1) também foram amplificados com sistema de três iniciadores, com 100 ng de DNA genômico, e com concentração final de 1X tampão, 2,5 mM MgCl₂, 0,35 mM de cada dNTP, 0,02 µM do iniciador contendo a cauda M13, 0,2 µM do iniciador sem a cauda M13, 0,2 µM do iniciador M13 marcado com um dos fluoróforos, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Sigma-Aldrich, D4545), em um volume final de 10 µL. A amplificação foi realizada em termociclador Veriti® 384-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®, 4388444) e um programa de amplificação com desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 40 ciclos de amplificação incluindo desnaturação inicial a 94°C por 30 segundos, anelamento a 62°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, e então, extensão final a 72°C por 15 minutos. A eletroforese capilar foi realizada como descrito anteriormente para o marcador da

2NS/2AS, e o tamanho dos alelos também foi determinado com o programa GeneMapper® v3.5 (Applied Biosystems®).

Os marcadores KASP foram amplificados em um volume total de reação de 4 µL, com 50 ng de DNA e 2 µL de KASP 2X Master Mix, incluindo 0,056 µl mix composto por: 46 µL ddH₂O, 30 µL de iniciador comum (100 µM) e 12 µL de cada iniciador marcado (100 µM). A reação de PCR foi realizada em termociclador Veriti® 384-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®, 4388444) utilizando as condições padrão indicadas (<https://www.lgcgroup.com/LGCGroup/media/PDFs/Products/Genotyping/KASP-thermal-cycling-conditions-all-protocols.pdf>). Os dados de fluorescência foram coletados com um leitor de microplacas (FLUOstar® Omega, BMG Labtech, Germany) e analisados por gráficos de agrupamento, escalando os valores para os eixos X e Y (<https://www.lgcgroup.com/LGCGroup/media/PDFs/Products/Genotyping/Software/Analysis-of-KASP-genotyping-data-using-cluster-plots.pdf?ext=.pdf>), utilizando o Microsoft Excel.

Outros nove marcadores SNPs, localizados nas regiões dos QTL foram convertidos em marcadores KASP (Tabela 3). As condições de amplificação e a análise de dados foram realizadas conforme descrito anteriormente para os marcadores KASP.

Tabela 3 - Marcadores KASP desenhados para identificar as regiões dos QTL de resistência de trigo a *Magnaporthe oryzae*.

Marcador	FAM/VIC	Iniciador Comum	Cromossomo
AX-94383423	ACCAACTTTCAGTACAACCGATTG ACCAACTTTCAGTACAACCGATTA	GCCAGCCCTAGTTTTACTCGTA	5B
AX-94457166	AAGCCCATTGCATCCCAGGACA GCCATTGCATCCCAGGACG	ATTGGCGGCGCAGAACCAGGAA	5B
AX-94493518	GCCACAAGAAACAATCACACGTATCT CCACAAGAAACAATCACACGTATCC	AGAAGCCATTTTCATCGCTCGAAGATTA	7B
AX-94502733	CCGAGAGCTTGCTTGTCGCG ACCGAGAGCTTGCTTGTCGCA	CTCCTCGGTCTCCTCCATCGTT	5B
AX-94508106	AGCAAAGATGGTGGAAGCTT AGCAAAGATGGTGGAAGCTC	GATAAATCTGAGCATAACAGCGG	7B
AX-94639372	CTGCAGAAACGAGTACGACA CTGCAGAAACGAGTACGACG	CGTATGGTTTTAGCAGAAGCCTT	2A
AX-94708128	ATGAGAACCTGAATGTTATTTTTGTCAGA ATGAGAACCTGAATGTTATTTTTGTCAGT	TAAATCCTGTTGTACTAGATCGCCTGAAA	5B
AX-94976327	GGAACCACTGGATCTACCTCCA GAACCACTGGATCTACCTCCG	CTTCCAATTTCTTCTCTGTGGTGGCAT	5B
AX-95093657	AGGACTTCAGCGGTAGCCA AGGACTTCAGCGGTAGCCG	TTATATGTAACCCAAGCAGGAGT	5B

Marcadores com até 10% de dados perdidos e distorção de segregação significativa (teste χ^2 , $P < 0,001$) foram adicionados ao mapa final. O mapa de ligação foi desenhado com o programa MapChart (VOORRIPS, 2002). Análises de QTL foram realizadas novamente para identificar as regiões dos QTL, e determinar se elas colocalizavam com os marcadores adicionados.

5.4 Resultados

5.4.1 Fenotipagem

Os genitores apresentaram diferenças altamente contrastantes para os sintomas da doença nas espigas e nas ráquis (Figura 1). A média dos dados fenotípicos e a estatística básica para a população DH está apresentada na Tabela 4. A assimetria e curtose para todas as avaliações indicaram uma distribuição normal, exceto para TLP_5DAI_i2 e SEB_7DAI_i2. A herdabilidade no sentido amplo variou de 82,0 a 99,0%.

Figura 1 - Sintomas de brusone em genótipos de trigo. Espigas e ráquis de BRS 209 e de CBFusarium ENT014, não-inoculadas (controle) e inoculadas com o isolado de *Magnaporthe oryzae* Py0925. Espigas aos nove dias após a inoculação.

BRS 209



CBFusarium ENT014



Tabela 4 - Perfil fenotípico e distribuição das características relacionadas à doença e à produção de grãos na população de linhagens duplo-haploides de trigo inoculadas com os isolados i1 (Py6025) e i2 (Py0925) de *Magnaporthe oryzae*.

Variável	Tamanho da amostra	Média	Variância	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Assimetria	Curtose	H ²
TLP_5DAI_i1	64	3,77	0,39	0,63	2	4	-2,43	4,00	0,82
TLP_5DAI_i2	85	2,03	0,99	1,00	1	5	1,42	1,65	0,96
SEL_5DAI_i1	59	1,02	0,22	0,47	0	1,57	-0,88	-0,41	0,96
SEL_5DAI_i2	85	0,86	0,07	0,27	0,33	1,53	0,08	-0,50	0,95
SEB_7DAI_i1	59	0,19	0,05	0,23	0	1,00	1,79	3,50	0,96
SEB_7DAI_i2	85	0,19	0,11	0,33	0	1,00	1,63	1,00	0,99
SEB_9DAI_i1	59	0,57	0,16	0,40	0	1,00	-0,51	-1,53	0,98
SEB_9DAI_i2	85	0,61	0,18	0,43	0	1,00	-0,43	-1,59	0,98
AACPD_i1	59	26,62	116,30	10,78	5,67	41,63	-0,73	-0,97	0,99
AACPD_i2	85	58,32	38,87	6,24	32,99	65,19	-1,32	1,96	0,98
PIR_i1	58	37,14	436,51	20,89	8	106	1,35	1,56	0,90
PIR_i2	85	35,42	565,51	23,78	1	109	0,85	0,40	0,98
PMG_i1	72	0,55	0,17	0,41	0,10	1,57	1,04	0,13	0,98
PMG_i2	85	0,20	0,01	0,10	0	0,57	1,25	3,02	0,93

TLP_5DAI = Tipo de Lesão Predominante nas espiguetas aos 5 DAI, SEL_5DAI = Severidade de Espiguetas com Lesão (%) aos 5 DAI, SEB_7DAI e SEB_9DAI = Severidade de Espiguetas Brancas (%) aos 7 e 9 DAI, AACPD = Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença calculada usando dados de SEB, PIR = número total de pontos de infecção nos dois lados da ráquis, e PMG = Proporção do Peso Médio do Grão de espigas inoculadas em relação às controle.

Apesar da diferença no número de genótipos avaliados para cada isolado, foi possível identificar padrões de correlação comuns entre algumas das características avaliadas como AACPD (Tabela 5). Para i1, AACPD mostrou correlação positiva $r=0,65$ com SEB_7DAI e $r=0,96$ com SEB_9DAI, e correlação negativa com PIR ($r=-0,56$) e PMG ($r=-0,88$). O mesmo padrão foi observado com as características para i2, onde AACPD mostrou baixa correlação positiva com SEB_7DAI ($r=0,53$), a qual aumentou aos 9 DAI ($r=0,87$), além de uma alta correlação negativa com PIR ($r=-0,71$) e PMG ($r=-0,70$). Por outro lado, TLP_5DAI e SEL_5DAI mostraram grande variação no padrão de correlação com as demais características, para ambos os isolados. Para i1, TLP_5DAI apresentou correlação positiva com SEB e AACPD, e correlação negativa com PMG. Para i2, TLP_5DAI apresentou correlação significativa positiva apenas com SEL_5DAI e SEB_7DAI. Comparando com SEL_5DAI, houve uma inversão na significância entre os isolados nos valores de correlação para as avaliações SEB_7DAI, SEB_9DAI, AACPD e PMG. Não foi observado inversão no padrão de significância de PMG com a avaliação de variáveis de branqueamento incluindo-se AACPD, e com PIR. Esses resultados indicam que características de branqueamento são os melhores parâmetros para a avaliação da resistência dos genótipos, se comparados com TLP ou SEL, devido à uniformidade dos resultados para ambos os isolados considerados.

Tabela 5 - Coeficiente de correlação entre as características avaliadas na população de linhagens duplo-haploides de trigo inoculadas com os isolados i1 (Py6025) e i2 (Py0925) de *Magnaporthe oryzae*.

Variável	TLP_5DAI	SEL_5DAI	SEB_7DAI	SEB_9DAI	AACPD	PIR	PMG
i1							
TLP_5DAI	-						
SEL_5DAI	0,11 NS	-					
SEB_7DAI	0,29 *	-0,48 ***	-				
SEB_9DAI	0,48 ***	-0,25 NS	0,62 ***	-			
AACPD	0,58 ***	-0,23 NS	0,65 ***	0,96 ***	-		
PIR	-0,20 NS	0,39 **	-0,40 **	-0,65 ***	-0,56 ***	-	
PMG	-0,61 ***	0,09 NS	-0,50 ***	-0,84 ***	-0,88 ***	0,36 **	-
i2							
TLP_5DAI	-						
SEL_5DAI	0,38 ***	-					
SEB_7DAI	0,35 ***	0,00 NS	-				
SEB_9DAI	0,05 NS	-0,43 ***	0,49 ***	-			
AACPD	0,09 NS	-0,38 ***	0,53 ***	0,87 ***	-		
PIR	-0,03 NS	0,51 ***	-0,30 **	-0,70 ***	-0,71 ***	-	
PMG	-0,13 NS	0,27 *	-0,37 ***	-0,54 ***	-0,70 ***	0,57 ***	-

TLP_5DAI = Tipo de Lesão Predominante nas espiguetas aos 5 DAI, SEL_5DAI = Severidade de Espiguetas com Lesão (%) aos 5 DAI, SEB_7DAI e SEB_9DAI = Severidade de Espiguetas Brancas (%) aos 7 e 9 DAI, AACPD = Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença calculada usando dados de SEB, PIR = número total de pontos de infecção nos dois lados da ráquis, e PMG = Proporção do Peso Médio do Grão de espigas inoculadas em relação às controle.

5.4.2 Construção do mapa de ligação

Um total de 4.352 SNPs foram polimórficos entre os genitores e não apresentaram dados perdidos. Desses, 3.553 SNPs estavam no padrão determinado para a construção do mapa esqueleto (apenas alelos AA ou BB, e com distorção de segregação significativa, teste χ^2 $P < 0,0001$). Excluindo os 3.021 marcadores redundantes, um total de 524 marcadores foram alocados no mapa esqueleto e oito ficaram sem ligação (Tabela 6).

Tabela 6 - Resumo dos mapas esqueleto, segunda fase e final para a população Embrapa-Brusone de linhagens duplo-haploides de trigo, com número de marcadores não-redundantes e redundantes alocados e comprimento genético.

Cr	Mapa Esqueleto		Mapa Segunda Fase		Mapa Final	
	Número de marcadores	Comp. (cM)	Número de marcadores	Comp. (cM)	Número de marcadores	Comp. (cM)
1A	26 [263]	143,25	30 [367]	153,56	30 [367]	153,56
1B	40 [375]	199,37	57 [672]	280,84	57 [672]	280,84
1D	9 [5]	151,66	14 [12]	167,87	14 [12]	167,87
2A	39 [441]	277,71	44 [633]	279,00	52 [639]	320,62
2B	50 [554]	149,65	64 [769]	193,94	65 [769]	183,98
2D	15 [17]	187,12	18 [39]	186,10	20 [41]	221,56
3A	33 [173]	232,50	45 [247]	238,72	45 [247]	238,72
3B	33 [174]	350,16	47 [332]	399,12	47 [332]	399,12
3D	10 [24]	116,52	14 [65]	131,30	14 [65]	131,30
4A	39 [195]	222,13	50 [270]	243,73	50 [270]	243,73
4B	21 [54]	105,11	24 [90]	106,79	24 [90]	106,79
4D	8 [15]	23,53	8 [21]	23,53	8 [21]	23,53
5A	26 [48]	184,21	42 [117]	177,41	42 [117]	177,41
5B	40 [161]	152,64	56 [222]	167,78	57 [229]	169,68
5D	7 [13]	233,51	7 [30]	233,51	7 [30]	233,51
6A	37 [246]	286,25	55 [340]	313,88	55 [340]	313,88
6B	4 [7]	65,76	6 [21]	65,32	6 [21]	65,32
6D	7 [13]	39,32	8 [23]	41,21	8 [23]	41,21
7A	34 [58]	167,33	43 [111]	173,92	43 [111]	173,92
7B	29 [149]	228,08	42 [226]	280,59	42 [226]	280,59
7D	17 [36]	211,15	25 [55]	220,99	25 [55]	220,99
Não ligados	6 [2]	-	14 [3]	-	14 [3]	-
Genoma	524 [3021]	3726,96	699 [4662]	4079,11	711 [4677]	4148,13

Cr = Cromossomo, Comp = Comprimento.

Marcadores redundantes são apresentados entre colchetes.

Para produzir o mapa segunda fase, 1.816 SNPs com 10% de dados perdidos e distorção de segregação, teste $\chi^2 P < 0,001$ foram adicionados ao mapa. Dos 5.361 SNPs alocados no mapa, 699 não foram redundantes. O mapa segunda fase foi composto por 21 grupos de ligação correspondendo aos 21 cromossomos de trigo, cobrindo um comprimento total de 4.079,11 cM. Ao todo, 17 marcadores permaneceram não ligados ao mapa. O genoma D foi composto por 339 marcadores, enquanto que os genomas A e B foram compostos por 2.394, e 2.628 marcadores, respectivamente (Tabela 6). Uma detecção de QTL preliminar foi realizada com o mapa segunda fase (Tabela 7). Como vários QTL foram detectados no 2A, procurou-se saturar esse cromossomo.

Tabela 7 - QTL identificados para as características avaliadas na população de linhagens duplo-haploides de trigo inoculadas com os isolados i1 (Py6025) e i2 (Py0925) de *Magnaporthe oryzae* no mapa segunda fase.

Variável	Nome do QTL	Cr	Posição	Marca esquerda	Marca direita	LOD	EVF (%)	Ad	IC à Esquerda	IC à Direita
TLP_5DAI_i1	<i>QPlt1.emt-2A</i>	2A	270	AX-94400566	AX-94818178	4,0	26,9	-0,31	269,5	273,5
SEL_5DAI_i2	<i>QSl52.emt-2A</i>	2A	276	AX-95202120	AX-94383218	6,2	28,9	0,14	273,5	277,0
SEB_7DAI_i1	<i>QBs71.emt-2A</i>	2A	269	AX-94717890	AX-94400566	4,9	32,3	-0,14	267,5	271,5
SEB_7DAI_i2	<i>QBs72.emt-2A</i>	2A	277	AX-94383218	AX-94469326	5,8	20,4	-0,17	276,5	277,0
SEB_9DAI_i1	<i>QBs91.emt-2A</i>	2A	270	AX-94400566	AX-94818178	22,5	83,0	-0,38	267,5	271,5
SEB_9DAI_i2	<i>QBs92.emt-2A</i>	2A	270	AX-94400566	AX-94818178	36,1	84,5	-0,39	268,5	271,5
AACPD_i1	<i>QAud1.emt-2A</i>	2A	270	AX-94400566	AX-94818178	21,9	82,2	-10,23	267,5	271,5
AACPD_i2	<i>QAud2.emt-2A</i>	2A	273	AX-94818178	AX-94396056	19,9	66,4	-5,17	271,5	274,5
PIR_i1	<i>QIpr1.emt-2A</i>	2A	266	AX-95138903	AX-94451172	10,1	41,6	14,85	263,5	266,5
PIR_i1	<i>QIpr1.emt-5B</i>	5B	86	AX-95142453	AX-94456777	3,8	11,8	7,32	84,5	87,5
PIR_i1	<i>QIpr1.emt-7B</i>	7B	252	AX-94466287	AX-95222583	3,3	11,9	7,34	243,5	258,5
PIR_i2	<i>QIpr2.emt-2A</i>	2A	277	AX-94383218	AX-94469326	15,5	56,9	18,10	276,5	277,0
PMG_i1	<i>QPag1.emt-2A</i>	2A	262	AX-94469556	AX-94639372	10,2	48,8	0,30	258,5	262,5
PMG_i2	<i>QPag2.emt-2A</i>	2A	273	AX-94818178	AX-94396056	7,1	33,2	0,06	271,5	275,5

TLP_5DAI = Tipo de Lesão Predominante nas espiguetas aos 5 DAI, SEL_5DAI = Severidade de Espiguetas com Lesão (%) aos 5 DAI, SEB_7DAI e SEB_9DAI = Severidade de Espiguetas Brancas (%) aos 7 e 9 DAI, AACPD = Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença calculada usando dados de SEB, PIR = número total de pontos de infecção nos dois lados da ráquis, e PMG = Proporção do Peso Médio do Grão de espigas inoculadas em relação às controle. Cr = Cromossomo; EVF = Explicação da variação fenotípica (%) pela marca; Ad = efeito aditivo estimado da marca; IC à esquerda e IC à Direita = Intervalo de confiança, à esquerda e à direita, respectivamente, calculado por LOD-1 a partir da posição estimada do QTL.

5.4.3 Saturação do cromossomo 2A, detecção de QTL e conversão de marcadores nas regiões dos QTL

A translocação 2NS/2AS foi identificada em CBFusarium ENT014. O marcador da 2NS (VENTRIUP/LN2) foi redundante com AX-94400566, mapeado a 9,5 cM de distância do início do cromossomo 2A (Tabela 8). O marcador KASP BS00086365, obtido do Axiom® Wheat HD Genotyping Array foi mapeado ao lado do marcador da 2NS. Ambos os marcadores, BS00086365 e o marcador da 2NS, são bordas de *QSl52.emt-2A* (Figura 2, Tabela 8). Os outros três marcadores KASP utilizados para saturar o cromossomo 2A, BS00022150, BS00089310, e BS00097307, não apresentaram os parâmetros determinados para a construção do mapa final.

Figura 2 - QTL de trigo identificados nos cromossomos 2A, 5B e 7B para a resistência a *Magnaporthe oryzae*. Os QTL e o LOD estão apresentados ao lado direito do cromossomo. Marcadores sublinhados representam os marcadores convertidos.

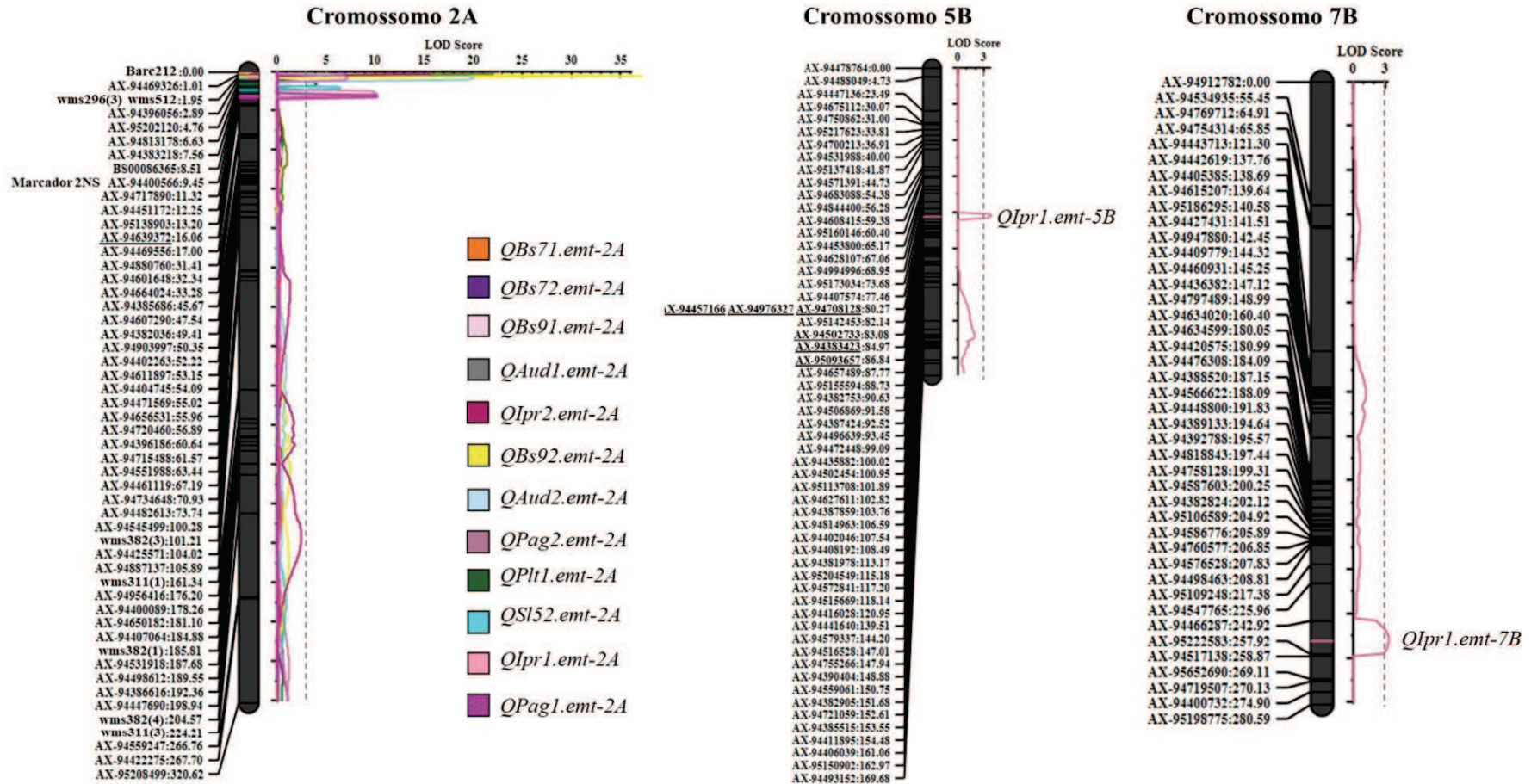


Tabela 8 - QTL identificados para as características avaliadas na população de linhagens duplo-haploides de trigo inoculadas com os isolados i1 (Py6025) e i2 (Py0925) de *Magnaporthe oryzae* no mapa final.

Característica	Nome do QTL	Cr	Posição	Marca esquerda	Marca direita	LOD	EVF (%)	Ad	IC à Esquerda	IC à Direita
TLP_5DAI_i1	<i>QPlt1.emt-2A</i>	2A	6	AX-95202120	AX-94818178	4,0	28,0	-0,32	4,5	7,5
SEL_5DAI_i2	<i>QSl52.emt-2A</i>	2A	9	BS00086365	AX-94400566	6,4	29,6	0,15	7,5	9,5
SEB_7DAI_i1	<i>QBs71.emt-2A</i>	2A	0	Barc212	AX-94469326	5,0	32,3	-0,14	0	1,5
SEB_7DAI_i2	<i>QBs72.emt-2A</i>	2A	0	Barc212	AX-94469326	5,8	20,4	-0,17	0	1,5
SEB_9DAI_i1	<i>QBs91.emt-2A</i>	2A	0	Barc212	AX-94469326	22,7	82,9	-0,38	0	1,5
SEB_9DAI_i2	<i>QBs92.emt-2A</i>	2A	2	wms296(3)	AX-94396056	36,2	85,2	-0,39	1,5	2,5
AACPD_i1	<i>QAud1.emt-2A</i>	2A	0	Barc212	AX-94469326	22,0	82,2	-10,23	0	1,5
AACPD_i2	<i>QAud2.emt-2A</i>	2A	3	AX-94396056	AX-95202120	20,0	66,3	-5,17	1,5	4,5
PIR_i1	<i>QIpr1.emt-2A</i>	2A	12	AX-94717890	AX-94451172	10,1	41,6	14,85	9,5	12,5
PIR_i1	<i>QIpr1.emt-5B</i>	5B	82	AX-94457166	AX-95142453	3,8	11,8	7,33	80,5	83,5
PIR_i1	<i>QIpr1.emt-7B</i>	7B	252	AX-94466287	AX-95222583	3,3	11,8	7,34	243,5	258,5
PIR_i2	<i>QIpr2.emt-2A</i>	2A	0	Barc212	AX-94469326	15,5	57,3	18,10	0	1,5
PMG_i1	<i>QPag1.emt-2A</i>	2A	13	AX-94451172	AX-95138903	10,3	48,8	0,30	11,5	13,5
PMG_i2	<i>QPag2.emt-2A</i>	2A	3	AX-94396056	AX-95202120	7,3	32,4	0,06	1,5	4,5

TLP_5DAI = Tipo de Lesão Predominante nas espiguetas aos 5 DAI, SEL_5DAI = Severidade de Espiguetas com Lesão (%) aos 5 DAI, SEB_7DAI e SEB_9DAI = Severidade de Espiguetas Brancas (%) aos 7 e 9 DAI, AACPD = Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença calculada usando dados de SEB, PIR = número total de pontos de infecção nos dois lados da ráquis, e PMG = Proporção do Peso Médio do Grão de espigas inoculadas em relação às controle. Cr = Cromossomo; EVF = Explicação da Variação Fenotípica (%) pela marca; Ad = efeito aditivo estimado da marca; IC à Esquerda e IC à Direita = Intervalo de confiança, à esquerda e à direita, respectivamente, calculado por LOD-1 a partir da posição estimada do QTL.

