

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

**Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Pyrenophora tritici-repentis* e reação de genótipos de trigo para mancha-amarela-da-folha**

Victória Vieira Bertagnolli

Passo Fundo

2018

Victória Vieira Bertagnolli

Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Pyrenophora tritici-repentis* e reação de genótipos de trigo para mancha-amarela-da-folha

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:  
Carolina Cardoso Deuner

Passo Fundo

2018

CIP – Catalogação na Publicação

---

B536c Bertagnolli, Victória Vieira  
Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de  
*Pyrenophora tritici-repentis* e reação de genótipos de trigo  
para mancha-amarela-da-folha / Victória Vieira Bertagnolli.  
– 2018.  
109 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Carolina Cardoso Deuner.  
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de  
Passo Fundo, 2018.

1. Trigo. 2. *Pyrenophora tritici-repentis*. 3. Plantas -  
Parasitos. I. Deuner, Carolina Cardoso, orientadora. II. Título.

CDU: 633.11

## ATA DE DEFESA DE TESE



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

"Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Pyrenophora tritici-repentis* e reação de genótipos de trigo para mancha-amarela-da-folha".

Elaborada por

Victória Vieira Bertagnolli

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

Aprovada em: 06/09/2018  
Pela Comissão Examinadora

**Dra. Carolina Cardoso Deuner**  
Presidente da Comissão Examinadora  
Orientadora

**Dr. Paulo Kuhnem**  
Biotrigo

**Dra. Camila Ranzi**  
Instituto Federal do Rio Grande do Sul  
Campus Ibirubá

**Dr. Edson Campanhola Bortoluzzi**  
Coordenador PPGAgro

**Dr. Leandro José Dallagnol**  
UFPeI

**Dr. André Cunha Rosa**  
Biotrigo

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

## **DEDICATÓRIA**

Dedido à minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela minha saúde, de espírito e do corpo, indispensável para enfrentar qualquer desafio.

Aos meus pais por estarem sempre presentes, me darem amor e segurança em todas etapas da minha vida.

Aos meus irmãos por me incentivarem e participarem de todas as minhas escolhas.

Ao meu marido, por me mostrar como enfrentar com objetividade e praticidade todos os desafios, e à sua família, por me darem apoio em todas as etapas do curso.

À toda minha família, incluindo avós, tios, sobrinhos, cunhadas e primos, pela alegria que representam à minha vida, e em especial ao meu primo Me. Augusto Bittencourt Vieira, por estar sempre disposto para me ajudar.

À professora orientadora, Dra. Carolina Cardoso Deuner, pelo estímulo e motivação constantes ao longo deste prazeroso convívio, além de sua dedicação, incentivo e amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/UPF pelos conhecimentos compartilhados.

À secretaria do Programa, nas pessoas de Patrícia Rizzardi e Danieli Gugel De Oliveira Dall'Agnol, pela ajuda constante nas diferentes etapas do curso.

À CAPES, à UPF e ao PPGAgro, pela concessão da bolsa de estudos, pela oportunidade de realizar este curso e pela dedicação com que atendem seus pós-graduandos.

Aos estudantes de Agronomia, Pedro Bertagnolli Neto, Gabrieli Riva e Natália Bonês Benedetti, pela ajuda na execução dos experimentos, compreensão, amizade, dedicação e pelo esforço. Foram imprescindíveis para que as atividades fossem mais leves e felizes.

Aos pesquisadores, Dr. Zhaohui Liu e Dr. Justin Faris, pela oportunidade em poder conviver e aprender com as pessoas que mais entendem de mancha-amarela-da-folha no mundo.

À banca, Dr. André Cunha Rosa, Dra. Camila Ranzi, Dra. Carolina Cardoso Deuner, Dr. Leandro José Dallagnol e Dr. Paulo Kuhnem. Com certeza suas contribuições e orientações certificaram ainda mais a temática escolhida e o caminho a seguir.

Aos colaboradores do Laboratório de Fitopatologia da UPF, Me. Cinara Cardoso e Paulo Tirloni, pela colaboração e paciência.

Aos meus colegas, motivados pelo mesmo sentimento de amor e dedicação a área das Ciências Agrárias.

A todas as pessoas que fazem parte da minha história de vida e que à sua maneira especial estiveram comigo ao longo desta caminhada prazerosa em busca do tão desejado título de Doutora. Deus os abençoe sempre!

## **EPIGRAFE**

“Estar decidido, acima de qualquer coisa, é o segredo do êxito.” (Robert Collier)

## RESUMO

BERTAGNOLLI, Victória Vieira. Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Pyrenophora tritici-repentis* e reação de genótipos de trigo para mancha-amarela-da-folha. 2018. 109 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

A doença mancha-amarela-da-folha (MAF), cujo agente causal é *Pyrenophora tritici-repentis* (*Ptr*), é uma das doenças foliares mais importantes da cultura do trigo, por causar perdas e danos em diferentes regiões tritícolas do mundo. Tendo em vista que há escassez de informação sobre a estrutura de raças do Brasil e sobre fontes de resistência em genótipos brasileiros, este trabalho caracterizou fenotipicamente e genotipicamente isolados de *Ptr* e assim, descreveu genótipos de trigo com resistência as raças brasileiras de *Ptr* e às toxinas seletivas ao hospedeiro *Ptr* ToxA e *Ptr* ToxB. Os resultados foram apresentados e discutidos separadamente neste documento, em dois capítulos. Capítulo 1: Caracterização fenotípica e genotípica de raças de *Pyrenophora tritici-repentis* no Brasil. Isolados oriundos de folhas e sementes de trigo em diferentes regiões tritícolas do país foram inoculados sobre o conjunto diferencial de genótipos de trigo, incluindo Glenlea, 6B662, 6B365, Salamouni, ND-495 e BR 34. Os sintomas produzidos nas folhas foram observados e classificados em necrose, clorose ou resposta de resistência, e assim as raças foram designadas pela caracterização fenotípica. Em relação a caracterização genotípica, esta foi realizada pela amplificação dos genes responsáveis pela produção das toxinas seletivas ao hospedeiro *Ptr* ToxA e *Ptr* ToxB por *Polymerase Chain Reaction*. A caracterização fenotípica indica a raça 2 de *Ptr* como predominante no Brasil, seguido pela raça 1, e a caracterização genotípica confirma a presença do gene *ToxA* e ausência de *ToxB* por isolados brasileiros, corroborando com a caracterização fenotípica deste estudo. Capítulo 2: Resistência a *Pyrenophora tritici-repentis* em trigo comum. Foram avaliados 38 genótipos de trigo para os componentes de resistência: eficiência relativa de infecção, número final de lesões, comprimento final de lesão, expansão da lesão e tipo de lesão. Todos os componentes foram avaliados com inoculações das raças 1 e 2 de *Ptr*. Além disso, os genótipos foram avaliados para sensibilidade às toxinas *Ptr* ToxA e *Ptr* ToxB pela técnica de infiltração em folhas com seringa sem agulha. Os experimentos foram realizados em casa-de-vegetação e câmaras de crescimento. Testes estatísticos não paramétricos foram realizados para comparar cultivares entre raças, cultivares dentro das raças e para comparar a infiltração de toxinas com os componentes de resistência, utilizando em todos os testes o valor- $p < 0,050$ . Genótipos com resistência às raças 1 e 2 de *Ptr* foram observados, bem como o predomínio de genótipos insensíveis a *Ptr* ToxA e *Ptr* ToxB. FPS Virtude, BRS Parrudo, LG Cromo, Quartzo e TBIO Sossego são genótipos brasileiros adaptados estatisticamente superiores aos demais para resistência genética a MAF, e podem ser usados estrategicamente em estudos de resistência, em programas de melhoramento genético de trigo e, em lavouras com previsão de condições ambientais e histórico favorável à doença.

Palavras-chave: 1. Cultivares. 2. *Ptr* ToxA. 3. *Ptr* ToxB. 4. Resistência. 5. *Triticum aestivum*.

## ABSTRACT

BERTAGNOLLI, Victória Vieira. Phenotypical and genotypical characterization of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates, and reaction of wheat genotypes to tan spot. 2018. 109 f. Thesis (Doctor in Agronomy) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

The tan spot disease, caused by *Pyrenophora tritici-repentis* (*Ptr*), is one of the most important foliar diseases of wheat crop, causing losses and damages in different wheat production regions of the world. Considering that there is a lack of information on the races structure in Brazil and on sources of resistance in Brazilian genotypes, this work characterized phenotypically and genotypically *Ptr* isolates and thus described wheat genotypes with resistance to the Brazilian *Ptr* races and the host-selective toxins (HST) *Ptr* ToxA and *Ptr* ToxB. The results were presented and discussed separately in this document, in two chapters. Chapter 1: Phenotypical and genotypical characterization of *Pyrenophora tritici-repentis* races in Brazil. Isolates from wheat leaves and seeds from different wheat productions regions of the country were inoculated on the differential set of wheat genotypes, including Glenlea, 6B662, 6B365, Salamouni, ND-495 and BR 34. The symptoms produced on the leaves were observed and classified in necrosis, chlorosis or resistance response, and thus the races were designated by the phenotypical characterization. In regard to the genotypical characterization, this was accomplished by the amplification of the genes responsible for the production of the HST *Ptr* ToxA and *Ptr* ToxB by Polymerase Chain Reaction. The phenotypical characterization indicates *Ptr* 2 race as predominant in Brazil, followed by race 1, and the genotypical characterization confirms presence of *ToxA* and absence of *ToxB* by Brazilian isolates, corroborating the phenotypical characterization of this study. Chapter 2: Resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* in common wheat. 38 wheat genotypes were analyzed for the components of resistance: relative infection efficiency, final number of lesions, final lesion length, lesion expansion and lesion type. All components were evaluated with inoculations of races 1 and 2 of *Ptr*. In addition, the genotypes were evaluated for sensitivity to toxins *Ptr* ToxA and *Ptr* ToxB by the technique of infiltration of toxins in leaves with needleless syringe. The experiments were performed in greenhouse and growth chambers. Non-parametric statistical tests were performed to compare cultivars between races, cultivars within races, and to compare toxin infiltration with resistance components, using p-value <0.050 in all tests. Genotypes resistant to *Ptr* races 1 and 2 were observed, as well as the predominance of genotypes insensitive to *Ptr* ToxA and *Ptr* ToxB. FPS Virtude, BRS Parrudo, LG Cromo, Quartzo, and TBIO Sossego are adapted Brazilian genotypes, statistically superior to the others for genetic resistance to tan spot, being able to be used strategically in studies of resistance in wheat breeding programs and in crops with prediction of environmental conditions and records favorable to the disease.

Key words: 1. Cultivars. 2. *Ptr* ToxA. 3. *Ptr* ToxB. 4. Resistance. 5. *Triticum aestivum*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>16</b>
1.1	<i>Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de <i>Pyrenophora tritici-repentis</i></i>	18
1.2	<i>Reação de genótipos de trigo para mancha-amarela-da-folha</i>	21
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO I</b>	<b>26</b>
3.1	<i>Resumo</i>	26
3.2	<i>Introdução</i>	27
3.3	<i>Material e Métodos</i>	29
3.3.1	<i>Caracterização fenotípica de isolados de <i>Pyrenophora tritici-repentis</i></i>	32
3.3.2	<i>Caracterização genotípica de isolados de <i>Pyrenophora tritici-repentis</i></i>	36
3.4	<i>Resultados</i>	38
3.5	<i>Discussão</i>	42
3.6	<i>Conclusões</i>	46
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO II</b>	<b>47</b>
4.1	<i>Resumo</i>	47
4.2	<i>Introdução</i>	47
4.3	<i>Material e Métodos</i>	48
4.3.1	<i>Avaliação dos componentes de resistência para as raças 1 e 2 de <i>Pyrenophora tritici-repentis</i></i>	50
4.3.2	<i>Infiltração das toxinas Ptr ToxA e Ptr ToxB em plantas de trigo</i>	54
4.3.3	<i>Análise de dados</i>	55
4.4	<i>Resultados</i>	56
4.4.1	<i>Avaliação dos componentes de resistência para as raças 1 e 2 de <i>Pyrenophora tritici-repentis</i></i>	56
4.4.2	<i>Infiltração das toxinas Ptr ToxA e Ptr ToxB em plantas de trigo</i>	68
4.5	<i>Discussão</i>	72
4.6	<i>Conclusões</i>	78
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b>	<b>81</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>83</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>93</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo do trigo (*Triticum aestivum* L.) vem sendo bastante questionado pelas condições ambientais desfavoráveis no Sul do Brasil, como chuvas na floração e colheita, geadas, e pelo valor de venda que muitas vezes coloca em risco a sustentabilidade econômica da atividade. Nesse sentido, todo investimento realizado na genética das cultivares são de extrema importância para manter e/ou aumentar as áreas tritícolas, amenizando perdas e danos na cultura.

Tendo em vista que plantas de trigo são acometidas por doenças, uma das principais da parte aérea é a mancha-amarela-da-folha (MAF), causada por *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (*Ptr*). O fungo apresenta grande variabilidade genética e está presente em diversos países, sendo responsável por reduções na produtividade de até 50%. Nesse sentido, o manejo da doença é crucial para não interferir negativamente no rendimento da cultura e comprometer a viabilidade econômica do cultivo. Atualmente, o manejo mais utilizado para a MAF conta com rotação de culturas, uso de fungicidas em sementes e parte aérea, e utilização de cultivares com resistência genética. No entanto, considera-se o uso de cultivares resistentes uma das formas preferenciais de manejo, visando a efetividade do controle, custo e segurança ambiental.

Ao reconhecer que resistência genética deve ser uma das principais formas de controle no manejo da MAF, a busca por cultivares resistentes inicia com o conhecimento prévio (caracterização) de dois objetos de estudo importantes: patógeno e planta, que nesse trabalho podem ser traduzidos para isolados de *Ptr* e genótipos de trigo. Desde os anos 70 pesquisas intensas no patossistema trigo-*Ptr* são realizadas ao redor do mundo, como nos Estados Unidos, Irã, Canadá, Austrália, Argentina, e cada vez mais o conhecimento sobre fatores de patogenicidade e virulência em isolados do fungo e mecanismos de resistência em genótipos de trigo são descritos por meio de técnicas

biológicas, moleculares e enzimáticas. No entanto, apesar da pesquisa estar avançada em diversos países, no Brasil pouco se conhece, se estuda e se comprova sobre o patógeno e sobre as cultivares em relação a resistência a MAF, dificultando o avanço de trabalhos para resistência genética.

Considerando que a caracterização dos isolados brasileiros de *Ptr* até agora é limitada apenas à caracterização fenotípica e que há carência de uma descrição mais completa e atual de cultivares de trigo registradas nos últimos anos, com bom potencial produtivo e adaptadas à diferentes regiões brasileiras, este trabalho foi planejado para responder a seguinte pergunta: a caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Ptr* associada a inoculações do fungo e infiltrações de toxinas permite identificar resistência genética em cultivares de trigo brasileiras?

A hipótese que norteou este estudo foi a de que a caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Ptr* associada a inoculações do fungo e infiltrações de toxinas permite identificar resistência genética em cultivares de trigo brasileiras.

Nessa perspectiva, através de isolados de *Ptr* e genótipos de trigo, o trabalho teve como objetivo caracterizar fenotipicamente e genotipicamente isolados de *Ptr* e assim, descrever genótipos de trigo com resistência às raças brasileiras de *Ptr* e às toxinas seletivas ao hospedeiro (TSHs) *Ptr* ToxA e *Ptr* ToxB. Para isso, foram desenvolvidas atividades de pesquisa com o intuito de: a) caracterizar fenotipicamente raças de *Ptr* com base em um conjunto diferencial padrão de genótipos de trigo; b) caracterizar genotipicamente isolados de *Ptr* com base na detecção de presença ou ausência dos genes produtores de *Ptr* ToxA e *Ptr* ToxB; c) descrever valores de componentes de resistência que sirvam como parâmetros para pesquisas futuras visando avaliar resistência no patossistema trigo-*Ptr*; d) verificar se os genótipos apresentam diferentes reações entre eles; e) verificar se os genótipos apresentam diferentes reações entre raças de *Ptr*; f) verificar se os genótipos apresentam diferentes reações para as toxinas infiltradas; g) descrever genótipos com melhor desempenho para resistência a MAF, com base nos componentes de resistência avaliados para diferentes raças de *Ptr* inoculadas e toxinas infiltradas.

O trabalho fornece informações básicas sobre a população de *Ptr* e genótipos de trigo, gerando avanços no conhecimento do patossistema trigo-*Ptr* e, conseqüentemente, no controle da MAF. A classificação de isolados em raças, com base na caracterização fenotípica e genotípica, assegura a precisão e qualidade dos resultados para inferir sobre a predominância de raças, indicando quais devem ser os principais alvos dos programas de melhoramento no país. As investigações sobre as reações de genótipos de trigo para as raças de *Ptr* contribuem na identificação de materiais adaptados e produtivos com resistência, permitindo que estudos posteriores sejam feitos para comprovar ou identificar novos genes e *Quantitative Trait Loci (QTL)* de resistência, e para que programas de melhoramento genético de trigo possam utilizar estes genótipos em cruzamentos no desenvolvimento de cultivares resistentes à MAF. Baseado nestes fatos, almeja-se benefícios futuros para a comunidade científica, sociedade e ambiente, através do controle da doença com menor risco ambiental e maior sustentabilidade econômica da cadeia produtiva do trigo.

A estrutura deste documento está organizada de forma que nesta Introdução está apresentada a problemática, o problema, a hipótese, os objetivos e a justificativa da pesquisa. O próximo componente do trabalho é a Revisão de Literatura, a qual apresenta restritamente os assuntos abordados nesta tese. Após, é apresentado o Capítulo I e II, e dentro de cada um consta Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusões. Após os capítulos, serão apresentadas as Considerações Finais, Conclusão Geral, Referências e Anexos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O trigo tem posição de destaque na produção agrícola mundial, representando um dos três cereais mais cultivados no mundo, atrás apenas do milho e do arroz (FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2015). O cereal apresenta importância na alimentação humana e na economia agrícola global, e suas principais espécies cultivadas são *T. aestivum* (trigo comum) e *Triticum durum* L. (trigo duro) (FAO, 2015), no entanto, apenas o trigo comum é cultivado no Brasil, visto que há dificuldade de adaptação do trigo duro no país por fatores ambientais (CAMARGO; FERREIRA FILHO, 2000).

O trigo é a principal cultura de grãos de inverno no Brasil (CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABSTECIMENTO, 2017), e quando integrada em sistemas de rotação de culturas contribui com o manejo conservacionista do solo, com aspectos fitossanitários das lavouras, e aumenta a eficiência de uso de maquinário, mão de obra e insumos nas propriedades, tornando-se importante para a sustentabilidade da agricultura (PIRES, 2017). No entanto, apesar da sua importância e disponibilidade de áreas para o plantio, o Brasil supre apenas metade da demanda interna (CONAB, 2018), e isso pode ser parcialmente explicado devido as dificuldades enfrentadas pelos agricultores, como baixa valorização do produto no momento de venda aliado ao alto custo de produção, adversidades climáticas, concorrência com o mercado externo e qualidade do produto (CAMPONOGARA et al., 2015), muitas vezes prejudicada por fatores bióticos e abióticos. Assim, essas situações fazem com que o interesse no trigo se encontre limitado àqueles que de fato conseguem agregar valor ao produto e/ou àqueles que acreditam e provam dos efeitos benéficos da cultura para o sistema de produção como um todo.

A região Sul do Brasil, responsável por mais de 85% da produção brasileira de trigo (CONAB, 2018), é também a que mais sofre com as condições meteorológicas durante o ciclo da cultura, pois chuvas intensas, dias encobertos e geadas comprometem a qualidade e produtividade do trigo. Nessa linha, o ambiente também parece ser o fator mais limitante e responsável por regular o desenvolvimento de epidemias (AMORIN; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011), e assim, além dos danos diretos, as condições ambientais também são responsáveis pelos danos indiretos sobre a cultura, como o desenvolvimento de doenças. Práticas conservacionistas de solo associadas ao plantio de trigo sobre trigo também favorecem o aparecimento e desenvolvimento da doença (JØRGENSEN; OLSEN, 2007).

A MAF é uma das principais doenças da parte aérea do trigo no Sul do Brasil. Além disso, está presente em diversas regiões tritícolas do mundo, como Estados Unidos, Canadá e Argentina (FARIS; LIU; XU, 2013; LAMARI et al., 2003; MORENO et al., 2015), e é considerada de grande importância e de grande impacto econômico (CIUFFETTI et al., 2010). A MAF é causada pelo fungo necrotrófico *Ptr* (fase anamórfica: *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoem.), o qual sobrevive entre as estações de cultivo em restos culturais, sementes, e outras gramíneas hospedeiras, incluindo centeio e triticale (ALI; FRANCL, 2003; KRUPINSKY, 1992). Na entressafra, normalmente o patógeno encontra-se na fase teleomórfica, e produz sobre restos culturais pseudotécios negros com setas longas, dentro dos quais encontram-se os ascósporos de coloração pardo-amarelada com três septos transversais e leve constrição. Sob condições favoráveis, os ascósporos são liberados dos pseudotécios maduros, causando infecções primárias sobre folhas de trigo. A liberação dos ascósporos é favorecida pela chuva, pela alta umidade relativa do ar e por temperaturas acima de 10 °C (WEGULO, 2011). A fase anamórfica, responsável principalmente pelo inóculo secundário, ocorre normalmente sobre lesões maduras nas folhas durante a estação de cultivo, e assim, o patógeno produz conidióforos simples ou em pequenos grupos, eretos, com coloração preto-oliva. Sobre os conidióforos são produzidos conídios solitários cilíndricos, com um a nove septos transversais, apresentando coloração hialina a ligeira coloração palha, e a espécie pode ser reconhecida pelo afunilamento cônico da célula basal do conídio que apresenta

formato similar a uma cabeça de cobra. Na temperatura de 20 °C a maioria das infecções ocorrem entre 6 e 24 h na presença de água livre (WEGULO, 2011).

Os meios mais utilizados no controle da doença são rotação de culturas, uso de fungicidas em órgãos aéreos e sementes, e uso de cultivares com bons níveis de resistência (REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 2017). Dentre essas medidas, a utilização de cultivares resistentes é considerado um meio eficaz, economicamente e socialmente viável, e ecologicamente seguro (LIU et al., 2015; SINGH et al., 2016; TADESSE et al., 2010), e por isso, mais estudos devem ser realizados no patossistema trigo-*Ptr*, com a intenção de desenvolver mais genótipos com bons níveis de resistência a MAF.

Ao conhecer os desafios e a importância da cultura do trigo e de uma das suas principais doenças, investimentos realizados na genética das cultivares são extremamente interessantes para garantir a sustentabilidade da triticultura no país, e por isso, devem ser apoiados e incentivados, principalmente por se tratar de um país que possui condições físicas e ambientais de suprir a demanda interna e que hoje é um dos principais importadores de trigo.

### **1.1 Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Pyrenophora tritici-repentis***

A caracterização de isolados de *Ptr* refere-se à identificação da raça, com base no conjunto diferencial padrão de genótipos de trigo, e suas respectivas TSHs, com base na amplificação dos genes *ToxA* e *ToxB*, incluindo respectivamente, a caracterização fenotípica e genotípica (ANDRIE et al., 2007).

A MAF produz no trigo pequenos pontos necróticos, que se expandem e se tornam elípticos ou em formato de diamante, com presença de halo amarelado. As lesões frequentemente coalescem umas com as outras ao aumentar de tamanho, resultando em grande quantidade de tecido afetado (WOLF, 2008). Além desses sintomas, em condições controladas, *Ptr* é capaz de desenvolver lesões específicas com necrose e/ou

clorose sobre um conjunto diferencial de genótipos de trigo (LAMARI et al., 1995; 2003). O desenvolvimento dos sintomas de necrose e clorose em plantas de trigo atacadas por *Ptr* depende de interações específicas entre isolados do fungo e genótipos de trigo (LAMARI; BERNIER, 1989b; LAMARI et al., 1995; 2003). Dessa forma, o reconhecimento de sintomas independentes (necrose e clorose) sobre genótipos conhecidos de trigo proporcionou a base de um sistema de classificação dos isolados.

Inicialmente foi criado um sistema de escala de notas baseado no tipo de lesão que genótipos de trigo produziam de acordo com o isolado inoculado (LAMARI; BERNIER, 1989a). A partir disso, com base na habilidade do isolado para induzir clorose ou necrose sobre um conjunto diferencial de genótipos de trigo, sugeriu-se um sistema de classificação de isolados em patótipos (LAMARI; BERNIER, 1989b). Foram identificados isolados que causavam necrose e clorose (necrose+ clorose+, patótipo 1), somente necrose (necrose+ clorose-, patótipo 2) e somente clorose (necrose- clorose+, patótipo 3) em genótipos suscetíveis de trigo. Mais tarde, através do estudo de isolados oriundos da Argélia, foi possível descrever um sistema de classificação de raças baseado na indução dos sintomas de necrose ou clorose sobre um conjunto diferencial de genótipos de trigo (LAMARI et al., 1995). Neste sistema foram descritas em sequência as raças 1 a 5. Após, com o uso dos principais genótipos diferenciadores Glenlea, 6B365, 6B662 e Salamouni, associado ao estudo de novos isolados de *Ptr*, foram adicionadas ao sistema de classificação a raça 6 (STRELKOV et al., 2002) e as raças 7 e 8 (LAMARI et al., 2003). Atualmente estão bem descritas as raças de 1 a 8, com base na capacidade de produzir clorose ou necrose em genótipos sensíveis de trigo. No entanto, essa caracterização fenotípica complementa-se com a hipótese comprovada de que cada uma dessas reações específicas é comandada por uma TSH (LAMARI; BERNIER, 1989c; LAMARI et al., 1995; 2003).

Concomitantemente ao estudo das raças com base no conjunto diferencial de genótipos de trigo, iniciou-se o estudo dos compostos tóxicos produtores dos sintomas típicos da MAF (TOMAS; BOCKUS, 1987), os quais mais tarde foram reconhecidos como TSH (LAMARI; BERNIER, 1989c) ou efetor necrotrófico. Até o momento estão descritas e reconhecidas no patossistema trigo-*Ptr* três TSHs, denominadas Ptr ToxA, Ptr

Tox B e Ptr Tox C, no entanto, sugere-se a presença de outras toxinas (ANDRIE et al., 2007), porém são necessárias mais pesquisas para que possam ser comprovadas.

Ptr ToxA é uma toxina protéica que induz necrose sobre genótipos sensíveis de trigo, Ptr ToxB é uma toxina protéica e causa clorose em genótipos sensíveis de trigo e, por fim, Ptr ToxC também induz clorose, porém, em genótipos de trigo diferentes daqueles que a Ptr ToxB induz. Sendo assim, Ptr ToxA causa necrose em Glenlea e ND-495 (ALI; FRANCL, 2003), Ptr ToxB causa clorose em 6B-662 e Katepwa (OROLAZA; LAMARI; BALLANCE, 1995), e Ptr ToxC causa clorose em 6B-365 (EFFERTZ et al., 2002). A cultivar Salamouni é insensível às toxinas específicas já caracterizadas de *Ptr*, bem como BR 34 (FARIS; FRIESEN, 2005; WOLF et al., 1998). Isolados que produzem todas as combinações possíveis de Ptr ToxA, Ptr ToxB e Ptr ToxC foram identificados e consequentemente classificados nas raças 1 a 8 (LAMARI et al., 2003). As raças 2, 3 e 5 foram designadas como raças base, enquanto as outras são diferentes combinações das raças base, com exceção da raça 4, que é avirulenta aos genótipos do conjunto diferencial de linhagens/cultivares de trigo, (STRELKOV; LAMARI, 2003). Nesse sentido, muitos trabalhos têm realizado juntamente com a caracterização fenotípica (avaliada pela capacidade dos isolados em causar clorose ou necrose sobre o conjunto diferencial de genótipos de trigo), a caracterização genotípica, a qual utiliza técnicas moleculares para caracterizar isolados com base na capacidade destes em produzir TSHs (MOMENI et al., 2014; MORENO; STENGLEIN; PERELLÓ, 2015). No entanto, apenas Ptr ToxA e Ptr ToxB foram clonadas e completamente caracterizadas, permitindo a caracterização genotípica dessas toxinas, enquanto a identificação de Ptr ToxC é reservada apenas aos sintomas produzidos no conjunto diferencial de genótipos de trigo. Diferentes métodos moleculares são utilizados para detectar a presença de genes responsáveis pela produção de Ptr ToxA e Ptr ToxB em isolados de *Ptr*. No entanto, o método de *PCR* tem sido bastante aceito para a caracterização genotípica de *Ptr*, e as sequências de primers para amplificação dos genes produtores das toxinas estão bem descritas (ANDRIE et al., 2007; MARTINEZ; OESCH; CIUFFETTI, 2004; MORENO; STENGLEIN; PERELLÓ, 2015).

O fungo *Ptr* é um organismo difícil de ser estudado, devido à alta variação dos sintomas e das interações entre isolados, genótipos e ambiente (KRUPINSKY, 1992). Além disso, *Ptr* apresenta grande variabilidade em sua morfologia, genoma e patogenicidade (SANTOS; MATSUMURA; VAN DER SAND, 2002). O conhecimento da variação da virulência e da patogenicidade do patógeno é importante para o desenvolvimento de cultivares com resistência durável, no combate às doenças de plantas (ARAYA, 2003).

No Brasil, há poucos trabalhos sobre a identificação de raças de *Ptr*, com descrição das raças 1, 2, 4, 7 e 8 para isolados brasileiros com base apenas na caracterização fenotípica (ALI; FRANCL, 2002; BERTAGNOLLI et al., 2017a; SANTANA; CLEBSCH; FRIESEN, 2008). No entanto, para garantir a detecção da amplitude da variação entre os isolados de *Ptr* para a classificação das raças, sempre que possível, os trabalhos devem incluir análises fenotípicas e genotípicas dos isolados, e eventual expansão do conjunto diferencial de genótipos de trigo (ANDRIE et al., 2007). Nesse sentido, há necessidade de expandir os estudos relacionados a interação entre *Ptr* e genótipos de trigo, para permitir a criação de ferramentas cada vez mais precisas e funcionais para caracterizar o patossistema e desenvolver genótipos de trigo resistentes a MAF (FARIS; LIU; XU, 2013).

## **1.2 Reação de genótipos de trigo para mancha-amarela-da-folha**

A manifestação da doença na planta é o resultado de interações específicas entre patógeno, hospedeiro e ambiente. Em trabalhos que tem como objetivo identificar genótipos resistentes, quando se expõe o hospedeiro ao patógeno, em uma condição ambiental que seja favorável à doença, pode-se avaliar a quantidade de doença que a planta desenvolve. Nesse sentido, a reação é definida como o comportamento da planta manifestado na presença de um estímulo, no caso, agente patogênico. Essa interação pode gerar diferentes respostas da planta ao patógeno, podendo ser classificada desde resistência até suscetibilidade (AMORIN, REZENDE, BERGAMIN FILHO, 2011).

Estudos que descreveram resistência genética a MAF foram realizados com cultivares brasileiras na década de 90. Assim, cultivares como BH1146, CNT 3, PEL 13737.68, Colotana 296-52, CNT 2, Trintecino, Iassul (IAS 20) e IAS 63 mostraram ser as melhores fontes de resistência a *Ptr*, tanto nas avaliações com plântulas em ambiente controlado como nas avaliações de campo (REES; PLATZ, 1990; RIEDE et al., 1996). Em 2005, outro estudo mostrou que a cultivar BR34 (insensível a *Ptr* ToxA e altamente resistente as raças 1, 2, 3 e 5 de *Ptr*) armazena mecanismos de resistência não específico as raças de *Ptr* (FARIS; FRIESEN, 2005). No entanto, apesar destes trabalhos apresentarem alta relevância na descrição de cultivares com resistência, ainda faltavam trabalhos que avaliassem a resistência de cultivares a isolados brasileiros bem caracterizados, com cultivares mais produtivas e atuais.

Na literatura diversos métodos de avaliação da reação de cultivares a MAF estão descritos. Tadesse et al. (2011) mostraram uma correlação significativamente positiva entre resistência em plântulas avaliada em casa de vegetação e resistência em planta adulta estimada em condições de campo para MAF, sugerindo que grandes quantidades de germoplasma de trigo possam ser avaliadas efetivamente e rapidamente, reduzindo o custo envolvido com ensaios em vários locais e evitando o risco de problemas com o tempo nas condições de campo. Nesse sentido, o sistema de escala de notas (LAMARI; BERNIER, 1989a) para classificar as reações das plantas aos isolados de *Ptr* em condições controladas, é um dos métodos mais aceitos e utilizados nas avaliações fenotípicas das reações de genótipos de trigo inoculados com isolados de *Ptr* (ALI et al., 2010; KARIYAWASAM et al., 2016; SINGH et al., 2016). Também são utilizados outros métodos como, período de incubação, eficiência relativa de infecção, taxa de expansão da lesão (DORNELES et al., 2018; PAZDIORA et al., 2017; RANZI; FORCELINI; DEUNER, 2015), os quais são importantes para o conhecimento mais detalhado das reações específicas da planta em relação ao patógeno. Assim, na escolha dos métodos para avaliação de cultivares é importante escolher os que são mais representativos para o objetivo do experimento.

O estudo das toxinas relacionadas as raças de *Ptr* permitiu sugerir que a interação trigo-*Ptr* seria inversa ao modelo clássico gene-a-gene (LAMARI; BERNIER, 2003).

Assim, uma parte da explicação para a interação compatível no patossistema trigo-*Ptr* se deve a presença de genes de sensibilidade a TSHs no hospedeiro e a produção de TSHs pelo patógeno, caso contrário, se o patógeno não produzir TSH ou se o hospedeiro não tiver o gene de sensibilidade a TSH, a interação é incompatível, resultando em resistência (FARIS; LIU; XU, 2013). No entanto, a outra parte da explicação para a interação compatível sugere que o patossistema trigo-*Ptr* é muito mais complexo, devido a identificação de *QTLs* não específicos as raças (FARIS; FRISEN, 2005; FARIS et al., 2012). Assim, a resistência a MAF envolve o reconhecimento de genes e *QTLs* específicos e não-específicos a TSHs e/ou raças, e depende da composição genética do genótipo (CHU et al., 2010), do isolado utilizado, das condições de inoculação e das metodologias utilizadas nas avaliações.

A sensibilidade a *Ptr ToxA*, é governada pelo gene *Tsn1*. *Ptr ToxA* é uma toxina protéica, com baixa massa molecular (13.2 kDa), codificada por um gene de cópia única (CIUFFETTI; TUORI; GAVENTA, 1997). A morte celular induzida pela *ToxA* é precedida por mudanças na maquinaria fotossintética, e na acumulação de espécies reativas de oxigênio, provavelmente devido a desorganização do fotossistema (MANNING et al., 2004, 2009). Já em relação a *Ptr ToxC*, o gene que governa a sensibilidade é o *Tsc1*. *Ptr ToxC* é uma TSH indutora de clorose extensa em 6B-365, no entanto, não é uma proteína como *Ptr ToxA* e *Ptr ToxB*. *Ptr ToxC* possui baixa massa molecular, é polar e não-iônica (EFFERTZ et al. 2002). Além disso, *Ptr ToxC* não foi completamente caracterizada, e os genes responsáveis por sua produção ainda não foram clonados, apesar de ser um importante fator de virulência relacionado ao desenvolvimento da MAF (EFFERTZ; ANDERSON; FRANCL, 2001; EFFERTZ et al., 2002). Por fim, *Tsc2* é o gene responsável por condicionar sensibilidade a *Ptr ToxB*. Após a purificação parcial da *Ptr ToxB* (ORALAZA; LAMARI; BALLANCE, 1995), Strelkov, Lamari e Ballance (1999) puderam purificar completamente a toxina *Ptr ToxB* e mostrar que esta é uma proteína com massa molecular de 6.61 kDa, estável ao calor e apresenta um nível muito elevado de atividade tóxica, com uma concentração mínima ativa de 14 nM. O gene da *ToxB* foi clonado e caracterizado, sendo responsável por codificar uma TSH de 64 aminoácidos (MARTINEZ et al., 2001). Além disso, o gene deve estar presente em

múltiplas cópias para induzir o sintoma forte de Ptr ToxB (MARTINEZ et al., 2001). A indução de clorose por Ptr ToxB é dependente de luz e envolve a interrupção da fotossíntese e a possibilidade de foto oxidação da clorofila (STRELKOV et al., 1998).

As TSHs são importantes fatores de virulência, no entanto sua associação com o desenvolvimento da doença nem sempre é significativa, e depende da composição genética do genótipo (CHU et al., 2010). FARIS et al. (2012) mostraram que o locus *Tsn1* é significativamente associado a MAF causada por isolados produtores de Ptr ToxA, sendo um importante fator de virulência. Porém, a quantidade de variação fenotípica explicada por *Tsn1* oscilou consideravelmente, com valores de 5 a 30% para diferentes isolados, sugerindo a existência de uma possível variabilidade no gene que regula a produção Ptr ToxA.

Um método bastante eficiente para avaliar a sensibilidade dos genótipos é técnica de infiltração de toxinas em folhas. Até agora foram completamente purificadas as toxinas Ptr ToxA e Ptr ToxB, podendo ser infiltradas em folhas de trigo (BALLANCE; LAMARI; BERNIER, 1989; STRELKOV et al., 1999; TOMAS et al., 1990; TUORI; WOLPERT; CIUFFETTI, 1995). Trabalhos mostram que o uso de toxinas/filtrados de cultura, em comparação a inoculação com esporos, tem a vantagem de tornar mais rápido e fácil o processo como um todo, o custo para a produção é menor, a reação é claramente distinta para genótipos sensíveis e insensíveis, por isso depende menos da experiência do avaliador, e das condições ambientais, além de que, pode ser facilmente combinada com avaliações de resistência para outras doenças foliares (SINGH; HUGHES 2006; SINGH et al., 2010). No entanto, tendo em vista que ainda não é possível obter filtrado puro de Ptr ToxC, que as TSHs não são as únicas responsáveis pelo desenvolvimento da doença, e que existem cultivares como Penawana, (sensível a Ptr ToxA e resistente a todas as raças de *Ptr*) (KARIYAWASAM et al., 2016), o uso de inóculo torna-se fundamental nas avaliações de resistência de genótipos para MAF.