Dos nove marcadores SSR, wms296, wms311, wms382, wms497 amplificaram mais de um loco que não foram exclusivos ao cromossomo 2A. Apenas wms497 amplificou dois locos em cromossomos diferentes do 2A. Ao todo, 18 locos foram mapeados, 11 deles no cromossomo 2A. Barc212 foi o primeiro marcador do cromossomo 2A e o marcador AX-94469326 (não convertido) está a 1 cM de distância dele (Figura 2). Esses dois marcadores são bordas dos QTL *QBs71.emt-2A*, *QBs72.emt-2A*, *QBs91.emt-2A*, *QAud1.emt-2A* e *QIpr2.emt-2A* (Tabela 8).

Ao todo, 14 QTL foram mapeados, sendo pelo menos um para cada variável analisada, exceto para TLP_5DAI_i2 e SEL_5DAI_i1 (Tabela 8). Todos os QTL identificados apresentam porcentagem de explicação da variação fenotípica acima de 11,8%. Dos QTL mapeados, 12 foram localizados no cromossomo 2A. Os QTL identificados para SEB_7DAI foram localizados na mesma posição, considerando ambos os isolados. Os dois QTL associados à SEB_9DAI, localizados no cromossomo 2A, apresentaram o LOD mais alto, explicando 82,9 e 85,2% da variação fenotípica, para os isolados Py6025 e Py0925, respectivamente. Os QTL relacionados com TLP_5DAI_i1, SEB e AACPD apresentaram efeito aditivo negativo, com variação de -10,23 a -0,14. Considerando a variável PIR, foram mapeados três QTL específicos para o isolado Py6025 e um QTL para Py0925.

Os seis marcadores KASP desenvolvidos para as regiões do QTL no cromossomo 5B foram convertidos (Figure 2). *QIpr1.emt-5B* tem os marcadores AX-94457166 (convertido) e AX-95142453 nas bordas esquerda e direita, respectivamente (Tabela 8). Embora o marcador AX-95142453 não tenha sido convertido, o marcador convertido AX-94502733 está a 1,0 cM dele. Nesse estudo não foi possível converter marcadores para *QIpr1.emt-7B*.

5.5 Discussão

Os genitores da população Embrapa-Brusone apresentaram dados fenotípicos altamente contrastantes para todas as variáveis avaliadas, e linhagens transgressivas na população também foram observadas. A cultivar BRS 209, genitor feminino da população DH, é altamente suscetível à brusone, apresentando completo branqueamento da espiga para ambos os isolados aos 9 DAI. BRS 209 foi mais suscetível do que Anahuac 75, introduzida do México e amplamente utilizada como controle de suscetibilidade em estudos de brusone do trigo (URASHIMA; KATO, 1994). Esta cultivar apresentou completo branqueamento da espiga aos 13 DAI (TORRES et al., 2018). CBFusarium ENT014, genitor masculino, também apresentou branqueamento das espigas, porém dias mais tarde. Portanto, a principal diferença entre os genitores da população é a velocidade no desenvolvimento dos sintomas de branqueamento. A herdabilidade de sentido amplo das variáveis avaliadas, para ambos os isolados, indica que as variações observadas são causadas por variações genéticas.

Os valores da AACPD podem ser utilizados para mensurar o desenvolvimento da doença. No entanto, obter dados do progresso da doença é trabalhoso e demorado. Para o presente estudo, oito avaliações de sintomas foram realizadas. Independentemente do isolado, a correlação da AACPD com o TLP_5DAI e com a SEL_5DAI foram menores do que com a SEB. Considerando ambos os isolados, uma baixa correlação positiva da AACPD com a SEB_7DAI (média de $r=0,59$) foi encontrada, e esta aumentou para $r=0,92$ aos 9 DAI. Esse resultado pode ser explicado pela observação de maiores diferenças da SEB entre os genótipos aos 9 DAI. Uma vez que a SEB_9DAI mostrou maior correlação com a AACPD, ela foi considerada a melhor variável para se avaliar a resistência de trigo à brusone. Ao invés de considerar TLP e SEL, trabalhos futuros, com o objetivo de otimizar o tempo dedicado às avaliações, deveriam priorizar variáveis de SEB ao longo do tempo, e, se ainda não for possível, realizar a avaliação da SEB aos 9 DAI.

Para ambos os isolados, o coeficiente de correlação de PMG com SEB e com a AACPD foi negativo, e foram mais altos para SEB_9DAI do que para SEB_7DAI, ,

ênfatizando a importância do período de tempo após a inoculação para a avaliação do impacto da doença na produção de trigo, como previamente observado por Rios et al. (2017). Quanto às variáveis relacionadas à doença, quanto maior a SEB menor foi o PMG de espigas inoculadas, como era esperado. Outros estudos também mostram que a brusone afeta negativamente as variáveis relacionadas com a fisiologia do trigo e, conseqüentemente, a produção de grãos, particularmente durante a fase inicial de enchimento do grão (GOULART; SOUSA; URASHIMA, 2007; RIOS et al., 2017). Em condições de campo, observa-se correlação significativa de $r=0,89$ entre o índice de doença e perdas de rendimento (COELHO et al., 2016).

O PIR corresponde ao sítio de penetração do fungo e é caracterizado por uma lesão de coloração negro brilhante. Acima do ponto de infecção na ráquis de espigas infectadas, os grãos de trigo são enrugados, e abaixo dele, sadios (GOULART; SOUSA; URASHIMA, 2007). Acreditava-se que cada ráquis de espiga de trigo infectada apresentava um ponto de infecção. Por outro lado, também havia relato de que alguns genótipos de trigo poderiam apresentar vários PIR em condições de alta pressão da doença (TOLEDO, 2004), como em casos de inoculação em ambiente controlado (FERREIRA et al., 2016a). O trabalho de Ferreira et al. (2016) foi o primeiro a identificar o número de PIR como uma importante característica de fenotipagem de trigo quanto à resistência a *M. oryzae*. No presente estudo, foi encontrada uma variação do total de PIR de 1 a 109. A caracterização das linhagens da população Embrapa-Brusone revelou distribuição normal dos dados, reforçando que PIR é uma característica herdável. Até o momento, PIR nunca havia sido considerado, nem na avaliação nem na quantificação da brusone de trigo, mas é uma característica importante, já que apresentou correlação com outras variáveis analisadas. O alto número de PIR associado com menor SEB ao longo do tempo, nos genótipos resistentes, pode ser um indicativo de resposta de hipersensibilidade.

A construção do mapa esqueleto usando marcadores sem dados perdidos é uma interessante abordagem para obtenção de um mapa robusto. Recentemente, estudos têm sido publicados usando essa abordagem e considerando como âncoras marcadores identificados em recentes mapas consenso de trigo (HUSSAIN et al., 2017; WEN et al., 2017; ZENG et al., 2019). No mapa esqueleto, 524 marcadores não redundantes foram

alocados, número similar ao encontrado na população DH Savannah x Rialto (ALLEN et al., 2017). Cinco marcadores, SSR e KASP, foram alocados no cromossomo 2A com o objetivo de saturar esse cromossomo. Um total de 5.388 marcadores foram usados para construir o mapa final, considerando marcadores redundantes, SSR e KASP. A adição de novos marcadores no mapa segunda fase melhorou a resolução do mapeamento de QTL.

Nesse estudo, ao todo foram identificados 14 QTL, sendo 12 deles relacionados a características da doença, e dois deles relacionados com características de produção de grãos. Pequenas diferenças nas posições dos QTL, comparando-se dados das inoculações com os dois isolados, podem ser devido a diferenças no número de amostras consideradas. Dez QTL relacionados à reação de trigo à brusone foram alocados na região distal do cromossomo 2A. Esses resultados enfatizam a importância desse cromossomo para a resistência de trigo a *M. oryzae*. Apenas um QTL (*QSl52.emt-2A*) foi colocalizado com o marcador VENTRIUP/LN2 da 2NS (HELGUERA et al., 2003). A recombinação no braço curto do cromossomo 2A, entre o marcador da 2NS e os QTL na região distal podem explicar os relatos de genótipos de trigo que contêm o marcador da translocação e que apresentam fenótipo suscetível à doença (CRUZ et al., 2016a), ou mesmo a situação oposta, em que genótipos de trigo apresentam baixa severidade da doença e ausência da translocação 2NS/2AS (FERREIRA et al., 2018).

O QTL para SEL foi localizado no cromossomo 2A para o isolado Py0925. *QBs71.emt-2A* e *QBs72.emt-2A*, identificados para ambos os isolados, foram alocados na mesma posição e explicam, em média 26,4% da variação fenotípica. Resultados similares de fenotipagem e de identificação de QTL para ambos os isolados confirmam a robustez dos experimentos. Os QTL de SEB_7DAI para ambos os isolados, SEB_9DAI_i1, AACPD_i1, e PIR_i2 foram identificados na mesma posição, com Barc212 na borda direita, sendo este um importante marcador da resistência relacionada a características de branqueamento e PIR. A conversão de novos marcadores na região do QTL, delimitados pelos marcadores Barc212 e AX-94469326, pode aprimorar programas de seleção assistida por marcadores.

Cruz et al. (2016) observaram, para determinados genótipos de trigo, associação da resistência à brusone e a presença da translocação 2NS/2AS. A identificação de QTL de PIR para o isolado Py6025 nos cromossomos 5B e 7B alertam para a existência de QTL isolado-específicos não-associados ao cromossomo 2A. Marcadores KASP convertidos no cromossomo 5B podem ser utilizados na seleção e no desenvolvimento de genótipos com resistência a *M. oryzae*.

Dois QTL de PMG para os dois isolados foram identificados no cromossomo 2A, e estariam relacionados com a tolerância de trigo a *M. oryzae*. Eles explicam, em média, 40,6% da variação fenotípica. Plantas que são tolerantes produzem bom rendimento mesmo quando infectadas por patógenos (BARRETT et al., 2009; NEWTON; GRAVOUIL; FOUNTAINE, 2010). Na Argentina, quatro cultivares de trigo comumente utilizadas foram submetidas à inoculação com oito isolados de *M. oryzae* (MARTÍNEZ et al., 2019). A redução no valor do peso de mil grãos, causada pelos diferentes isolados do patógeno testados, variou de 18,5% a 74,9%. Para brusone de trigo, poucos estudos abordam o desenvolvimento de estratégias de melhoramento baseadas em avaliações de tolerância do hospedeiro.

Para o cromossomo 2A, os QTL detectados de maior importância, *QBs91.emt-2A* e *QBs92.emt-2A*, estão a 9,5 e 7,5 cM de distância, respectivamente, do marcador da 2NS. QTL de efeito maior foram identificados considerando a SEB_9DAI e AACPD. A porcentagem de variação fenotípica explicada por esses QTL variou de 66,3 a 85,2%, mostrando a importância dessas variáveis para a avaliação da resistência de trigo a *M. oryzae*. Além da região distal do cromossomo 2A, outras regiões do genoma, *QIpr1.emt-5B* e *QIpr1.emt-7B*, influenciam a resistência de trigo ao patógeno.

O trigo apresenta cinco tipos de resistência a *Gibberella zeae* (agente causal da giberela) (MESTERHAZY, 1995). Três deles estão relacionados com a resistência contra o estabelecimento inicial da infecção, com a resistência à velocidade de invasão da hifa e com a tolerância. No patossistema *M. oryzae*-trigo, propõe-se a existência de pelos menos três mecanismos similares. O primeiro envolveria a resposta de hipersensibilidade, expressa pelo número de PIR. O segundo seria a resistência à colonização dos tecidos do

hospedeiro pelo patógeno, expressa pelo atraso no desenvolvimento do branqueamento das espigas. *M. oryzae* se desenvolve mais rapidamente na ráquila de cultivares suscetíveis do que na de resistentes (HA; KOOPMANN; VON TIEDEMANN, 2016). Mais estudos devem ser realizados para explicar como ocorre a penetração e a colonização de *M. oryzae* em trigo. A identificação de QTL específicos para cada uma dessas características indicam que a hipersensibilidade e a resistência à colonização do patógeno são independentes. O terceiro mecanismo seria relacionado à tolerância, expresso pela proporção do peso médio do grão entre espiga inoculada e controle.

5.6 Conclusões

Foram identificados 14 QTL, 12 deles relacionados com a resistência de trigo a *M. oryzae* e dois relacionados à produção de grãos sob condições de inoculação com o patógeno. Esse é o primeiro estudo que identifica QTL de trigo conferindo resistência a *M. oryzae*. Novos marcadores KASP já estão sendo desenvolvidos para saturar as regiões dos QTL identificados. Linhagens isogênicas estão em desenvolvimento para o mapeamento fino dos QTL nos cromossomos 2A, 5B e 7B. O uso dos marcadores reportados nesse estudo tem uso potencial para o desenvolvimento de cultivares de trigo resistentes à brusone.

- O Capítulo III foi submetido para publicação na revista “Phytopathology”

6 CAPÍTULO IV - Caracterização de genes-candidatos de resistência a *Magnaporthe oryzae* em trigo

6.1 Resumo

Análises de transcriptomas vêm sendo realizadas para entender a base genética que controla a resistência de trigo a *Magnaporthe oryzae*. Assim, genes diferencialmente expressos (GDE) podem ser selecionados como genes-candidatos para caracterização funcional. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de genes-candidatos de resistência em mutantes obtidos por TILLING e realizar um estudo de transcriptômica para identificar GDE em resposta a infecção por um segundo isolado do patógeno. Os genótipos de trigo Cadenza (hexaplóide) e Kronos (tetraplóide), genitores silvestres dos mutantes TILLING, se mostraram suscetíveis a *M. oryzae*. Os mutantes de Cadenza para *Caffeic Acid O-Methyltransferase* apresentaram variação na reação a *M. oryzae* tanto em planta jovem como em espiga, apresentando potencial para trabalhos futuros. Por outro lado, os mutantes para *Hsp60* e *Wir1b* não apresentaram diferença significativa de reação com o genótipo silvestre Kronos. Um segundo estudo de transcriptômica foi realizado com os genótipos BRS 209 (suscetível) e CBFusarium ENT014 (resistente), inoculados com o isolado Py0925, às 40 horas após a inoculação. As funções moleculares mais representativas em termos GO foram ligação heme, ligação por íon ferro e atividade oxidoredutase, com modulação de expressão inversa nos dois genótipos em resposta à inoculação. Foram identificados 388 GDE na cultivar BRS 209 e 249 GDE no genótipo CBFusarium ENT014, sendo 198 e 95, respectivamente, com anotação. Entre os 95 genes com anotação diferencialmente expressos no genótipo CBFusarium ENT014, 24 são relacionados à defesa, 23 com indução de expressão e apenas um com expressão reduzida sob condições de inoculação com *M. oryzae*.

Palavras-chave: 1. Brusone. 2. *Triticum aestivum*. 3. Expressão gênica diferencial 4. Mutantes TILLING.

6.2 Introdução

As plantas impedem o ataque de patógenos utilizando mecanismos de defesa espécie-específicos e de amplo-espectro, enquanto os patógenos utilizam estratégias para detoxificar compostos antimicrobianos e evitar os mecanismos de resistência da planta (MAOR; SHIRASU, 2005). Os fungos fitopatogênicos diferem no tipo de interação com as plantas pelas suas estratégias de alimentação, sendo classificados como biotróficos, necrotróficos e hemibiotróficos. Os fungos biotróficos crescem e se nutrem de tecido vegetal vivo, enquanto os necrotróficos se desenvolvem em tecido vegetal morto ou em

decomposição (VLEESHOUWERS; OLIVER, 2014). Os fungos hemibiotróficos combinam as duas estratégias de alimentação para sobreviver, estabelecendo interação biotrófica nas primeiras fases do desenvolvimento e, em seguida, comportando-se como necrotróficos. *Magnaporthe oryzae* B.C. Couch e L.M. Kohn (anamorfo *Pyricularia oryzae*) é um fungo hemibiotrófico, causador da brusone em várias espécies de hospedeiros (SKAMNIOTI; GURR, 2009). O arroz e o trigo são as principais culturas afetadas por *M. oryzae*.

Durante 30 anos, a brusone do trigo foi considerada restrita a América do Sul. Em 2016, a doença foi encontrada em Bangladesh (MALAKER et al., 2016) e na Índia (BHATTACHARYA; PAL, 2017). As lesões causadas por *M. oryzae* apresentam diferentes formas e tamanhos, podendo ser observadas em todos os tecidos da planta (LAU et al., 2011; TORRES et al., 2015). A infecção do fungo na espiga é considerada a forma mais danosa da doença por afetar diretamente a produção de grãos. O fungo infecta a ráquis e coloniza o tecido, impedindo o transporte de nutrientes para a parte superior ao ponto de penetração, causando redução na qualidade e no rendimento de grãos. Dados coletados entre 1988 e 1992 no estado do Mato Grosso do Sul, sob condições naturais de infecção, demonstraram redução de 0,4 a 32,9% no rendimento de grãos (GOULART; SOUSA; URASHIMA, 2007).

Estudos vêm sendo desenvolvidos para entender a base genética que controla a resistência e quais são os mecanismos de defesa do trigo a *M. oryzae*. Dez genes de resistência a *M. oryzae* já foram identificados (ANH et al., 2015; CUMAGUN et al., 2014; NGA; HAU; TOSA, 2009; TAGLE; CHUMA; TOSA, 2015; TAKABAYASHI et al., 2002; VY et al., 2014; WANG et al., 2018; ZHAN; MAYAMA; TOSA, 2008), porém nenhum foi ainda utilizado para desenvolver cultivares resistentes à brusone. Uma associação entre a presença da translocação 2NS/2AS e a resistência de trigo ao agente causal da brusone também foi identificada (CRUZ et al., 2016a).

Em plantas jovens de trigo inoculadas com *M. oryzae*, foi observado intensa reprogramação transcricional (TUFAN et al., 2009). Os transcritos diferencialmente expressos tiveram suas funções anotadas e foram divididos em quatro categorias: defesa

celular, metabolismo da planta, transporte celular e regulação da transcrição. Esse importante trabalho foi, no entanto, conduzido em plantas jovens. Como já foi observado que não há correlação entre a reação de planta jovem e de planta adulta (MACIEL et al., 2014), estudos com espigas de trigo são de extrema importância e ainda escassos na literatura.

Análises de expressão gênica de oito genes relacionados com a resistência foram conduzidos em espigas de genótipos de trigo com respostas contrastantes à brusone e à giberela (HA; KOOPMANN; VON TIEDEMANN, 2016). Os genes de resistência avaliados tiveram diferentes padrões de expressão nas cultivares analisadas e foram mais responsivos à inoculação com *Fusarium graminearum* do que à com *M. oryzae*. Duas bibliotecas subtrativas, *forward* e *reverse*, foram geradas pela equipe da Embrapa Trigo utilizando cDNA sintetizado a partir de RNA de espigas controle e inoculadas com o isolado de *M. oryzae* Py6025 (TORRES et al., 2018). Análises de transcriptomas também foram realizadas utilizando-se as plataformas 454 (Roche) e HiSeq2000 (Illumina) (TORRES et al., 2018). A partir desses estudos de transcriptômica, genes diferencialmente expressos (GDE) na planta podem ser selecionados como genes-candidatos para outros tipos de análises e poderão auxiliar na determinação e no estudo de função.

O TILLING (*Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*) é uma técnica de genética reversa, não transgênica, que pode ser utilizada para o estudo de genes-candidatos. Essa técnica combina mutagênese induzida por agentes químicos com *screening* das mutações de alto rendimento, para identificar mutações em um único nucleotídeo em uma região específica de um gene de interesse (TAHERI et al., 2017). Quando comparado com outras técnicas, como o RNAi e a mutagênese insercional, o TILLING se destaca devido aos menores custo e tempo para o desenvolvimento, à alta eficiência para a construção da população mutante, e à possibilidade de aplicação para qualquer espécie de planta (KUROWSKA et al., 2011; WANG; SHI, 2015). A técnica de TILLING em trigo já foi utilizada para avaliar mutações em genes *waxy*, codificando a enzima GBSSI (*granule-bound starch synthase I* – amido sintase granular I) (BOTTICELLA et al., 2011; BOVINA et al., 2014; DONG et al., 2009; HAZARD et al.,

2012; RAWAT et al., 2012; SESTILI et al., 2010, 2015; SLADE et al., 2005, 2012) e também *VRNI* (*VERNALIZATION* 1 – VERNALIZAÇÃO 1) (CHEN; DUBCOVSKY, 2012). Essa técnica também foi utilizada para elucidar a função do gene *TaMlo* na resistência de trigo a oídio (agente causal *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) (ACEVEDO-GARCIA et al., 2017).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de genes-candidatos de resistência em mutantes TILLING submetidos à inoculação com *M. oryzae* e desenvolver análises de transcriptomas quanto às respostas de defesa da planta frente ao patógeno utilizando-se um segundo isolado do patógeno.

6.3 Material e Métodos

6.3.1 Seleção de genes-candidatos e dos respectivos mutantes TILLING

A seleção de três genes-candidatos foi realizada utilizando-se os dados da análise de transcriptomas gerados por Torres et al. (2018). Espigas do genótipo CBFusarium ENT014, resistente à brusone, foram inoculadas com suspensão de esporos do isolado de *M. oryzae* Py6025 (SISGEN AC50A60), na concentração de 2×10^5 conídios/mL. Espigas do mesmo genótipo, aspergidas com solução de água de osmose reversa e Tween 80 (2 gotas em 1 L de água), foram consideradas controle. As coletas de tecido vegetal das condições controle e inoculada foram realizadas às 40 horas após a inoculação (HAI).

Foram realizadas duas inoculações independentes para esse experimento, sendo analisada uma amostra de cada inoculação. Para a escolha dos genes-candidatos foram considerados genes com fold-change (\log_2FC) mínimo de 2 e *false discovery rate* (FDR) máximo de 10^{-5} . Assim, foram identificados 13 GDE comuns às duas inoculações, dos quais foram selecionados TR34288_c0_g2 (similaridade com a proteína *Disease Resistance Protein*, RPM1), TR65444_c2_g4 (similaridade com *Tricetin 3'4'5'-O-Trimethyltransferase / Caffeic Acid O-Methyltransferase*) e TR42373_c0_g2 (similaridade com *Protein Wheat-Induced Resistance 1B*, WIR1B) para a seleção dos mutantes TILLING (Tabela 1).

Tabela 1 - Proteínas putativas codificadas pelos genes diferencialmente expressos selecionados como genes-candidatos de resistência de trigo a *Magnaporthe oryzae* para o estudo de mutantes TILLING.

Proteínas putativas codificadas pelos genes-candidatos	Transcritos diferencialmente expressos	Sequências produzindo alinhamento significativo	Linhagens mutantes
<i>Disease Resistance Protein</i>	TR34288_c0_g2	IWGSC_CSS_5DL_scaff_4567935	Cadenza0727
<i>Tricetin 3'4'5'-O-Trimethyltransferase</i>	TR65444_c2_g4	IWGSC_CSS_5DL_scaff_4519592	Cadenza1682
<i>Wheat-Induced Resistance 1B</i>	TR42373_c0_g2	IWGSC_CSS_5BS_scaff_2240591	Cadenza1541 Kronos3291

O experimento com os mutantes foi realizado no John Innes Centre (Reino Unido), durante período do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) da CAPES (processo 88881.133721/2016-01). Para cada um dos genes-candidatos, foram realizadas análises *in silico* de duas populações TILLING através de *exon capture* no “*In silico* wheat TILLING resource” (<http://www.wheat-tilling.com/>). Este é um banco de populações TILLING de trigo hexaploide, cultivar Cadenza, e de trigo tetraploide, cultivar Kronos, de um projeto conjunto entre University of California - Davis, Rothamsted Research, The Earlham Institute e John Innes Centre. Foram pré-selecionados somente mutantes com mutação do tipo ganho de códon de parada (do inglês, “*stop-gained*”) e homozigoto para o alelo mutante.

Para o gene *Wir1b*, foram selecionados para as análises de fenotipagem dois mutantes de Kronos (Tabela 2). Para o gene *Tricetin 3'4'5'-O-Trimethyltransferase*, não foram encontrados mutantes nos padrões previamente determinados. Porém, utilizando *scaffold* semelhante ao da *Tricetin 3'4'5'-O-Trimethyltransferase*, codificando para Caffeic Acid O-Methyltransferase (COMT), três mutantes de Cadenza foram selecionados (Tabela 2). Para o gene *RPM1* não foram encontrados mutantes nos padrões determinados. Ainda, de modo a dar continuidade a estudos já desenvolvidos no John Innes Centre, foram selecionados mutantes de Kronos com mutações para o gene codificando para uma Heat Shock Protein 60 (HSP60) (Tabela 2).

Tabela 2 - Mutantes TILLING selecionados para a caracterização da reação a *Magnaporthe oryzae*.