Por fim, a suscetibilidade de cultivares de trigo, expressa por necrose e/ou clorose, varia conforme o período de umidade em pós-inoculação, idade das folhas de trigo, agressividade e tipo de lesão produzida por isolados de *Ptr* e a quantidade de resíduos

infectados em diferentes sistemas de cultivo do solo (LAMARI; BERNIER 1989a; PERELLÓ et al., 2003). Nesse sentido, o desenvolvimento e uso de cultivares resistentes foi relatado como controle efetivo para a MAF (FRIESEN; FARIS, 2004).

### 3 CAPÍTULO I

#### Caracterização fenotípica e genotípica de raças de *Pyrenophora tritici-repentis* no Brasil

##### 3.1 Resumo

A mancha-amarela-da-folha, causada por *Pyrenophora tritici-repentis* (*Ptr*), é uma das principais doenças do trigo no Sul do Brasil e está presente em regiões tritícolas de diversos países. Isolados do fungo são classificados em oito raças, de acordo com as toxinas seletivas ao hospedeiro que produzem. Apesar do conhecimento sobre a estrutura de raças do patógeno ser essencial para estratégias de controle da doença, no Brasil, esta informação é escassa. Assim, o objetivo do trabalho foi determinar a estrutura de raças de isolados de *Ptr*, usando pela primeira vez técnicas biológicas e moleculares. Foram coletados isolados de *Ptr* a partir de diferentes regiões tritícolas do Brasil, e estes foram submetidos a caracterização fenotípica e genotípica. Na caracterização fenotípica foram utilizados seis genótipos de trigo como diferenciadores por isolado, incluindo Glenlea, Salamouni, ND-495, BR 34, 6B662 e 6B365. Os genótipos foram semeados em tubetes plásticos e aos 16 dias após a semeadura foram inoculados pela técnica de aspersão de esporos na concentração de 3.000 conídios/ml. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições, e três a quatro plântulas por repetição. O controle negativo foi composto por água e Tween 20. Oito dias após a inoculação foi avaliado o tipo de lesão. Lesões com notas inferiores a três indicam resposta de resistência do genótipo ao isolado. Notas maiores que dois indicam suscetibilidade do genótipo ao isolado, e assim, o sintoma foi classificado como necrose ou clorose. A caracterização genotípica ocorreu com base na amplificação dos genes *ToxA* e *ToxB* por *Polymerase Chain Reaction*, fazendo uso de *primers* e DNAs controle já descritos na literatura. Na caracterização fenotípica, todos isolados de *Ptr* foram patogênicos a todos genótipos do conjunto diferencial. Os isolados classificados como raça 2 causaram suscetibilidade nos genótipos Glenlea e ND495, e os isolados classificados como raça 1 causaram suscetibilidade também no genótipo 6B365. Com relação a caracterização genotípica, houve amplificação de *ToxA* por todos isolados brasileiros, e ausência de *ToxB*. Dessa forma, a caracterização genotípica concorda com a caracterização fenotípica deste estudo. Assim, isolados brasileiros de *Ptr* pertencem as raças 1 (35%) e 2 (65%). O estudo descreve pela primeira vez de forma detalhada e precisa a estrutura de raças de *Ptr* do Brasil, e esta informação será útil para melhoristas locais que pretendem melhorar a resistência genética para mancha-amarela-da-folha em cultivares de trigo.

Palavras-chave: 1. Conjunto diferencial. 2. Isolados. 3. Mancha-amarela-da-folha. 4. Toxinas. 5. Trigo.

## 3.2 Introdução

*Pyrenophora tritici-repentis* (*Ptr*) (Died.) Drechsler, agente causal da mancha-amarela-da-folha (MAF), é um dos patógenos mais importantes da cultura do trigo, pois apresenta potencial para diminuir a produtividade próximo a 30% (BHATHAL; LOUGHMAN; SPEIJERS, 2003). A doença está presente em diversas regiões tritícolas do mundo, como Estados Unidos, Canadá, Argentina, Irã e Brasil (ALI; FRANCL, 2003; BERTAGNOLLI, 2015; LEPOINT et al., 2010; MOMENI et al., 2014; MORENO; STENGLEIN; PERELLÓ, 2015), e é capaz de infectar mais de 26 espécies de plantas (KRUPINSKY, 1992). Devido sua importância econômica, pesquisas para o entendimento da relação trigo-*Ptr* e conseqüentemente para o controle da doença começaram a ser realizadas na década de 70 (HOSFORD Jr., 1971; MISRA; SINGH, 1972) e nos últimos anos têm sido intensificadas (BENSLIMANE, 2018; FARIS; LIU; XU, 2013; KARIYAWASAM et al., 2016).

A resistência genética é uma das formas preferencias de controle da MAF (JØRGENSEN; OLSEN, 2007; LIU et al., 2015), e assim, o conhecimento sobre o patógeno é fator fundamental para o desenvolvimento de cultivares resistentes. Nesse sentido, o estudo da relação patógeno-planta permitiu o desenvolvimento de um sistema de classificação de isolados de *Ptr* em raças com base nos sintomas produzidos sobre um conjunto diferencial de cultivares de trigo (LAMARI et al., 1995; 2003). Além disso, foi observado que cada interação compatível entre um isolado com sua correspondente cultivar hospedeira suscetível é mediada por uma toxina seletiva do hospedeiro (TSH) (LAMARI; BERNIER, 1989c; LAMARI et al., 2003). As TSHs *Ptr* ToxA e *Ptr* ToxB foram completamente caracterizadas e clonadas, e podem ser identificadas em isolados através de métodos moleculares (ANDRIE et al., 2007). Já *Ptr* ToxC foi parcialmente purificada (EFFERTZ et al., 2002), e por isso, sua identificação ocorre apenas pela reação do conjunto diferencial de genótipos de trigo. Por enquanto, em nível mundial, oito raças de *Ptr* foram caracterizadas de acordo com o tipo de toxina que produzem e habilidade de causar clorose ou necrose sobre o conjunto diferencial de genótipos de trigo (LAMARI et al., 2003). *Ptr* ToxA causa necrose em Glenlea e ND495 (ALI; FRANCL, 2003), *Ptr* ToxB causa clorose em 6B662 (OROLAZA; LAMARI; BALLANCE, 1995;

STRELKOV et al., 1998; STRELKOV et al., 1999), e *Ptr ToxC* causa clorose em 6B365 (EFFERTZ et al., 2002). A cultivar Salamouni é insensível às toxinas específicas já caracterizadas de *Ptr* (LAMARI et al., 2003), bem como BR34 (FARIS; FRIESEN, 2005). Isolados que produzem todas as combinações possíveis de *Ptr ToxA*, *Ptr ToxB* e *Ptr ToxC* foram identificados e classificados nas raças 1 a 8 (LAMARI et al., 2003). As raças 2, 3 e 5 foram designadas como raças base, enquanto as outras são diferentes combinações das raças base, com exceção da raça 4, que é avirulenta aos genótipos de trigo do conjunto diferencial (LAMARI et al., 2003).

A caracterização das raças de *Ptr* no Brasil foi realizada apenas pela caracterização fenotípica, utilizando o conjunto diferencial de genótipos de trigo (ALI; FRANCL, 2002; BERTAGNOLLI et al., 2017a; GAMBA; STRELKOV; LAMARI, 2012; SANTANA; CLEBSCH; FRIESEN, 2008). No entanto, trabalhos desenvolvidos em outros países, com frequência, incluem a caracterização genotípica do patógeno, por meio da utilização de técnicas moleculares para identificação dos genes produtores das toxinas produzidas pelo fungo (ANDRIE et al., 2007; BENSLIMANE, 2018; MOMENI et al., 2014; MORENO; STENGLLEIN; PERELLÓ, 2015), a fim de gerar maior confiabilidade nos resultados quando se utiliza ambas as caracterizações (ANDRIE et al., 2007). Nesse sentido, há escassez de informações a respeito da população do patógeno no Brasil, dificultando o desenvolvimento de estratégias de controle eficientes para a doença.

Tendo em vista que a caracterização de isolados de *Ptr* é um fator imperativo para o desenvolvimento de cultivares resistentes de trigo (ALI; GURUNG; ADHIKARI, 2010), e que há carência de estudos com isolados brasileiros de *Ptr*, este trabalho tem como objetivo liderar a base de conhecimento do patógeno em diferentes regiões tritícolas do Brasil, fornecendo pela primeira vez informação precisa sobre a estrutura de raças do país, por meio de caracterização genotípica e fenotípica de raças de *Ptr* em trigo.

### 3.3 Material e Métodos

#### Isolados de *Pyrenophora tritici-repentis*

Foram utilizados isolados provenientes de folhas e sementes de trigo (L.) do Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR) e Mato Grosso do Sul (MS) (Tabela 1). Os isolados foram obtidos a partir da coleção da Embrapa Trigo - Passo Fundo e também da coleta de material vegetal durante a realização deste estudo. As regiões coletadas representam importantes áreas tritícolas do Brasil e os locais de coletas predominaram no Sul do Brasil porque há maior frequência da MAF devido às exigências climáticas do patógeno para seu desenvolvimento. Além disso, estudos anteriores mostraram que o gênero *Pyrenophora* não foi detectado em trabalhos de sanidade de sementes realizados no estado do Mato Grosso e no estado de Minas Gerais (GOMES et al., 2011; KOBAYASTI; PIRES, 2011).

Tabela 1 - Origem dos isolados de *Pyrenophora tritici-repentis* obtidos em plantas de *Triticum aestivum*. Passo Fundo, 2018

(Continua)

Estado	Município	Ano da coleção	Isolado	Origem
PR	Alto Alegre	2015	BRPtr3	Folha
PR	Arapongas	2015	BRPtr20	Folha
PR	Astorga	2015	BRPtr4	Folha
PR	Campo Mourão	2015	BRPtr21	Folha
PR	Campo Mourão	2006	BRPtr24	Folha
PR	Campo Mourão	2015	BRPtr33	Folha
PR	Campo Mourão	2015	BRPtr35	Folha
PR	Guarapuava	2014	BRPtr26	Folha
PR	Ingazeiro	2015	BRPtr5	Folha
PR	Londrina	2011	BRPtr32	Folha
PR	Marilândia do Sul	2014	BRPtr10	Folha
PR	Marilândia do Sul	2014	BRPtr11	Folha
PR	Maringá	2014	BRPtr14	Folha
PR	Maringá	2014	BRPtr25	Folha
PR	Ponta Porã	2005	BRPtr28	Folha
PR	Tamarana	2015	BRPtr6	Folha
PR	Tamarana	2015	BRPtr15	Folha
PR	Tamarana	2015	BRPtr16	Folha
PR	Tamarana	2015	BRPtr17	Folha

				(Conclusão)
Estado	Município	Ano da coleção	Isolado	Origem
PR	Tamarana	2015	BRPtr18	Folha
PR	Tamarana	2015	BRPtr19	Folha
RS	Boa Vista das Missões	2007	BRPtr12	Folha
RS	Campo Novo	2014	BRPtr23	Folha
RS	Campos Borges	2007	BRPtr30	Folha
RS	Carazinho	2007	BRPtr36	Folha
RS	Coxilha	2014	BRPtr7	Folha
RS	Coxilha	2015	BRPtr8	Folha
RS	Entre Ijuís	2007	BRPtr22	Folha
RS	Getúlio Vargas	2015	BRPtr2	Folha
RS	Lagoa Vermelha	2005	BRPtr13	Folha
RS	Lagoa Vermelha	2007	BRPtr29	Folha
RS	Palmeira das Missões	2007	BRPtr34	Folha
RS	Passo Fundo	2007	BRPtr9	Folha
RS	Ronda Alta	2015	BRPtr39	Folha
RS	São Luiz Gonzaga	2015	BRPtr40	Semente
RS	São Pedro das Missões	2007	BRPtr37	Folha
RS	Sertão	2008	BRPtr1	Folha
RS	Três de Maio	2007	BRPtr31	Folha
RS	Vacaria	2007	BRPtr27	Folha
RS	Vacaria	2007	BRPtr38	Folha

Fonte: Dados do autor.

A partir das análises sanitárias com plaqueamento em meio sólido batata-dextrose-ágar (BDA) (BRASIL, 2009) de sementes de trigo, houve identificação das colônias de *Pyrenophora* spp. Estas foram repicadas para meio de cultura V8-BDA (150 ml de suco V8 Campbell's, 10 g de BDA Merck, 3 g CaCO<sub>3</sub>, 16 g de agar-agar bacteriológico puro Sigma-Aldrich e 850 ml de água destilada esterilizada), adaptado de Lamari e Bernier (1989a). De forma similar, folhas com sintomas de MAF foram submetidas à desinfestação com álcool 70% por 30 segundos, e após, com hipoclorito de sódio a 1% durante dois minutos. Foram enxaguadas com água destilada esterilizada por três vezes, e após secas em papel filtro previamente esterilizado. Os tecidos foliares afetados foram recortados no tamanho de 0,5 mm<sup>2</sup> e dispostos em placas de Petri com 9 cm de diâmetro sobre o meio de cultura BDA. O material foi incubado em câmara de crescimento com temperatura de 22 °C e fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Após esse período, nos

locais onde foi observado o crescimento de colônias de *Pyrenophora* spp., estas foram repicadas para o meio de cultura V8-BDA.

### **Esporulação dos isolados de *Pyrenophora tritici-repentis***

Os isolados oriundos de folhas e sementes de trigo foram submetidos ao processo de esporulação, visando em primeiro momento realizar o isolamento monospórico para obtenção da cultura pura e para garantir que a espécie isolada era de *Ptr*, e em outra etapa, para realizar a inoculação através da aspersão de esporos.

As colônias repicadas para meio de cultura V8-BDA foram incubadas durante cinco dias no escuro com temperatura de 25 °C, até atingirem aproximadamente 3-4 cm de diâmetro. Após esse período, com a base do tubo de ensaio esterilizado, o micélio aéreo foi levemente raspado. As placas foram fechadas novamente e incubadas por 24 horas com luz contínua a 20 °C para a produção de conidióforos e após mais 12 horas de escuro a 16 °C para a produção de conídios, conforme a metodologia adaptada de Raymond et al. (1985). Após a formação dos conídios, foram colocados 5 ml de água destilada esterilizada por placa e os conídios foram removidos da colônia com a base do tubo de ensaio. A suspensão foi então vertida em Becker, com posterior coleta de amostras de 10 µL para contagem do número de conídios em microscópio óptico Primo Star (Zeiss) com magnitude de 100 vezes.

### **Isolamento monospórico de *Pyrenophora tritici-repentis***

Alíquotas de 10 µL de água destilada esterilizada contendo esporos de *Pyrenophora* spp. foram colocadas sobre lâminas transparentes de microscópio para a contagem do número de conídios. A solução de esporos foi ajustada para 8 conídios/10 µL de água destilada. Esse mesmo volume foi espalhado sobre a superfície de meio de cultura ágar-água (20 g ágar-água bacteriológico puro (Sigma-Aldrich) e 1000 ml de água destilada) em placas de Petri, as quais foram incubadas em câmara de crescimento por 6 h, a 25 °C, na presença de luz. Conídios e conidióforos de *Pyrenophora* spp. foram analisados para certificar-se em primeiro momento que a colônia isolada era de *Ptr*.

Assim, foi possível perceber nos 77 isolados de *Pyrenophora* spp. que apenas um isolado oriundo de sementes era *Ptr*, enquanto todos os isolados oriundos de folhas mostraram ser *Ptr*. Além disso, todos os isolados oriundos de sementes que não eram *Ptr* foram inoculados sobre o conjunto diferencial padrão de genótipos de trigo e não geraram sintomas em nenhum dos genótipos do estudo, mostrando não serem patogênicos ao trigo. Dessa forma, o trabalho continuou com os 40 isolados que mostraram ser da espécie *Ptr*.

Com auxílio de microscópio e estilete, pequenas porções de meios contendo um esporo germinado foram transferidas para outras placas contendo meio de cultura V8-BDA, sendo incubadas até o crescimento das colônias puras do fungo em 2/3 das placas. A partir disso, procedeu-se novamente a avaliação das colônias de *Ptr* através das características gerais, com observação de micélio aéreo com coloração branca e micélio rasteiro com coloração verde oliva escuro (BERTAGNOLLI et al., 2017b; MEHTA, 1993; WIESE, 1987).

#### **Armazenamento dos isolados de *Pyrenophora tritici-repentis***

As colônias puras foram cortadas em círculos de 7 mm de diâmetro com molde de inox. Após, foram repassadas com agulha histológica para novas placas de Petri em câmara de fluxo laminar. As placas foram deixadas em posição semiaberta até que os discos estivessem completamente secos, e assim, foram passados para microtubos de 2 ml com as respectivas identificações. Os isolados foram armazenados em freezer a -5 °C até o momento do uso.

#### **3.3.1 Caracterização fenotípica de isolados de *Pyrenophora tritici-repentis***

##### **Material vegetal e inoculação**

Foi semeado o conjunto diferencial padrão de genótipos de trigo para detecção das raças. Os genótipos utilizados foram Glenlea, 6B662, 6B365, Salamouni, ND-495 e BR 34 (ALI; FRANCL, 2003; ANDRIE et al., 2007; FARIS; FRIESEN, 2005; LAMARI et al. 1995, 2003; STRELKOV et al., 2002), os quais foram doados para o experimento pela

Embrapa Trigo, Passo Fundo, Rio Grande do Sul e pela North Dakota State University, Fargo, Dakota do Norte.

A semeadura foi realizada em tubetes plásticos com volume de 290 cm<sup>3</sup>, perfurados na base e preenchidos com substrato Carolina Soil (composto por turfa, vermiculita, resíduo orgânico, resíduo orgânico agroindustrial classe A e calcário). Em cada tubete, três a quatro plântulas do mesmo genótipo foram mantidas. A cada dois dias, os tubetes foram irrigados com aproximadamente 20 ml de água, e dez dias após o plantio foi realizada a adubação com N-P-K com 20 ml por tubete da diluição de 50 g do produto comercial Kristalon Laranja (Yara) (06-12-36) em 5 litros de água. Aos 16 dias após a semeadura, quando as plantas estavam no estágio 1.12 (2<sup>a</sup> folha desenrolada) (ZADOKS; CHANG; KONZAK, 1974), foi realizada a inoculação através da técnica de aspersão de esporos.

Alíquotas de 10 µL de água destilada contendo esporos de *Ptr* foram colocadas sobre a lâmina de microscópio para contagem do número de conídios e posterior ajuste da solução para 30 conídios/ 10 µl. 1 ml de Tween 20 (Sigma Aldrich) foi adicionado como surfactante a cada 100 ml da solução de esporos. A inoculação foi realizada sobre o conjunto diferencial de genótipos de trigo, com aspersor automático com 3 bar de pressão e volume de 100 ml de solução sobre o conjunto de genótipos de cada isolado. As plantas foram levadas para câmara úmida com luz direta por 24 horas, temperatura de 18 °C e umidade do ar próximo a 90%. Após esse período, as plantas permaneceram por sete dias em câmara de crescimento com temperatura controlada de 18±2 °C e fotoperíodo de 12 horas.

### **Delineamento experimental**

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. A unidade experimental consistiu em três a quatro plântulas do mesmo genótipo. Foram utilizadas quatro repetições por genótipo para cada isolado, e os ensaios foram realizados duas vezes. Os ensaios para cada isolado contaram com os seis genótipos diferenciadores (Glenlea, BR

34, 6B662, 6B365, Salamouni e ND495). Tratamento com Tween 20 e água (1 ml/100 ml de água) foi usado como controle negativo neste estudo.

### **Avaliações**

As avaliações do tipo de lesão causado por isolados de *Ptr* em folhas de trigo ocorreram aos oito dias após a inoculação, com notas de 1 a 5 (Figura 1), de acordo com a escala (LAMARI; BERNIER, 1989a): 1 = pequenas manchas com coloração marrom a preta sem necrose ou clorose; 2 = pequenas manchas marrom escuras com pequena quantidade de clorose ou necrose; 3 = pequenas manchas de coloração marrom a preta circundada por halo distinto de clorose ou necrose, não coalescidas; 4 = pequenas manchas de coloração marrom a preta, circundada por necrose bronzeada ou clorose, às vezes coalescidas; 5 = maioria das lesões coalescidas, com tecido afetado necrótico ou clorótico. Nota maior ou igual a 3 mostra que houve suscetibilidade do genótipo, sendo possível, desse modo, classificar os sintomas como necrose ou clorose. Notas inferiores a 3 consideram o genótipo resistente ao isolado testado (LAMARI et al., 2003). Após, foi realizada a classificação em raças com base no tipo de sintoma que o conjunto diferencial de genótipos de trigo apresentou para cada isolado (Tabela 2). Obteve-se a nota de maior frequência de cada ensaio.

### **Análise de dados**

Para formar a tabela descritiva dos resultados foi utilizado a moda de cada ensaio, e nas situações em que a moda dos ensaios coincidiu, foi inserido a moda que os representa.

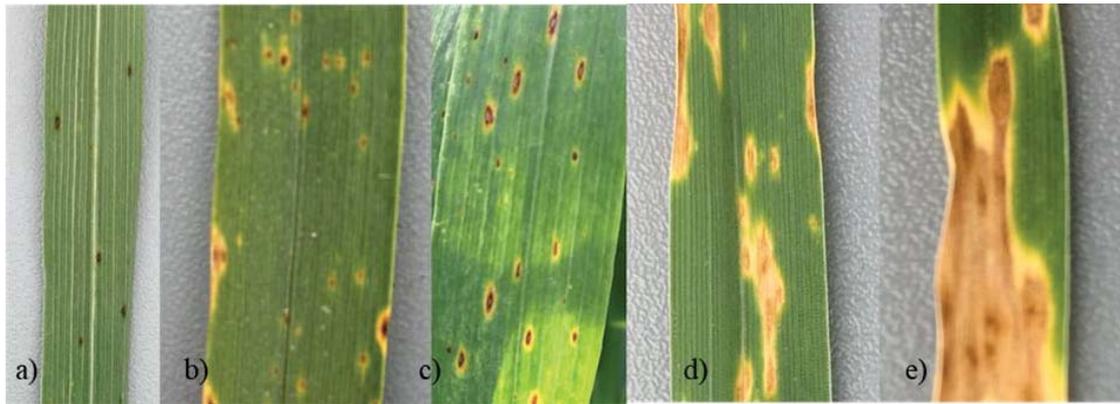


Figura 1 - Representação do tipo de lesão descrito por Lamari e Bernier (1989a) obtido pela inoculação com isolados brasileiros de *Pyrenophora tritici-repentis* sobre genótipos conhecidos de trigo. Isolado BRPtr9: a) lesão tipo 1 em Salamouni; b) lesão tipo 2 em 6B365; c) lesão tipo 3 em Glenlea. Isolado BRPtr23: d) lesão tipo 4 em Glenlea; e) lesão tipo 5 em ND495. Passo Fundo, 2017

Fonte: Dados do autor.

Tabela 2 - Reação do conjunto diferencial padrão de genótipos de trigo para oito raças de *Pyrenophora tritici-repentis*. Passo Fundo, 2018

Raça	Conjunto diferencial de genótipos de trigo					
	Glenlea	BR 34	6B662	6B365	Sal. <sup>1</sup>	ND495
1	N <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	C	R	N
2	N	R	R	R	R	N
3	R	R	R	C	R	R
4	R	R	R	R	R	R
5	R	R	C	R	R	R
6	R	R	C	C	R	...
7	N	R	C	R	R	...
8	N	R	C	C	R	...

Fonte: Elaborado de acordo com Lamari et al. (1995; 2003), Strelkov et al. (2002), Ali e Francl (2003), Faris e Friesen (2005) e Andrie et al. (2007).

Nota: ... Dado não disponível.

<sup>1</sup>Salamouni. <sup>2</sup>Necrose. <sup>3</sup>Clorose. <sup>4</sup>Resistência.

### 3.3.2 Caracterização genotípica de isolados de *Pyrenophora tritici-repentis*

#### Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de micélio liofilizado. Para cada um dos isolados testados, foi utilizado aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de micélio com 7 dias de incubação no escuro a 18 °C, obtido através da raspagem superficial do meio de cultura sólido V8-BDA, produzido de acordo com Lamari e Bernier (1989a). O micélio foi colocado em tubo plástico de 5 ml, transferido para o liofilizador, no qual permaneceu toda noite, e após armazenado a -80 °C. O micélio liofilizado foi macerado mecanicamente em uma plataforma TissueLyzer II (Qiagen) com uma esfera de aço durante 80s a 2000 rpm. Para a extração do DNA foi adicionado ao micélio macerado o tampão de lise celular (para 10 ml de solução: 4 ml - 1 M de Tris-HCl; 1,2 ml - 0,5 M EDTA; 0,3 ml - 5 M NaCl; 0,5 ml - 20% SDS (dodecil sulfato de sódio); 4 ml – ddH<sub>2</sub>O) na quantidade de 700 µl. Após o tubo foi deixado em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente, próximo a 20 °C. Foi acrescido 200 µl da solução III armazenada a 4 °C, vortexado (Mini Vortex Mixer, VWR) por 5 segundos a 3000 rpm e em seguida centrifugado a 1300 rpm por dez minutos. A solução III continha 5 M de acetato de potássio (60 ml), ácido acético glacial (11,5 ml) e água destilada (28,5 ml). O sobrenadante (500 µl) foi transferido para um tubo de 1,5 ml contendo 500 µl de isopropanol a 4 °C, permanecendo no gelo por 15 minutos, e após foi centrifugado por 4 minutos com 8.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pélete formado foi lavado com etanol 70% (50 µl) com centrifugação durante 2 minutos a 2000 rpm. Com uso de pipeta, foi realizada a remoção do etanol e o pélete foi secado na câmara de fluxo laminar por 20 minutos. Após estar seco, foi adicionado 50 µl de ddH<sub>2</sub>O para dissolver o pélete. A qualidade e quantidade do DNA extraído foi determinado com espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

## Amplificação por *Polymerase Chain Reaction* dos genes *ToxA* e *ToxB*

A detecção da presença ou ausência dos genes das toxinas *ToxA* e *ToxB* foi realizada em 40 isolados de *Ptr* do Brasil (Tabela 1), através da amplificação da região de interesse via *Polymerase Chain Reaction* (*PCR*) com primers específicos já descritos na literatura (Tabela 3). A conformidade dos isolados de *Ptr* foi determinada por primers específicos para genes do tipo de acasalamento (mating type gene) sugeridos por Lepoint et al. (2010). As reações foram realizadas com volume final de 20 µl, contendo 10x *PCR* tampão (Bullseye), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Bullseye), 1 mM de cada dNTP (Bullseye), 10 µM de cada forward primer, 10 µM de cada reverse primer, 5 U de Taq polymerase (Bullseye) e 10 ng de DNA. A amplificação foi realizada no termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) e as condições de termociclagem foram: desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 60 °C por 30 s, extensão a 95 °C por 30 s além da extensão final a 72 °C por 5 min.

Tabela 3 - Primers usados e suas sequências. Passo Fundo, 2018

Locus	Primers	Sequências	Referência
<i>ToxA</i>	TA51F	5'-GCGTTCTATCCTCGTACTTC-3'	Andrie et al. (2007)
	TA52R	5'-GCATTCTCCAATTTTCACG-3'	Andrie et al. (2007)
<i>ToxB</i>	TB71F	5'-GCTACTTGCTGTGGCTATC-3'	Andrie et al. (2007)
	TB6R	5'-ACGTCCTCCACTTTGCACACTCTC-3'	Martinez et al. (2004)
<i>MAT1-1-1</i>	PtrPLP1	5'-CACTGCCCACTCACCTTGTGC-3'	Lepoint et al. (2010)
	PtrPLP4	5'-ATGCGCTCAGCAAGGAAGGTCG-3'	Lepoint et al. (2010)

### Análise dos resultados

O produto de *PCR* foi visualizado em gel de agarose 1%, tampão de corrida TBE 1x (10,8 g de Tris Base, 5,5 g de ácido bórico, 5,8 g de EDTA e 1000 ml de água deionizada). Foram utilizados como controle positivo para *ToxA* o DNA do isolado 86-124 (raça 2), e como controle positivo para *ToxB* o DNA do isolado DW5 sem *MAT1-1-1* (raça 5) (AMEEN et al., 2017; FRIESEN et al., 2005), o qual também funcionou como controle negativo para *MAT1-1-1* nos ensaios de *ToxB*. Na amostra em branco foi usado somente água no lugar do DNA. A estimativa do comprimento dos fragmentos

amplificados foi realizada utilizando o marcador de peso molecular de 1 kb Plus DNA (GeneRuler). O PCR foi repetido no mínimo duas vezes com amostras de DNA independentes.

### 3.4 Resultados

Todos isolados de *Ptr* foram patogênicos a todos genótipos do conjunto diferencial utilizados no experimento. Foi possível detectar a presença de duas raças dentre os isolados testados (Tabela 4). Observou-se que 35% dos isolados pertenceram a raça 1, enquanto 65% pertenceram a raça 2, mostrando o predomínio da raça 2 na população amostrada. Com relação a frequência das raças por estado, no PR, 29% dos isolados de *Ptr* foram classificados como raça 1, contra 71% de raça 2. Da mesma forma, no estado do RS, 39% dos isolados foram classificados como raça 1, contra 61% de raça 2.

Isolados classificados como raça 2 mostraram causar suscetibilidade nos genótipos Glenlea e ND495, com desenvolvimento do sintoma de necrose. Por outro lado, isolados classificados como raça 1 causaram necrose em Glenlea e ND495, e clorose em 6B365 (Figura 2). Os genótipos 6B662, BR34 e Salamouni mostraram resistência a todos isolados testados, ou seja, notas menores que três. Inoculações somente com água e Tween 20 nos controles negativos não mostraram desenvolvimento de sintomas da doença e nem de outras injúrias, como esperado.

Tabela 4 - Reações de genótipos de trigo inoculados com 40 isolados de *Pyrenophora tritici-repentis* em casa-de-vegetação. Fargo e Passo Fundo, 2016 – 2017

(Continua)

Isolado	6B365		6B662		Glenlea		BR34		ND495		Salamouni		Raça <sup>3</sup>
	Nota <sup>1</sup>	Sint. <sup>2</sup>	Nota	Sint.	Nota	Sint.	Nota	Sint.	Nota	Sint.	Nota	Sint.	
BRPtr1	2	R	1-2	R	3	Nec	1-2	R	3-5	Nec	1	R	2
BRPtr2	5	Cl	1-2	R	3	Nec	2	R	4	Nec	1	R	1
BRPtr3	4	Cl	1	R	3	Nec	1	R	3-5	Nec	1	R	1
BRPtr4	5	Cl	2	R	4	Nec	1	R	4	Nec	1-2	R	1
BRPtr5	2	R	1-2	R	4-5	Nec	1	R	4-5	Nec	1-2	R	2
BRPtr6	2	R	2	R	3	Nec	1	R	3	Nec	1	R	2
BRPtr7	2	R	1	R	3	Nec	1	R	5	Nec	1	R	2

(Conclusão)

Isolado	6B365		6B662		Glenlea		BR34		ND495		Salamouni		Raça <sup>3</sup>
	Nota <sup>1</sup>	Sint. <sup>2</sup>	Nota	Sint.	Nota	Sint.	Nota	Sint.	Nota	Sint.	Nota	Sint.	
BRPtr8	3	Cl	1	R	3-4	Nec	1	R	3	Nec	1	R	1
BRPtr9	2	R	2	R	3	Nec	1	R	3-4	Nec	1	R	2
BRPtr10	3-4	Cl	1	R	3	Nec	1	R	3-4	Nec	1	R	1
BRPtr11	2	R	1	R	3	Nec	1	R	3	Nec	1	R	2
BRPtr12	4	Cl	1	R	3	Nec	1	R	4	Nec	1	R	1
BRPtr13	4	Cl	2	R	3	Nec	1	R	3-4	Nec	1	R	1
BRPtr14	1	R	1	R	3	Nec	1	R	3-4	Nec	1	R	2
BRPtr15	2	R	2	R	4	Nec	1	R	4	Nec	1	R	2
BRPtr16	2	R	2	R	3	Nec	1	R	3-4	Nec	1	R	2
BRPtr17	2	R	2	R	3	Nec	1	R	3-4	Nec	1	R	2
BRPtr18	2	R	2	R	3	Nec	1	R	4	Nec	1	R	2
BRPtr19	1-2	R	2	R	3	Nec	1	R	3-4	Nec	1	R	2
BRPtr20	2	R	1-2	R	4-5	Nec	1	R	3-4	Nec	1	R	2
BRPtr21	2	R	1-2	R	4	Nec	1-2	R	4	Nec	1-2	R	2
BRPtr22	4	Cl	1-2	R	4	Nec	1	R	3-4	Nec	1	R	1
BRPtr23	2	R	1-2	R	4	Nec	1-2	R	5	Nec	1	R	2
BRPtr24	2	R	1-2	R	3	Nec	1	R	4	Nec	1	R	2
BRPtr25	4	Cl	2	R	3	Nec	1	R	4	Nec	1	R	1
BRPtr26	2	R	1-2	R	4	Nec	1	R	4	Nec	1	R	2
BRPtr27	2	R	2	R	5	Nec	1-2	R	5	Nec	2	R	2
BRPtr28	4	Cl	2	R	3	Nec	1	R	4	Nec	1	R	1
BRPtr29	2	Cl	1-2	R	4-5	Nec	1	R	4	Nec	1	R	2
BRPtr30	2	R	2	R	4	Nec	1	R	3-4	Nec	1	R	2
BRPtr31	2	R	1-2	R	4-5	Nec	1	R	3-4	Nec	1-2	R	2
BRPtr32	4-5	Cl	1-2	R	4-5	Nec	1	R	4	Nec	1	R	1
BRPtr33	2	R	1	R	3	Nec	1	R	3	Nec	1	R	2
BRPtr34	5	Cl	2	R	4-5	Nec	1	R	4	Nec	1-2	R	1
BRPtr35	2	R	2	R	4-5	Nec	1-2	R	4	Nec	1	R	2
BRPtr36	3-4	Cl	1-2	R	3-4	Nec	1	R	3-4	Nec	1	R	1
BRPtr37	2	R	2	R	4-5	Nec	1	R	4-5	Nec	1-2	R	2
BRPtr38	4-5	Cl	1-2	R	4-5	Nec	1	R	3-4	Nec	1	R	1
BRPtr39	2	R	1	R	3	Nec	1	R	3	Nec	1	R	2
BRPtr40	2	R	2	R	4	Nec	1	R	3	Nec	1	R	2

Fonte: Dados do autor.

<sup>1,2</sup>Notas e sintomas de acordo com Lamari e Bernier (1989a). <sup>3</sup>O gene de *ToxA* foi amplificado por *PCR* em todos isolados coletados, enquanto o gene de *ToxB* não foi amplificado por nenhum isolado.

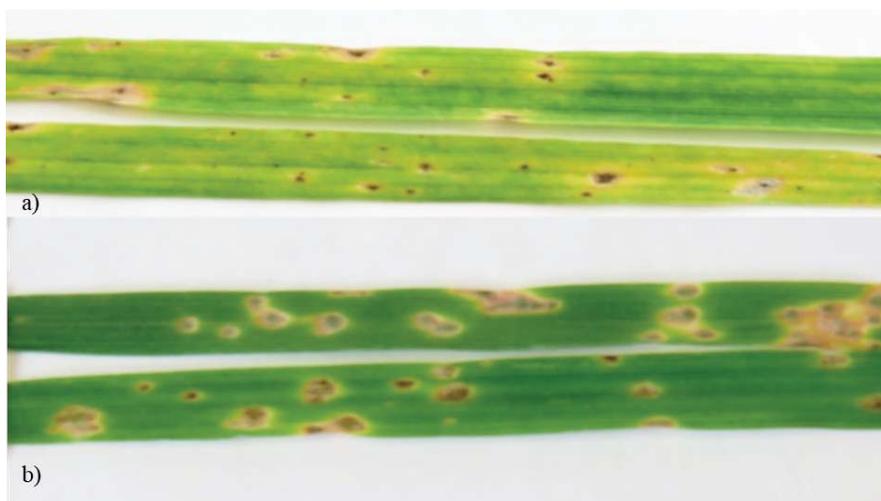


Figura 2 - Distinção dos sintomas de clorose e necrose através da inoculação com isolado brasileiro de *Pyrenophora tritici-repentis* (BRPtr3) sobre genótipos conhecidos de trigo. a) sintoma de clorose sobre o genótipo 6B365. b) sintoma de necrose sobre o genótipo ND495. Fargo, 2016

Fonte: Dados do autor.

A caracterização genotípica via análise de *PCR* foi realizada para a confirmação da caracterização fenotípica dos isolados de *Ptr* em relação as TSHs que estes produzem. Dessa forma, foi utilizado um conjunto de primers projetados para amplificar a fase de leitura aberta (*open reading frame*) de *ToxA* e *ToxB* (ANDRIE et al., 2007). O conjunto de primers para *ToxA* amplifica um fragmento de 573-pb, enquanto o conjunto de primers para *ToxB* amplifica um fragmento de 232-pb.

Os conjuntos de primers amplificaram produtos de tamanho esperado para os isolados testados. O produto de *PCR* para *ToxA* foi amplificado em todos isolados, exceto para o controle negativo DW5 (Figura 3). Porém, o produto de *PCR* para *Ptr ToxB* foi amplificado apenas no isolado usado como controle positivo DW5, mostrando que nenhum isolado brasileiro produz *Ptr ToxB* (Figura 4). Dessa forma, a confirmação da produção de *ToxA* e ausência de produção de *ToxB* por todos isolados brasileiros testados corrobora com a caracterização fenotípica deste estudo.