Proteínas putativas codificadas pelos genes-candidatos	Linhagens mutantes	Cromossomos
Caffeic Acid O-Methyltransferase	Cadenza0260	
	Cadenza1323	2AS
	Cadenza1752	2BS 2DS
Heat Shock Protein 60	Kronos2892	
	Kronos1367	4AL 5BL
Wheat-Induced Resistance 1B	Kronos2197	5B
	Kronos3291	5B

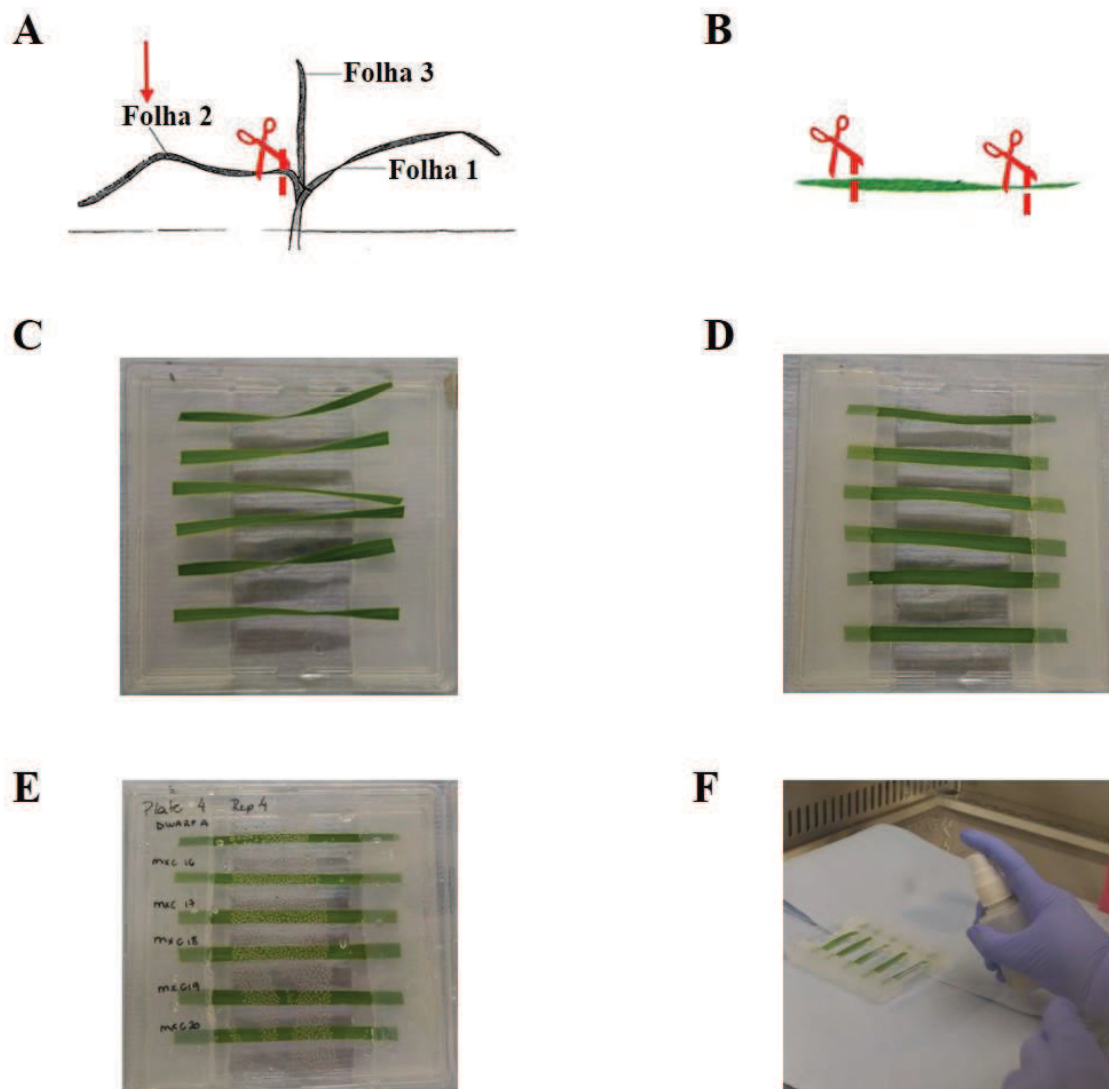
6.3.2 Inoculação dos mutantes TILLING

Os genótipos silvestres, Cadenza e Kronos, e os mutantes selecionados foram caracterizados quanto à reação a *M. oryzae*, em plantas jovens e em espigas. A cultivar Anahuac 75 foi incluída nas inoculações como controle suscetível. As sementes foram mantidas durante quatro dias em papel filtro umedecido com água contendo ácido giberélico (40 µL de GA3, Sigma G7645, a cada 50 mL de água) à temperatura de 4°C, no escuro. Em seguida, as sementes foram mantidas à temperatura ambiente por um dia para estimular a germinação. As sementes pré-germinadas foram semeadas em bandejas. As inoculações em plantas jovens foram realizadas em folhas destacadas, 15 dias após a semeadura, utilizando-se a segunda folha de cada planta. Após a retirada da folha para as inoculações, as plantas foram transferidas para potes de 1 L e mantidas em casa-de-vegetação, à temperatura ambiente, visando à obtenção de espigas, para a inoculação de plantas adultas.

Nas inoculações, foi utilizado o isolado Br32, concedido originalmente por Didier Tharreau (CIRAD, Montpellier, França), que pertence à coleção de isolados de *M. oryzae* do John Innes Centre. O isolamento foi realizado a partir de planta de trigo coletada no Brasil. Br32 foi cultivado em meio “*Complete Medium Agar 1,5%*” (Anexo 1) durante 14 dias, com temperatura de 24°C dia/noite e regime de 16h de luz branca fluorescente. Os conídios foram suspensos em água estéril e a concentração da suspensão foi ajustada para 3×10^5 conídios/mL.

A inoculação de plantas jovens foi realizada quando as plantas atingiram o estágio fenológico (EF) 12-13 da escala de Zadoks (ZADOKS; CHANG; KONZAK, 1974). A segunda folha foi retirada da planta (Figura 1A), as extremidades foram eliminadas (Figura 1B), a folha foi posicionada no centro de uma placa contendo meio ágar-água 1%, com a superfície adaxial voltada para cima (Figura 1C). As extremidades foram cobertas com meio ágar-água 1% (Figura 1D) e as placas foram identificadas (Figura 1E). Em seguida, as folhas foram aspergidas com a suspensão de esporos (Figura 1F). Cada folha foi considerada uma repetição, havendo cinco repetições por genótipo. Após a inoculação, as placas foram colocadas em uma bandeja, com papel toalha umedecido com água, cobertas com um saco plástico, para manter a umidade, e colocadas em câmara climatizada (24°C dia/noite com 16h de luz). As folhas inoculadas foram mantidas em câmara climatizada durante oito dias, sendo que nas primeiras 24 horas permaneceram no escuro. A partir do terceiro dia após a inoculação (DAI), as folhas foram fotografadas e a severidade foi avaliada.

Figura 1 - Inoculação de plantas jovens de trigo com o isolado Br32 de *Magnaporthe oryzae*. A) Corte da segunda folha, B) Retirada das extremidades, C) Posicionamento das folhas em placas com a superfície adaxial voltada para cima, D) Cobertura das extremidades das folhas com meio ágar-água 1%, E) Identificação das placas, e F) Inoculação com a suspensão de esporos.



Quando as plantas atingiram o EF 58 da escala de Zadoks (emergência completa da espiga) (ZADOKS; CHANG; KONZAK, 1974) foi realizado o experimento de planta adulta. O colmo de cada espiga foi cortado na base da planta e rapidamente transferido para um recipiente com água. A base foi cortada novamente e o colmo transferido para outro recipiente com água. O processo foi repetido mais duas vezes e, então, as espigas foram transferidas individualmente para tubos plásticos de 15 mL, contendo 10 mL de água e aspergidas com a suspensão de esporos. Cada espiga foi considerada uma

repetição, havendo cinco repetições por genótipo. Após a inoculação, as plantas foram submetidas a ambiente com 24 horas de escuro, sob temperatura de 24°C dia/noite e 24 horas de saturação de umidade, proporcionando condições ótimas de infecção para o fungo. Passadas as primeiras 24 HAI, as plantas foram mantidas, durante seis dias, à temperatura de 24°C dia/noite, regime de 16h de luz branca fluorescente e alta umidade. Aos sete DAI, as plantas foram transferidas para câmara de ambiente controlado nas mesmas condições de temperatura. A severidade de espiguetas brancas foi avaliada a partir do aparecimento dos sintomas até o total branqueamento ou a maturação das espigas.

6.3.3 Avaliação da doença e análise estatística

No experimento de planta jovem, foram realizadas estimativas visuais de severidade aos 3, 4, 5, 6, 7 e 8 DAI. Para o experimento de planta adulta, foi avaliada a severidade de espiguetas brancas aos 5, 7, 9, 12, 14 e 16 DAI. Posteriormente, foi estimada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) tanto para severidade da doença na folha quanto na espiga.

Os dados de AACPD foram transformados com o arco seno da raiz quadrada, para atender os pressupostos da normalidade dos resíduos, homocedasticidade e independência dos erros, e submetidos à análise de variância (ANOVA). Os genótipos foram avaliados em grupos, sendo esses: i) genótipos silvestres, Cadenza e Kronos, juntamente com Anahuac 75; ii) Cadenza silvestre, os mutantes, Cadenza0260, Cadenza1323 e Cadenza1752, para o gene *Comt*, e Anahuac 75; iii) Kronos silvestre, o mutante Kronos 2892 para o gene *Hsp60* e Anahuac 75; e iv) Kronos silvestre, os mutantes, Kronos2197 e Kronos3291, para o gene *Wir1b*, e Anahuac 75. Quando houve diferença significativa, as médias foram agrupadas de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Todas as análises foram desenvolvidas no programa R (R CORE TEAM, 2018), utilizando o pacote básico e o pacote “agricolae” (MENDIBURU, 2017).

6.3.4 Inoculações com o isolado de *Magnaporthe oryzae* Py0925

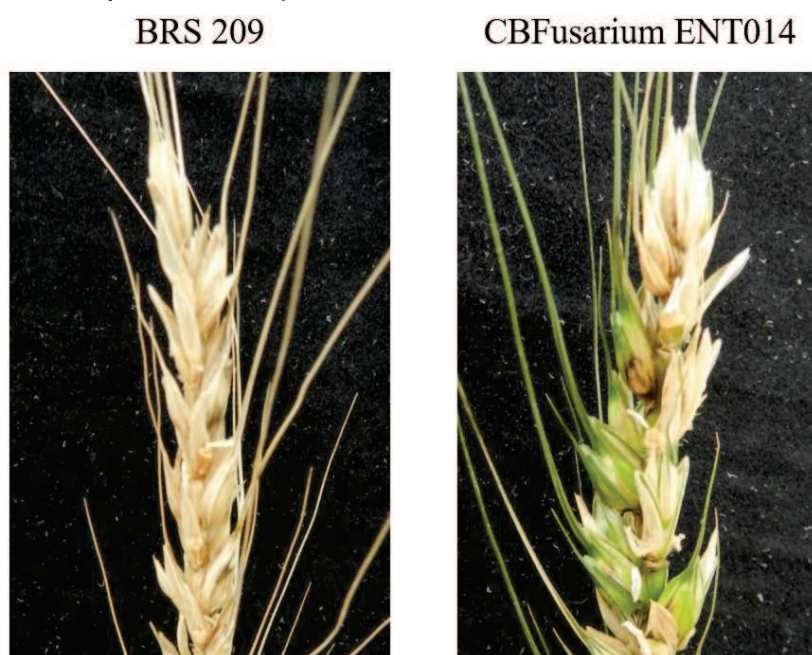
Em 2015, foi constatada a perda de patogenicidade do isolado Py6025, utilizado inicialmente nas inoculações e nas análises de expressão gênica. Dessa forma, foi conduzido um novo estudo de transcriptômica com a cultivar de trigo BRS 209, desenvolvida pela Embrapa Trigo, altamente suscetível à brusone, e CBFusarium ENT014, resistente à brusone. Os genótipos foram semeados e mantidos em casa de vegetação até o espigamento. Quando atingiram o EF 58 da escala de Zadoks (ZADOKS; CHANG; KONZAK, 1974), as plantas foram inoculadas.

As inoculações foram realizadas com o isolado Py0925, proveniente da coleção de isolados de *M. oryzae* do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Trigo, obtido a partir de espiga da cultivar Embrapa 22, coletada em 2009, na cidade de Perdizes-MG (SISGEN AC50A60). O isolado foi cultivado em meio de aveia (60 g aveia, 12 g ágar, 1 L de água) durante 10-14 dias, com temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ e regime de 12h de luz branca fluorescente. Os conídios foram suspensos em água de osmose reversa com Tween 80 (2 gotas para 1 L de água) e a concentração da suspensão foi ajustada para 2×10^5 conídios/mL. Cada espiga foi aspergida com a suspensão de esporos (condição inoculada) ou com solução de água de osmose reversa e Tween 80 (condição controle). Cada colmo foi considerado uma repetição, sendo que foram realizadas três repetições para cada tratamento. Quinze minutos após a inoculação, as plantas foram submetidas a ambiente com 15 horas de escuro, sob temperatura de 28°C e 24 horas de saturação de umidade, de modo a propiciar condições ótimas de infecção para o fungo. Passadas as primeiras 24 HAI, as plantas foram mantidas durante seis dias à temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 horas de luz e nebulização de água durante 2 minutos, a cada 30 minutos. No sétimo DAI, as plantas foram transferidas para casa-de-vegetação ainda sob condições de manutenção de alta temperatura ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$). As plantas foram inspecionadas diariamente, para identificação do aparecimento dos sintomas.

6.3.5 Extração de RNA

Amostras de tecido vegetal das espigas em condição controle e inoculada, dos dois genótipos de trigo, foram coletadas às 16, 20, 24, 40 e 44 HAI. Após coleta, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C . Quando confirmado o aparecimento dos sintomas da doença nas espigas (Figura 2) foi realizada a extração de RNA total do tecido vegetal.

Figura 2 - Sintomas de brusone em espiga dos genótipos BRS 209 e CBFusarium ENT014 aos 17 dias após a inoculação.



As amostras foram maceradas mecanicamente em uma plataforma Mini-BeadBeater® (Biospec Products®) durante 2 minutos. A extração de RNA total foi realizada utilizando TRIzol (Invitrogen®, 15596018), conforme instruções do fabricante, sendo que a cada 100 mg de material vegetal foi adicionado 1 mL de reagente. No final do procedimento, o RNA extraído foi dissolvido em 50 μL de água estéril livre de RNase. A concentração de RNA das amostras foi quantificada em NanoDrop® 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific®, ND-2000) a 260 nm. O perfil do RNA total extraído foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1,4% corado com brometo de etídeo, em tampão TAE (Tris-ácido acético-EDTA; Tris base 40 mM, ácido acético 20

mM, EDTA sal dissódico 1 mM) pH 8,3. As amostras de RNA total foram tratadas em coluna RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, 74903), para eliminação de DNA remanescente. Após serem novamente quantificadas em NanoDrop® 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific®, ND-2000) a 260 nm, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C.

6.3.6 Validação de genes-candidatos por RT-qPCR

Foram realizados experimentos de RT-qPCR utilizando as amostras de RNA do genótipo resistente CBFusarium ENT014, coletadas na inoculação com o isolado Py0925, para validação da expressão diferencial dos genes-candidatos selecionados a partir de um estudo de transcriptômica realizado anteriormente (Torres et al., 2018). Após a extração de RNA e o tratamento com DNase, o cDNA das amostras foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA, utilizando-se o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen®, 18080400). Diferentes diluições do cDNA sintetizado foram inicialmente testadas para definição da concentração a ser usada nas análises de RT-qPCR. A caracterização do perfil de expressão, considerando-se amostras de espigas controle e inoculadas do genótipo CBFusarium ENT014 coletadas às 40 HAI, com três repetições cada, foi realizada com iniciadores desenhados com o programa Primer 3 Plus, para genes codificadores de RPM1, Tricetin 3'4'5'-O-Trimethyltransferase, WIR1B, identificados como diferencialmente expressos (Tabela 3).

A RT-qPCR foi realizada em placas de 96 poços MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems®, N8010560), utilizando-se o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®, 4309155). As reações foram compostas por 1,6 µL de cDNA previamente diluído em água ultrapura na proporção 1:100, 10 µL de SYBR® Green Master Mix 2X, 7,76 µL de água ultrapura e 0,64 µL de iniciadores diluídos juntos a 10 ng/µL, num volume final de 20 µL. Na etapa inicial de normalização da amplificação das amostras, foi otimizada a amplificação dos genes de referência *EF1α* e *Actina* (Tabela 3).

Tabela 3 - Sequência dos iniciadores de genes-candidatos de resistência de trigo a *Magnaporthe oryzae* selecionados para validação de expressão diferencial em análises de RT-qPCR.

Gene-candidato	Transcritos diferencialmente expressos	Iniciador <i>Forward</i>	Iniciador <i>Reverse</i>	Finalidade
<i>Disease Resistance Protein</i>	TR34288_c0_g2	ATGTGGCAACATTGCTGTTT	CGGAGCTCATTAAGGAAAGG	Gene-candidato
<i>Tricetin 3'4'5'-O-Trimethyltransferase</i>	TR65444_c2_g4	CCACGACAAGGTCACTATGG	TTGTACTCGTACGCCGTCAT	Gene-candidato
<i>Wheat-Induced Resistance 1b</i>	TR42373_c0_g2	TCGTGCATATCGCTCTCTTC	GACGTTAGGGTCGAGAGCAC	Gene-candidato
<i>EF1α</i>		TGGTGTCATCAAGCCTGGTATGGT	ACTCATGGTGCATCTCAACGGACT	Gene de referência
<i>Actina</i>		ACCTTCAGTTGCCAGCAAT	CAGAGTCGAGCACAATAACCAGTTG	Gene de referência

As condições de amplificação foram: ciclo inicial de desnaturação de 5 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por 10 segundos e 72°C por 15 segundos, e aquisição dos dados a 60°C por 35 segundos. Foram realizadas triplicatas técnicas para cada uma das amostras avaliadas. A curva de dissociação (*Melt Curve*) foi obtida de 55 a 99°C para confirmação da qualidade de amplificação do produto de PCR (amplificação de um único fragmento). As reações foram realizadas em aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems®).

A eficiência de amplificação de cada par de iniciadores em qPCR foi estimada com o programa LinReg (RAMAKERS et al., 2003). Todas as análises dos dados de expressão foram realizadas após quantificação comparativa dos produtos amplificados pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para comparar a diferença de expressão entre as amostras de cada tratamento foi utilizado o teste t-Student ($p \leq 0,05$).

6.3.7 Sequenciamento dos transcriptomas de BRS 209 e CBFusarium ENT014 em resposta ao isolado de *Magnaporthe oryzae* Py0925

Foi realizado o sequenciamento de transcriptomas de espigas dos genótipos BRS 209 e CBFusarium ENT014, 40 horas após inoculadas com o isolado Py0925 ou não inoculadas. Foram utilizadas três replicatas biológicas. As amostras de RNA foram coletadas de espigas, preservadas em RNastable® (Biomatrix, 93221-001) e enviadas para a empresa Fasteris (Fasteris SA, Plan-Les-Ouates, Suíça) para o sequenciamento dos transcriptomas na plataforma Illumina (HiSeq 2500). O sequenciamento foi realizado em 2 x 125 ciclos, ou seja, as duas pontas dos fragmentos foram sequenciadas em pares de 125 pb. *O base-calling* foi realizado com o uso do pipeline CASAVA versão 1.8.2. A verificação de qualidade dos dados brutos foi feita com o uso da ferramenta FastQC v0.11.5 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

As sequências obtidas foram processadas para remoção de adaptadores e trimagem por qualidade usando o programa Trimmomatic versão 0.36 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). Nesta operação, foram removidas subsequências contendo adaptadores

e outras sequências específicas de sequenciamento Illumina. Foram removidas as 13 bases iniciais, as extremidades com valores de qualidade inferiores a 5, ou a partir de janelas de 4 nucleotídeos com média de qualidade inferior a 5 e, ao final, mantidas apenas sequências com comprimento mínimo de 25 pares de bases.

A montagem do transcriptoma molde foi realizada com o programa Trinity versão 2.5.1 (GRABHERR et al., 2011), utilizando as sequências de todas as doze bibliotecas, após o mapeamento no genoma de referência (Taestivum 296 v2), utilizando o programa STAR versão 2.5.3a (DOBIN et al., 2013). Na montagem, foram mantidos apenas *contigs* com comprimento mínimo de 200 bases. Para avaliar a qualidade do transcriptoma montado, foi examinado o número de transcritos que parecem ser de comprimento pleno (*full-length*) ou próximo disso. Os transcritos da montagem foram alinhados com o transcriptoma de referência (Taestivum 296 v2).

A contagem dos níveis de expressão nas doze amostras foi realizada com base nas sequências de cada biblioteca que mantiveram o par completo após a trimagem. Os dados de contagem, feita com o programa RSEM versão 1.2.31, foram transformados para FPKM (fragmentos de RNA-seq por kilobase do comprimento efetivo do transcrito por milhão de fragmentos) para normalização dentro da biblioteca e TMM (“Trimmed Mean of M-values”), para normalização entre as diferentes bibliotecas. Os valores de RPKMs TMM-normalizados foram usados para análise de expressão diferencial utilizando o pacote edgeR (MCCARTHY; CHEN; SMYTH, 2012) para cada par de amostras. Genes com $FDR \leq 1e^{-3}$ nas comparações entre amostras foram considerados diferencialmente expressos. A anotação das sequências dos genes e as análises de enriquecimento funcional foram realizadas integrando-se as informações de diferentes bases de dados como: UniProt, NCBI, GO, KEGG, EggNOG e Pfam.

6.4 Resultados e Discussão

Considerando o estudo dos mutantes, foi caracterizada, primeiramente, a reação dos genótipos silvestres, Cadenza e Kronos, a *M. oryzae*, juntamente com Anahuac 75, para verificar o nível de resistência/suscetibilidade dos genótipos. Entre os genótipos

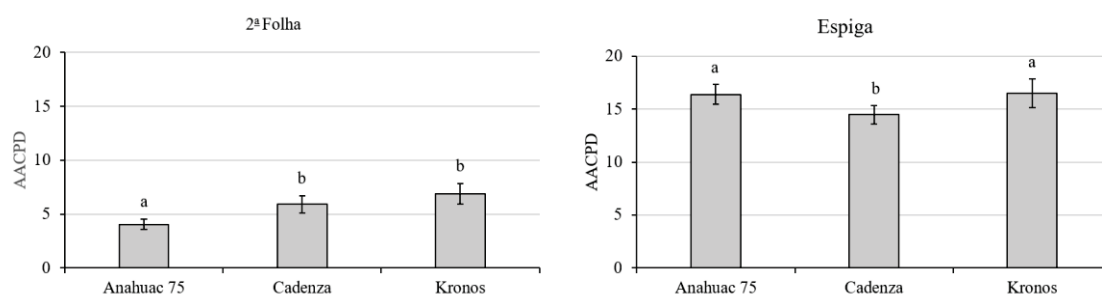
mutantes, Kronos1367 (para *Hsp60*) não germinou, impossibilitando a realização das avaliações fenotípicas. Houve diferença significativa na reação dos genótipos silvestres, tanto em folha de planta jovem como em espiga (Tabela 4). Em planta jovem, Cadenza e Kronos não diferiram entre si, enquanto que Anahuac 75 apresentou menor suscetibilidade (Figura 3). Em planta adulta, Kronos e Anahuac 75 não apresentaram diferença significativa, mas diferiram significativamente de Cadenza, que apresenta menor suscetibilidade à brusone (Figura 3).

Tabela 4 - Análise de variância dos dados de área abaixo da curva de progresso da doença, em folha e em espiga, para cada um dos conjuntos de genótipos de trigo avaliados.

Fonte de variação	Génótipos analisados	GL	Folha	Espiga
Silvestre	Anahuac 75, Cadenza, Kronos	2	18,16 ***	5,55 *
<i>COMT</i>	Anahuac 75, Cadenza, Cadenza0260, Cadenza1323, Cadenza1752	4	32,65 ***	12,41 ***
<i>Hsp60</i>	Anahuac 75, Kronos, Kronos2892	2	13,95 ***	0,13 ns
<i>Wir1b</i>	Anahuac 75, Kronos, Kronos2197, Kronos3291	3	21,32 ***	0,96 ns

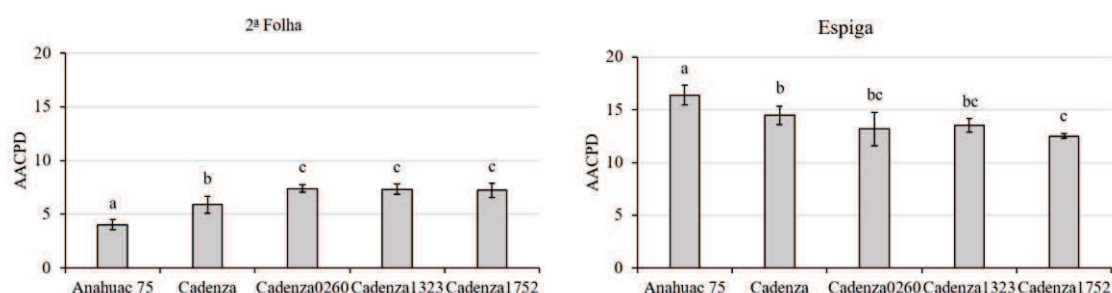
GL = graus de liberdade, ns = não significativo, *** = $p \leq 0,001$, * = $p \leq 0,05$.

Figura 3 - Área abaixo da curva de progresso da severidade de brusone na segunda folha e na espiga da cultivar Anahuac 75 e dos genótipos silvestres, Cadenza e Kronos. Diferenças estatísticas entre os genótipos, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), são representadas por letras minúsculas diferentes.



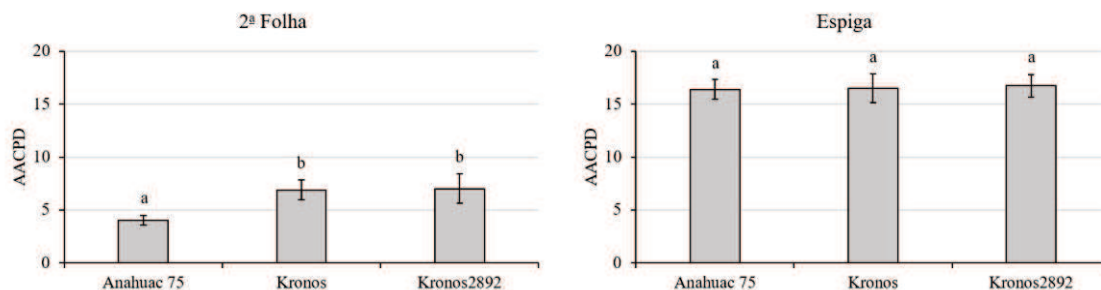
Analisando os resultados obtidos para os mutantes do gene *COMT* em Cadenza, notou-se que houve diferença significativa dos genótipos, considerando os dois estádios avaliados (Tabela 4). Em planta jovem, tanto o genótipo silvestre quanto os mutantes *COMT* diferiram significativamente de Anahuac 75 (Figura 4). Os mutantes não diferiram entre si, mas apresentaram diferença significativa quando comparados com Cadenza silvestre, apresentando maior suscetibilidade em folhas (Figura 4). Em espigas, ao contrário da avaliação em folhas, Anahuac 75 foi mais suscetível do que o Cadenza silvestre e do que os mutantes para o gene *COMT*. Os mutantes para o gene *COMT* não apresentaram diferença significativa quando comparados com o genótipo silvestre. Cadenza silvestre apresentou-se mais suscetível do que os mutantes, ao contrário do que ocorre em planta jovem.

Figura 4 - Área abaixo da curva de progresso da severidade de brusone na segunda folha e na espiga da cultivar Anahuac 75 e dos genótipos Cadenza silvestre e respectivos mutantes, Cadenza0260, Cadenza1323 e Cadenza1752, para o gene *COMT*. Diferenças estatísticas entre os genótipos, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), são representadas por letras minúsculas diferentes.



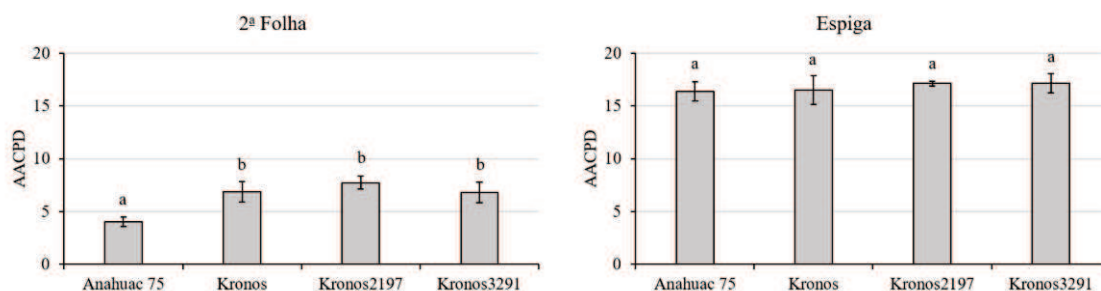
Dos mutantes selecionados para o gene *Hsp60*, somente Kronos2892 pôde ser avaliado fenotipicamente quanto à reação a *Magnaporthe oryzae*. A diferença significativa observada em planta jovem entre os genótipos considerados para *HSP60* (Tabela 4) é devido à menor suscetibilidade de Anahuac 75 em relação ao genitor Kronos silvestre e ao mutante Kronos2892 (Figura 5). Em planta jovem, Kronos2892 foi mais suscetível do que Anahuac 75, porém não diferiu de Kronos silvestre (Figura 5). Em espigas, não foram observadas diferenças significativas entre a AACPD dos genótipos avaliados (Figura 5).

Figura 5 - Área abaixo da curva de progresso da severidade de brusone na segunda folha e na espiga da cultivar Anahuac 75 e dos genótipos Kronos silvestre e mutante Kronos2892 para o gene *Hsp60*. Diferenças estatísticas entre os genótipos, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), são representadas por letras minúsculas diferentes.



Considerando o gene *Wir1b*, houve diferença significativa entre Kronos e Anahuac 75, somente em planta jovem (Figura 6). Em folhas, os mutantes para o gene *Wir1b*, Kronos2197 e Kronos3291, diferiram significativamente de Anahuac 75 que se mostrou menos suscetível. Porém, os mutantes de Kronos considerados não apresentaram diferenças quando comparados com o genótipo Kronos silvestre. Em espigas de plantas adultas, não houve diferença significativa nem entre os genótipos Kronos, silvestre e mutantes para o gene *Wir1b*, nem entre Kronos e Anahuac 75.

Figura 6 - Área abaixo da curva de progresso da severidade de brusone na segunda folha e na espiga da cultivar Anahuac 75 e dos genótipos Kronos silvestre e respectivos mutantes, Kronos2197 e Kronos3291, para o gene *Wir1b*. Diferenças estatísticas entre os genótipos, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), são representadas por letras minúsculas diferentes.



A alta semelhança de Cadenza e Kronos com relação a Anahuac 75, tanto na segunda folha quanto em espiga, indica o quanto os genótipos silvestres são suscetíveis a

M. oryzae. Esperava-se observar nos mutantes alteração significativa na reação à brusone, uma vez que eles foram selecionados a partir de GC de resistência a *M. oryzae*. Essa alteração no fenótipo somente foi observada nos mutantes para o gene *COMT*, os quais devem continuar sendo estudados.

O trigo é um hexaploide composto pelos genomas A, B e D com a maioria dos genes presentes em três cópias homólogas (aproximadamente 93-96% de identidade) com função similar (SLADE et al., 2005; GUPTA et al., 2008). Um dos pontos importantes para o *screening* dos mutantes de trigo é que devem ser identificadas mutações específicas para cada um dos genes homólogos do genoma, para o estudo efetivo de cada gene e da sua contribuição para o fenótipo (BOTTICELLA et al., 2011).

Para o gene *COMT*, foram identificados três mutantes, com mutações nos cromossomos 2A, 2B e 2D, sendo os mais adequados para o estudo. O ácido cafeico é um composto orgânico encontrado nas plantas e um potente antioxidante (GÜLÇİN, 2006). Em planta jovem, os três mutantes foram mais suscetíveis do que Cadenza, enquanto que em planta adulta ocorre o oposto. Devido às diferenças observadas nas reações dos mutantes, é importante que, futuramente, seja realizado o cruzamento entre as linhagens mutantes, originando-se mutantes duplos (com mutações nos 2A e 2B, 2A e 2D, e 2B e 2D) e o mutante triplo (com mutações no 2A, 2B e 2D) para avaliar o efeito de cada um dos genes no fenótipo. A população de mutantes de Cadenza já foi utilizada para estudar a resistência de trigo a oídio (agente causal *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) (ACEVEDO-GARCIA et al., 2017). Em cevada, alelos do gene *Mlo* que apresentam perda de função (*mlo*) são responsáveis pela resistência durável a oídio. Em trigo, existem três genes ortólogos aos genes de resistência de cevada, *TaMlo-1A*, *-1B* e *-1D* (KONISHI; SASAKUMA; SASANUMA, 2010), que têm mostrado relação com a resistência a esse patógeno (ELLIOTT et al., 2002; VÁRALLYAY; GICZEY; BURGYÁN, 2012). Genótipos com os alelos *TaMlo-1A*, *-1B* e *-1D*, ou com dois desses, silenciados apresentaram aumento dos níveis de resistência (ACEVEDO-GARCIA et al., 2017).

Kronos1367, mutante selecionado para o estudo do gene *HSP60*, não germinou. O problema de germinação pode ter ocorrido devido ao processo de mutação com a presença

de mutações residuais. O mutante Kronos2892 e o respectivo genótipo silvestre apresentaram o mesmo padrão de suscetibilidade, tanto em planta jovem quanto em planta adulta. HSP60 é uma classe de proteínas responsivas a choques térmicos, sendo também denominada de chaperonas. Em folhas de tomate inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*, observou-se aumento da HSP60 no início da infecção, um dia após a inoculação, seguido por um rápido declínio da quantidade de proteína (GOROVITS et al., 2007). Por outro lado, em resposta ao tratamento com mosca branca, transmissora do Vírus do Frisado Amarelo do Tomateiro (TYLCV - *Tomato yellow leaf curl virus*), a abundância de HSP60 diminuiu, tanto em plantas resistentes quanto em suscetíveis, quando tratadas com insetos sem e com o vírus (GOROVITS et al., 2007).

Os mutantes para o gene *Wir1b* não apresentaram diferença significativa entre si, nem mesmo quando comparados com o genótipo silvestre, mas observou-se um aumento de suscetibilidade, mesmo que não significativo, no mutante Kronos 2197. Neste estudo, esperava-se encontrar variação significativa da resposta dos mutantes para esse gene que integra uma família gênica relacionada com a resistência basal a patógenos em cereais (TUFAN et al., 2012). Essa família gênica foi identificada pela primeira vez em trigo (cultivar Fidel) inoculado com um isolado de *B. graminis* f. sp. *hordei* (SCHWEIZER; HUNZIKER; MÖSINGER, 1989). *Wir1* é composta por três genes: *TaWir1a*, *TaWir1b* e *TaWir1c* (BULL et al., 1992; FRANCK; DUDLER, 1995) e homólogos de *TaWIR1* foram encontrados em arroz (MAUCH et al., 1998) e em cevada (GAUPELS et al., 2008; DOUCHKOV et al., 2011).

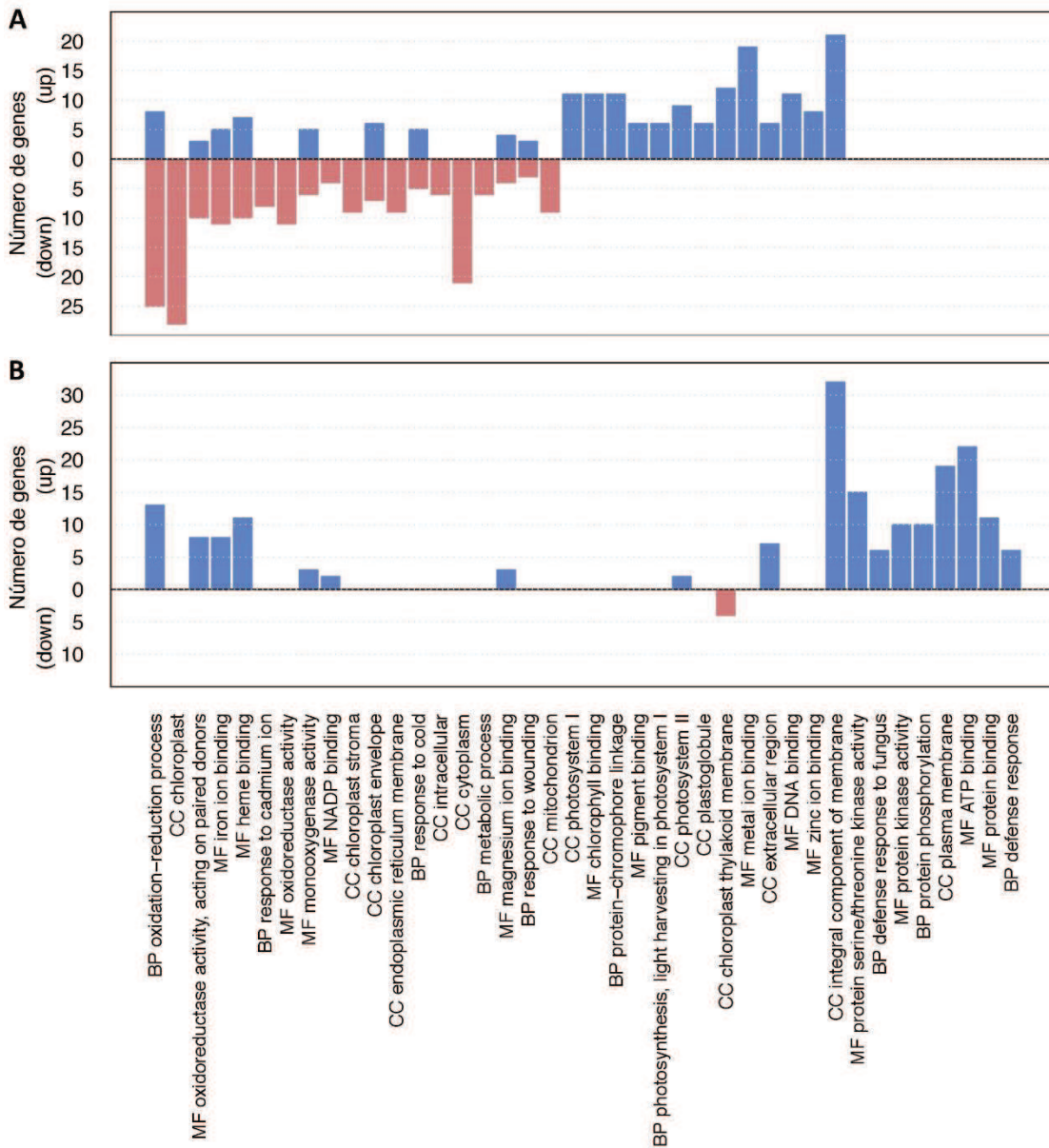
TaWir1 codifica uma proteína integral de membrana, com um domínio N-terminal polar apontando para o citoplasma e um domínio C-terminal extracitoplasmático rico em glicina e prolina (BULL et al., 1992). Em trigo, há acúmulo de transcritos de *Wir1* em resposta a patógenos biotróficos, *B. graminis* f. sp. *hordei* (SCHWEIZER; HUNZIKER; MÖSINGER, 1989), *Puccinia triticina* (BOLTON et al., 2008) e *P. striiformis* f. sp. *tritici* (CORAM; WANG; CHEN, 2008; BOZKURT et al., 2010), e patógenos hemibiotróficos, *F. pseudograminearum* (DESMOND et al., 2008), *M. oryzae* (TUFAN et al., 2009) e *F. graminearum* (DIETHELM et al., 2012). Na interação *M. oryzae*-trigo, o silenciamento dos transcritos de *TaWIR1* não teve efeito na resistência à penetração inicial do fungo nas

células da epiderme de folhas de plantas jovens de trigo (TUFAN et al., 2012). No entanto, depois do estabelecimento da infecção, o desenvolvimento intracelular do fungo foi facilitado. Sugere-se que as proteínas TaWIR1 poderiam estar relacionadas com o aumento da adesão da membrana plasmática à parede celular durante o ataque do patógeno (BULL et al., 1992). Para o gene *Wir1b*, selecionado como gene-candidato de resistência, não foram encontrados mutantes para os três genomas do trigo.

Devido à perda da virulência do isolado Py6025, que impossibilitou a continuidade dos experimentos de avaliação da reação de trigo, optou-se pelo uso do isolado de *M. oryzae* Py0925 para as análises subsequentes. Para validar a expressão diferencial observada em genes às 40 HAI graças ao sequenciamento de transcriptomas com a plataforma Illumina (TORRES et al., 2018) foram realizados experimentos de RT-qPCR. Os iniciadores desenhados para os genes codificadores de RPM1, Tricetin 3'4'5'-O-trimethyltransferase e WIR1B não amplificaram fragmentos. Novos iniciadores deverão ser desenhados para se determinar a modulação de expressão desses genes em amostras de trigo inoculadas com o isolado Py0925 às 40 HAI e, em seguida, caracterizar o perfil de expressão desses genes ao longo do tempo (às 16, 20, 24, 40 e 44 HAI) nos genótipos BRS 209 e CBFusarium ENT014. As amostras vegetais obtidas em diferentes intervalos de tempo após a inoculação já foram coletadas e o RNA total, extraído.

Paralelamente, foi realizado o sequenciamento dos transcriptomas da cultivar BRS 209 e do genótipo CBFusarium ENT014, a partir de amostras de espigas coletadas às 40 HAI com suspensão do isolado de *M. oryzae* Py0925, objetivando identificar genes potencialmente envolvidos nos mecanismos de imunidade inata do genótipo resistente ao patógeno (CBFusarium ENT014). Foram identificados 388 GDE na cultivar BRS 209 (suscetível) e 249 GDE no genótipo CBFusarium ENT014 (resistente) (Figura 7), sendo que 198 e 95, respectivamente, deles obtiveram anotação.

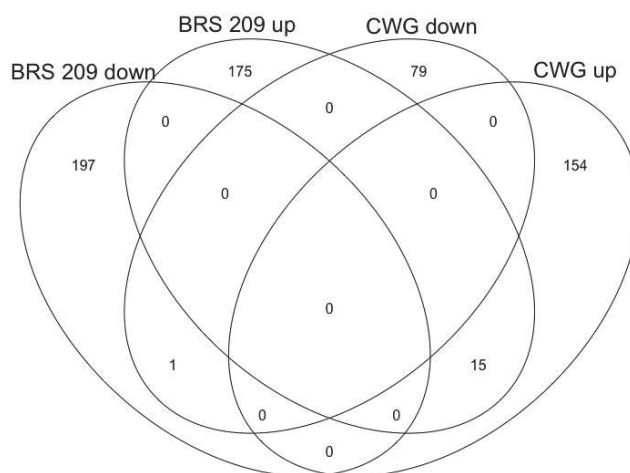
Figura 7 - Genes diferencialmente expressos em espigas de trigo controle e inoculadas com o isolado de *Magnaporthe oryzae* Py0925, da cultivar BRS 209 e do genótipo CBFusarium ENT014.



Ao todo, foram identificados 637 GDE, sendo 16 deles modulando a expressão nos dois genótipos (BRS 209 e CBFusarium ENT014) (Figura 8). Considerando os 605 GDE que modularam em apenas um dos dois genótipos, a cultivar suscetível, às 40 HAI, apresentou maior número de GDE (372) do que o genótipo resistente, com 233 GDE (Figura 8). Na interação *M. oryzae*-arroz, considerando os transcriptomas de ambos os

organismos, alterações de expressão gênica foram maiores em interações incompatíveis (com reação de resistência por parte da planta hospedeira) do que em interações compatíveis (KAWAHARA et al., 2012). Esses autores também examinaram as mudanças na expressão gênica empregando a estratégia de RNAseq porém às 24 HAI.

Figura 8 - Diagrama de Venn dos genes diferenciamente expressos em espigas de trigo, controle e inoculadas com o isolado de *Magnaporthe oryzae* Py0925, da cultivar BRS 209 e do genótipo CBFusarium ENT014, às 40 horas após a inoculação.



Como critério para a identificação de DEG, adotou-se uma linha de corte em FDR $\leq 1e-3$, sem filtro por fold change. Assim, 354 categorias GO foram contempladas, sendo a maioria delas com um ou dois genes. As funções moleculares mais representativas em termos GO foram ligação heme (*heme binding*), ligação por íon ferro (*iron ion binding*) e atividade oxidorreductase, atuando em doadores pareados, com incorporação ou redução de oxigênio molecular (*oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen*) para ambos os genótipos. No entanto, eles exibem uma modulação de expressão inversa. Na cultivar BRS 209, a maioria dos genes nesses termos GO tiveram a expressão reduzida, enquanto que no genótipo CBFusarium ENT014 houve indução de genes anotados nessas categorias funcionais em resposta à inoculação com *M. oryzae*.

Tanto as funções ligação heme quanto ligação por íon ferro são relacionadas com o íon ferro (Fe). A ligação heme é uma função molecular relacionada com a interação

heme seletiva e não-covalente (ASHBURNER et al., 2000; CARBON et al., 2009; THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2017). A ligação por íon ferro é a função relacionada com a interação seletiva e não-covalente com íons ferro (ASHBURNER et al., 2000; CARBON et al., 2009; THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2017). O ferro é um importante elemento para a maioria dos seres vivos e está envolvido em processos celulares como a transferência de elétrons na cadeia respiratória, fotossíntese e detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Por outro lado, o excesso de ferro pode causar problemas para o organismo devido ao potencial em reagir com oxigênio, produzindo formas danosas de ERO. Por esse motivo, a aquisição, a utilização e o armazenamento de ferro são altamente regulados a nível de célula e tecido, já que ele pode ser tanto benéfico quanto maléfico para o organismo (AZNAR et al., 2015). Patógenos e seus hospedeiros competem pela aquisição de ferro, e os mecanismos que regulam sua absorção, seu transporte e seu armazenamento têm importante papel na corrida armamentista entre plantas e seus patógenos (VERBON et al., 2017).

Vários estudos de análise de transcriptomas mencionam a regulação de genes relacionados com ferro quando a planta é submetida a estresse biótico, evidenciando seu papel importante na interação planta-patógeno. Em bibliotecas de sequências expressas (*expressed sequence tag* - EST), desenvolvidas com trigo inoculado com *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, foi observada alta porcentagem de transcritos relacionados com ferro (LIU et al., 2005). A homeostase de ferro é fortemente ligada com a interação planta-patógeno, e o ferro é um fator associado com a explosão oxidativa e a regulação de defesas em cereais. Nas folhas de trigo, em resposta a oídio, o Fe^{3+} é transportado para a parede celular, através de corpos semelhantes a vesículas guiadas pela polimerização de actina, onde é depositado e acumulado na forma redox ativa (LIU et al., 2007). No mesmo estudo, sugere-se que o ferro regula a expressão de genes, tanto pelo próprio ferro ou por estresse oxidativo mediado por ferro.

A ferritina é uma proteína de ligação a íons de ferro que atua na reserva de ferro em diversos organismos como animais, plantas e bactérias (ZHAO, 2010). Plantas de tabaco transgênicas expressando ectopicamente a proteína de ligação ferro, promovem o acúmulo de ferritina em suas folhas, exibindo tolerância à necrose causada pelo vírus da

necrose do fumo e pelas infecções dos fungos *Alternaria alternata* e *Botrytis cinerea* (DEÁK et al., 1999). O ácido oxálico (AO), principal fator de virulência de *Sclerotinia sclerotiorum* (agente causal do mofo branco), é degradado por oxidase do oxalato. Folhas de soja transgênica carregando um gene de oxidase do oxalato exibiram alteração na expressão de genes quando inoculadas com AO, sendo que a ferritina foi a que apresentou a maior indução (CALLA et al., 2014). Esses estudos sugerem que a ferritina auxilia na defesa contra patógenos, principalmente devido à sua função antioxidante (BRIAT et al., 2010).

Heme é uma porfirina que contém ferro na sua região central (VAVILIN; VERMAAS, 2002). Plantas de arroz, espécie não-hospedeira de *Puccinia triticina* f. sp. *tritici*, apresentam a proteína ligação heme SOUL com expressão reduzida quando inoculada com esse patógeno (LI et al., 2012). Considerando a defesa da planta, a regulação dessa proteína é relacionada com a proteção contra a morte celular e o rompimento da membrana, e poderia explicar a ausência de necrose ou resposta de hipersensibilidade após a inoculação. Arroz tratado com probenazole, um indutor químico de resistência a doenças, promoveu a indução de *OsHAP2E*, um fator de transcrição ativador da proteína heme (SHIMONO et al., 2003). Linhagens de arroz superexpressando *OsHAP2E* apresentaram índices de doença significativamente menores do que o genótipo silvestre (ALAM et al., 2015).

A atividade oxidorreductase, atuando em doadores pareados, com incorporação ou redução de oxigênio molecular é definida pela catálise de um reação de oxido-redução (redox) na qual o hidrogênio ou elétrons são transferidos para cada doador, e o oxigênio molecular é reduzido ou incorporado ao doador (ASHBURNER et al., 2000; CARBON et al., 2009; THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2017). As oxidorreductases podem ser oxidases, desidrogenases, peroxidases, oxigenases e reductases. Análises de transcriptomas de folhas de um acesso resistente de *Triticum monoccocum* var. *monoccocum* e um acesso suscetível de *Triticum boeoticum* ssp. *thaouadar* var. *reuteri* inoculados com *P. triticina* f. sp. *tritici* mostraram que a atividade oxidorreductase é a quarta função molecular mais representativa expressa em ambos os materiais (SERFLING et al., 2016). Oxalato oxidase e peroxidases foram identificadas como genes-

candidatos de resistência a doenças como mancha amarela (*Pyrenophora tritici-repentis*) e ferrugem do colmo (*Puccinia graminis* f. sp *tritici*), indicando que são raça não-específicas e estão envolvidas tanto na produção e modulação de EROs quanto na explosão oxidativa (FARIS et al., 1999).

Entre os 233 GDE exclusivos de CBFusarium ENT014, 24 são relacionados à defesa, sendo que 23 foram induzidos em espigas submetidas à inoculação (Tabela 5). E, apenas um cDNA codificando para uma LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase putativa (TRINITY_GG_24416_c5_g1) apresentou expressão reduzida em condições de inoculação com *M. oryzae* (Tabela 5).

Tabela 5 - Genes diferencialmente expressos relacionados à defesa em espigas de trigo do genótipo CBFusarium ENT014 inoculado com o isolado de *Magnaporthe oryzae* Py0925.

(Continua)

Identificação do Gene	log2FC	FDR ^a	Anotação RecName ^b	Tradução livre para os RecName	Ontologia do Gene ^c	Pfam ^d
TRINITY_GG_122631_c0_g1	2.572076151	9.56E-04	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2	Proteína serina/treonina quinase com receptor like LRR FLS2	GO:0016021, GO:0005886, GO:0005524, GO:0004674	<i>LRR_8</i> (PF13855), <i>LRR_1</i> (PF00560), <i>LRR_6</i> (PF13516), <i>Pkinase</i> (PF00069), <i>Pkinase_Tyr</i> (PF07714)
TRINITY_GG_24416_c5_g1	-2.27331286	3.64E-07	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g51880	Provável proteína serina/treonina quinase com receptor like LRR At1g51880	GO:0016021, GO:0005524, GO:0004674	-
TRINITY_GG_9503_c2_g1	2.21110391	8.82E-04	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g67720	Provável proteína serina/treonina quinase com receptor like LRR At1g67720	GO:0016021, GO:0005886, GO:0005524, GO:0004674, GO:0042742, GO:0012501, GO:0006468, GO:0009751	<i>Pkinase</i> (PF00069), <i>Pkinase_Tyr</i> (PF07714), <i>Jacalin</i> (PF01419)
TRINITY_GG_101753_c0_g1	2.168975032	1.25E-06	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g47570	Provável proteína serina/treonina quinase com receptor like LRR At3g47570	GO:0016021, GO:0005886, GO:0005524, GO:0004674	<i>LRRNT_2</i> (PF08263), <i>LRR_8</i> (PF13855), <i>LRR_6</i> (PF13516), <i>LRR_1</i> (PF00560), <i>Pkinase_Tyr</i> (PF07714), <i>Pkinase</i> (PF00069)
TRINITY_GG_20131_c4_g1	8.869539194	1.65E-04	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g47570	Provável proteína serina/treonina quinase com receptor like LRR At3g47570	GO:0016021, GO:0005886, GO:0005524, GO:0004674	-
TRINITY_GG_106713_c19_g1	8.746158257	8.54E-04	Putative leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g24130	Putativa proteína serina/treonina quinase com receptor like LRR At2g24130	GO:0016021, GO:0005886, GO:0005524, GO:0004674	-

Tabela 5 - Genes diferencialmente expressos relacionados à defesa em espigas de trigo do genótipo CBFusarium ENT014 inoculado com o isolado de *Magnaporthe oryzae* Py0925.