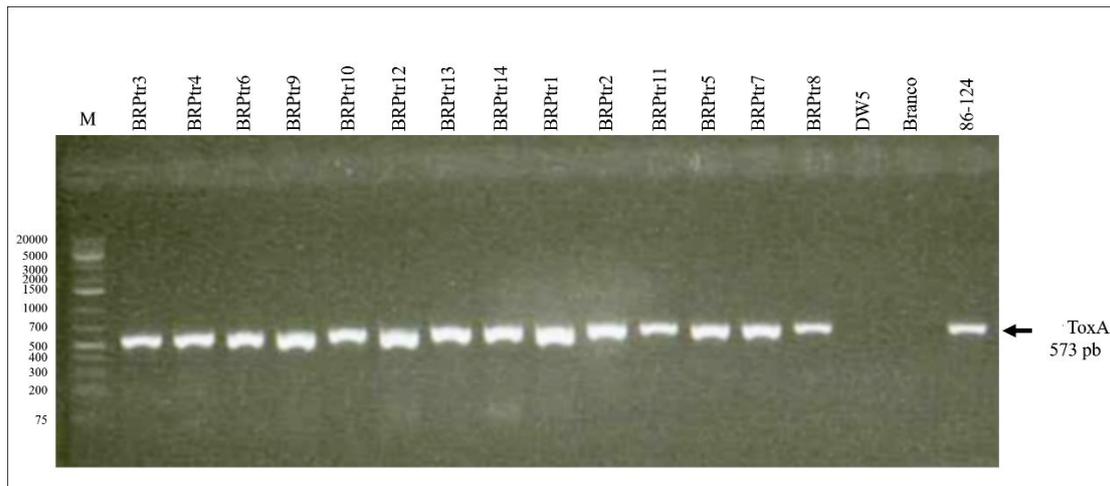


Figura 3 - Amplificação por *PCR* de *ToxA* em amostras de isolados brasileiros de *Pyrenophora tritici-repentis*. Fargo - 2016

Fonte: Dados do autor.

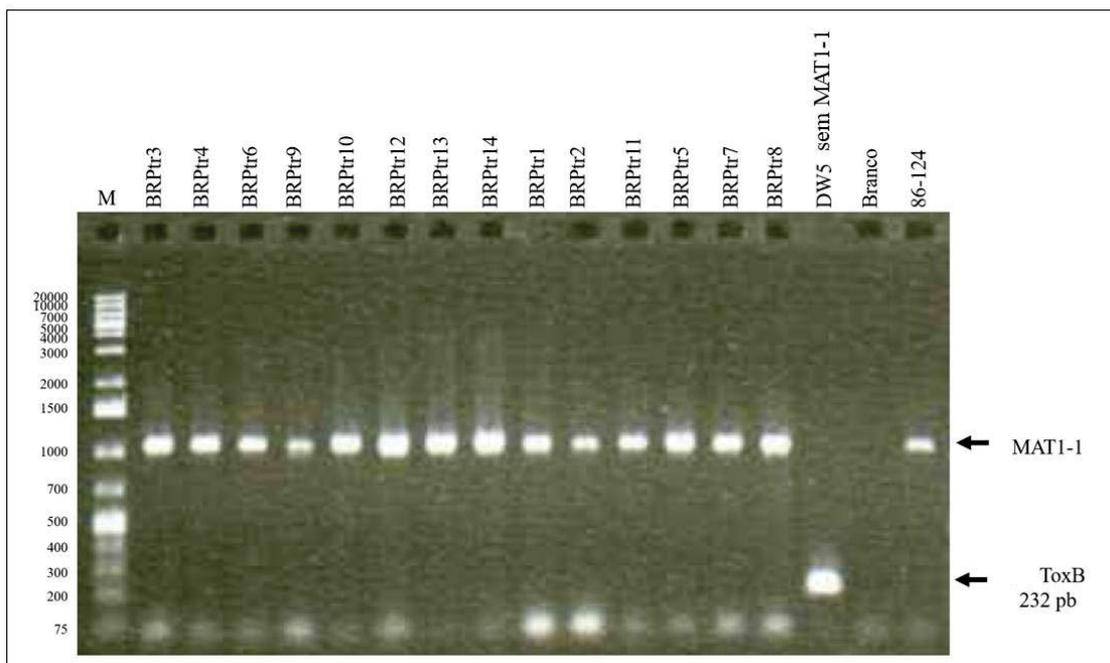


Figura 4 - Amplificação via *PCR* de *ToxB* em isolados brasileiros de *Pyrenophora tritici-repentis*, e amplificação do *MAT1-1-1*. Fargo - 2016

Fonte: Dados do autor.

### 3.5 Discussão

Os resultados mostraram que a raça 2 de *Ptr* é predominante no Brasil, seguido pela raça 1. Tendo em vista que cada uma das raças designadas pela caracterização fenotípica no conjunto diferencial comanda as reações de suscetibilidade ou resistência através de TSHs (EFFERTZ et al., 2002; FARIS et al., 1996; FRIESEN; FARIS, 2004; LAMARI; BERNIER, 1989c; ; LAMARI et al., 1995, 2003; TOMAS et al., 1990; TUORI; WOLPERT; CIUFFETTI, 1995), a associação da caracterização fenotípica e genotípica deste estudo confirmou a presença de *ToxA* na população amostrada e ausência de *ToxB*, enquanto a caracterização fenotípica sugeriu a presença de *Ptr ToxC*, visto que *Ptr ToxC* foi parcialmente purificada (EFFERTZ et al., 2002) e sua detecção por métodos moleculares ainda não está disponível.

A classificação em raças com base na patogenicidade e virulência iniciou com isolados de *Ptr* coletados em plantas de trigo, em Manitoba, Canadá (LAMARI; BERNIER, 1989a, 1989b, 1989c). Os isolados foram classificados como patótipos 1, 2 e 3 e posteriormente como raça 1, 2 e 3, respectivamente (LAMARI; BERNIER, 1989c, 1995). A raça 4 foi descrita por não apresentar nenhuma das TSHs conhecidas, ou seja, não causar clorose ou necrose em nenhum dos genótipos do conjunto diferencial. A partir disso, com a coleta de isolados predominantemente em trigo duro (*Triticum durum* L.) no nordeste da Argélia surgiu a descrição da raça 5 (LAMARI; BERNIER, 1995). As raças 6, 7 e 8 foram inseridas no sistema de classificação de raças tempo depois, com a caracterização de isolados do leste da Argélia (STRELKOV et al., 2002) e das Regiões do Crescente Fértil e do Cáucaso (LAMARI et al., 2003).

Através da caracterização de isolados de *Ptr* oriundos de diversos locais e em diferentes trabalhos é possível perceber que a raça 1 parece predominar em isolados de trigo duro e trigo comum (*Triticum aestivum* L.) nas diferentes regiões tritícolas do mundo, fazendo com que *Ptr ToxA* e *Ptr ToxC* também sejam as TSHs predominantes. Em um estudo realizado com 85 isolados de trigo comum coletados em Dakota do Norte e Dakota do Sul, 92% pertenceram a raça 1, 3% a raça 2 e 5% a raça 4. Dos 22 isolados de trigo comum coletados nos estados do Kansas e Oklahoma, 96% pertenceram a raça 1

e 5% a raça 4. Dos 71 isolados de trigo duro, coletados em Dakota do Norte, 89% pertenceram a raça 1, enquanto 11% pertenceram a raça 5 (ALI; FRANCL, 2003). Nesse sentido, o trabalho mostrou a predominância da raça 1 em plantas de trigo amostradas dos EUA. A mesma tendência foi observada no Canadá, pois a raça 1 predominou em 88% dos isolados amostrados (LAMARI; BERNIER, 1989c). Além desses, um estudo com isolados oriundos do Irã mostrou que 90% dos isolados foram classificados fenotipicamente como raça 1, enquanto os outros 10% foram classificados como raça 2 (MOMENI et al., 2014). Já no que se refere a coleções de isolados de diferentes locais do mundo, Leisová, Hanzalová e Kucera (2008) mostraram que em uma coleção de 100 isolados de *Ptr* oriundos da República Tcheca, Eslováquia, Rússia, Argentina, Canadá, e Estados Unidos, 76 pertenceram a raça 1. Lepoint et al. (2010) também observou a predominância da raça 1 em 61% dos isolados de *Ptr* coletados em diversos países. Assim, observa-se divergência com a frequência de distribuição de raças do Brasil, pois foi a raça 2 que predominou na população amostrada de forma geral e também por região (RS e PR). No entanto, observa-se semelhança quanto a predominância de TSHs, pois *Ptr* ToxA e *Ptr* ToxC foram as toxinas observadas na população.

A partir da caracterização genotípica, todos isolados brasileiros mostraram ter o gene que codifica para *Ptr* ToxA. *Ptr* ToxA é responsável pelos sintomas de necrose nos genótipos do conjunto diferencial Glenlea e ND495, e é descrita como uma toxina proteica, com baixa massa molecular (13.2 kDa), codificada por um gene de cópia única (CIUFFETTI; TUORI; GAVENTA, 1997). A morte celular induzida por *Ptr* ToxA é precedida por mudanças na maquinaria fotossintética, e na acumulação de espécies reativas de oxigênio, provavelmente devido a desorganização do fotossistema (MANNING et al., 2004; MANNING et al., 2009). Por outro lado, nenhum isolado brasileiro mostrou ter o gene de *Ptr* ToxB, responsável pelo sintoma de clorose em 6B662. Resultados similares na caracterização genotípica foram encontrados com isolados coletados em diversas regiões da Austrália (ANTONI et al., 2010), pois em todos isolados testados foi possível amplificar *ToxA* e em nenhum foi possível amplificar *ToxB*, sugerindo uma possível formação similar da população, passível de identificação em estudos genéticos posteriores. Acrescenta-se ainda que, a partir da caracterização

fenotípica foi possível identificar a presença de Ptr ToxC em 35% dos isolados, com base no sintoma de clorose em 6B365. Ptr ToxC é uma TSH indutora de clorose extensa em 6B365, no entanto, não é uma proteína como Ptr ToxA e Ptr ToxB. Ptr ToxC possui baixa massa molecular, é polar e não-iônica (EFFERTZ et al. 2002). Ptr ToxC não foi completamente caracterizada e os genes responsáveis por sua produção ainda não foram clonados, apesar de ser um importante fator de virulência relacionado ao desenvolvimento da MAF (EFFERTZ; ANDERSON; FRANCL, 2001; EFFERTZ et al., 2002). Portanto, o estudo fenotípico é de importância relevante no estudo da MAF, e não deve ser deixado de lado, visto que permite o reconhecimento de fatores de virulência ainda não detectados por técnicas moleculares.

Poucos trabalhos com descrição de raças para isolados brasileiros de *Ptr* foram feitos até o momento. Um estudo com 24 isolados mostrou que 50% corresponderam à raça 1 e 50% a raça 2 (SANTANA; CLEBSCH; FRIESEN, 2008). Nesse sentido, este trabalho concorda com os resultados encontrados por Santana, Clebsch e Friesen (2008), e além disso, valida a caracterização fenotípica com base na caracterização genotípica pela primeira vez em isolados brasileiros. Em relação a diferença na frequência de distribuição das raças, esta provavelmente se deve ao fluxo populacional do patógeno, com diferenças nos locais e anos de coleta dos isolados.

Um trabalho com isolados brasileiros de *Ptr* mostrou que de nove isolados coletados de sementes de trigo, oito pertenceram a raça 4 (BERTAGNOLLI, 2015). Assim, foi por esse motivo que o isolamento a partir de sementes de trigo também foi conduzido neste trabalho, pois pretendia-se confirmar se o local de coleta influenciava na raça. No entanto, com a confirmação de apenas um isolado de *Ptr* obtido em sementes, não foi possível verificar a predominância da raça 4 em sementes, porém, pode-se observar que sementes de trigo veiculam também fungos não-patogênicos ao trigo, mas que podem ser patogênicos a outras culturas. Análises moleculares iniciais realizadas neste estudo indicaram a presença de *Pyrenophora avenae* S. Ito e Kurib ou *Pyrenophora chaetomioides* Speg. nas sementes, no entanto, será necessário fazer inoculações em hospedeiros para comprovar a espécie. Dessa forma, essa observação implica em duas consequências. A primeira consequência é que provavelmente foram realizados muitos

diagnósticos errados com relação a espécie de *Pyrenophora* encontrada em sementes de trigo do Brasil, gerando informações erradas sobre *Ptr* e atrapalhando medidas de manejo eficientes para a doença. A maioria dos testes de patologia de sementes no Brasil são realizados em papel filtro ou plaqueamento em meio BDA, e estes normalmente permitem o crescimento apenas da estrutura vegetativa, pois *Ptr* é um patógeno exigente em condições artificiais para produzir estruturas reprodutivas (RAYMOND et al., 1985). Nesse sentido, o diagnóstico de presença de *Ptr* com base apenas na estrutura vegetativa não é suficiente para discriminar a espécie, e quando realizado sozinho pode levar a erros de identificação. A segunda consequência, ainda passível de confirmação quanto a espécie, é que o trigo não funciona como rotação para a aveia para o controle de *P. avenae* ou *P. chaetomioides*. Além disso, ao considerar que a semente tem uma disseminação restrita da espécie de *Ptr* como demonstra esse trabalho, ou ainda, se ela dissemina na sua maior proporção isolados da raça 4 (BERTAGNOLLI et al., 2017a), então talvez ela seja pouco responsável pelas epidemias e/ou pela variabilidade genética do patógeno, como discutido em alguns trabalhos (FRIESEN et al., 2005; LEISOVÁ; HANZALOVÁ; KUCERA, 2008). No entanto, antes de qualquer mudança no manejo da MAF, mais trabalhos devem ser realizados com isolados de sementes para verificar se esse comportamento se mantém, ou se ocorreu em função do local e ano de coleta dos isolados.

Apesar dos isolados brasileiros mostrarem a predominância de apenas duas TSHs, discrepâncias na caracterização fenotípica e/ou entre caracterização fenotípica e genotípica são comuns em estudos de estrutura de raças e já aconteceram com isolados brasileiros. Em um estudo realizado por Ali e Francl (2002) com caracterização fenotípica de isolados brasileiros, sete foram classificados como raça 1, enquanto 12 produziram necrose em Glenlea, Katepwa, ND495, 6B365 e Salamouni, não se encaixando em nenhuma das raças descritas até o momento. Portanto, deve haver continuidade nos trabalhos de caracterização de isolados do Brasil, pois nas situações em que a caracterização molecular discorda da caracterização fenotípica, ou a caracterização fenotípica discorda do atual sistema de raças, os pesquisadores tendem a sugerir a presença de novas raças e/ou TSHs (ALI; GURUNG; ADHIKARI, 2010; ANDRIE et al.,

2007; LEPOINT et al., 2010; MORENO; STENGLIN; PERELLÓ, 2015), e estas devem ser estudadas para o controle genético da MAF.

### **3.6 Conclusões**

Isolados de *Ptr* coletados no Brasil pertencem as raças 1 e 2, e assim, produzem as TSHs *Ptr ToxA* e *Ptr ToxC*.

O gene *ToxA* está presente em isolados de *Ptr* do Brasil, enquanto o gene *ToxB* está ausente.

Pela primeira vez resultados da caracterização fenotípica de raças de *Ptr* do Brasil são validados com o uso da caracterização genotípica.

## 4 CAPÍTULO II

### Resistência a *Pyrenophora tritici-repentis* em trigo comum

#### 4.1 Resumo

A mancha-amarela-da-folha (MAF), causada por *Pyrenophora tritici-repentis* (*Ptr*), é uma das principais doenças foliares do trigo no Sul do Brasil e o uso de cultivares resistentes parece ser a medida preferencial de controle. Tendo em vista que a caracterização de cultivares é a primeira etapa no desenvolvimento de resistência genética a MAF, o trabalho teve como objetivo identificar fontes de resistência em cultivares brasileiras para os isolados das raças 1 e 2 de *Ptr* e para as toxinas *Ptr* ToxA e *Ptr* ToxB. Foram avaliadas 37 cultivares registradas e adaptadas a diferentes regiões tritícolas do Brasil, além da cultivar Salamouni, com resistência a todas as raças e com insensibilidade a todas toxinas seletivas ao hospedeiro conhecidas até o momento. Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e em câmaras de crescimento, em delineamento inteiramente casualizado. Os componentes de resistência para ambas raças de *Ptr* foram avaliados através da inoculação pela técnica de aspersão de esporos, e os experimentos para descrição de sensibilidade as toxinas foram executados com a técnica de infiltração com seringa sem agulha. Diferentes testes estatísticos não paramétricos foram realizados para comparar cultivares entre raças, cultivares dentro das raças e para comparar a infiltração de toxinas com os componentes de resistência, utilizando em todos os testes o valor- $p < 0,050$ . Foram observadas cultivares com resistência nos testes de avaliação de componentes de resistência e também a maior parte das cultivares mostraram insensibilidade a *Ptr* ToxA e *Ptr* ToxB. FPS Virtude, BRS Parrudo, LG Cromo, Quartzo e TBIO Sossego são as cultivares comerciais que se mostram mais consistentes para resistência, indicando potencial de uso em programas de melhoramento genético de trigo para o controle da MAF.

Palavras-chave: 1. Mancha-amarela-da-folha. 2. Raças. 3. Reação. 4. Toxinas. 5. *Triticum aestivum*.

#### 4.2 Introdução

A mancha-amarela-da-folha (MAF), causada pelo fungo *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (*Ptr*) (fase anamórfica: *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoem.), é a principal doença foliar do trigo no Sul do Brasil. Além disso, a doença gera preocupação global por estar presente em todas as áreas tritícolas do mundo (FARIS; LIU; XU, 2013) e ter potencial de reduzir a qualidade das sementes e a produtividade

(REES; PLATZ; MAYER, 1982; SINGH et al., 2010). Nesse sentido, a utilização de cultivares resistentes é considerada uma alternativa eficaz para o controle da MAF (FRIESEN; FARIS, 2004).

As interações com patógenos necrotróficos, tais como o patossistema trigo-*Ptr*, envolve o reconhecimento de toxinas seletivas ao hospedeiro (TSHs) por genes de sensibilidade, também conhecidas como efetores necrotróficos. O reconhecimento de uma TSH por um gene de sensibilidade do hospedeiro, resulta em uma interação compatível, permitindo a suscetibilidade, enquanto que, a falta do reconhecimento de uma TSH pelo hospedeiro resulta em uma interação incompatível e permite a resistência (FARIS et al., 2013). No entanto, devido a complexidade do patossistema trigo-*Ptr* baseado em evidências fornecidas pela identificação de *QTLs* de resistência não específico as raças de *Ptr* (CHU et al., 2008; KARIYAWASAM et al., 2016; FARIS et al. 2012; FARIS; LIU; XU, 2013), a detecção de sensibilidade dos genótipos às TSHs não é suficiente para descrever resistência, e assim, técnicas de inoculação com diferentes isolados também são fundamentais para caracterizar genótipos.

Mesmo que alguns estudos tenham relatado a presença de cultivares brasileiras com bons níveis de resistência genética a MAF (FARIS; FRIESEN, 2005; REES; PLATZ, 1990; RIEDE et al., 1996), ainda faltavam trabalhos que contemplassem uma descrição mais completa e atual de cultivares indicadas para o cultivo no Brasil, através de ensaios com as raças de *Ptr* descritas no Brasil, com isolados brasileiros, e com infiltração de TSHs. Nesse sentido, o trabalho teve como objetivo verificar fontes de resistência em genótipos brasileiros adaptados para isolados das raças 1 e 2 de *Ptr* e para as toxinas *Ptr* ToxA e *Ptr* ToxB, visando descrever uma boa base para pesquisas futuras que almejam estudar e compreender melhor as interações trigo-*Ptr*, bem como, desenvolver cultivares com resistência genética a MAF.

### **4.3 Material e Métodos**

O estudo foi dividido em duas etapas. O trabalho com componentes de resistência através da inoculação foi conduzido na casa de vegetação da Faculdade de Agronomia e

---

Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, no ano de 2017. Já o trabalho com infiltração de toxinas foi conduzido na casa de vegetação e na câmara de crescimento da Biotrigo Genética Ltda., Passo Fundo, RS, nos anos de 2017 e 2018.

### Material Vegetal

Foram utilizadas para os ensaios 37 cultivares comerciais indicadas e/ou registradas para o cultivo na BA, RS, SC, DF, PR, MG, MS, SP e/ou GO (REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 2017; BRASIL, 2018), e Salamouni, uma cultivar de trigo crioulo com resistência a todas raças e TSHs conhecidas (FARIS et al., 2013) (Tabela 5). Salamouni foi adicionada com o intuito de testá-la para os componentes de resistência com isolados e cultivares brasileiras. As sementes foram doadas pelas empresas EMBRAPA Trigo (Passo Fundo), OR Sementes (Passo Fundo), Biotrigo Genética (Passo Fundo) e Fundação Pró-Sementes (Passo Fundo).

Tabela 5 - Descrição das cultivares do experimento. Passo Fundo, 2018

(Continua)

Cultivar	Mantenedor	Ano de registro	Reação à MAF <sup>1</sup>
BBR Aventureiro	Biotrigo Genética Ltda.	2015	...
BRS 394	EMBRAPA	2014	S
BRS Gralha Azul	EMBRAPA	2011	MS/MR
BRS Marcante	EMBRAPA	2013	MR
BRS Parrudo	EMBRAPA	2012	MR
BRS Reponte	EMBRAPA	2014	MS
BRS Sabiá	EMBRAPA	2013	MR
BRS Sanhaço	EMBRAPA	2016	MR
BRS Umbú	EMBRAPA	2003	R
Celebra	Biotrigo Genética Ltda.	2013	MS/MR
FPS Amplitude	Biotrigo Genética Ltda.	2017	S/MS
FPS Certero	Biotrigo Genética Ltda.	2016	MS/MR
FPS Virtude	Biotrigo Genética Ltda.	2015	MS/MR
Inova	Biotrigo Genética Ltda.	2016	MS/MR
LGCROMO	Limagrain Brasil S.A.	2015	MS/MR
LGORO	Limagrain Brasil S.A.	2014	MR
LGSUPRA	Limagrain Brasil S.A.	2015	MR

			(Conclusão)
Cultivar	Mantenedor	Ano de registro	Reação à MAF <sup>1</sup>
Marfim	Biotrigo Genética Ltda. OR Melhoramento de Sementes Ltda.	2007	MS
OR 1401	OR Melhoramento de Sementes Ltda.	2014	MR
ORS 1403	OR Melhoramento de Sementes Ltda.	2014	MR
ORS Vintecinco	OR Melhoramento de Sementes Ltda.	2013	MS/MR
Quartzo	Biotrigo Genética Ltda. OR Melhoramento de Sementes Ltda.	2007	MR
Safira	Biotrigo Genética Ltda. OR Melhoramento de Sementes Ltda.	2003	S
Salamouni	...	...	R <sup>2</sup>
Supera	Biotrigo Genética Ltda. OR Melhoramento de Sementes Ltda.	2004	MR
TBIO Alpaca	Biotrigo Genética Ltda.	2016	MS/MR
TBIO Audaz	Biotrigo Genética Ltda.	2017	MR
TBIO Consistência	Biotrigo Genética Ltda.	2017	MS
TBIO Iguaçu	Biotrigo Genética Ltda.	2011	MR
TBIO Itaipu	Biotrigo Genética Ltda.	2011	SI
TBIO Mestre	Biotrigo Genética Ltda.	2012	MS
TBIO Noble	Biotrigo Genética Ltda.	2013	MS
TBIO Sintonia	Biotrigo Genética Ltda.	2013	MS/MR
TBIO Sinuelo	Biotrigo Genética Ltda.	2012	MS/MR
TBIO Sonic	Biotrigo Genética Ltda.	2017	...
TBIO Sossego	Biotrigo Genética Ltda.	2015	MR
TBIO Tibagi	Biotrigo Genética Ltda.	2010	MR
TBIO Toruk	Biotrigo Genética Ltda.	2013	MS

Fonte: Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale (2017) e Brasil (2018).

Nota: ... Dado não disponível.

<sup>1</sup>Mancha-amarela-da-folha. <sup>2</sup>Cultivar de trigo com resistência (FARIS; LIU, XU, 2013).

#### 4.3.1 Avaliação dos componentes de resistência para as raças 1 e 2 de *Pyrenophora tritici-repentis*

##### Isolados de *Pyrenophora tritici-repentis*

Foram utilizados dois isolados brasileiros de *Ptr* para avaliar as cultivares, incluindo BrPtr8 (raça 1) e BrPtr7 (raça 2), descritos neste trabalho. Os isolados foram escolhidos pelo rápido desenvolvimento da estrutura vegetativa em meio artificial e pelo potencial em produzir grande quantidade de conídios por placa. Além disso, estes isolados

mostraram ser agressivos sobre os genótipos de trigo Glenlea e ND495. BrPtr8 produz Ptr ToxA e Ptr ToxC, e BrPtr7 produz apenas Ptr ToxA. Discos de micélio dos isolados armazenados em freezer a -5 °C foram repicados para meio de cultura V8-BDA (batata-dextrose-ágar) (150 ml de suco V8 Campbell's, 10 g de BDA Merck, 3 g CaCO<sub>3</sub>, 16 g de agar-agar bacteriológico puro Sigma-Aldrich e 850 ml de água destilada esterilizada), adaptado de Lamari e Bernier (1989a). Os discos foram incubados durante cinco dias no escuro com temperatura de 25 °C, até atingirem aproximadamente 3-4 cm de diâmetro. Após esse período, com a base do tubo de ensaio esterilizado, o micélio aéreo foi levemente raspado. As placas foram fechadas novamente e incubadas por 24 horas com luz contínua a 20 °C para a produção de conidióforos e após mais 12 horas de escuro a 16 °C para a produção de conídios, conforme a metodologia adaptada de Raymond et al. (1985). Assim, 5 ml de água destilada esterilizada foram adicionadas por placa e os conídios foram removidos da colônia com a base do tubo de ensaio. A suspensão foi então vertida em Becker e ajustada para 30 conídios/10 µl. A cada 100 ml foi adicionada 2 gotas de Tween 20 (Sigma Aldrich) como surfactante.

### **Delineamento experimental**

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Foram realizados dois ensaios para a raça 1 e dois ensaios para a raça 2. A unidade experimental foi composta por cinco plantas do mesmo genótipo. Para cada ensaio da raça 1 foram utilizadas três repetições e para a raça 2 cada ensaio contou com quatro repetições, assim, o maior número de observações foi para a raça 2 (57,1%) em comparação a raça 1 (42,9%). Tal fato ocorreu devido a capacidade operacional e espacial disponível para execução dos ensaios.

### **Tratos culturais e inoculação de *Pyrenophora tritici-repentis***

As cultivares foram semeadas em vasos plásticos com volume de 1500 cm<sup>3</sup> em solo oriundo de vermicompostagem (Tabela 6). As sementes foram cobertas com 2 cm de substrato Carolina Soil. Em cada vaso, cinco plantas do mesmo genótipo foram mantidas. A cada dois dias, os vasos foram irrigados com aproximadamente 30 ml de

água, e 15 dias após o plantio foi realizada a adubação com N-P-K com 30 ml por vaso da diluição de 50 g do produto comercial Kristalon Laranja (Yara) (06-12-36) em 5 litros de água. A adubação foi repetida após 21 dias.

As plantas foram inoculadas pela técnica de aspersão de esporos 40 dias após plantio, próximo ao estágio 8 (LARGE, 1954), com uma fina névoa gerada pelo pulverizador manual de plástico (Sanremo, REF: 501 – 580 ml) até o ponto de escorrimento. Após a inoculação, as bandejas foram preenchidas com água, e os conjuntos foram envoltos por sacos plásticos transparentes, tutorados, e fechados 40 cm acima da altura das plantas por 48 horas. A temperatura durante as inoculações não ultrapassou 28 °C, a umidade relativa do ar se manteve próxima aos 90%, os sacos foram abertos e iniciaram as avaliações. Em cada ensaio foi adicionado como controle negativo as cultivares Quartzo e Marfim, as quais foram inoculados somente com água e Tween 20.

Tabela 6 - Laudo de análise de solo<sup>1</sup> antes da implantação do experimento na casa-de-vegetação no ano de 2017. Passo Fundo – 2018

Argila (%) <sup>2</sup>	pH H <sub>2</sub> O <sup>3</sup>	Índice SMP	P <sup>4</sup> mg/dm <sup>3</sup>	K <sup>4</sup> mg/dm <sup>3</sup>	M.O. (%) <sup>5</sup>
32	6,5	6,6	>100	>400	8,3
Al <sup>5</sup> cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	Ca <sup>5</sup> cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	Mg <sup>5</sup> cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	Al + H cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	CTC cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	Saturação p/ bases (%)
0	14,5	8,3	2,2	27	92
Saturação por Al (%)	S <sup>6</sup> mg/dm <sup>3</sup>	Zn <sup>4</sup> mg/dm <sup>3</sup>	Cu <sup>4</sup> mg/dm <sup>3</sup>	B <sup>7</sup> mg/dm <sup>3</sup>	Mn <sup>5</sup> mg/dm <sup>3</sup>
0	16	51	1,6	1,8	2

Fonte: Dados do autor.

<sup>1</sup>Laboratório de Análises de Solo da UFRGS, Porto Alegre, RS. <sup>2</sup>Determinada pelo método do densímetro. <sup>3</sup>pH em água 1:1. <sup>4</sup>Método de Mehlich 1. <sup>5</sup>Matéria orgânica determinada por digestão úmida. Elementos trocáveis extraídos com KCl 1 mol.l-1. <sup>6</sup>S-SO<sub>4</sub> extraído com CaHPO<sub>4</sub> 500 mg/l de P. <sup>7</sup>Extraído com água quente.

## Avaliações

Foram realizadas avaliações dos componentes de resistência quantitativos, incluindo período de incubação (PI), eficiência relativa de infecção (ERI), número final de lesões (NFL), comprimento final de lesão (CFL), taxa de expansão de lesão ( $r$ ), e do componente de resistência qualitativo tipo de lesão. Todas as avaliações foram realizadas tanto para raça 1, quanto para raça 2 de *Ptr*, e todos componentes foram avaliados sobre a penúltima folha emitida do colmo principal. O PI foi avaliado na abertura das câmaras úmidas, 48 horas após inoculação, através do exame visual das folhas com lupa de bolso com magnitude de 60x. Computou-se o tempo em que pelo menos uma lesão em cada repetição foi visualizada. A ERI representa a razão entre o número de lesões formadas por  $\text{cm}^2$  de área foliar pelo número de conídios depositados por  $\text{cm}^2$  de área foliar. Assim, na inoculação foram depositadas lamínulas  $2 \times 2$  cm na superfície foliar, em cinco locais de cada repetição, e 8 horas após a inoculação foi realizada a contagem do número de esporos viáveis em cada lamínula, com auxílio de um microscópio óptico (Primo Star, Zeiss). Os esporos foram considerados viáveis com tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao comprimento do esporo. A contagem do número de lesões por  $\text{cm}^2$  foi realizada 120 horas após inoculação, com a avaliação de  $1 \text{ cm}^2$  em cinco diferentes pontos da região central das folhas de cada repetição, calculando-se a ERI em porcentagem. O NFL indica o número de sítios de infecção que efetivamente se desenvolveram, e foi mensurado por centímetro quadrado ao final das avaliações, em cinco locais da região central das folhas por repetição 288 horas após inoculação. O CFL foi quantificado com paquímetro digital (Digimess, resolução de 0,01mm) 288 horas após inoculação, com mensuração de 20 lesões por repetição, considerando como lesão a região necrótica mais a região clorótica. A  $r$  foi determinada pela mensuração diária de cinco lesões por repetição, a partir de 96 horas após inoculação, durante 10 dias, com paquímetro digital. Os valores de comprimento de lesão em função do tempo foram plotados para análise de regressão linear, sendo  $r$  a inclinação da reta, conforme metodologia proposta por Jesus Júnior et al. (2004, p. 159).

O tipo de lesão foi avaliado oito dias após a inoculação, com notas de 1 a 5, de acordo com a escala de Lamari e Bernier (1989a). Lesões tipo 1 são pequenas manchas

com coloração marrom a preta sem necrose ou clorose, lesões tipo 2 são pequenas manchas marrom escuras com pequena quantidade de clorose ou necrose, lesões tipo 3 são pequenas manchas de coloração marrom a preta circundada por halo distinto de clorose ou necrose, não coalescidas, lesões tipo 4 são pequenas manchas de coloração marrom a preta, circundada por necrose bronzeada ou clorose, às vezes coalescidas e lesões tipo 5 são lesões coalescidas, com tecido afetado necrótico ou clorótico. Notas maiores ou igual a 3 indicam suscetibilidade do genótipo ao isolado, e notas inferiores a 3 consideram o genótipo resistente ao isolado testado (LAMARI et al., 2003). As notas foram dadas com base no tipo de lesão de maior frequência em cada repetição, através da avaliação de todas as plantas da unidade experimental.

#### **4.3.2 Infiltração das toxinas Ptr ToxA e Ptr ToxB em plantas de trigo**

As cultivares foram avaliadas para reação as TSHs Ptr ToxA e Ptr ToxB. Os filtrados das culturas puras foram produzidos e doados pela North Dakota State University, Fargo, Estados Unidos, e enviados ao Brasil. Os genes das TSHs foram clonados e transformados dentro da levedura *Pichia pastoris* cepa X33 (LIU et al., 2009; ABEYSEKARA et al., 2010). As cepas X33 geneticamente modificadas foram usadas para produzir cada uma das TSHs. As cepas foram cultivadas em meio de cultura BDA por 24-48 horas na temperatura de 30 °C, com agitação constante e vigorosa. Após esse período, as culturas foram centrifugadas para recolher os filtrados de cultura, e assim foram liofilizados e enviados ao Brasil.

#### **Delineamento experimental**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Foram realizados dois ensaios para Ptr ToxA e para Ptr ToxB, com a finalidade de confirmar a resposta de sensibilidade ou insensibilidade de cada cultivar a cada toxina. A unidade experimental foi constituída por três plântulas do mesmo genótipo, e cada ensaio contou com três repetições.

## **Tratos culturais e infiltração de Ptr ToxA e Ptr ToxB**

As cultivares foram semeadas em tubetes plásticos de 290 cm<sup>3</sup>, preenchidos com substrato Carolina Soil. Em cada tubete, três plântulas do mesmo genótipo foram mantidas. A cada dois dias, os tubetes foram irrigados com aproximadamente 20 ml de água, e dez dias após o plantio foi realizada a adubação com N-P-K com 20 ml por tubete da diluição de 50 g do produto comercial Kristalon Laranja (Yara) (06-12-36) em 5 litros de água. A infiltração foi realizada quando todas as plantas apresentavam a segunda folha completamente expandida, com aproximadamente 18 dias após semeadura.

As toxinas liofilizadas foram ressuspendidas em água Milli-Q estéril e aproximadamente 20 µl das TSHs foram infiltradas através da pressão sobre a segunda folha de cada plântula de trigo, usando seringas de 1 ml (sem agulha). As áreas infiltradas foram marcadas com caneta permanente atóxica e as plantas foram colocadas em câmara de crescimento a 21 °C com fotoperíodo de 12 horas. Nesse experimento, Salamouni funcionou também como controle negativo, pois é insensível a Ptr ToxA e Ptr ToxB. Além dela, foram usados como controle positivo as cultivares Glenlea e 6B662, para Ptr ToxA e para Ptr ToxB (FARIS; LIU; XU, 2013), respectivamente.

### **Avaliações**

As reações foram avaliadas cinco dias após infiltração, descrevendo sensibilidade ou insensibilidade, de acordo com Kariyawasam et al. (2016). A resposta de sensibilidade foi gerada quando pelo menos 66% das plantas e/ou repetições apresentavam desenvolvimento de clorose ou necrose dentro da área marcada, da mesma forma foi avaliada a insensibilidade, quando pelo menos 66% das plantas não desenvolveram reações dentro da área marcada.

#### **4.3.3 Análise de dados**

O estudo foi dividido em duas partes para avaliar os componentes de resistência (raça 1 e raça 2, ambas com 38 cultivares). Após, as cultivares foram submetidas a

infiltração de Ptr ToxA e Ptr ToxB para avaliar a sensibilidade às toxinas. Nesse sentido, para descrever as variáveis quantitativas utilizou-se medidas de tendência central, dispersão e posição, e para descrever as variáveis qualitativas do estudo foram utilizadas frequências absolutas e relativas. Em todas análises o nível de significância utilizado foi de 5%. Para comparar as variáveis ERI, NFL, CFL e r entre as raças em cada cultivar e entre as cultivares em cada raça foram utilizadas Regressões Log-Lineares Gama (MCCULLAGH; NELDER, 1989), sendo que para corrigir os valores-p das comparações múltiplas foi utilizado o método de Holm-Bonferroni (HOLM, 1979). Para comparar as variáveis qualitativas do estudo foi utilizado o teste Exato de Fisher (AGRESTI, 2003), e para comparar a sensibilidade à infiltração de Ptr ToxA com as variáveis quantitativas do estudo foi utilizado o teste de Mann Whitney (HOLLANDER; WOLFE, 1999). O software utilizado nas análises foi o R (versão 3.5.0).

#### **4.4 Resultados**

##### **4.4.1 Avaliação dos componentes de resistência para as raças 1 e 2 de *Pyrenophora tritici-repentis***

###### **Componentes de resistência quantitativos entre raças e cultivares**

A descrição dos componentes de resistência do estudo com resultados de duas raças de *Ptr* identifica números de referência para estudos posteriores e contribui para o maior conhecimento da interação trigo-*Ptr*. Dessa forma, torna-se importante ressaltar os valores encontrados neste trabalho (Tabela 7). A média da ERI foi de 30,59%, com mínimo de 3,37% e máximo de 100,00%. A média do NFL foi de 2,29, com mínimo de 0,20 e o máximo de 11,40. A média do CFL foi de 1,51 mm, com mínimo de 0,51 mm e o máximo de 5,18 mm. A média da r foi de 0,16 com um desvio padrão de 0,14, sendo o mínimo 0,001 e o máximo 0,854.