(Continuação)

Identificação do Gene	log2FC	FDR ^a	Anotação RecName ^b	Tradução livre para os RecName	Ontologia do Gene ^c	Pfam ^d
TRINITY_GG_33658_c0_g1	2.173624848	8.89E-05	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g19130	At2g19130 proteína serina/treonina quinase com receptor like lecitina S tipo G	GO:0016021, GO:0005886, GO:0005524, GO:0005516, GO:0030246, GO:0004674, GO:0006468, GO:0048544	<i>B_lectin</i> (PF01453), <i>S_locus_glycop</i> (PF00954), <i>PAN_2</i> (PF08276), <i>Pkinase_Tyr</i> (PF07714), <i>Pkinase</i> (PF00069)
TRINITY_GG_36806_c10_g3	9.859940027	7.02E-12	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase SD1-1	SD1-1 proteína serina/treonina quinase com receptor like lecitina S tipo G	GO:0016021, GO:0005886, GO:0009506, GO:0005524, GO:0005516, GO:0030246, GO:0004674, GO:0031625, GO:0006468, GO:0048544	-
TRINITY_GG_28163_c15_g1	2.656635657	1.57E-04	LRR receptor kinase SERK2	Receptor quinase LRR SERK2	GO:0016021, GO:0005886, GO:0005524, GO:0042803, GO:0004672, GO:0004675, GO:0009742, GO:0007166, GO:0009729, GO:0006468	<i>LRRNT_2</i> (PF08263), <i>LRR_1</i> (PF00560), <i>LRR_8</i> (PF13855)
TRINITY_GG_70444_c0_g1	1.691064186	8.70E-04	Probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At1g35710	Provável proteína quinase com receptor like LRR At1g35710	GO:0016021, GO:0016020, GO:0005886, GO:0009506, GO:0090406, GO:0005524, GO:0004674	<i>LRR_8</i> (PF13855), <i>LRR_1</i> (PF00560)
TRINITY_GG_67155_c0_g1	2.416215721	7.68E-04	Wall-associated receptor kinase 3	Receptor quinase 3 associado à parede	GO:0016021, GO:0005524, GO:0005509, GO:0030247, GO:0004674, GO:0007166	<i>Pkinase</i> (PF00069), <i>Pkinase_Tyr</i> (PF07714)
TRINITY_GG_67133_c0_g1	8.933376849	1.49E-04	Wall-associated receptor kinase-like 1	Receptor like-quinase 1 associado à parede	GO:0016021, GO:0009505, GO:0005886, GO:0005524, GO:0030247, GO:0004674, GO:0007166	-

Tabela 5 - Genes diferencialmente expressos relacionados à defesa em espigas de trigo do genótipo CBFusarium ENT014 inoculado com o isolado de *Magnaporthe oryzae* Py0925.

(Continuação)						
Identificação do Gene	log2FC	FDR ^a	Anotação RecName ^b	Tradução livre para os RecName	Ontologia do Gene ^c	Pfam ^d
TRINITY_GG_127434_c2_g1	2.385593715	1.56E-04	MDIS1-interacting receptor like kinase 2	Receptor like-quinase 2 interagindo com MDIS1	GO:0016021, GO:0016020, GO:0005886, GO:0009506, GO:0090406, GO:0005524, GO:0004674	<i>LRR_1</i> (PF00560), <i>LRR_8</i> (PF13855)
TRINITY_GG_86562_c0_g1	1.453396001	6.26E-04	Protein SUPPRESSOR OF NPR1-1 CONSTITUTIVE 4	Proteína supressora de NPR1-1 constitutivo 4	GO:0016021, GO:0005886, GO:0005524, GO:0008889, GO:0004674, GO:0006968, GO:0006952, GO:0006071, GO:0045087, GO:0006629	<i>Pkinase</i> (PF00069), <i>Pkinase_Tyr</i> (PF07714)
TRINITY_GG_36806_c9_g1	2.824143028	6.11E-05	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 6	Proteína quinase com receptor rico em cisteína	GO:0016021, GO:0005886, GO:0005524, GO:0004674, GO:0042742, GO:0006468	<i>Stress-antifung</i> (PF01657)
TRINITY_GG_122913_c0_g1	1.880865297	6.42E-04	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GII	GII endo glucano- 1,3-beta-glucosidase	GO:0042973, GO:0006076, GO:0050832	<i>Glyco_hydro_17</i> (PF00332)
TRINITY_GG_104629_c0_g1	2.749445904	1.82E-06	Chitinase 5	Quitinase 5	GO:0008061, GO:0004568, GO:0016998, GO:0006032, GO:0006952, GO:0000272	<i>Chitin_bind_1</i> (PF00187), <i>Glyco_hydro_19</i> (PF00182)
TRINITY_GG_20175_c21_g1	1.760198418	1.51E-04	Basic endochitinase A	Endoquitinase básica A	GO:0005576, GO:0008061, GO:0004568, GO:0016998, GO:0006032, GO:0050832, GO:0031640, GO:0000272	<i>Chitin_bind_1</i> (PF00187), <i>Glyco_hydro_19</i> (PF00182)
TRINITY_GG_160722_c0_g1	3.142223315	3.81E-10	Pathogenesis-related protein 1C	Proteína relacionada à patogênese 1C	GO:0006952, GO:0009607	<i>Thaumatins</i> (PF00314)

Tabela 5 - Genes diferencialmente expressos relacionados à defesa em espigas de trigo do genótipo CBFusarium ENT014 inoculado com o isolado Py0925 de *Magnaporthe oryzae*.

Identificação do Gene	log2FC	FDR ^a	Anotação RecName ^b	Tradução livre para os RecName	Ontologia do Gene ^c	Pfam ^d	(Conclusão)
TRINITY_GG_82899_c1_g1	3.438627358	4.97E-09	Thaumatococin-like protein PWIR2	Proteína taumatococina-like PWIR2	GO:0006952, GO:0009607	<i>Thaumatococin</i> (PF00314)	
TRINITY_GG_107002_c3_g2	3.499080002	1.21E-05	Peroxidase	Peroxidase	GO:0005576, GO:0020037, GO:0046872, GO:0004601, GO:0042744, GO:0006979	<i>Peroxidase</i> (PF00141)	
TRINITY_GG_97788_c1_g1	3.588679699	1.19E-20	Peroxidase	Peroxidase	GO:0005576, GO:0020037, GO:0046872, GO:0004601, GO:0042744, GO:0006979	<i>Peroxidase</i> (PF00141)	
TRINITY_GG_51766_c1_g1	2.643866224	1.87E-04	Protein WIR1A	Proteína WIR1A	GO:0016021	-	
TRINITY_GG_56385_c0_g1	3.280209878	7.32E-07	Protein WIR1A	Proteína WIR1A	GO:0016021	-	

^aFDR: *false discovery rate*

^bAnotação RecName: banco de dados em UniprotKB/Swiss-Prot, <https://www.uniprot.org>

^cOntologia do Gene: banco de dados em <http://geneontology.org/>

^dPfam: banco de dados em <https://pfam.xfam.org/>

Receptores quinase (RLK, *Receptor Like Kinases*) em plantas estão envolvidos em um diverso conjunto de respostas, incluindo desenvolvimento, crescimento, percepção de hormônio e resposta a patógenos (GOFF; RAMONELL, 2007). Os sensores de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP - *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) do hospedeiro são tipicamente receptores quinase (RONALD; BEUTLER, 2010). No presente estudo, foram identificados 15 RLKs como GDE apenas no genótipo resistente inoculado (Tabela 5). Receptores do tipo RLK compreendem uma grande família de receptores em plantas (TOR; LOTZE; HOLTON, 2009). Essas proteínas funcionam como uma unidade de processamento central, aceitando em paralelo sinais de entrada interna e externamente. RLKs convertem sinais de entrada em sinais de saída apropriados, levando a mudanças no metabolismo, na expressão de genes e no desenvolvimento (HARDIE, 1999). Devido às suas características estruturais únicas, RLKs são adequados para a sinalização célula-a-célula e são considerados um dos grupos mais importantes de receptores da superfície celular (GOU et al., 2010).

As proteínas RLKs podem ser divididas em subclasses de acordo com as especificidades do substrato entre os domínios quinase: tirosina quinase (o tipo predominante em animais), e serina/treonina quinase e histidina quinase, ambos encontrados em plantas (AFZAL; WOOD; LIGHTFOOT, 2008). Os domínios quinase dos diferentes RLKs tem mais de 45% de identidade em aminoácidos, enquanto seus domínios extracelulares têm pouca similaridade de sequência (HU; XIONG; YANG, 2005). Entre os 15 RLKs identificados no presente estudo, o domínio serina/treonina quinase está presente em todos eles. Serina/treonina quinases participam na catalisação da transferência do grupo gamma-fosforil do ATP para resíduos de serina/treonina nos substratos da proteína. Eles são conhecidos por modular as rotas envolvidas na resistência das plantas à infecção por patógenos (PTI) (YAN et al., 2012).

Neste trabalho, RLKs com diferentes motivos foram identificados: dois GDE codificando para G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase (TRINITY_GG_33658_c0_g1 e TRINITY_GG_36806_c10_g3), um GDE codificando para uma cysteine-rich RLK (CRK) (TRINITY_GG_36806_c9_g1) e um GDE

codificando para um RLK atípico (TRINITY_GG_86562_c0_g1 - Protein SUPPRESSOR OF NPR1-1 CONSTITUTIVE 4-SNC4) (Tabela 5). *Pi-d2*, um dos genes de arroz conferindo resistência a *M. oryzae*, é um tipo-G de lecitina receptor quinase (CHEN et al., 2006). CRKs apresentam uma ou mais repetições do “domínio de função desconhecida 26” (DUF26, *domain unknown function*) consistindo de um motivo C-X8-C-X2-C na parte extracelular da proteína. Membros dessa família são induzidos por ácido salicílico e patógenos, e alguns deles também estão envolvidos na regulação da morte celular em *Arabidopsis* (CHEN et al., 2004). *TaCRK1* é o primeiro gene CRK isolado de trigo e altos níveis de expressão foram observados em trigo submetido à inoculação com *Rhizoctonia cerealis*, e depois da aplicação de ABA exógeno (YANG et al., 2013).

Nove RLKs contendo repetições ricas em leucina (LRR - *Leucine-Rich Repeats*) na região extracelular foram identificados (Tabela 5). Membros dessa subfamília estão envolvidos na iniciação da sinalização e ativação de processos de defesa. São a maior e a mais bem estudada sub-família de RLKs (PENG et al., 2009). O genoma do arroz tem mostrado conter em torno de 320 genes LRR-RLK (DIEVART et al. 2016). Eles estão envolvidos nas respostas a diversos sinais como hormônios, esteróides, luz, ferimentos e patógenos. Alguns exemplos de LRR-RLKs são *XA21*, que confere resistência de amplo-espectro a diferentes raças de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), *BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BR1)* envolvido na percepção de brassinoesteróides, *CLAVATA1* relacionada ao controle das células meristemáticas, *PEP RECEPTOR 1 (PEPR1)* e *PEPR2* que detectam o dano associado ao padrão molecular do peptídeo 1 (Pep1); duas importantes PRR (*pattern recognition receptor*), *FLAGELLIN SENSING2 (FLS2)* e *EF-TU receptor (EFR)* que reconhecem flagelina bacteriana e EF-Tu, respectivamente; e a subfamília SERK (SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE3) (CHEN; RONALD, 2011; YEH et al., 2015). *OsSERK1* media a embriogênese somática em arroz, e é induzido por isolado avirulento de *M. oryzae* e por moléculas sinalizadoras de defesa, como ácido salicílico e ácido jasmônico. Também em arroz, *OsBRR1 (Blast Resistance Related 1)* codifica um LRR-RLK cuja expressão é altamente induzida em folhas infectadas por *M. oryzae*. Supressão e

superexpressão de *OsBRR1* levam ao aumento da suscetibilidade e ao aumento da resistência ao patógeno, respectivamente (PENG et al., 2009).

Foram identificados dois GDE codificando quinases associadas à parede (WAKs - *wall-associated kinases*) (TRINITY_GG_67133_c0_g1 e TRINITY_GG_67155_c0_g1) (Tabela 5). WAKs são uma subfamília de RLKs de plantas. Elas possuem um domínio amino-terminal fortemente associado com a matriz extracelular, uma única região transmembrana e um domínio citoplasmático de quinase (HE; HE; KOHORN, 1998). Os RLKs do tipo WAK estão associados à pectina, que está presente na lamela média e na parede celular primária (WAGNER; KOHORN, 2001). As paredes celulares das plantas são compostas por uma matriz complexa de celulose, hemicelulose, pectinas e proteínas que circundam cada célula. As proteínas WAK são necessárias para a expansão celular e também estão envolvidas na resposta a patógenos. De fato, fragmentos de pectina são comumente gerados por patógenos e podem servir como sinais para ativar vias de sinalização específicas relacionadas à defesa de plantas (KOHORN; KOHORN, 2012). Embora não esteja claro como WAKs estão envolvidas no processo de defesa, elas são conhecidas por estarem associadas à patogênese (ZHANG et al., 2005). No arroz, um gene similar a *WAK* (*WAK-like*) confere menor sensibilidade à brusone (LI et al., 2009).

A maneira mais eficaz de defesa das plantas é a reação de hipersensibilidade, que restringe o crescimento e os danos causados pelos patógenos. Alteração dos fluxos iônicos através da membrana da célula vegetal, geração de ERO, mudanças no estado de fosforilação de proteínas reguladoras e ativação transcricional de genes relacionados à defesa ocorrem em resposta à infecção por patógenos. A morte celular ocorre no local da infecção e é acompanhada por processos de lignificação, suberização e deposição de calose na parede celular e produção de compostos fenólicos, fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PR, *pathogen-related*). As proteínas PR se acumulam localmente, nos tecidos infectados e adjacentes, e também em tecidos não infectados remotos (EBRAHIM; USHA; SINGH, 2011). No último caso, eles estão associados ao desenvolvimento de resistência sistêmica adquirida (SAR, *systemic acquired resistance*),

que aumenta a capacidade da planta de se defender contra patógenos, especialmente biotróficos e hemibiotróficos (HAMMERSCHMIDT, 2009).

Proteínas PR têm sido classificadas em 17 famílias e algumas delas são antimicrobianas. Três sequências codificando proteínas envolvidas na degradação de componentes da parede celular fúngica, uma glucan endo-1,3-beta-glucosidase (TRINITY_GG_122913_c0_g1) e duas quitinases (TRINITY_GG_104629_c0_g1 e TRINITY_GG_20175_c21_g1), foram identificadas nesse estudo (Tabela 5). Após a celulose, a quitina é o polímero mais abundante nos organismos vivos. É o principal componente da parede celular dos fungos. As quitinases fazem parte do grupo das PR e são fortemente induzidas em células vegetais infectadas por patógenos (CLETUS et al., 2013). Uma quitinase classe VII isolada e purificada de trigo exerceu uma atividade antifúngica de amplo espectro contra vários patógenos, incluindo *Fusarium* sp., agente causal da giberela (SINGH; ISAAC KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007). Beta 1,3-glucanase pertence à O-Glycosyl hydrolases que hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos, ou entre um carboidrato e uma fração não-carboidrato. Juntamente com as liquenases e exo-1,3-glucanases, endo-1,3-beta-glucanases são encontradas em plantas e fungos. Uma expressão coordenada de beta 1,3-glucanases e quitinases tem sido descrita em muitas espécies de plantas, incluindo espigas de trigo infectadas por *Fusarium graminearum* (LI et al., 2001). Plantas transgênicas suscetíveis expressando uma combinação de genes de beta-1,3-glucanase e de quitinase apresentam uma maior resistência a doenças fúngicas, e atraso na evolução da infecção por *F. graminearum* em espigas de trigo, em comparação com plantas controle (ANAND et al., 2003).

Além de quitinases e beta 1,3-glucanases, duas sequências codificando proteínas similares a taumatina (TLPs, *thaumatin-like proteins*) (TRINITY_GG_160722_c0_g1 e TRINITY_GG_82899_c1_g1) foram identificadas (Tabela 5). Coincidente com esses resultados, transcritos de uma beta 1,3-glucanase, uma quitinase e uma TLP foram induzidos em espigas de trigo infectadas por *M. oryzae* (HA; KOOPMANN; VON TIEDEMANN, 2016). TLPs contêm cerca de 200 resíduos de aminoácidos e são universais em plantas, incluindo briófitas, gimnospermas e angiospermas (LIU;

STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010). Sua expressão é induzida pelo ataque de patógenos e elas são classificadas como família de proteínas PR 5. Nesta família, há TLPs induzidas por estresses ambientais, incluindo seca, frio, sal, ferimentos e hormônios vegetais. As TLPs apresentam uma atividade antifúngica bem documentada, que pode estar relacionada à sua atividade de ligação e/ou hidrólise aos beta-1,3-glucanos insolúveis em água, um importante componente da parede celular fúngica. Em contraste, algumas TLPs não mostram atividade antifúngica, apesar de sua atividade de glucanase. De fato, elas poderiam interferir com o destino e o metabolismo dos beta-1,3-glucanos derivados de plantas, como consequência de ferimentos ou da deposição de calose (GRENIER et al., 1999). A inibição da xilanase é outro mecanismo de ação das TLPs na defesa das plantas. O xilano é um dos polissacarídeos mais abundantes na parede celular das plantas superiores. As xilanases podem ser produzidas por microrganismos e por plantas. Um inibidor da xilanase do tipo taumatina em trigo apresentou atividade exclusivamente contra xilanases de origem microbiana (DORNEZ et al., 2010).

As peroxidases são enzimas que catalisam a oxidorredução entre o H_2O_2 e vários redutores. Duas sequências de peroxidases (TRINITY_GG_97788_c1_g1 e TRINITY_GG_107002_c3_g2) foram identificadas (Tabela 5). Ambas são peroxidases de classe III, uma enzima clássica com um domínio de ligação heme, codificada por uma família multigênica em plantas. Entre outros processos, as peroxidases da classe III são induzidas durante a defesa da planta hospedeira. As peroxidases também são conhecidas por pertencerem à subfamília de proteínas PR 9 (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). Na interação planta-patógeno, as peroxidases atuam no reforço das paredes celulares do hospedeiro (por exemplo, suberização, lignificação), no metabolismo de EROs e de espécies reativas de nitrogênio, na produção de metabólitos antimicrobianos, e nas vias de sinalização (HIRAGA et al., 2001; ALMAGRO et al., 2009). A indução de peroxidases em resposta à infecção por *M. oryzae* é relatada em vários estudos. Plantas de arroz no estágio de oito folhas apresentaram acúmulo de transcritos de oito genes de peroxidases após a inoculação com *M. oryzae* (SASAKI et al., 2004). Alguns deles foram detectados às 6-12 HAI, quando ainda não há sintomas, e outros, aos 5 DAI, quando as lesões estão desenvolvidas. Uma linhagem de arroz resistente, quando inoculada com *M. oryzae*,

apresentou mais genes regulados e com maior expressão de genes codificadores de peroxidases, do que linhagens suscetíveis (GUPTA et al., 2012).

Por fim, dois GDE codificando para WIR1A foram identificados (TRINITY_GG_56385_c0_g1 e TRINITY_GG_51766_c1_g1) (Tabela 5). Genes dessa família também foram identificados como diferencialmente expressos, no primeiro estudo de transcriptômica do genótipo CBFusarium ENT014 inoculado com o isolado de *M. oryzae* Py6025 (*Wir1b*).

6.5 Conclusões

Os mutantes de Cadenza para *COMT* apresentaram alteração na reação a *M. oryzae*, em planta jovem e em planta adulta. Cruzamentos entre essas linhagens mutantes poderiam ser realizados para se verificar a influência de cada uma das cópias do gene na reação à doença. Não se obteve resultado significativo de alteração do fenótipo dos mutantes TILLING de trigo para *Hsp60* e *Wir1b*. Novos mutantes poderão ser selecionados para prosseguir com o estudo.

Iniciadores desenhados para os genes *RPM1*, *Tricetin 3'4'5'-O-Trimethyltransferase*, e *Wir1b*, identificados nos experimentos com o isolado Py6025, e analisados em RT-qPCR com amostras de RNA obtidas de espigas inoculadas com o isolado Py0925, não amplificaram fragmentos. Novos iniciadores deverão ser desenhados e utilizados para se caracterizar o perfil de expressão desses genes ao longo do tempo, e em resposta à inoculação, em BRS 209 (suscetível) e em CBFusarium ENT014 (resistente).

O sequenciamento dos transcriptomas de espigas de trigo em resposta à inoculação revelou que as funções moleculares mais representativas em termos GO são ligação heme, ligação por íon ferro e atividade oxidorreductase. Interessante observar que, às 40 HAI, para essas categorias GO, há uma modulação de expressão inversa em BRS 209 e CBFusarium ENT014 em resposta à inoculação com *M. oryzae*, com a modulação de expressão de um maior número de genes na cultivar suscetível. No genótipo resistente

CBFusarium ENT014, foram identificados 24 GDE relacionados à defesa, sendo 23 induzidos e um com expressão reduzida em condições de inoculação com *M. oryzae*.

- Parte do Capítulo IV foi aceito para publicação no livro “Wheat Blast” da CRC Press, como capítulo “Genetic and molecular basis of Wheat - *Magnaporthe oryzae* *Triticum* interaction”

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A brusone do é um fator limitante para a produção de trigo em regiões tropicais e subtropicais, em função dos efeitos na qualidade e no rendimento dos grãos. Dentre as medidas de controle disponíveis, a resistência genética é uma das opções para reduzir os danos causados por *Magnaporthe oryzae*. Por ser uma doença relativamente recente, poucos genótipos de trigo são descritos como resistentes/moderadamente resistentes ao patógeno. Diversos estudos estão sendo realizados para identificar fontes de resistência e genes de resistência a *M. oryzae*, e elucidar os mecanismos envolvidos na interação *M. oryzae*-trigo.

Apesar de diversos trabalhos apresentarem a caracterização da reação de genótipos de trigo a *M. oryzae*, a metodologia de inoculação e avaliação da doença não é padronizada, dificultando a comparação dos resultados obtidos em cada pesquisa. Com base em estudos publicados, no Capítulo I foi realizada a caracterização da reação de dez genótipos de trigo a dois isolados do patógeno (Py0925 e Py1121) identificação de variáveis eficientes na discriminação dos genótipos. De fato, há variação na reação dos genótipos, como já observado em outros trabalhos. As variáveis mais informativas para a discriminação dos genótipos de trigo quanto à reação à brusone foram: severidade de espiguetas brancas, área abaixo da curva de progresso da doença (estimada a partir da severidade de branqueamento avaliada ao longo do tempo) e proporção do peso médio do grão de espigas inoculadas com relação às controle. Por outro lado, a severidade de espiguetas com lesão, o tipo de lesão predominante e a proporção do número de grãos por espiga inoculadas em relação às controle não permitiram diferenciação entre os genótipos resistentes e suscetíveis. Os genótipos CBFusarium ENT014 e CPAC 07434 apresentaram a menor severidade de espiguetas brancas e a maior proporção do peso médio do grão.

Os genótipos CBFusarium ENT014 e CPAC 07434, já haviam sido caracterizados como resistentes a *M. oryzae* em condições de viveiros de brusone e, no Capítulo II, análises moleculares revelaram que esses genótipos possuem o marcador da translocação 2NS/2AS (VENTRIUP/LN2). Por outro lado, outros 13 genótipos resistentes avaliados nesse capítulo, não apresentaram esse marcador. Dentre esses genótipos, estão as cultivares BR 18 e BRS 229, duas das mais importantes fontes de resistência durável à brusone no Brasil. A identificação de materiais resistentes que não possuem o marcador da translocação 2NS/2AS reforça a necessidade de estudos visando à descoberta de outros genes e/ou QTL que sejam efetivos para o controle da doença.

No Capítulo III, foi desenvolvido o mapeamento de QTL, buscando completar uma lacuna do conhecimento sobre o patossistema *M. oryzae*-trigo. Até onde se sabe, esse foi o primeiro estudo que identificou QTL de trigo conferindo resistência a *M. oryzae*. A população de mapeamento foi desenvolvida a partir do cruzamento da cultivar suscetível BRS 209 e o genótipo resistente CBFusarium ENT014 (população Embrapa-Brusone). Quando inoculados com Py0925, ambos os genótipos, reproduziram o padrão de reação anteriormente observado e apresentado no Capítulo I. A fenotipagem da população foi realizada após inoculação com os dois isolados do patógeno (Py6025 e Py0925), conforme a metodologia proposta e apresentada no Capítulo I. A perda de patogenicidade do isolado Py6025 impossibilitou a fenotipagem de todas as linhagens da população Embrapa-Brusone. Devido a isso, também foi necessário a fenotipagem da população com um segundo isolado, Py0925. Como o tempo foi exíguo para a realização desse experimento parte dos genótipos da população não puderam ser fenotipados com o isolado Py0925.

Foram identificados 12 QTL relacionados com a resistência de trigo a *M. oryzae* e dois relacionados à produção de grãos quando submetidos à inoculação com o patógeno. Todas as variáveis consideradas apresentaram pelo menos um QTL, com exceção do tipo de lesão predominante e severidade de espiguetas com lesão, reforçando que essas avaliações não são as mais importantes para a caracterização da reação de genótipos de trigo à brusone. O número de pontos de infecção na ráquis apresentou grande variação entre as linhagens da população, e QTL específicos para essa característica foram

encontrados. Essa variável foi avaliada no Capítulo I, e outros estudos devem ser desenvolvidos para se entender a influência dos pontos de infecção na reação à doença.

Novos marcadores KASP já estão sendo desenvolvidos, no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, para saturar as regiões dos QTL identificados. Linhagens isogênicas estão em desenvolvimento para o mapeamento fino dos QTL nos cromossomos 2A, 5B e 7B. O uso dos marcadores reportados nesse estudo tem papel potencial para o desenvolvimento de cultivares de trigo resistentes à brusone.

Com os resultados obtidos nos Capítulos I e III, sugere-se a existência de pelo menos três mecanismos de resistência da planta hospedeira frente a *M. oryzae*, similares ao observado no patossistema *Gibberella zeae* - trigo. A proposta desta tese é a de que o primeiro envolveria a resposta de hipersensibilidade, expressa pelo número de PIR e o segundo, a resistência à colonização dos tecidos do hospedeiro pelo patógeno, expressa pelo atraso no desenvolvimento do branqueamento das espigas. Já o terceiro mecanismo estaria relacionado à tolerância, expressa pela proporção do peso médio do grão entre espigas inoculadas e controle.

O Capítulo IV apresentou as atividades que tinham como objetivo identificar e analisar genes-candidatos de resistência de trigo a *M. oryzae*. O estudo dos mutantes TILLING para os genes-candidatos de resistência foi uma das justificativas para a realização de projeto junto ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) da Capes, realizado no John Innes Centre (Reino Unido). Infelizmente, não foram obtidos resultados significativos de alteração do fenótipo dos mutantes para os genes *Hsp60* e *Wir1b*, em resposta à inoculação. Os mutantes de Cadenza para *Caffeic Acid O-Methyltransferase* apresentaram alteração na reação a *M. oryzae*, em planta jovem e em planta adulta. Dando continuidade a essa caracterização, seria importante realizar cruzamentos entre essas linhagens mutantes para verificar a influência de cada uma das cópias do gene estudado na reação à doença. Além disso, utilizando-se de outros parâmetros de seleção de mutantes *in silico*, novos mutantes poderiam ser eleitos para a caracterização dos genes *Hsp60*, *RPM1* e *Wir1b*.

A perda de patogenicidade do isolado Py6025 também interferiu na validação da expressão diferencial dos genes *Rpm1*, *Tricetin 3'4'5'-O-Trimethyltransferase*, e *Wir1b* em RT-qPCR. Esses experimentos foram realizados com amostras de RNA obtidas de espigas inoculadas com o isolado de *M. oryzae* Py0925. Os iniciadores desenhados para os genes *Rpm1*, *Tricetin 3'4'5'-O-Trimethyltransferase*, e *Wir1b*, porém, não amplificaram fragmentos. Dessa forma novos iniciadores deverão ser desenhados e utilizados para se caracterizar o perfil de expressão ao longo do tempo em BRS 209 (suscetível) e CBFusarium ENT014 (resistente), submetidos ou não à inoculação.

O sequenciamento dos transcriptomas de espigas de trigo em resposta à inoculação com o isolado de *M. oryzae* Py0925 permitiu a identificação de um conjunto de genes diferencialmente expressos em resposta à inoculação, tanto no genótipo resistente quanto no suscetível. Transcritos da família gênica *Wir1*, que já haviam sido identificados como diferencialmente expressos em resposta à inoculação com o isolado Py6025, também foi identificada em resposta à inoculação com o Py0925. Trabalhos futuros permitirão análises comparativas entre os resultados obtidos com as inoculações dos dois isolados. Nesse caso, novos genes-candidatos poderão ser selecionados para a validação de experimentos em RT-qPCR, a exemplo dos diferencialmente expressos exclusivamente no genótipo resistente.

8 CONCLUSÃO GERAL

As avaliações da severidade de espiguetas brancas, da área abaixo da curva de progresso da doença e da proporção do peso médio do grão (entre espigas inoculadas e controle) são eficientes na discriminação de genótipos de trigo, e devem ser consideradas para a caracterização quanto à reação a *Magnaporthe oryzae*. As análises de tipo de lesão predominante e de severidade de espiguetas com lesão não são informativas para a fenotipagem com relação à brusone e podem ser dispensadas das avaliações. O número de pontos de infecção apresentou variação tanto nos dez genótipos avaliados no Capítulo I quanto na população duplo-haploide analisada no Capítulo III. Essa característica merece atenção em estudos futuros. A metodologia de inoculação e avaliação da brusone descrita nesse trabalho pode ser utilizada em trabalhos futuros para otimização do tempo dedicado às avaliações e maior eficiência na caracterização da reação de genótipos de trigo à brusone.

A identificação de materiais resistentes que não possuem o marcador molecular da translocação 2NS/2AS reforçou a necessidade de estudos visando à descoberta de outros genes e/ou QTL, assim como a elucidação dos mecanismos de resistência envolvidos. Até onde se sabe, nessa tese foi desenvolvido o primeiro mapeamento de QTL de resistência de trigo a *M. oryzae*. Doze desses QTL estão relacionados com a resistência e dois com a produção de grãos.

Não foram obtidos resultados significativos de alteração do fenótipo dos mutantes TILLING de trigo para os genes *Hsp60* e *Wir1b*. Porém os mutantes de Cadenza para *Caffeic Acid O-Methyltransferase* (Cadenza0260, Cadenza1323 e Cadenza1752) apresentaram alteração na reação a *M. oryzae*, em planta jovem e em planta adulta.

O sequenciamento dos transcriptomas de espigas de trigo em resposta à inoculação revelou as funções moleculares ligação heme, ligação por íon ferro e atividade oxidorreductase, atuando em doadores pareados, com incorporação ou redução de oxigênio molecular, como as mais representativas em termos GO. Interessante observar que houve uma modulação de expressão inversa, para essas categorias GO, em BRS 209 e CBFusarium ENT014, em resposta à inoculação com *M. oryzae*. Foi observada a modulação de expressão de um maior número de genes na cultivar suscetível, às 40 horas após a inoculação, do que no genótipo resistente. Para CBFusarium ENT014, foram identificados 24 genes diferencialmente expressos relacionados à defesa, e que não o foram na cultivar suscetível, sendo 23 induzidos e um com expressão reduzida em condições de inoculação com *M. oryzae*. Estes 24 genes de expressão gênica diferencial especificamente no genótipo resistente poderão ser empregados como genes-candidatos em estudos futuros.

REFERÊNCIAS

ACEVEDO-GARCIA, J.; SPENCER, D.; THIERON, H.; REINSTÄDLER, A.; HAMMOND-KOSACK, K.; PHILLIPS, A. L.; PANSTRUGA, R. *mlo*-based powdery mildew resistance in hexaploid bread wheat generated by a non-transgenic TILLING approach. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 3, p. 367–378, 2017.

AFZAL, A. J.; WOOD, A. J.; LIGHTFOOT, D. A. Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 5, p. 507–517, 2008.

ALAM, M. M.; TANAKA, T.; NAKAMURA, H.; ICHIKAWA, H.; KOBAYASHI, K.; YAENO, T.; YAMAOKA, N.; SHIMOMOTO, K.; TAKAYAMA, K.; NISHINA, H.; NISHIGUCHI, M. Overexpression of a rice *heme activator protein* gene (*OsHAP2E*) confers resistance to pathogens, salinity and drought, and increases photosynthesis and tiller number. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 1, p. 85–96, 2015.

ALBRECHT, J. C.; VIEIRA, E. A.; SILVA, M. S. e; ANDRADE, J. M. V. de; SCHEEREN, P. L.; TRINDADE, M. da G.; SOARES SOBRINHO, J.; SOUSA, C. N. A. de; REIS, W. P.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q.; FRONZA, V.; CARGNIN, A.; YAMANAKA, C. H. Adaptabilidade e estabilidade de genótipos de trigo irrigado no Cerrado do Brasil Central. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 12, p. 1727–1734, 2007.

ALLEN, A. M.; WINFIELD, M. O.; BURRIDGE, A. J.; DOWNIE, R. C.; BENBOW, H. R.; BARKER, G. L. A.; WILKINSON, P. A.; COGHILL, J.; WATERFALL, C.; DAVASSI, A.; SCOPES, G.; PIRANI, A.; WEBSTER, T.; BREW, F.; BLOOR, C.; GRIFFITHS, S.; BENTLEY, A. R.; ALDA, M.; JACK, P.; PHILLIPS, A. L.; EDWARDS, K. J. Characterization of a Wheat Breeders' Array suitable for high-throughput SNP genotyping of global accessions of hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*). **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 3, p. 390–401, 2017.

ALMAGRO, L.; GÓMEZ ROS, L. V; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; ROS BARCELÓ, A.; PEDREÑO, M. A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p. 377–390, 2009.

ANAND, A.; ZHOU, T.; TRICK, H. N.; GILL, B. S.; BOCKUS, W. W.; MUTHUKRISHNAN, S. Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 384, p. 1101–1111, 2003.

ANH, V. L.; ANH, N. T.; TAGLE, A. G.; VY, T. T. P.; INOUE, Y.; TAKUMI, S.; CHUMA, I.; TOSA, Y. *Rmg8*, a new gene for resistance to *Triticum* isolates of *Pyricularia oryzae* in hexaploid wheat. **Phytopathology**, v. 105, n. 12, p. 1568–1572, 2015.

ANH, V. L.; INOUE, Y.; ASUKE, S.; VY, T. T. P.; ANH, N. T.; WANG, S.; CHUMA, I.; TOSA, Y. *Rmg8* and *Rmg7*, wheat genes for resistance to the wheat blast fungus, recognize the same avirulence gene *AVR-Rmg8*. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 5, p. 1252–1256, 2018.

ANJOS, J. R. dos N.; DA SILVA, D. B.; CHARCHAR, M. J. D.; RODRIGUES, G. C. Ocorrência de brusone (*Pyricularia grisea*) em trigo e centeio na região dos cerrados do Brasil Central. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 79–82, 1996.

ARRUDA, M. A.; BUENO, C. R. N. C.; ZAMPROGNO, K. C.; LAVORENTI, N. A.; URASHIMA, A. S. Reação do trigo à *Magnaporthe grisea* nos diferentes estádios de desenvolvimento. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 121–126, 2005.

ASHBURNER, M.; BALL, C. A.; BLAKE, J. A.; BOTSTEIN, D.; BUTLER, H.; CHERRY, J. M.; DAVIS, A. P.; DOLINSKI, K.; DWIGHT, S. S.; EPPIG, J. T.; HARRIS, M. A.; HILL, D. P.; ISSEL-TARVER, L.; KASARSKIS, A.; LEWIS, S.; MATESE, J. C.; RICHARDSON, J. E.; RINGWALD, M.; RUBIN, G. M.; SHERLOCK, G. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 25–29, 2000.

AZNAR, A.; CHEN, N. W. G.; THOMINE, S.; DELLAGI, A. Immunity to plant pathogens and iron homeostasis. **Plant Science**, v. 240, p. 90–97, 2015.

BACALTCHUK, B.; CUNHA, G. R.; PIRES, J. L. F.; JACOBSEN, L. A.; SILVA, M. S.; ALBRECHT, J. C. Trigo no Brasil: os desafios de um país tropical. In: ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, A. G. (Ed.). **Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 163–184.

BARIANA, H. S.; MCINTOSH, R. A. Cytogenetic studies in wheat. XV. Location of rust resistance genes in VPM1 and their genetic linkage with other disease resistance genes in chromosome 2A. **Genome**, v. 36, n. 3, p. 476–482, 1993.

BARRETT, L. G.; KNISKERN, J. M.; BODENHAUSEN, N.; ZHANG, W.; BERGELSON, J. Continua of specificity and virulence in plant host-pathogen interactions: causes and consequences. **New Phytologist**, v. 183, n. 3, p. 513–529, 2009.

BHATTACHARYA, R.; PAL, S. Deadly wheat blast symptoms enters India through the Bangladesh border, Bengal govt burning crops on war footing. **Hindustan Times, India**, 2017. Disponível em: <<https://www.hindustantimes.com/kolkata/deadly-wheat-blast-symptoms-enters-india-through-the-bangladesh-border-bengal-govt-burning-crops-on-war-footing/story-3zoWQ0H7sdMU4HxQyzWUsN.html>>. Acesso em: 19 jan. 2019.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BOLTON, M. D.; KOLMER, J. A.; XU, W. W.; GARVIN, D. F. *Lr34*-mediated leaf rust resistance in wheat: transcript profiling reveals a high energetic demand supported by transient recruitment of multiple metabolic pathways. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 12, p. 1515–1527, 2008.

BONMAN, J. M.; DE DIOS, T. I. V.; KHIN, M. M. Physiologic specialization of *Pyricularia oryzae* in the Philippines. **Plant disease**, v. 70, p. 767–769, 1986.

BOTTICELLA, E.; SESTILI, F.; HERNANDEZ-LOPEZ, A.; PHILLIPS, A.; LAFIANDRA, D. High resolution melting analysis for the detection of EMS induced mutations in wheat *SbellA* genes. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 156, 2011.

BOVINA, R.; BRUNAZZI, A.; GASPARINI, G.; SESTILI, F.; PALOMBIERI, S.; BOTTICELLA, E.; LAFIANDRA, D.; MANTOVANI, P.; MASSI, A. Development of a TILLING resource in durum wheat for reverse- and forward-genetic analyses. **Crop and Pasture Science**, v. 65, n. 1, p. 112, 2014.

BOZKURT, T. O.; MCGRANN, G. R. D.; MACCORMACK, R.; BOYD, L. A.; AKKAYA, M. S. Cellular and transcriptional responses of wheat during compatible and incompatible race-specific interactions with *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 5, p. 625-640, 2010.

BRIAT, J.-F.; RAVET, K.; ARNAUD, N.; DUC, C.; BOUCHEREZ, J.; TOURAINE, B.; CELLIER, F.; GAYMARD, F. New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. **Annals of Botany**, v. 105, n. 5, p. 811–822, 2010.

BROMAN, K. W.; WU, H.; SEN, S.; CHURCHILL, G. A. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. **Bioinformatics**, v. 19, n. 7, p. 889–890, 2003.

BRUNETTA, D.; BASSOI, M. C.; DOTTO, S. R.; SCHEEREN, P. L.; MIRANDA, M. Z. de; TAVARES, L. C. V.; MIRANDA, L. C. Características e desempenho agrônômico da cultivar de trigo BRS 229 no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 889-892, 2006.

BRUNETTA, D.; DOTTO, S. R.; BASSOI, M. C.; SCHEEREN, P. L.; MIRANDA, M. Z. de. **Cultivares de trigo da EMBRAPA Paraná e seu manejo**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 56 p. (Embrapa Soja. Documentos, 259).

BULL, J.; MAUCH, F.; HERTIG, C.; REBMANN, G.; DUDLER, R. Sequence and expression of a wheat gene that encodes a novel protein associated with pathogen defense. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 5, n. 6, p. 516–519, 1992.

BULOS, M.; ECHARTE, M.; SALA, C. Occurrence of the rust resistance gene *Lr37* from *Aegilops ventricosa* in Argentine cultivars of wheat. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 580-586, 2006.

BYRNE, P. F.; MCMULLEN, M. D.; SNOOK, M. E.; MUSKET, T. A.; THEURI, J. M.; WIDSTROM, N. W.; WISEMAN, B. R.; COE, E. H. Quantitative trait loci and metabolic pathways: genetic control of the concentration of maysin, a corn earworm resistance factor, in maize silks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 17, p. 8820–8825, 1996.

CAIERÃO, E.; SCHEEREN, P. L.; SÓ E SILVA, M.; DE CASTRO, R. L.; CARGNIN, A. Uso do germoplasma da Embrapa nos programas de melhoramento de trigo no Brasil. **Ciência Rural**, v. 44, n. 1, p. 57–63, 2014.

CALLA, B.; BLAHUT-BEATTY, L.; KOZIOL, L.; SIMMONDS, D. H.; CLOUGH, S. J. Transcriptome analyses suggest a disturbance of iron homeostasis in soybean leaves during white mould disease establishment. **Molecular Plant Pathology**, v. 15, n. 6, p. 576–588, 2014.

CARBON, S.; IRELAND, A.; MUNGALL, C. J.; SHU, S.; MARSHALL, B.; LEWIS, S. AmiGO: online access to ontology and annotation data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 2, p. 288–289, 2009.

CASTROAGUDÍN, V. L.; CERESINI, P. C.; DE OLIVEIRA, S. C.; REGES, J. T. A.; MACIEL, J. L. N.; BONATO, A. L. V.; DORIGAN, A. F.; MCDONALD, B. A. Resistance to QoI fungicides is widespread in Brazilian populations of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Phytopathology**, v. 105, n. 3, p. 284–294, 2015.

CASTROAGUDÍN, V. L.; MOREIRA, S. I.; PEREIRA, D. A. S.; MOREIRA, S. S.; BRUNNER, P. C.; MACIEL, J. L. N.; CROUS, P. W.; MCDONALD, B. A.; ALVES, E.; CERESINI, P. C. *Pyricularia graminis-tritici*, a new *Pyricularia* species causing wheat blast. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 37, n. 1, p. 199–216, 2016.

CERESINI, P. C.; CASTROAGUDÍN, V. L.; RODRIGUES, F. Á.; RIOS, J. A.; EDUARDO AUCIQUE-PÉREZ, C.; MOREIRA, S. I.; ALVES, E.; CROLL, D.; MACIEL, J. L. N. Wheat Blast: past, present, and future. **Annual Review of Phytopathology**, v. 56, n. 1, p. 427–456, 2018.

CERESINI, P. C.; CASTROAGUDÍN, V. L.; RODRIGUES, F. Á.; RIOS, J. A.; AUCIQUE-PÉREZ, C. E.; MOREIRA, S. I.; CROLL, D.; ALVES, E.; DE CARVALHO, G.; MACIEL, J. L. N.; MCDONALD, B. A. Wheat blast: from its origins in South America to its emergence as a global threat. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 2, p. 155–172, 2019.

CHEN, A.; DUBCOVSKY, J. Wheat TILLING mutants show that the vernalization gene *VRN1* down-regulates the flowering repressor *VRN2* in leaves but is not essential for flowering. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 12, p. e1003134, 2012.

CHEN, K.; FAN, B.; DU, L.; CHEN, Z. Activation of hypersensitive cell death by pathogen-induced receptor-like protein kinases from Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, v. 56, n. 2, p. 271–283, 2004.

CHEN, X.; RONALD, P. C. Innate immunity in rice. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 8, p. 451–459, 2011.

CHEN, X.; SHANG, J.; CHEN, D.; LEI, C.; ZOU, Y.; ZHAI, W.; LIU, G.; XU, J.; LING, Z.; CAO, G.; MA, B.; WANG, Y.; ZHAO, X.; LI, S.; ZHU, L. A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. **The Plant Journal**, v. 46, n. 5, p. 794–804, 2006.

CLETUS, J.; BALASUBRAMANIAN, V.; VASHISHT, D.; SAKTHIVEL, N. Transgenic expression of plant chitinases to enhance disease resistance. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 11, p. 1719–1732, 2013.

COBB, J. N.; DECLERCK, G.; GREENBERG, A.; CLARK, R.; MCCOUCH, S. Next-generation phenotyping: requirements and strategies for enhancing our understanding of genotype–phenotype relationships and its relevance to crop improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 4, p. 867–887, 2013.

COELHO, M. A. de O.; TORRES, G. A. M.; CECON, P. R.; SANTANA, F. M. Sowing date reduces the incidence of wheat blast disease. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 631–637, 2016.

CONAB. **Acompanhamento da Safra brasileira de grãos**: v. 6 – safra 2018/19 - n. 5 – Quinto levantamento. Brasília: Conab, 2019.

CORAM, T. E.; WANG, M.; CHEN, X. Transcriptome analysis of the wheat–*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* interaction. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 2, p. 157–169, 2008.

CORDEIRO, M. B.; DALLACORT, R.; FREITAS, P. S. L. de; SEABRA JUNIOR, S.; SANTI, A.; FENNER, W. Aptidão agroclimática do trigo para as regiões de Rondonópolis, São José do Rio Claro, São Vicente e Tangará da Serra, Mato Grosso, Brasil. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 9, n. 1, p. 96–101, 2015.

COUCH, B. C.; FUDAL, I.; LEBRUN, M.-H.; THARREAU, D.; VALENT, B.; VAN KIM, P.; NOTTÉGHEM, J.-L.; KOHN, L. M. Origins of host-specific populations of the Blast Pathogen *Magnaporthe oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. **Genetics**, v. 170, n. 2, p. 613–630, 2005.

COUCH, B. C.; KOHN, L. M. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. **Mycologia**, v. 94, n. 4, p. 683–693, 2002.

CRUZ, C. D.; BOCKUS, W. W.; STACK, J. P.; TANG, X.; VALENT, B.; PEDLEY, K. F.; PETERSON, G. L. Preliminary assessment of resistance among U.S. wheat cultivars to the *Triticum* pathotype of *Magnaporthe oryzae*. **Plant Disease**, v. 96, n. 10, p. 1501–1505, 2012.

CRUZ, C. D.; BOCKUS, W. W.; STACK, J. P.; VALENT, B.; MACIEL, J. N.; PETERSON, G. L. A standardized inoculation protocol to test wheat cultivars for reaction to Head Blast caused by *Magnaporthe oryzae* (*Triticum* pathotype). **Plant Health Progress**, v. 17, n. 3, p. 186–187, 2016b.

CRUZ, C. D.; PETERSON, G. L.; BOCKUS, W. W.; KANKANALA, P.; DUBCOVSKY, J.; JORDAN, K. W.; AKHUNOV, E.; CHUMLEY, F.; BALDELOMAR, F. D.; VALENT, B. The 2NS Translocation from *Aegilops ventricosa* confers resistance to the *Triticum* Pathotype of *Magnaporthe oryzae*. **Crop science**, v. 56, n. 3, p. 990–1000, 2016a.

CRUZ, C. D.; VALENT, B. Wheat blast disease: danger on the move. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 3, p. 210–222, 2017.

CRUZ, M. F. A.; DEBONA, D.; RIOS, J. A.; BARROS, E. G.; RODRIGUES, F. A. Potentiation of defense-related gene expression by silicon increases wheat resistance to leaf blast. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, n. 6, p. 394–400, 2015.

CRUZ, M. F. A.; PRESTES, A. M.; MACIEL, J. L. N.; SCHEEREN, P. L. Resistência parcial à brusone de genótipos de trigo comum e sintético nos estádios de planta jovem e de planta adulta. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 1, p. 24–31, 2010.

CUMAGUN, C. J. R.; ANH, V. L.; VY, T. T. P.; INOUE, Y.; ASANO, H.; HYON, G.-S.; CHUMA, I.; TOSA, Y. Identification of a hidden resistance gene in tetraploid wheat using laboratory strains of *Pyricularia oryzae* produced by backcrossing. **Phytopathology**, v. 104, n. 6, p. 634–640, 2014.

CUNHA, G. R. A expedição de Martim Afonso. In: CUNHA, G. R. (Ed.). **Trigo, 500 anos no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. p. 40–44.

DEÁK, M.; HORVÁTH, G. V.; DAVLETOVA, S.; TÖRÖK, K.; SASS, L.; VASS, I.; BARNA, B.; KIRÁLY, Z.; DUDITS, D. Plants ectopically expressing the ironbinding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 192–196, 1999.

DEAN, R. A.; TALBOT, N. J.; EBBOLE, D. J.; FARMAN, M. L.; MITCHELL, T. K.; ORBACH, M. J.; THON, M.; KULKARNI, R.; XU, J.-R.; PAN, H.; READ, N. D.; LEE, Y.-H.; CARBONE, I.; BROWN, D.; OH, Y. Y.; DONOFRIO, N.; JEONG, J. S.; SOANES, D. M.; DJONOVIC, S.; KOLOMIETS, E.; REHMEYER, C.; LI, W.; HARDING, M.; KIM, S.; LEBRUN, M.-H.; BOHNERT, H.; COUGHLAN, S.; BUTLER, J.; CALVO, S.; MA, L.-J.; NICOL, R.; PURCELL, S.; NUSBAUM, C.;

GALAGAN, J. E.; BIRREN, B.W. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Nature**, v. 434, n. 7036, p. 980–986, 2005.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A. L.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414–430, 2012.

DEL DUCA, L. de J. A.; SOUSA, C. N. A. de; SCHEEREN, P. L.; LINHARES, A. G.; SÓ e SILVA, M.; NASCIMENTO JUNIOR, A. do; CAIERÃO, E.; PIRES, J. L.; EICHELBERGER, L.; CHAVES, M. S.; COSTAMILAN, L. M.; PRESTES, A. M.; LIMA, M. I. P. M.; MIRANDA, M. Z. de; GUARIENTI, E. M.; VOSS, M.; LUZ, W. C. da; CUNHA, G. R. da; ALBUQUERQUE, A. C. S.; LHAMBY, J. C. B. **Cultivar de trigo BRS Angico testada e indicada para as regiões de adaptação 4 e 5 do Estado de Santa Catarina**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2005.

DELVENTHAL, R.; RAJARAMAN, J.; STEFANATO, F. L.; REHMAN, S.; AGHNOUM, R.; MCGRANN, G. R. D.; BOLGER, M.; USADEL, B.; HEDLEY, P. E.; BOYD, L.; NIKS, R. E.; SCHWEIZER, P.; SCHAFFRATH, U. A comparative analysis of nonhost resistance across the two Triticeae crop species wheat and barley. **BMC Plant Biology**, v. 17, n. 1, p. 232, 2017.

DESMOND, O. J.; MANNERS, J. M.; SCHENK, P. M.; MACLEAN, D. J.; KAZAN, K. Gene expression analysis of the wheat response to infection by *Fusarium pseudograminearum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 73, n. 1–3, p. 40–47, 2008.

DEVANNA, B. N.; SHARMA, T. R. Wheat blast disease management: cues from the advancements in molecular biology of rice-*Magnaporthe* pathosystem. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 249–259, 2018.

DIETHELM, M.; RHEL, M.; WAGNER, C.; MIKOLAJEWSKI, S.; GROTH, J.; HARTL, L.; FRIEDT, W.; SCHWEIZER, G. Gene expression analysis of four WIR1-like genes in floret tissues of European winter wheat after challenge with *G. zeae*. **Euphytica**, v. 186, n. 1, p. 103–114, 2012.

DIEVART, A.; PERIN, C.; HIRSCH, J.; BETTEMBOURG, M.; LANAU, N.; ARTUS, F.; BUREAU, C.; NOEL, N.; DROC, G.; PEYRAMARD, M.; PEREIRA, S.; COURTOIS, B.; MOREL, J.-B.; GUIDERDONI, E. The phenome analysis of mutant alleles in Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase genes in rice reveals new potential targets for stress tolerant cereals. **Plant Science**, v. 242, p. 240–249, 2016.

DOBIN, A.; DAVIS, C. A.; SCHLESINGER, F.; DRENKOW, J.; ZALESKI, C.; JHA, S.; BATUT, P.; CHAISSON, M.; GINGERAS, T. R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 2013.

DONG, C.; DALTON-MORGAN, J.; VINCENT, K.; SHARP, P. A modified TILLING method for wheat breeding. **The Plant Genome Journal**, v. 2, n. 1, p. 39, 2009.

DORNEZ, E.; CROES, E.; GEBRUERS, K.; DE CONINCK, B.; CAMMUE, B. P. A.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Accumulated evidence substantiates a role for three classes of Wheat Xylanase Inhibitors in plant defense. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 4, p. 244–264, 2010.

DOUCHKOV, D.; JOHRDE, A.; NOWARA, D.; HIMMELBACH, A.; LUECK, S.; NIKS, R.; SCHWEIZER, P. Convergent evidence for a role of WIR1 proteins during the interaction of barley with the powdery mildew fungus *Blumeria graminis*. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 1, p. 20–29, 2011.