Tabela 7 - Descritiva dos componentes de resistência. Passo Fundo – 2018

Variáveis	N <sup>1</sup>	Média	D.P. <sup>2</sup>	1ºQ <sup>3</sup>	2ºQ <sup>4</sup>	3ºQ <sup>5</sup>
ERI <sup>6</sup>	434	30,59	15,95	18,82	27,50	40,00
Número final de lesões	434	2,29	1,44	1,40	2,00	2,80
Comprimento final de lesão	434	1,51	0,63	1,06	1,35	1,84
Expansão da lesão	434	0,16	0,14	0,07	0,12	0,20

Fonte: Dados do autor.

<sup>1</sup>Número de observações. <sup>2</sup>Desvio padrão. <sup>3</sup>Primeiro Quartil, medida de posição em que pelo menos 25% dos valores são menores que ele. <sup>4</sup>Segundo Quartil, medida de posição em que pelo menos 50% dos valores são menores que ele. <sup>5</sup>Terceiro Quartil, medida de posição em que pelo menos 75% dos valores são menores que ele. <sup>6</sup>Eficiência relativa de infecção.

Em relação ao PI não houve diferença estatística para as cultivares estudadas. As câmaras úmidas foram retiradas 48 horas após a inoculação, sendo este o momento em que iniciaram as avaliações. No entanto, 48 horas após a inoculação, todas as cultivares estudadas apresentavam lesões pela infecção de *Ptr*. Assim, o método de inoculação utilizado no trabalho não permitiu identificar diferenças estatísticas neste componente de resistência, sendo retirado das análises estatísticas do experimento.

Em relação a análise das fontes de variação e interação do estudo (Tabela 8), observou-se que para o ERI, NFL, e r houve influência significativa da raça, cultivar e da interação cultivar x raça, ao passo que o comprimento final da lesão mostrou influência significativa apenas da cultivar e da interação cultivar x raça. A partir da observação da interação significativa cultivar x raça, para todas as variáveis quantitativas foram realizados os desdobramentos para cada variável.

Tabela 8 - Análise das fontes de variação e interação do estudo. Passo Fundo, 2018

Fontes de variação	ERI <sup>1</sup> Valor-p <sup>2</sup>	Número final de lesões Valor-p	Comprimento final da lesão Valor-p	Expansão da lesão Valor-p
Raça	<0,001	<0,001	0,196	<0,001
Cultivar	<0,001	0,001	<0,001	<0,001
Cultivar x Raça	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Fonte: Dados do autor.

<sup>1</sup>Eficiência relativa de infecção. <sup>2</sup>Regressões log-lineares gama (valor-p<0,050).

A ERI foi estatisticamente maior na raça 2 em comparação a raça 1 (Tabela 9), com diferença significativa entre as raças para as cultivares BRS Reponte, BRS Sabiá, BRS Sanhaço, BRS Umbú, Celebra, FPS Amplitude, FPS Virtude, OR 1401, ORS 1403, ORS Vintecinco, TBIO Iguaçu, TBIO Mestre e TBIO Sinuelo. Em relação a ERI na raça 1 (Anexo 1), a cultivar FPS Virtude foi a que apresentou menor média, não diferindo estatisticamente de BRS 394, BRS Parrudo, BRS Reponte, BRS Sabiá, BRS Sanhaço, BRS Umbú, Celebra, FPS Certero, Inova, LG Cromo, OR 1401, ORS 1403, ORS Vintecinco, TBIO Iguaçu, TBIO Tibagi e TBIO Toruk. TBIO Itaipú apresentou a maior média, diferindo estatisticamente de BRS Reponte, BRS Sanhaço, BRS Umbú, FPS Virtude e TBIO Toruk. Em relação a ERI na raça 2 as cultivares FPS Certero e Inova apresentaram as menores médias, diferindo estatisticamente apenas de TBIO Mestre. TBIO Mestre apresentou a maior média, diferindo estatisticamente de BRS Sanhaço, FPS Certero, FPS Virtude, Inova, LG Oro, LG Supra e TBIO Audaz.

Tabela 9 - Comparação da eficiência relativa de infecção (%) entre as raças 1 e 2 de *Pyrenophora tritici-repentis*. Passo Fundo – 2018

(Continua)

Cultivares	Raça 1 <sup>1</sup>		Raça 2 <sup>2</sup>		Valor-p <sup>3</sup>
	Média	D.P. <sup>4</sup>	Média	D.P.	
BBR Aventureiro	28,7	18,7	38,1	10,0	1,000
BRS 394	19,6	1,5	35,0	13,1	1,000
BRS Gralha Azul	21,2	4,5	36,8	17,2	0,290
BRS Marcante	25,6	1,0	40,7	5,9	1,000
BRS Parrudo	14,6	6,8	30,0	6,0	0,414
BRS Reponte	14,6	4,0	41,4	7,6	<b>0,001</b> <sup>5</sup>
BRS Sabiá	17,4	5,6	38,2	12,5	<b>0,011</b>
BRS Sanhaço	11,3	8,3	26,8	5,2	<b>0,004</b>
BRS Umbú	11,4	3,6	36,7	8,2	<b>0,006</b>
Celebra	20,2	17,0	55,0	19,3	<b>0,037</b>
FPS Amplitude	19,8	4,5	46,4	14,0	<b>0,004</b>
FPS Certero	16,7	8,5	20,0	5,4	1,000
FPS Virtude	6,0	2,2	22,5	5,0	<b>0,001</b>
Inova	21,4	5,0	20,0	5,9	1,000
LG Cromo	18,7	8,0	32,9	13,0	0,251
LG Oro	25,2	8,9	23,1	7,3	1,000
LG Supra	29,1	12,4	25,2	5,4	1,000
Marfim	21,5	7,6	28,8	14,2	1,000

Cultivares	Raça 1 <sup>1</sup>		Raça 2 <sup>2</sup>		(Conclusão)
	Média	D.P. <sup>4</sup>	Média	D.P.	Valor-p <sup>3</sup>
OR 1401	17,0	9,3	34,6	16,3	<b>0,037</b>
ORS 1403	15,4	10,5	37,9	7,2	<b>0,002</b>
ORS Vintecinco	16,1	7,1	35,4	8,1	<b>0,011</b>
Quartzo	34,7	19,3	38,2	13,8	1,000
Safira	24,5	2,5	30,7	7,5	1,000
Salamouni	30,9	19,5	30,9	18,2	1,000
Supera	25,6	15,9	31,3	17,8	1,000
TBIO Alpaca	29,9	8,1	39,5	15,9	1,000
TBIO Audaz	29,2	11,2	23,5	7,7	1,000
TBIO Consistência	21,3	13,5	33,0	18,3	0,814
TBIO Iguaçu	18,2	8,2	48,3	18,6	<b>0,046</b>
TBIO Itaipu	47,8	7,3	53,3	32,2	1,000
TBIO Mestre	22,9	4,8	63,6	25,8	<b>&lt;0,001</b>
TBIO Noble	19,2	5,1	32,6	12,6	0,345
TBIO Sintonia	31,2	18,5	42,5	14,0	1,000
TBIO Sinuelo	24,5	10,6	53,9	9,9	<b>0,011</b>
TBIO Sonic	39,9	7,1	48,3	17,3	1,000
TBIO Sossego	26,0	9,4	43,8	12,7	0,370
TBIO Tibagi	19,5	16,0	40,0	10,5	0,414
TBIO Toruk	12,7	1,9	30,8	7,4	0,108

Fonte: Dados do autor.

<sup>1</sup>Isolado BRPtr8. <sup>2</sup>Isolado BRPtr7. <sup>3</sup>Regressões log-lineares gama (valor-p<0,050). <sup>4</sup>Desvio padrão. <sup>5</sup>Em negrito diferença significativa entre raças para p<0,050.

Em relação ao NFL, este foi maior na raça 1, com diferença significativa entre as raças nas cultivares BRS Sanhaço, Inova, TBIO Audaz e TBIO Sossego (Tabela 6). Para o NFL na raça 1 (Anexo 1), BRS Parrudo apresentou a menor média, não diferindo estatisticamente de BRS 394, BRS Marcante, BRS Sabiá, BRS Umbú, Celebra, FPS Amplitude, FPS Certero, FPS Virtude, Inova, LG Supra, Marfim, OR 1401, ORS 1403, ORS Vintecinco, Quartzo, Safira, Salamouni, Supera, TBIO Consistência, TBIO Iguaçu, TBIO Mestre, TBIO Noble, TBIO Sintonia, TBIO Sinuelo, TBIO Sonic e TBIO Sossego. A cultivar TBIO Itaipú apresentou o maior número final de lesões, diferindo estatisticamente apenas de BRS Parrudo. Para o NFL na raça 2, BRS Parrudo novamente apresentou a menor média, não diferindo estatisticamente de BRS 394, BRS Marcante, BRS Sanhaço, BRS Umbú, Celebra, FPS Certero, FPS Virtude, Inova, Marfim, ORS 1403,

ORS Vintecinco, Quartzo, Safira, Salamouni, TBIO Audaz, TBIO Consistência, TBIO Iguaçu, TBIO Noble, TBIO Sintonia, TBIO Sonic e TBIO Sossego, , TBIO Tibagi e TBIO Toruk. TBIO Mestre apresentou a maior média, diferindo estatisticamente de BRS Parrudo e TBIO Sossego.

Tabela 10 - Comparação do número final de lesões entre as raças 1 e 2 de *Pyrenophora tritici-repentis*. Passo Fundo – 2018

(Continua)

Cultivares	Raça 1 <sup>1</sup>		Raça 2 <sup>2</sup>		Valor-p <sup>3</sup>
	Média	D.P. <sup>4</sup>	Média	D.P.	
BBR Aventureiro	3,8	2,0	2,3	0,8	1,000
BRS 394	2,9	0,9	1,9	0,7	1,000
BRS Gralha Azul	4,3	2,2	2,2	0,5	0,415
BRS Marcante	2,0	0,2	1,8	0,4	1,000
BRS Parrudo	0,7	0,2	0,6	0,3	1,000
BRS Reponte	3,1	1,7	2,8	0,7	1,000
BRS Sabiá	1,8	0,9	2,4	0,6	1,000
BRS Sanhaço	4,0	1,4	1,5	1,1	<b>0,009<sup>5</sup></b>
BRS Umbú	2,3	1,0	1,0	0,3	0,783
Celebra	3,7	1,4	1,4	0,6	0,303
FPS Amplitude	2,9	2,8	2,2	0,7	1,000
FPS Certero	2,6	1,9	0,9	0,4	0,132
FPS Virtude	3,3	1,0	1,3	0,2	0,335
Inova	3,1	1,5	0,9	0,4	<b>0,033</b>
LG Cromo	3,1	0,9	2,1	0,8	1,000
LG Oro	3,1	1,1	2,3	1,3	1,000
LG Supra	3,0	1,2	2,6	1,2	1,000
Marfim	3,0	1,4	1,8	0,4	1,000
OR 1401	2,2	0,9	1,9	0,9	1,000
ORS 1403	2,8	1,6	1,4	0,4	0,222
ORS Vintecinco	2,8	0,9	1,4	0,8	0,346
Quartzo	2,0	1,4	1,4	1,0	1,000
Safira	2,0	0,5	1,8	1,1	1,000
Salamouni	2,1	0,7	1,1	0,4	0,415
Supera	3,0	1,1	2,4	0,9	1,000
TBIO Alpaca	4,5	3,5	2,5	0,8	0,582
TBIO Audaz	3,9	3,6	1,3	0,8	<b>0,002</b>
TBIO Consistência	3,0	2,7	1,6	0,5	0,459
TBIO Iguaçu	2,3	0,2	1,9	2,0	1,000
TBIO Itaipu	4,7	1,5	2,6	1,1	1,000
TBIO Mestre	1,7	0,4	2,7	2,3	1,000

(Conclusão)

Cultivares	Raça 1 <sup>1</sup>		Raça 2 <sup>2</sup>		Valor-p <sup>3</sup>
	Média	D.P. <sup>4</sup>	Média	D.P.	
TBIO Noble	2,2	0,9	1,6	0,8	1,000
TBIO Sintonia	2,4	1,0	1,8	0,7	1,000
TBIO Sinuelo	2,6	1,6	2,0	0,7	1,000
TBIO Sonic	3,1	0,9	1,9	1,2	1,000
TBIO Sossego	2,5	0,9	1,0	0,8	<b>0,018</b>
TBIO Tibagi	4,5	0,8	1,6	0,4	0,227
TBIO Toruk	4,3	2,2	1,7	0,9	0,391

Fonte: Dados do autor.

<sup>1</sup>Isolado BRPtr8. <sup>2</sup>Isolado BRPtr7. <sup>3</sup>Regressões log-lineares gama (valor-p<0,050). <sup>4</sup>Desvio padrão. <sup>5</sup>Em negrito diferença significativa entre raças para p<0,050.

Em relação ao CFL, este foi maior na raça 2 (Tabela 11), mostrando diferença significativa entre as raças nos cultivares BRS Marcante, BRS Reponte e LG Oro. No CFL para raça 1 (Anexo 1), BRS Marcante apresentou a menor média, diferindo estatisticamente de BRS Sabiá e BRS Umbú. BRS Sabiá apresentou o maior CFL, diferindo estatisticamente de BRS Marcante, BRS Reponte, BRS Celebra, FPS AMPLITUDE, LG Cromo, LG Oro, ORS 1403, Quartzo, Salamouni e TBIO Sossego. No CFL na raça 2, Quartzo foi a cultivar que apresentou menor média, não diferindo estatisticamente de BRS Parrudo, BRS Sanhaço, BRS Umbú, Celebra, FPS Certero, FPS Virtude, Inova, LG Cromo, ORS 1403, Safira, Salamouni, TBIO Alpaca, TBIO Audaz, TBIO Consistência, TBIO Iguazú, TBIO Noble, TBIO Sintonia, TBIO Sinuelo, TBIO Sossego, TBIO Tibagi, TBIO Toruk. BRS Marcante apresentou a maior média, diferindo de BRS Parrudo, BRS Sanhaço, FPS Certero, Inova, LG Cromo, Quartzo, Salamouni, TBIO Audaz, TBIO Consistência, TBIO Iguazú, TBIO Noble e TBIO Sossego.

Tabela 11 - Comparação do comprimento final da lesão (mm) entre as raças 1 e 2 de *Pyrenophora tritici-repentis*. Passo Fundo – 2018

(Continua)

Cultivares	Raça 1 <sup>1</sup>		Raça 2 <sup>2</sup>		Valor-p <sup>3</sup>
	Média	D.P. <sup>4</sup>	Média	D.P.	
BBR Aventureiro	1,53	0,49	1,76	0,40	1,000
BRS 394	1,58	0,24	2,48	0,25	1,000
BRS Galha Azul	1,76	0,70	1,58	0,51	1,000

(Conclusão)

Cultivares	Raça 1 <sup>1</sup>		Raça 2 <sup>2</sup>		Valor-p <sup>3</sup>
	Média	D.P. <sup>4</sup>	Média	D.P.	
BRS Marcante	0,89	0,04	2,84	0,24	<b>0,001</b>
BRS Parrudo	1,33	0,03	1,01	0,35	1,000
BRS Reponte	1,18	0,24	2,31	0,52	<b>0,002</b>
BRS Sabiá	2,63	1,50	2,29	1,24	1,000
BRS Sanhaço	1,70	0,76	1,04	0,22	0,120
BRS Umbú	2,52	0,50	1,23	0,39	0,083
Celebra	0,98	0,22	1,46	0,50	1,000
FPS Amplitude	1,12	0,24	1,52	0,49	1,000
FPS Certero	1,16	0,38	0,99	0,13	1,000
FPS Virtude	1,66	0,21	1,36	0,27	1,000
Inova	1,89	0,10	0,95	0,21	0,121
LG Cromo	1,06	0,35	1,33	0,40	1,000
LG Oro	0,96	0,26	1,66	0,55	<b>0,040</b>
LG Supra	1,40	0,47	2,24	0,31	0,168
Marfim	1,30	0,46	1,76	0,75	1,000
OR 1401	1,48	0,57	1,94	0,96	1,000
ORS 1403	1,29	0,43	1,36	0,22	1,000
ORS Vintecinco	1,52	0,42	1,79	0,49	1,000
Quartzo	1,07	0,21	0,82	0,17	1,000
Safira	1,48	0,46	1,66	0,55	1,000
Salamouni	1,14	0,34	0,93	0,32	1,000
Supera	1,90	0,62	1,97	0,80	1,000
TBIO Alpaca	1,32	0,19	1,37	0,33	1,000
TBIO Audaz	1,90	0,53	1,27	0,50	0,499
TBIO Consistência	1,42	0,23	1,16	0,47	1,000
TBIO Iguaçú	1,23	0,18	1,16	0,64	1,000
TBIO Itaipu	1,88	0,35	1,91	0,12	1,000
TBIO Mestre	1,35	0,39	1,61	0,50	1,000
TBIO Noble	1,59	0,60	1,23	0,33	1,000
TBIO Sintonia	1,60	0,76	1,36	0,53	1,000
TBIO Sinuelo	1,70	0,42	1,50	0,25	1,000
TBIO Sonic	1,63	0,13	2,15	0,25	1,000
TBIO Sossego	1,06	0,14	0,92	0,18	1,000
TBIO Tibagi	1,22	0,46	1,72	0,32	1,000
TBIO Toruk	1,44	0,30	1,32	0,18	1,000

Fonte: Dados do autor.

<sup>1</sup>Isolado BRPtr8. <sup>2</sup>Isolado BRPtr7. <sup>3</sup>Regressões log-lineares gama (valor-p<0,050). <sup>4</sup>Desvio padrão. <sup>5</sup>Em negrito diferença significativa entre raças para p<0,050.

Em relação a r, esta foi maior na raça 2, com diferença significativa entre as raças nas cultivares BRS Gralha Azul, BRS Parrudo e BRS Reponte (Tabela 12). Na raça 1 (Anexo 1), BRS Parrudo apresentou a menor média, não diferindo estatisticamente das demais cultivares. Na raça 2, BRS Umbú apresentou a menor média, não diferindo de BRS Parrudo, BRS Sanhaço, Celebra, FPS Amplitude, FPS Certero, FPS Virtude, Inova, LG Cromo, LG Oro, LG Supra, Marfim, OR 1401, ORS 1403, ORS Vintecinco, Quartzo, Safira, Salamouni, TBIO Alpaca, TBIO Audaz, TBIO Consistência, TBIO Iguaçu, TBIO Itaipu, TBIO Mestre, TBIO Noble, TBIO Sintonia, TBIO Sinuelo, TBIO Sonic, TBIO Sossego, TBIO Tibagi, TBIO Toruk. BRS 394 apresentou a maior média, diferindo estatisticamente de BRS Parrudo, BRS Sanhaço, BRS Umbú, Celebra, FPS Certero, Inova, LG Cromo, ORS Vintecinco, Quartzo, Safira, Salamouni, TBIO Alpaca, TBIO Consistência, TBIO Iguaçu, TBIO Mestre, TBIO Noble, TBIO Sintonia, TBIO Sossego.

Tabela 12 - Comparação da expansão da lesão entre as raças 1 e 2 de *Pyrenophora tritici-repentis*. Passo Fundo – 2018

(Continua)

Cultivares	Raça 1 <sup>1</sup>		Raça 2 <sup>2</sup>		Valor-p <sup>3</sup>
	Média	D.P. <sup>4</sup>	Média	D.P.	
BBR Aventureiro	0,15	0,07	0,31	0,11	0,057
BRS 394	0,14	0,05	0,62	0,15	0,335
BRS Gralha Azul	0,13	0,08	0,30	0,14	<b>0,022<sup>5</sup></b>
BRS Marcante	0,06	0,01	0,31	0,05	1,000
BRS Parrudo	0,04	0,03	0,05	0,07	<b>&lt;0,001</b>
BRS Reponte	0,10	0,05	0,59	0,24	<b>&lt;0,001</b>
BRS Sabiá	0,09	0,04	0,44	0,15	1,000
BRS Sanhaço	0,11	0,03	0,11	0,09	1,000
BRS Umbú	0,10	0,02	0,05	0,01	1,000
Celebra	0,07	0,02	0,08	0,09	1,000
FPS Amplitude	0,09	0,01	0,16	0,15	1,000
FPS Certero	0,06	0,02	0,06	0,04	1,000
FPS Virtude	0,08	0,02	0,13	0,06	1,000
Inova	0,06	0,02	0,06	0,03	1,000
LG Cromo	0,08	0,04	0,06	0,04	0,642
LG Oro	0,09	0,02	0,19	0,14	0,841
LG Supra	0,09	0,04	0,19	0,13	1,000
Marfim	0,18	0,03	0,21	0,14	1,000
OR 1401	0,15	0,07	0,20	0,18	1,000
ORS 1403	0,16	0,05	0,14	0,14	1,000

(Conclusão)

Cultivares	Raça 1 <sup>1</sup>		Raça 2 <sup>2</sup>		Valor-p <sup>3</sup>
	Média	D.P. <sup>4</sup>	Média	D.P.	
ORS Vintecinco	0,15	0,06	0,10	0,05	1,000
Quartzo	0,09	0,03	0,14	0,10	1,000
Safira	0,14	0,04	0,08	0,04	1,000
Salamouni	0,14	0,07	0,07	0,10	1,000
Supera	0,18	0,04	0,22	0,20	1,000
TBIO Alpaca	0,14	0,06	0,09	0,05	1,000
TBIO Audaz	0,17	0,06	0,19	0,11	1,000
TBIO Consistência	0,14	0,04	0,11	0,05	0,841
TBIO Iguaçu	0,20	0,02	0,07	0,02	1,000
TBIO Itaipu	0,19	0,04	0,18	0,07	1,000
TBIO Mestre	0,10	0,06	0,13	0,11	1,000
TBIO Noble	0,20	0,12	0,13	0,12	1,000
TBIO Sintonia	0,15	0,05	0,08	0,08	1,000
TBIO Sinuelo	0,13	0,04	0,14	0,09	1,000
TBIO Sonic	0,23	0,05	0,16	0,08	1,000
TBIO Sossego	0,13	0,07	0,09	0,09	1,000
TBIO Tibagi	0,20	0,03	0,16	0,09	1,000
TBIO Toruk	0,14	0,02	0,11	0,09	0,608

Fonte: Dados do autor.

<sup>1</sup>Isolado BRPtr8. <sup>2</sup>Isolado BRPtr7. <sup>3</sup>Regressões log-lineares gama (valor-p<0,050). <sup>4</sup>Desvio padrão. <sup>5</sup>Em negrito diferença significativa entre raças para p<0,050.

Ao comparar as raças para cada uma das variáveis quantitativas, observaram-se diferenças significativas em algumas cultivares para ERI, NFL, CFL e r, sugerindo a existência de mecanismos de resistência ou suscetibilidade específicos para as raças. Além disso, ao relacionar cultivares com melhor desempenho de resistência para os componentes de resistência avaliados (Tabela 13), nota-se que FPS Virtude e BRS Sanhaço na ERI, BRS Parrudo no número final de lesões, LG Cromo, Quartzo, Salamouni e TBIO Sossego no CFL foram estatisticamente superiores as demais cultivares em ambas raças de *Ptr*. Tendo em vista que a r para raça 1 não mostrou diferença significativa entre as cultivares, o mesmo tipo de comparação não pode ser realizado. No entanto, vale ressaltar que apesar de BRS Parrudo não ter mostrado diferença significativa das demais cultivares na raça 1, esta cultivar apresentou a menor média na raça 1 e também na raça 2.

Tabela 13 - Relação de cultivares com melhor desempenho<sup>1</sup> para os componentes de resistência quantitativos avaliados com raça 1 e 2 de *Pyrenophora tritici-repentis*. Passo Fundo – 2018

	Raça 1 <sup>2</sup>	Raça 2 <sup>3</sup>
ERI <sup>4</sup>	FPS Virtude, BRS Reponte, BRS Sanhaço, BRS Umbú, TBIO Toruk	FPS Certero, Inova, BRS Sanhaço, FPS Virtude, LG Oro, LG Supra, TBIO Audaz
Número final de lesões	BRS Parrudo	BRS Parrudo e TBIO Sossego
Comprimento final de lesão	BRS Marcante, BRS Reponte, Celebra, FPS Amplitude, LG Cromo, LG Oro, ORS 1403, Quartzo, Salamouni, TBIO Sossego	BRS Parrudo, BRS Sanhaço, FPS Certero, Inova, LG Cromo, Quartzo, Salamouni, TBIO Audaz, TBIO Consistência, TBIO Iguaçu, TBIO Noble, TBIO Sossego
Expansão da lesão	SI <sup>5</sup>	BRS Parrudo, BRS Sanhaço, BRS Umbú, Celebra, FPS Certero, Inova, LG Cromo, ORS Vintecinco, Quartzo, Safira, Salamouni, TBIO Alpaca, TBIO Consistência, TBIO Iguaçu, TBIO Mestre, TBIO Noble, TBIO Sintonia, TBIO Sossego

Fonte: Dados do autor.

<sup>1</sup>Cultivares que obtiveram a menor média ou não diferiram da menor média, mas que diferiram da maior média em cada uma das variáveis quantitativas para cada raça de *Ptr* (valor- $p < 0,050$ ). <sup>2</sup>Isolado BRPtr8. <sup>3</sup>Isolado BRPtr7. <sup>4</sup>Eficiência relativa de infecção. <sup>5</sup>Sem informação pois não houve diferença estatística significativa entre cultivares com  $p < 0,050$ .

### Tipo de lesão entre raças e cultivares

Em relação ao tipo de lesão, notas inferiores a 3 indicam resistência dos genótipos ao isolado e notas maiores ou iguais a 3 indicam suscetibilidade (LAMARI et al., 2003; 2005). A lesão tipo 3 predominou nos ensaios (41% das observações) (Tabela 14), no entanto, notas inferiores a 3 predominaram nas observações em 55,5% dos casos, mostrando em maior frequência a reação de resistência nas cultivares avaliadas, contra 44,5% das observações de suscetibilidade.

Tabela 14 - Tabela descritiva da variável qualitativa tipo de lesão. Passo Fundo – 2018

Variável qualitativa		N <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>
Tipo de lesão <sup>3</sup>	Nota 1	86	19,80
	Nota 2	155	35,70
	Nota 3	178	41,00
	Nota 4	14	3,20
	Nota 5	1	0,20

Fonte: Dados do autor.

<sup>1</sup>Número de observações. <sup>2</sup>Porcentagem do número de observações para cada nota relativo ao número total de observações. <sup>3</sup>De acordo com a escala de Lamari e Bernier (1989a).

Houve diferença significativa nos tipos de lesão para as raças 1 e 2 de *Ptr* (Tabela 11). Notas iguais ou superiores a 3 indicam suscetibilidade dos genótipos, assim foram encontradas em maior frequência na raça 1 em 48,8% das observações em comparação aos 41,1% encontrados na raça 2. Dessa forma, o isolado da raça 1 deste estudo mostrou maior agressividade para o tipo de lesão em comparação a raça 2.

Tabela 15 - Comparação do tipo de lesão para as raças 1 e 2 de *Pyrenophora tritici-repentis*. Passo Fundo – 2018

Tipo de Lesão <sup>1</sup>	Raça 1 <sup>2</sup>		Raça 2 <sup>3</sup>		Valor-p <sup>4</sup>
	N <sup>5</sup>	% <sup>6</sup>	N	%	
Nota 1	13	7,0	73	29,4	<0,001
Nota 2	82	44,1	73	29,4	
Nota 3	81	43,5	97	39,1	
Nota 4	9	4,8	5	2,0	
Nota 5	1	0,5	0	0,0	

Fonte: Dados do autor.

<sup>1</sup>De acordo com a escala de Lamari e Bernier (1989a). <sup>2</sup>Isolado BRPtr8. <sup>3</sup>Isolado BRPtr7. <sup>4</sup>Teste Exato de Fisher. <sup>5</sup>Número de observações. <sup>6</sup>Porcentagem do número de observações para cada nota relativo ao número total de observações em cada raça.

Em relação ao tipo de lesão para cada uma das cultivares (Tabela 16) observou-se que as cultivares com maior frequência de notas 1 e 2 para ambas raças de *Ptr* foram BRS

Parrudo, BRS Sanhaço, Celebra, FPS Amplitude, FPS Certero, FPS Virtude, Inova, LG Cromo, LG Oro, ORS 1403, Quartzo, Salamouni, TBIO Sossego e TBIO Toruk. Nesse sentido, pode-se considerar que essas cultivares apresentam resistência aos isolados testados ao considerar o tipo de lesão.

Tabela 16 - Comparação dos tipos de lesão<sup>1</sup> entre as cultivares na raça 1 e 2 de *Pyrenophora tritici-repentis*. Passo Fundo – 2018

(Continua)

Cultivar	Raça 1 <sup>2</sup>			Raça 2 <sup>3</sup>		
	Lesão tipo 1	Lesão tipo 2	Tipo de lesão > 2	Lesão tipo 1	Lesão tipo 2	Tipo de lesão > 2
	% <sup>4</sup>	%	%	%	%	%
BBR Aventureiro	0,0	33,3	66,7	0,0	12,5	87,5
BRS 394	0,0	33,3	66,7	0,0	0,0	100,0
BRS Gralha Azul	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0
BRS Marcante	0,0	66,7	33,3	0,0	0,0	100,0
BRS Parrudo	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	0,0
BRS Reponte	0,0	33,3	66,7	0,0	0,0	100,0
BRS Sabiá	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0
BRS Sanhaço	0,0	66,7	33,3	87,5	12,5	0,0
BRS Umbú	0,0	33,3	66,7	0,0	50,0	50,0
Celebra	66,7	0,0	33,3	0,0	100,0	0,0
FPS Amplitude	0,0	83,3	16,7	12,5	50,0	37,5
FPS Certero	33,3	66,7	0,0	100,0	0,0	0,0
FPS Virtude	0,0	100,0	0,0	50,0	50,0	0,0
Inova	33,3	66,7	0,0	100,0	0,0	0,0
LG Cromo	16,7	83,3	0,0	25,0	75,0	0,0
LG Oro	0,0	66,7	33,3	25,0	50,0	25,0
LG Supra	0,0	50,0	50,0	0,0	0,0	100,0
Marfim	0,0	16,7	83,3	0,0	25,0	75,0
OR 1401	16,7	83,3	0,0	0,0	12,5	87,5
ORS 1403	16,7	66,7	16,7	50,0	37,5	12,5
ORS Vintecinco	0,0	16,7	83,3	50,0	50,0	0,0
Quartzo	50,0	50,0	0,0	100,0	0,0	0,0
Safira	0,0	0,0	100,0	0,0	25,0	75,0
Salamouni	16,7	83,3	0,0	50,0	37,5	12,5
Supera	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0
TBIO Alpaca	0,0	33,3	66,7	62,5	37,5	0,0
TBIO Audaz	0,0	0,0	100,0	25,0	75,0	0,0
TBIO Consistência	0,0	50,0	50,0	100,0	0,0	0,0
TBIO Iguaçu	0,0	0,0	100,0	25,0	75,0	0,0
TBIO Itaipu	0,0	0,0	100,0	0,0	50,0	50,0

(Conclusão)

Cultivar	Raça 1			Raça 2		
	Lesão tipo 1	Lesão tipo 2	Tipo de lesão > 2	Lesão tipo 1	Lesão tipo 2	Tipo de lesão > 2
	%	%	%	%	%	%
TBIO Mestre	0,0	16,7	83,3	0,0	0,0	100,0
TBIO Noble	0,0	33,3	66,7	25,0	75,0	0,0
TBIO Sintonia	16,7	83,3	0,0	0,0	50,0	50,0
TBIO Sinuelo	0,0	50,0	50,0	0,0	50,0	50,0
TBIO Sonic	0,0	0,0	100,0	0,0	75,0	25,0
TBIO Sossego	16,7	83,3	0,0	62,5	37,5	0,0
TBIO Tibagi	0,0	33,3	66,7	0,0	25,0	75,0
TBIO Toruk	0,0	66,7	33,3	100,0	0,0	0,0

Fonte: Dados do autor.

<sup>1</sup>De acordo com a escala de Lamari e Bernier (1989a). <sup>2</sup>Isolado BRPtr8. <sup>3</sup>Isolado BRPtr7. <sup>4</sup>Porcentagem do número de observações para cada nota relativo ao número total de observações em cada raça para cada cultivar.

Na inoculação somente com água e Tween 20 (controle negativo), todas as plantas controle permaneceram sadias, sem nenhuma lesão de origem biótica ou abiótica durante a realização do experimento, confirmando que os danos nas folhas das cultivares inoculadas com *Ptr* foram causados apenas pelo patógeno e não por outros tipos de estresse.

#### 4.4.2 Infiltração das toxinas *Ptr ToxA* e *Ptr ToxB* em plantas de trigo

Em relação a *Ptr ToxA*, 70,3% das cultivares foram insensíveis (Tabela 17). Da mesma forma, em relação a *Ptr ToxB*, 71,0% das cultivares foram insensíveis, mostrando que os genótipos avaliados apresentam maior frequência de insensibilidade do que sensibilidade, tornando este resultado um ponto positivo na busca por fontes de resistência a *Ptr ToxA* e *Ptr ToxB* em genótipos brasileiros adaptados.

Tabela 17 - Sensibilidade geral das cultivares para as toxinas PtrToxA e Ptr ToxB. Passo Fundo – 2018

Toxinas		% <sup>1</sup>
Ptr ToxA	Insensível	70,3
	Sensível	29,7
Ptr ToxB	Insensível	71,0
	Sensível	29,0

Fonte: Dados do autor.

<sup>1</sup>Porcentagem do número de observações sensíveis e insensíveis das cultivares em relação a infiltração das toxinas Ptr ToxA e Ptr ToxB.

Em relação a sensibilidade das cultivares (Tabela 18), BBR Aventureiro, BRS Sabiá, Celebra, FPS Amplitude, Marfim, Safira, Supera, TBIO Iguaçu, TBIO Mestre, TBIO Sintonia, TBIO Tibagi foram sensíveis para infiltração de Ptr ToxA. Já para Ptr ToxB, as cultivares BBR Aventureiro, BRS Sabiá, BRS Sanhaço, Celebra, Marfim, Safira, Supera, TBIO Iguaçu, TBIO Mestre. TBIO Sintonia e TBIO Tibagi foram sensíveis. Dessa forma, observou-se muitas cultivares com resistência as TSHs Ptr ToxA e Ptr ToxB, complementando o estudo em relação as respostas de resistência para inoculação com as raças 1 e 2 de *Ptr*.

Tabela 18 - Comparação da sensibilidade das cultivares à Ptr ToxA e Ptr ToxB. Passo Fundo – 2018

(Continua)

Sensibilidade à infiltração de toxinas (sensível = +; insensível = -)		
Cultivar	Ptr ToxA	Ptr ToxB
BBR Aventureiro	+	+
BRS 394	-	-
BRS Gralha Azul	-	-
BRS Marcante	-	-
BRS Parrudo	-	-
BRS Reponte	-	-
BRS Sabiá	+	+
BRS Sanhaço	-	+
BRS Umbú	-	-
Celebra	+	+
FPS Amplitude	+	-
FPS Certero	-	-

(Conclusão)

Sensibilidade à infiltração de toxinas (sensível = +; insensível = -)		
Cultivar	Ptr ToxA	Ptr ToxB
FPS Virtude	-	-
Inova	-	-
LG Cromo	-	-
LG Oro	-	-
LG Supra	-	-
Marfim	+	+
OR 1401	-	-
ORS 1403	Si <sup>1</sup>	-
ORS Vintecinco	-	-
Quartzo	-	-
Safira	+	+
Salamouni	-	-
Supera	+	+
TBIO Alpaca	-	-
TBIO Audaz	-	-
TBIO Consistência	-	-
TBIO Iguaçú	+	+
TBIO Itaipu	-	-
TBIO Mestre	+	+
TBIO Noble	-	-
TBIO Sintonia	+	+
TBIO Sinuelo	-	-
TBIO Sonic	-	-
TBIO Sossego	-	-
TBIO Tibagi	+	+
TBIO Toruk	-	-

Fonte: Dados do autor.

<sup>1</sup>Genótipo não infiltrado.

A cultivar Salamouni, usada como controle negativo nesse experimento, mostrou resposta de insensibilidade as toxinas, como esperado, e está descrita na tabela pois foi testada também para os componentes de resistência, participando das análises estatísticas. Já os controles positivos, Glenlea e 6B662, mostraram resposta de sensibilidade para a infiltração com Ptr ToxA e Ptr ToxB, respectivamente, confirmando a eficiência do método usado.

## Sensibilidade à infiltração de Ptr ToxA para os componentes de resistência

Apenas Ptr ToxA foi comparada com os componentes de resistência, pois esta é produzida pelos isolados raça 1 (BRPtr8) e raça 2 (BRPtr7), e o gene que codifica para Ptr ToxB está ausente nestes isolados, não justificando sua comparação. Em relação a comparação do tipo de lesão com sensibilidade à infiltração de Ptr ToxA (Figura 5), houve diferença significativa. As notas 1 e 2 foram superiores na categoria insensível, e refletem a reação de resistência das cultivares aos isolados. Já as notas 3, 4 e 5 foram superiores na categoria sensível, e refletem a reação de suscetibilidade das cultivares aos isolados. A nota 1 representou 22,5% da categoria insensível e 12,9% da categoria sensível, a nota 2 representou 39,6% da categoria insensível em comparação a 26,4% da categoria sensível, a nota 3 representou 36,1% da categoria insensível em comparação com 53,6 da categoria sensível, e as notas 4 e 5 representaram 1,8% e 0% na categoria insensível, respectivamente, comparado a 6,4 e 0,7% na categoria sensível, também respectivamente.