DVORAK, J.; ZHANG, H. B. Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 24, p. 9640–9644, 1990.

EBRAHIM, S.; USHA, K.; SINGH, B. Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. **Sci Against Microb Pathog**, v. 2, p. 1043–1054, 2011.

ELLIOTT, C.; ZHOU, F.; SPIELMEYER, W.; PANSTRUGA, R.; SCHULZE-LEFERT, P. Functional Conservation of Wheat and Rice *Mlo* orthologs in defense modulation to the Powdery Mildew Fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, n. 10, p. 1069–1077, 2002.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**. 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>> Acesso em: 30 jan. 2019.

FARIAS, A. R.; MINGOTI, R.; HOLLER, W. A.; SPADOTTO, C. A.; LOVISI FILHO, E.; DE MORI, C.; CUNHA, G. R. da; DOSSA, A. A.; FERNANDES, J. M. C.; SÓ E SILVA, M. **Potencial de produção de trigo no Brasil a partir de diferentes cenários de expansão da área de cultivo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Campinas: Embrapa Gestão Territorial, 2016. 40p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento online / Embrapa Trigo, ISSN 1677-8901 ; 85; Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Gestão Territorial, ISSN 2317-8779 ; 5).

FARIS, J. D.; LI, W. L.; LIU, D. J.; CHEN, P. D.; GILL, B. S. Candidate gene analysis of quantitative disease resistance in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 2, p. 219–225, 1999.

FEDERIZZI, L. C.; SCHEEREN, P. L.; NETO, J. F. B.; MILACH, S. C. K. P.; PACHECO, M. T. Melhoramento de trigo. In: BOREM, A. (Ed.). **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 1999. p. 535–571.

FERREIRA, J. R.; DEUNER, C. C.; TORRES, G. A. M.; CONSOLI, L.; CASASSOLA, A.; FERNANDES, J. M. C.; SEIXAS, C. D. S. Influência do estágio fenológico na intensidade da brusone e mecanismos de resistência em trigo. In: Reunião da comissão brasileira de pesquisa de trigo e triticale, 10, 2016, Londrina. **Anais...** Londrina: Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale, 2016a.

FERREIRA, J. R.; DEUNER, C. C.; TORRES, G. A. M.; CONSOLI, L.; CASASSOLA, A.; FERNANDES, J. M. C. Fine phenotyping unlocks wheat mechanisms of reaction to *Magnaporthe oryzae*. In: Book of abstracts..., Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo: Embrapa Trigo; Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2016b.

FERREIRA, J. R.; VANCINI, C.; DEUNER, C. C.; TORRES, G. A. M.; CONSOLI, L.; SEIXAS, C. D. S.; DIANESE, A. D. C.; GOULART, A. C. P.; SOTO-GONZÁLES, H. H. **Absence of 2NS/2AS in wheat resistance sources to *Magnaporthe oryzae* in Brazil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2018. 21 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Trigo, ISSN 1677- 8901; 91)

FLOR, H. H. Current status of the Gene-For-Gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, v. 9, n. 1, p. 275–296, 1971.

FRANCK, S.; DUDLER, R. Nucleotide sequence (Genbank/EMBL/DDBJ accession number X87686) of a wheat cDNA encoding a putative pathogen-inducible protein homologous to PWIR1. **Plant Physiology**, v. 109, p. 338, 1995.

FUKUOKA, S.; SAKA, N.; KOGA, H.; ONO, K.; SHIMIZU, T.; EBANA, K.; HAYASHI, N.; TAKAHASHI, A.; HIROCHIKA, H.; OKUNO, K.; YANO, M. Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in Rice. **Science**, v. 325, n. 5943, p. 998–1001, 2009.

FUKUOKA, S.; YAMAMOTO, S.-I.; MIZOBUCHI, R.; YAMANOUCHI, U.; ONO, K.; KITAZAWA, N.; YASUDA, N.; FUJITA, Y.; THI THANH NGUYEN, T.; KOIZUMI, S.; SUGIMOTO, K.; MATSUMOTO, T.; YANO, M. Multiple functional polymorphisms

in a single disease resistance gene in rice enhance durable resistance to blast. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 4550, 2015.

GAUPELS, F.; BUHTZ, A.; KNAUER, T.; DESHMUKH, S.; WALLER, F.; VAN BEL, A. J. E.; KOGEL, K.-H.; KEHR, J. Adaptation of aphid stylectomy for analyses of proteins and mRNAs in barley phloem sap. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 12, p. 3297–3306, 2008.

GLADIEUX, P.; CONDON, B.; RAVEL, S.; SOANES, D.; MACIEL, J. L. N.; NHANI, A.; CHEN, L.; TERAUCHI, R.; LEBRUN, M.-H.; THARREAU, D.; MITCHELL, T.; PEDLEY, K. F.; VALENT, B.; TALBOT, N. J.; FARMAN, M.; FOURNIER, E. Gene flow between divergent cereal- and grass-specific lineages of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. **mBio**, v. 9, n. 1, p. e01219-17, 2018.

GOFF, K. E.; RAMONELL, K. M. The role and regulation of receptor-like kinases in plant defense. **Gene regulation and systems biology**, v. 1, p. 167–175, 2007.

GOLDMAN, I. L.; ROCHEFORD, T. R.; DUDLEY, J. W. Quantitative trait loci influencing protein and starch concentration in the Illinois Long Term Selection maize strains. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 87, n. 1–2, p. 217–224, 1993.

GOROVITS, R.; AKAD, F.; BEERY, H.; VIDAUSKY, F.; MAHADAV, A.; CZOSNEK, H. Expression of stress-response proteins upon whitefly-mediated inoculation of *Tomato yellow leaf curl virus* in Susceptible and resistant tomato plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 11, p. 1376–1383, 2007.

GOU, X.; HE, K.; YANG, H.; YUAN, T.; LIN, H.; CLOUSE, S. D.; LI, J. Genome-wide cloning and sequence analysis of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 19, 2010.

GOULART, A. C. P.; SOUSA, P. G.; URASHIMA, A. S. Danos em trigo causados pela infecção de *Pyricularia grisea*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 4, p. 358–363, 2007.

GOULART, A.; PAIVA, F.; MESQUITA, A. Ocorrência de brusone (*Pyricularia oryzae*) do trigo (*Triticum aestivum*) em Mato Grosso do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 112–114, 1990.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACOEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; DI PALMA, F.; BIRREN,

B. W.; NUSBAUM, C.; LINDBLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644–652, 2011.

GRENIER, J.; POTVIN, C.; TRUDEL, J.; ASSELIN, A. Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric beta-1,3-glucans. **The Plant Journal**, v. 19, n. 4, p. 473–480, 1999.

GROTH, J. V.; OZMON, E. A.; BUSCH, R. H. Repeatability and relationship of incidence and severity measures of Scab of Wheat caused by *Fusarium graminearum* in inoculated nurseries. **Plant Disease**, v. 83, n. 11, p. 1033–1038, 1999.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v. 217, n. 2–3, p. 213–220, 2006.

GUPTA, P. K.; KULWAL, P. L.; MIR, R. R. QTL Mapping: methodology and applications in cereal breeding. In: GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. (Ed.). **Cereal Genomics II**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. p. 275–318.

GUPTA, P. K.; MIR, R. R.; MOHAN, A.; KUMAR, J. Wheat Genomics: present status and future prospects. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2008, p. 1–36, 2008.

GUPTA, S. K.; RAI, A. K.; KANWAR, S. S.; CHAND, D.; SINGH, N. K.; SHARMA, T. R. The single functional blast resistance gene *Pi54* activates a complex defence mechanism in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 2, p. 757–772, 2012.

HA, X.; KOOPMANN, B.; VON TIEDEMANN, A. Wheat Blast and Fusarium Head Blight display contrasting interaction patterns on ears of wheat genotypes differing in resistance. **Phytopathology**, v. 106, n. 3, p. 270–281, 2016.

HAMMERSCHMIDT, R. Systemic acquired resistance. **Advances in Botanical Research**. Academic Press, v. 51, p. 173–222, 2009.

HARDIE, D. G. Plant protein serine/threonine kinases: classification and functions. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, n. 1, p. 97–131, 1999.

HAYASHI, N.; INOUE, H.; KATO, T.; FUNAO, T.; SHIROTA, M.; SHIMIZU, T.; KANAMORI, H.; YAMANE, H.; HAYANO-SAITO, Y.; MATSUMOTO, T.; YANO, M.; TAKATSUJI, H. Durable panicle blast-resistance gene *Pbl* encodes an atypical CC-

NBS-LRR protein and was generated by acquiring a promoter through local genome duplication. **The Plant Journal**, v. 64, n. 3, p. 498–510, 2010.

HAZARD, B.; ZHANG, X.; COLASUONNO, P.; UAUY, C.; BECKLES, D. M.; DUBCOVSKY, J. Induced mutations in the *starch branching enzyme II (SBEII)* genes increase amylose and resistant starch content in durum wheat. **Crop science**, v. 52, n. 4, p. 1754–1766, 2012.

HE, X.; LIU, X.; WANG, L.; WANG, L.; LIN, F.; CHENG, Y.; CHEN, Z.; LIAO, Y.; PAN, Q. Identification of the novel recessive gene *pi55(t)* conferring resistance to *Magnaporthe oryzae*. **Science China Life Sciences**, v. 55, n. 2, p. 141–149, 2012.

HE, Z.-H.; HE, D.; KOHORN, B. D. Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. **The Plant Journal**, v. 14, n. 1, p. 55–63, 1998.

HELGUERA, M.; KHAN, I. A.; KOLMER, J.; LIJAVETZKY, D.; ZHONG-QI, L.; DUBCOVSKY, J. PCR assays for the cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. **Crop Science**, v. 43, n. 5, p. 1839, 2003.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of Class III Plant Peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, n. 5, p. 462–468, 2001.

HIRATA, K.; TOSA, Y.; NAKAYASHIKI, H.; MAYAMA, S. Significance of *PWT4-Rwt4* interaction in the species specificity of *Avena* isolates of *Magnaporthe oryzae* on wheat. **Journal of General Plant Pathology**, v. 71, n. 5, p. 340–344, 2005.

HITTALMANI, S.; PARCO, A.; MEW, T. V.; ZEIGLER, R. S.; HUANG, N. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, n. 7, p. 1121–1128, 2000.

HORBACH, R.; NAVARRO-QUESADA, A. R.; KNOGGE, W.; DEISING, H. B. When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 1, p. 51–62, 2011.

HU, H.; XIONG, L.; YANG, Y. Rice *SERK1* gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. **Planta**, v. 222, n. 1, p. 107–117, 2005.

HU, K.-M.; QIU, D.-Y.; SHEN, X.-L.; LI, X.-H.; WANG, S.-P. Isolation and manipulation of Quantitative Trait Loci for disease resistance in rice using a candidate gene approach. **Molecular Plant**, v. 1, n. 5, p. 786–793, 2008.

HUANG, S.; SIRIKHACHORNKIT, A.; SU, X.; FARIS, J.; GILL, B.; HASELKORN, R.; GORNICKI, P. Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 12, p. 8133–8138, 2002.

HUSSAIN, B.; LUCAS, S. J.; OZTURK, L.; BUDAK, H. Mapping QTLs conferring salt tolerance and micronutrient concentrations at seedling stage in wheat. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15662, 2017.

IGARASHI, S. Update on wheat blast (*Pyricularia oryzae*) in Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON WHEAT FOR THE NONTRADITIONAL WARM AREAS, 3., 1990, Foz do Iguaçu, Brazil, México. **Anais...** México: CIMMYT, 1991.

IGARASHI, S.; UTIMADA, C. M.; IGARASHI, L. C.; KAZUMA, A. H.; LOPES, R. S. *Pyricularia* em trigo. 1. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 351–352, 1986.

INOUE, Y.; VY, T. T. P.; YOSHIDA, K.; ASANO, H.; MITSUOKA, C.; ASUKE, S.; ANH, V. L.; CUMAGUN, C. J. R.; CHUMA, I.; TERAUCHI, R.; KATO, K.; MITCHELL, T.; VALENT, B.; FARMAN, M.; TOSA, Y. Evolution of the wheat blast fungus through functional losses in a host specificity determinant. **Science**, v. 357, n. 6346, p. 80 LP-83, 2017.

INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v. 436, n. 7052, p. 793–800, 2005.

IWGSC - International Wheat Genome Sequencing Consortium. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. **Science**, v. 361, n. 6403, p. eaar7191, 2018.

JACOBSEN, L. A. Um pouco de história e de política de trigo. In: CUNHA, G. R. (Ed.). **Trigo, 500 anos no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. p. 33–39.

JAHIER; ABELARD; TANGUY; DEDRYVER; RIVOAL; KHATKAR; BARIANA. The *Aegilops ventricosa* segment on chromosome 2AS of the wheat cultivar “VPM1” carries the cereal cyst nematode resistance gene *Cre5*. **Plant Breeding**, v. 120, n. 2, p. 125–128, 2001.

JAMIL, M.; ALI, A.; AKBAR, K. F.; NAPAR, A. A.; GUL, A.; MUJEEB-KAZI, A. QTL Analysis in plants: ancient and modern perspectives. In: HAKEEM, K. R.; TOMBULOĞLU, H.; TOMBULOĞLU, G. (Ed.). **Plant Omics: trends and applications**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 59–82.

KANKANALA, P.; CZYMMEK, K.; VALENT, B. Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the Blast Fungus. **The Plant Cell**, v. 19, n. 2, p. 706–724, 2007.

KAWAHARA, Y.; OONO, Y.; KANAMORI, H.; MATSUMOTO, T.; ITOH, T.; MINAMI, E. Simultaneous RNA-Seq analysis of a mixed transcriptome of Rice and Blast Fungus interaction. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49423, 2012.

KNOLL, J. E.; RAMOS, M. L.; ZENG, Y.; HOLBROOK, C. C.; CHOW, M.; CHEN, S.; MALEKI, S.; BHATTACHARYA, A.; OZIAS-AKINS, P. TILLING for allergen reduction and improvement of quality traits in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 81, 2011.

KOHLI, M. M.; MEHTA, Y. R.; GUZMAN, E.; VIEDMA, L. de; CUBILLA, L. E. *Pyricularia* blast-a threat to wheat cultivation. **Czech J. Genet. Plant Breed**, v. 47, p. S130-134, 2011.

KOHORN, B. D.; KOHORN, S. L. The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin receptors. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, p. 88, 2012.

KOIDE, Y.; KOBAYASHI, N.; XU, D.; FUKUTA, Y. Resistance genes and selection DNA markers for Blast Disease in rice (*Oryza sativa* L.). **Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ**, v. 43, n. 4, p. 255–280, 2009.

KONISHI, S.; SASAKUMA, T.; SASANUMA, T. Identification of novel *Mlo* family members in wheat and their genetic characterization. **Genes & Genetic Systems**, v. 85, n. 3, p. 167–175, 2010.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distances from recombination values. **Annals of Eugenics**, v. 12, n. 1, p. 172–175, 1943.

KUROWSKA, M.; DASZKOWSKA-GOLEC, A.; GRUSZKA, D.; MARZEC, M.; SZURMAN, M.; SZAREJKO, I.; MALUSZYNSKI, M. TILLING - a shortcut in functional genomics. **Journal of Applied Genetics**, v. 52, n. 4, p. 371–390, 2011.

LARGE, E. C. Growth stages in cereals illustration of the feekes scale. **Plant Pathology**, v. 3, n. 4, p. 128–129, 1954.

LAU, D.; SANTANA, F. M.; MACIEL, J. L. N.; FERNADES, J. M. C.; COSTAMILAN, L. M.; CHAVES, M. S.; LIMA, M. I. P. M. Doenças de trigo no Brasil. In: PIRES, J. L. F.; VARGAS, L.; CUNHA, G. R. (Ed.). **Trigo no Brasil: bases para produção competitiva e sustentável**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2011. p. 283–323.

LI, H.; GOODWIN, P. H.; HAN, Q.; HUANG, L.; KANG, Z. Microscopy and proteomic analysis of the non-host resistance of *Oryza sativa* to the wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina* f. sp. *tritici*. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 4, p. 637–650, 2012.

LI, H.; ZHOU, S.-Y.; ZHAO, W.-S.; SU, S.-C.; PENG, Y.-L. A novel wall-associated receptor-like protein kinase gene, *OsWAK1*, plays important roles in rice blast disease resistance. **Plant Molecular Biology**, v. 69, n. 3, p. 337–346, 2009.

LI, W. L.; FARIS, J. D.; MUTHUKRISHNAN, S.; LIU, D. J.; CHEN, P. D.; GILL, B. S. Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinases and β -1,3-glucanases from wheat spikes infected by *Fusarium graminearum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, n. 2–3, p. 353–362, 2001.

LIU, B.; ZHANG, S.; ZHU, X.; YANG, Q.; WU, S.; MEI, M.; MAULEON, R.; LEACH, J.; MEW, T.; LEUNG, H. Candidate defense genes as predictors of quantitative Blast resistance in rice. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 10, p. 1146–1152, 2004.

LIU, G.; GREENSHIELDS, D. L.; SAMMYNAIKEN, R.; HIRJI, R. N.; SELVARAJ, G.; WEI, Y. Targeted alterations in iron homeostasis underlie plant defense responses. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 4, p. 596–605, 2007.

LIU, G.; SHENG, X.; GREENSHIELDS, D. L.; OGIEGLO, A.; KAMINSKYJ, S.; SELVARAJ, G.; WEI, Y. Profiling of wheat Class III Peroxidase genes derived from Powdery Mildew-attacked epidermis reveals distinct sequence-associated expression patterns. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, n. 7, p. 730–741, 2005.

LIU, J.-J.; STURROCK, R.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 5, p. 419–436, 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

MACIEL, J. L. N. *Magnaporthe oryzae*, the Blast Pathogen: current status and options for its control. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 6, n. 050, p. 1–8, 2011.

MACIEL, J. L. N.; CERESINI, P. C.; CASTROAGUDIN, V. L.; ZALA, M.; KEMA, G. H. J.; MCDONALD, B. A. Population structure and pathotype diversity of the Wheat Blast pathogen *Magnaporthe oryzae* 25 years after its emergence in Brazil. **Phytopathology**, v. 104, n. 1, p. 95–107, 2014.

MACIEL, J. L. N.; DANELLI, A. L. D.; BOARETTO, C.; FORCELINI, C. A. Diagrammatic scale for the assessment of blast on wheat spikes. **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 3, p. 162–166, 2013.

MACIEL, J. L. N.; PALUDO, E. A.; SÓ E SILVA, M.; SCHEEREN, P. L.; CAIERÃO, E. **Reação à brusone de genótipos de trigo do programa de melhoramento da Embrapa Trigo no estágio de planta adulta**. 2008. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2008.

MAIA, N. Obtention des bles tendres résistants au piétin-verse par croisements interspécifiques bles x *Aegilops*. **Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France**, v. 53, p. 149–154, 1967.

MALAKER, P. K.; BARMA, N. C. D.; TIWARI, T. P.; COLLIS, W. J.; DUVEILLER, E.; SINGH, P. K.; JOSHI, A. K.; SINGH, R. P.; BRAUN, H.-J.; PETERSON, G. L.; PEDLEY, K. F.; FARMAN, M. L.; VALENT, B. First report of Wheat Blast caused by *Magnaporthe oryzae* Pathotype *Triticum* in Bangladesh. **Plant Disease**, v. 100, n. 11, p. 2330, 2016.

MAOR, R.; SHIRASU, K. The arms race continues: battle strategies between plants and fungal pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 399–404, 2005.

MARONE, D.; RUSSO, M.; LAIDÒ, G.; DE LEONARDIS, A.; MASTRANGELO, A. Plant Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeat (NBS-LRR) Genes: Active

Guardians in Host Defense Responses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 7302–7326, 2013.

MARTÍNEZ, S. I.; SANABRIA, A.; FLEITAS, M. C.; CONSOLO, V. F.; PERELLÓ, A. Wheat blast: aggressiveness of isolates of *Pyricularia oryzae* and effect on grain quality. **Journal of King Saud University - Science**, v. 31, n. 2, p. 150-157, 2019.

MAUCH, F.; REIMMANN, C.; FREYDL, E.; SCHAFFRATH, U.; DUDLER, R. Characterization of the rice pathogen-related protein Rirla and regulation of the corresponding gene. **Plant Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 577–586, 1998.

MCCARTHY, D. J.; CHEN, Y.; SMYTH, G. K. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 10, p. 4288–4297, 2012.

MENDIBURU, F. de. **Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research**, 2017. R package version 1.2-8. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>

MENG, L.; LI, H.; ZHANG, L.; WANG, J. QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations. **The Crop Journal**, v. 3, n. 3, p. 269–283, 2015.

MESTERHAZY, A. Types and components of resistance to Fusarium head blight of wheat. **Plant Breeding**, v. 114, n. 5, p. 377–386, 1995.

MIAH, G.; RAFII, M. Y.; ISMAIL, M. R.; PUTEH, A. B.; RAHIM, H. A.; ASFALIZA, R.; LATIF, M. A. Blast resistance in rice: a review of conventional breeding to molecular approaches. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 3, p. 2369–2388, 2013.

MOCHIDA, K.; YOSHIDA, T.; SAKURAI, T.; OGIHARA, Y.; SHINOZAKI, K. TriFLDB: A database of clustered full-length coding sequences from Triticeae with applications to comparative grass genomics. **Plant Physiology**, v. 150, n. 3, p. 1135–1146, 2009.

NEWTON, A. C.; GRAVOUIL, C.; FOUNTAINE, J. M. Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. **Annals of Applied Biology**, v. 157, n. 3, p. 343–359, 2010.

NGA, N. T. T.; HAU, V. T. B.; TOSA, Y. Identification of genes for resistance to a *Digitaria* isolate of *Magnaporthe grisea* in common wheat cultivars. **Genome**, v. 52, n. 9, p. 801–809, 2009.

OLIVEIRA, D. M. de; SOUZA, M. A. de; ROCHA, V. S.; ASSIS, J. C. de. Desempenho de genitores e populações segregantes de trigo sob estresse de calor. **Bragantia**, v. 70, n. 1, p. 25–32, 2011.

OU, S. H. Pathogen variability and host resistance in Rice Blast disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 18, n. 1, p. 167–187, 1980.

PAGANI, A. P. S.; DIANESE, A. C.; CAFÉ-FILHO, A. C. Management of wheat blast with synthetic fungicides, partial resistance and silicate and phosphite minerals. **Phytoparasitica**, v. 42, n. 5, p. 609–617, 2014.

PARLEVLIET, J. E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. **Annual Review of Phytopathology**, v. 17, n. 1, p. 203–222, 1979.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. p. 704.

PASINATO, A.; CUNHA, G. R. da; FONTANA, D. C.; MONTEIRO, J. E. B. de A.; NAKAI, A. M.; OLIVEIRA, A. F. de. Potential area and limitations for the expansion of rainfed wheat in the Cerrado biome of Central Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 7, p. 779–790, 2018.

PEÑA, R. J. Wheat for bread and other foods. In: **Bread Wheat**. Rome: FAO, 2002. p. 19–37.

PENG, H.; ZHANG, Q.; LI, Y.; LEI, C.; ZHAI, Y.; SUN, X.; SUN, D.; SUN, Y.; LU, T. A putative leucine-rich repeat receptor kinase, OsBRR1, is involved in rice blast resistance. **Planta**, v. 230, n. 2, p. 377–385, 2009.

PFLIEGER, S.; LEFEBVRE, V.; CAUSSE, M. The candidate gene approach in plant genetics: a review. **Molecular breeding**, v. 7, n. 4, p. 275–291, 2001.

PIANA, C. F. B.; CARVALHO, F. I. F. Trigo: A cultura que deu suporte a civilização. In: BARBIERE, R. L.; STUMPF, E. R. T. (Ed.). **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 819–852.

PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. C. Ocorrência da brusone (*Pyricularia oryzae*) em lavouras comerciais de trigo (*Triticum aestivum*) no estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 83–84, 1990.

PIRON, F.; NICOLAÏ, M.; MINOÏA, S.; PIEDNOIR, E.; MORETTI, A.; SALGUES, A.; ZAMIR, D.; CARANTA, C.; BENDAHMANE, A. An Induced Mutation in Tomato eIF4E Leads to Immunity to Two Potyviruses. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. e11313, 2010.

PIZOLOTTO, C. A.; MACIEL, J. L. N.; FERNANDES, J. M. C.; BOLLER, W. Saprotrophic survival of *Magnaporthe oryzae* in infested wheat residues. **European Journal of Plant Pathology**, v. 153, n. 2, p. 327–339, 2019.

PIZOLOTTO, C. A.; MACIEL, J. L. N.; FERNANDES, J. M. C.; FERREIRA, J. R.; TORRES, G. A. M.; CONSOLI, L.; BOLLER, W. Reação à brusone de genótipos de trigo portadores da translocação 2NS/AS de *Aegilops ventricosa*. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 11.; FÓRUM NACIONAL DE TRIGO, 2017, Cascavel. **Resumos expandidos...**, Cascavel: Coodetec, 2017. p. 151-155.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; CASTRO, N. Pathogenic variation among isolates of *Pyricularia oryzae* affecting rice, wheat, and grasses in Brazil. **Tropical Pest Management**, v. 38, n. 4, p. 367–371, 1992.

PRESTES, A. M.; ARENDT, P. F.; FERNANDES, J. M. C.; SCHEEREN, P. L. Resistance to *Magnaporthe grisea* among Brazilian wheat genotypes. In: BUCK, H. T.; NISI, J. E.; SALOMÓN, N. (Ed.). **Wheat production in stressed environments**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 119–123.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria, 2018. URL <https://www.R-project.org/>

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H. L.; MOORMAN, A. F. . Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62–66, 2003.

RAWAT, N.; SEHGAL, S. K.; JOSHI, A.; ROTHE, N.; WILSON, D. L.; MCGRAW, N.; VADLANI, P. V.; LI, W.; GILL, B. S. A diploid wheat TILLING resource for wheat functional genomics. **BMC Plant Biology**, v. 12, n. 1, p. 205, 2012.

RCBPTT - REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 1., 2007. **Informações técnicas para a safra 2008: trigo e triticale**. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 147 p. (Embrapa Soja. Documentos, 301)

RCBPTT - REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 11., 2018, Cascavel. **Informações técnicas para trigo e triticale - safra 2018**. Cascavel: Comissão de Pesquisa de Trigo e Triticale. 2018a. 258 p.

RCBPTT - REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 12., 2018, Passo Fundo. **Informações técnicas para trigo e triticale - safra 2019**. Brasília, DF: Embrapa. 2018b. 240 p.

RCBPTT - REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 5., 2011, Dourados. **Informações técnicas para trigo e triticale - safra 2012**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2011. 204 p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistema de produção, 9).

RCCSBPTT - REUNIÃO DA COMISSÃO CENTRO-SUL BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 20., 2005, Londrina. **Informações técnicas da Comissão Centro-Sul Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale para a safra de 2005**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 234 p. (Embrapa Soja. Sistemas de produção, 7).

RCSBPTT - REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 38.; REUNIÃO DA COMISSÃO CENTRO-SUL BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 21., 2006, P. F. **Informações técnicas para a safra 2007: trigo e triticale**. Passo Fundo: Embrapa Trigo: Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale: Comissão Centro-Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale, 2007. 114 p. (Embrapa Trigo. Documentos, 71).

RIBOT, C.; HIRSCH, J.; BALZERGUE, S.; THARREAU, D.; NOTTÉGHEM, J.-L.; LEBRUN, M.-H.; MOREL, J.-B. Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 114–124, 2008.

RIOS, J. A.; RIOS, V. S.; PAUL, P. A.; SOUZA, M. A.; ARAUJO, L.; RODRIGUES, F. A. Fungicide and cultivar effects on the development and temporal progress of wheat blast under field conditions. **Crop Protection**, v. 89, p. 152–160, 2016.

RIOS, J. A.; RIOS, V. S.; PAUL, P. A.; SOUZA, M. A.; NETO, L. B. M. C.; RODRIGUES, F. A. Effects of blast on components of wheat physiology and grain yield as influenced by fungicide treatment and host resistance. **Plant Pathology**, v. 66, n. 6, p. 877–889, 2017.

ROBERT, O.; ABELARD, C.; DEDRYVER, F. Identification of molecular markers for the detection of the yellow rust resistance gene *Yr17* in wheat. **Molecular Breeding**, v. 5, n. 2, p. 167–175, 1999.

ROCHA, J. R. do A. S. de C.; PIMENTEL, A. J. B.; RIBEIRO, G.; SOUZA, M. A. de. Eficiência de fungicidas no controle da brusone em trigo. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 4, p. 347–352, 2014.

RÖDER, M. S.; KORZUN, V.; WENDEHAKKE, K.; PLASCHKE, J.; TIXIER, M.-H.; LEROY, P.; GANAL, M. W. A microsatellite map of wheat. **Genetics**, v. 149, n. 4, p. 2007 LP-2023, 1998.

RONALD, P. C.; BEUTLER, B. Plant and animal sensors of conserved microbial signatures. **Science**, v. 330, n. 6007, p. 1061–1064, 2010.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 24, p. 8014–8018, 1984.

SANTANA, F. M.; MACIEL, J. L. N.; LAU, D.; CARGNIN, A.; SEIXAS, C. D. S.; BASSOI, M. C.; GOULART, A. C. P.; SUSSEL, A. A. B.; SCHIPANSKI, C. A.; MONTECELLI, T. D. N.; CHAGAS, J. H.; GUIZELINE, J. **Eficiência de fungicidas para o controle da brusone do trigo: resultados dos ensaios cooperativos - safra 2011**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2013. 20 p. html. (Embrapa Trigo. Comunicado Técnico online, 328). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co328.htm>. Acesso em: 02 mai. 2019.

SASAKI, K.; IWAI, T.; HIRAGA, S.; KURODA, K.; SEO, S.; MITSUHARA, I.; MIYASAKA, A.; IWANO, M.; ITO, H.; MATSUI, H.; OHASHI, Y. Ten rice peroxidases redundantly respond to multiple stresses including infection with Rice Blast Fungus. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 10, p. 1442–1452, 2004.

SCHEEREN, P. L.; CAIERÃO, E.; SILVA, M. S.; BONOW, S. Melhoramento de trigo no Brasil. In: PIRES, J. L. F.; VARGAS, L.; CUNHA, G. R. (Ed.). **Trigo no Brasil**:

bases para produção competitiva e sustentável. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2011. p. 427–452.

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

SCHWEIZER, P.; HUNZIKER, W.; MÖSINGER, E. cDNA cloning, in vitro transcription and partial sequence analysis of mRNAs from winter wheat (*Triticum aestivum* L.) with induced resistance to *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. **Plant Molecular Biology**, v. 12, n. 6, p. 643–654, 1989.

SEHGAL, D.; SINGH, R.; RAJPAL, V. R. Quantitative Trait Loci mapping in plants: concepts and approaches. In: RAJPAL, V. R.; RAO, S. R.; RAINA, S. N. (Ed.). **Molecular Breeding for Sustainable Crop Improvement..** Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 31-59.

SERFLING, A.; TEMPLER, S. E.; WINTER, P.; ORDON, F. Microscopic and molecular characterization of the prehaustorial resistance against Wheat Leaf Rust (*Puccinia triticina*) in Einkorn (*Triticum monococcum*). **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1668, 2016.

SESTILI, F.; BOTTICELLA, E.; BEDO, Z.; PHILLIPS, A.; LAFIANDRA, D. Production of novel allelic variation for genes involved in starch biosynthesis through mutagenesis. **Molecular Breeding**, v. 25, n. 1, p. 145–154, 2010.

SESTILI, F.; PALOMBIERI, S.; BOTTICELLA, E.; MANTOVANI, P.; BOVINA, R.; LAFIANDRA, D. TILLING mutants of durum wheat result in a high amylose phenotype and provide information on alternative splicing mechanisms. **Plant Science**, v. 233, p. 127–133, 2015.

SHARMA, T. R.; RAI, A. K.; GUPTA, S. K.; VIJAYAN, J.; DEVANNA, B. N.; RAY, S. Rice blast management through host-plant resistance: retrospect and prospects. **Agricultural Research**, v. 1, n. 1, p. 37–52, 2012.

SHIMONO, M.; YAZAKI, J.; NAKAMURA, K.; KISHIMOTO, N.; KIKUCHI, S.; IWANO, M.; YAMAMOTO, K.; SAKATA, K.; SASAKI, T.; NISHIGUCHI, M. cDNA microarray analysis of gene expression in rice plants treated with probenazole, a chemical inducer of disease resistance. **Journal of General Plant Pathology**, v. 69, n. 1, p. 76–82, 2003.

SILVA, C. P.; NOMURA, E.; FREITAS, E. G.; BRUGNARO, C.; URASHIMA, A. S. Eficiência de tratamentos alternativos no controle de *Pyricularia grisea* em sementes de trigo. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 2, p. 127–131, 2009.

SINGH, A. K.; SINGH, P. K.; ARYA, M.; SINGH, N. K.; SINGH, U. S. Molecular screening of blast resistance genes in rice using SSR markers. **The Plant Pathology Journal**, v. 31, n. 1, p. 12–24, 2015.

SINGH, A.; ISAAC KIRUBAKARAN, S.; SAKTHIVEL, N. Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat. **Protein Expression and Purification**, v. 56, n. 1, p. 100–109, 2007.

SKAMNIOTI, P.; GURR, S. J. Against the grain: safeguarding rice from rice blast disease. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 141–150, 2009.

SLADE, A. J.; FUERSTENBERG, S. I.; LOEFFLER, D.; STEINE, M. N.; FACCIOTTI, D. A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 75–81, 2005.

SLADE, A. J.; MCGUIRE, C.; LOEFFLER, D.; MULLENBERG, J.; SKINNER, W.; FAZIO, G.; HOLM, A.; BRANDT, K. M.; STEINE, M. N.; GOODSTAL, J. F.; KNAUF, V. C. Development of high amylose wheat through TILLING. **BMC Plant Biology**, v. 12, n. 1, p. 69, 2012.

SÓ E SILVA, M. Trigo no Brasil começa nos Cerrados. In: CUNHA, G. R. (Ed.). **Trigo no Brasil: história e tecnologia de produção**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. p. 103–108.

SÓ E SILVA, M.; DEL DUCA, L. de J. A.; SCHEEREN, P. L.; SOUSA, C. N. A. de; LINHARES, A. G.; NASCIMENTO JUNIOR, A. do; EICHELBERGER, L.; CAIERÃO, E.; PIRES, J. L.; CHAVES, M. S.; COSTAMILAN, L. M.; PRESTES, A. M.; LIMA, M. I. P. M.; MIRANDA, M. Z. de; GUARIENTI, E. M.; VOSS, M.; LUZ, W. C. da; LHAMBY, J. C. B. **Cultivar de trigo BRS Angico testada e indicada para cultivo nas regiões de adaptação 7 e 8 do Paraná**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2005.

SOMERS, D. J.; ISAAC, P.; EDWARDS, K. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, n. 6, p. 1105–1114, 2004.

SOUSA, C. N. A.; CAIERÃO, E. **Cultivares de trigo indicadas para cultivo no Brasil e Instituições criadoras 1922 a 2014**. 2. ed. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2014.

SOUSA, P. G. BR 18-Terena: cultivar de trigo para o Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 7, p. 1039–1043, 2002.

SRIVASTAVA, D.; SHAMIM, M.; KUMAR, M.; MISHRA, A.; PANDEY, P.; KUMAR, D.; YADAV, P.; SIDDIQUI, M. H.; SINGH, K. N. Current status of conventional and molecular interventions for blast resistance in rice. **Rice Science**, v. 24, n. 6, p. 299–321, 2017.

ST.CLAIR, D. A. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, n. 1, p. 247–268, 2010.

SUZUKI, T.; EIGUCHI, M.; KUMAMARU, T.; SATOH, H.; MATSUSAKA, H.; MORIGUCHI, K.; NAGATO, Y.; KURATA, N. MNU-induced mutant pools and high performance TILLING enable finding of any gene mutation in rice. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 279, n. 3, p. 213–223, 2008.

TAGLE, A. G.; CHUMA, I.; TOSA, Y. *Rmg7*, a new gene for resistance to *triticum* isolates of *Pyricularia oryzae* identified in tetraploid wheat. **Phytopathology**, v. 105, n. 4, p. 495–499, 2015.

TAHERI, S.; ABDULLAH, T. L.; JAIN, S. M.; SAHEBI, M.; AZIZI, P. TILLING, high-resolution melting (HRM), and next-generation sequencing (NGS) techniques in plant mutation breeding. **Molecular Breeding**, v. 37, n. 3, p. 40, 2017.

TAKABAYASHI, N.; TOSA, Y.; OH, H. S.; MAYAMA, S. A gene-for-gene relationship underlying the species-specific parasitism of *Avena/Triticum* isolates of *Magnaporthe grisea* on wheat cultivars. **Phytopathology**, v. 92, n. 11, p. 1182–1188, 2002.

TALBOT, N. J. On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 177–202, 2003.

TANWEER, F. A.; RAFII, M. Y.; SIJAM, K.; RAHIM, H. A.; AHMED, F.; LATIF, M. A. Current advance methods for the identification of blast resistance genes in rice. **Comptes Rendus Biologies**, v. 338, n. 5, p. 321–334, 2015.

THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D331–D338, 2017.

TOLEDO, J. Enfermedades. In: Díaz, O.; Guzmán, E.; Toledo, J.; Franco, P.; Terrazas, D.; Antezana, A. (Ed.). **Guía de recomendaciones técnicas del cultivo de trigo**. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia, 2004. p. 36-45.

TOR, M.; LOTZE, M. T.; HOLTON, N. Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 13, p. 3645-3654, 2009.

TORRES, G. A. M.; CONSOLI, L.; GONZÁLES, H. H. S.; BINNECK, E.; DIANESE, A. de C.; SEIXAS, C. D. S.; GOULART, A. C. P.; SANTANA, F. M.; WEBBER, N. F.; COELHO, M. A. O.; SCAGLIUSI, S. M. M.; NHANI JUNIOR, A.; BONATO, A. L. V.; NICOLAU, M.; BONOW, S. Blast (*Magnaporthe oryzae*), a potential threat to wheat production in South America. In: SEMINARIO INTERNACIONAL: 1914-2014, UN SIGLO DE MEJORAMIENTO DE TRIGO EN LA ESTANZUELA, 2014, La Estanzuela, Uruguay. [Anales...]. Montevideo: INIA, 2018. p. 167-175. (INIA. Serie técnica, 241). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/188533/1/2018SeminaroINIAP167.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

TORRES, G. A. M.; GONZÁLES, H. H. S.; WEBBER, N. F.; SCHERER, H. M. **Tipos de lesão de brusone em trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2015. 10 p. (Embrapa Trigo. Comunicado técnico online, 346). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/133610/1/ID-43389-2015-CTO346.pdf>>. Acesso em: 9 dez. 2018.

TORRES, G. A. M.; SANTANA, F. M.; FERNANDES, J. M. C.; SÓ E SILVA, M. **Doenças da espiga causam perda de rendimento em trigo nos estados do Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul, em 2009**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. 10 p. html. (Embrapa Trigo. Comunicado técnico online, 255). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPT-2010/40745/1/p-co255.pdf>>. Acesso em: 9 dez. 2018.

TRIQUES, K.; STURBOIS, B.; GALLAIS, S.; DALMAIS, M.; CHAUVIN, S.; CLEPET, C.; AUBOURG, S.; RAMEAU, C.; CABOCHE, M.; BENDAHMANE, A. Characterization of *Arabidopsis thaliana* mismatch specific endonucleases: application to mutation discovery by TILLING in pea. **The Plant Journal**, v. 51, n. 6, p. 1116–1125, 2007.

TUFAN, H. A.; MCGRANN, G. R. D.; MACCORMACK, R.; BOYD, L. A. TaWIR1 contributes to post-penetration resistance to *Magnaporthe oryzae*, but not *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, in wheat. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 7, p. 653–665, 2012.

TUFAN, H. A.; MCGRANN, G. R. D.; MAGUSIN, A.; MOREL, J.-B.; MICHÉ, L.; BOYD, L. A. Wheat blast: histopathology and transcriptome reprogramming in response to adapted and nonadapted *Magnaporthe* isolates. **New Phytologist**, v. 184, n. 2, p. 473–484, 2009.

UAUY, C.; PARAISO, F.; COLASUONNO, P.; TRAN, R. K.; TSAI, H.; BERARDI, S.; COMAI, L.; DUBCOVSKY, J. A modified TILLING approach to detect induced mutations in tetraploid and hexaploid wheat. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 115, 2009.

URASHIMA, A. S.; GROSSO, C. R. F.; STABILI, A.; FREITAS, E. G.; SILVA, C. P.; NETTO, D. C. S.; FRANCO, I.; BOTTAN, J. H. M. Effect of *Magnaporthe grisea* on seed germination, yield and quality of wheat. In: WANG, G.-L.; VALENT, B. (Ed.). **Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. p. 267–277.

URASHIMA, A. S.; IGARASHI, S.; KATO, H. Host range, mating type, and fertility of *Pyricularia grisea* from wheat in Brazil. **Plant Disease**, v. 77, n. 12, p. 1211–1216, 1993.

URASHIMA, A. S.; KATO, H. Varietal resistance and chemical control of wheat blast fungus. **Summa Phytopathologica**, v. 20, n. 2, p. 107–112, 1994.

URASHIMA, A. S.; LAVORENT, N. A.; GOULART, A. C. P.; MEHTA, Y. R. Resistance spectra of wheat cultivars and virulence diversity of *Magnaporthe grisea* isolates in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 511–518, 2004.

URASHIMA, A. S.; LEITE, S. F.; GALBIERI, R. Eficiência da disseminação aérea em *Pyricularia grisea*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 3, p. 275–279, 2007.

USDA. **Wheat: world markets and trade**. 2019 Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain-wheat.pdf>>. Acesso em: 03 fev 2019

VALENT, B.; FARMAN, M.; TOSA, Y.; BEGEROW, D.; FOURNIER, E.; GLADIEUX, P.; ISLAM, M. T.; KAMOUN, S.; KEMLER, M.; KOHN, L. M.; LEBRUN, M.-H.; STAJICH, J. E.; TALBOT, N. J.; TERAUCHI, R.; THARREAU, D.; ZHANG, N. *Pyricularia graminis-tritici* is not the correct species name for the wheat

blast fungus: response to Ceresini et al. (MPP 20:2). **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 2, p. 173–179, 2019.

VALENT, B.; FARRALL, L.; CHUMLEY, F. G. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. **Genetics**, v. 127, n. 1, p. 87-101, 1991.

VAN GINKEL, M.; TRETOWAN, R. M.; AMMAR, K.; WANG, J.; LILLEMO, M. **Guide to bread wheat breeding at CIMMYT**. Mexico, D.F.: CIMMYT, 2002. 52 p. (CIMMYT. Wheat special report, 5).

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, n. 1, p. 135–162, 2006.

VANEGAS, C. D. G.; GARVIN, D. F.; KOLMER, J. A. Genetics of stem rust resistance in the spring wheat cultivar Thatcher and the enhancement of stem rust resistance by *Lr34*. **Euphytica**, v. 159, n. 3, p. 391–401, 2008.

VÁRALLYAY, É.; GICZEY, G.; BURGYÁN, J. Virus-induced gene silencing of *Mlo* genes induces powdery mildew resistance in *Triticum aestivum*. **Archives of Virology**, v. 157, n. 7, p. 1345–1350, 2012.

VAVILIN, D. V.; VERMAAS, W. F. J. Regulation of the tetrapyrrole biosynthetic pathway leading to heme and chlorophyll in plants and cyanobacteria. **Physiologia Plantarum**, v. 115, n. 1, p. 9–24, 2002.

VERBON, E. H.; TRAPET, P. L.; STRINGLIS, I. A.; KRUIJS, S.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Iron and Immunity. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, n. 1, p. 355–375, 2017.

VLEESHOUWERS, V. G. A. A.; OLIVER, R. P. Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, n. 3, p. 196–206, 2014.

VOORRIPS, R. E. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **Journal of Heredity**, v. 93, n. 1, p. 77–78, 2002.

VOSS-FELS, K.; FRISCH, M.; QIAN, L.; KONTOWSKI, S.; FRIEDT, W.; GOTTWALD, S.; SNOWDON, R. J. Subgenomic diversity patterns caused by directional selection in bread wheat gene pools. **The Plant Genome**, v. 8, n. 2, 2015.

VSN INTERNATIONAL. **GenStat for Windows (18th Edition)**. Hemel Hempstead, UK., 2015. .

VY, T. T. P.; HYON, G.-S.; NGA, N. T. T.; INOUE, Y.; CHUMA, I.; TOSA, Y. Genetic analysis of host–pathogen incompatibility between *Lolium* isolates of *Pyricularia oryzae* and wheat. **Journal of general plant pathology**, v. 80, n. 1, p. 59–65, 2014.

WAGNER, T. A.; KOHORN, B. D. Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. **The Plant Cell**, v. 13, n. 2, p. 303, 2001.

WANG, B.; EBBOLE, D. J.; WANG, Z. The arms race between *Magnaporthe oryzae* and rice: Diversity and interaction of Avr and R genes. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, n. 12, p. 2746–2760, 2017.

WANG, G. L.; MACKILL, D. J.; BONMAN, J. M.; MCCOUCH, S. R.; CHAMPOUX, M. C.; NELSON, R. J. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. **Genetics**, v. 136, n. 4, p. 1421–1434, 1994.

WANG, G.-L.; VALENT, B. Durable resistance to rice blast. **Science**, v. 355, n. 6328, p. 906–907, 2017.

WANG, J.; LI, H.; ZHANG, L.; MENG, L. **Users' manual of QTL IciMapping**. The Quantitative Genetics Group, Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Beijing 100081, China, and Genetic Resources Program, International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Apdo. Postal 6-641, 06600 Mexico, D.F., Mexico. 2016.

WANG, N.; SHI, L. Screening of mutations by TILLING in plants. In: BATLEY, J. (Ed.). **Plant Genotyping**. New York, NY: Springer New York, 2015. p. 193–203.

WANG, S.; ASUKE, S.; VY, T. T. P.; INOUE, Y.; CHUMA, I.; WIN, J.; KATO, K.; TOSA, Y. A new resistance gene in combination with *Rmg8* confers strong resistance against *Triticum* isolates of *Pyricularia oryzae* in a common wheat landrace. **Phytopathology**, v. 108, n. 11, p. 1299–1306, 2018.

WANG, T. L.; UAUY, C.; ROBSON, F.; TILL, B. TILLING in extremis. **Plant Biotechnology Journal**, v. 10, n. 7, p. 761–772, 2012.

WANG, X.; LEE, S.; WANG, J.; MA, J.; BIANCO, T.; JI, Y. Current advances on genetic resistance to rice blast disease. In: LEE, S. (Ed.). **Rice - Germplasm, Genetics and Improvement**. Rijeka: InTech, 2014. p. Ch. 7.

WEN, W.; HE, Z.; GAO, F.; LIU, J.; JIN, H.; ZHAI, S.; QU, Y.; XIA, X. A high-density consensus map of common wheat integrating four mapping populations scanned by the 90K SNP Array. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1389, 2017.

WILLIAMSON, V. M.; THOMAS, V.; FERRIS, H.; DUBCOVSKY, J. An translocation confers resistance against root-knot nematodes to common wheat. **Crop Science**, v. 53, n. 4, p. 1412, 2013.

WINFIELD, M. O.; ALLEN, A. M.; BURRIDGE, A. J.; BARKER, G. L. A.; BENBOW, H. R.; WILKINSON, P. A.; COGHILL, J.; WATERFALL, C.; DAVASSI, A.; SCOPES, G.; PIRANI, A.; WEBSTER, T.; BREW, F.; BLOOR, C.; KING, J.; WEST, C.; GRIFFITHS, S.; KING, I.; BENTLEY, A. R.; Edwards, K. J. High-density SNP genotyping array for hexaploid wheat and its secondary and tertiary gene pool. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 5, p. 1195–1206, 2016.

YAN, L.; MA, Y.; LIU, D.; WEI, X.; SUN, Y.; CHEN, X.; ZHAO, H.; ZHOU, J.; WANG, Z.; SHUI, W.; LOU, Z. Structural basis for the impact of phosphorylation on the activation of plant receptor-like kinase BAK1. **Cell Research**, v. 22, n. 8, p. 1304–1308, 2012.

YANG, K.; RONG, W.; QI, L.; LI, J.; WEI, X.; ZHANG, Z. Isolation and characterization of a novel wheat cysteine-rich receptor-like kinase gene induced by *Rhizoctonia cerealis*. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 3021, 2013.

YASUDA, N.; MITSUNAGA, T.; HAYASHI, K.; KOIZUMI, S.; FUJITA, Y. Effects of pyramiding quantitative resistance genes *pi21*, *Pi34*, and *Pi35* on rice leaf blast disease. **Plant Disease**, v. 99, n. 7, p. 904–909, 2015.

YEH, Y.-H.; CHANG, Y.-H.; HUANG, P.-Y.; HUANG, J.-B.; ZIMMERLI, L. Enhanced Arabidopsis pattern-triggered immunity by overexpression of cysteine-rich receptor-like kinases. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 322, 2015.

ZADOKS, J. C.; CHANG, T. T.; KONZAK, C. F. A decimal code for the growth stages of cereals. **Weed Research**, v. 14, n. 6, p. 415–421, 1974.

ZENG, Q.; WU, J.; HUANG, S.; YUAN, F.; LIU, S.; WANG, Q.; MU, J.; YU, S.; CHEN, L.; HAN, D.; KANG, Z. SNP-based linkage mapping for validation of adult plant stripe rust resistance QTL in common wheat cultivar Chakwal 86. **The Crop Journal**, v. 7, n. 2, p. 176-186, 2019.

ZHAN, S. W.; MAYAMA, S.; TOSA, Y. Identification of two genes for resistance to *Triticum* isolates of *Magnaporthe oryzae* in wheat. **Genome**, v. 51, n. 3, p. 216–221, 2008.

ZHANG, N.; LUO, J.; ROSSMAN, A. Y.; AOKI, T.; CHUMA, I.; CROUS, P. W.; DEAN, R.; DE VRIES, R. P.; DONOFRIO, N.; HYDE, K. D.; LEBRUN, M.-H.; TALBOT, N. J.; THARREAU, D.; TOSA, Y.; VALENT, B.; WANG, Z.; XU, J.-R. Generic names in Magnaporthales. **IMA Fungus**, v. 7, n. 1, p. 155–159, 2016.

ZHANG, S.; CHEN, C.; LEI, L.; LING, M.; JASWINDER, S.; NING, J.; XING-WANG, D.; ZHENG-HUI, H.; PEGGY G., L. Evolutionary expansion, gene structure, and expression of the rice wall-associated kinase gene family. **Plant Physiology**, v. 139, n. 3, p. 1107–1124, 2005.

ZHAO, G. Phytoferritin and its implications for human health and nutrition. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1800, n. 8, p. 815–823, 2010.

ANEXOS

Anexo I - Meio para cultura de isolados de *Magnaporthe oryzae*

Meio para cultura de isolados de *Magnaporthe oryzae*

Preparo para 1 L de *Complete Media Agar 1,5%*

NaNO ₃	6 g	} Ajustar para pH 6.5 com NaOH
KCl	0,52 g	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,52 g	
KH ₂ PO ₄	1,52 g	
Micronutrientes (1mL do estoque, descrição abaixo)	0,10%	
D-Glicose	10 g	
Peptona	2 g	
Extrato de levedura	1 g	
Ácidos de casamino	1 g	
Solução de vitamina (descrição abaixo)	1 mL	
Ágar	15 g	

Micronutrientes (1000X)

H ₂ O	80 mL	} Adicionar cada um em ordem e ferver. Resfriar até a temperatura de 60°C e ajustar para pH 6.5 com KOH. Quando estiver em temperatura ambiente ajustar o volume para 100 mL
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,2 g	
H ₃ BO ₃	1,1 g	
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,5 g	
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,17 g	
CuSO ₄ .2H ₂ O	0,16 g	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,15 g	
Na ₄ EDTA	5 g	

Solução de vitamina (100mL)

Biotina	0,01 g	} Estocar em garrafa de vidro escura a 4°C
Piridoxina (vit. B6)	0,01 g	
Tiamina (vit. B1)	0,01 g	
Riboflavina (vit. B2)	0,01 g	
PABA (ácido para-aminobenzóico)	0,01 g	
Ácido nicotínico	0,01 g	



PPGAgro

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV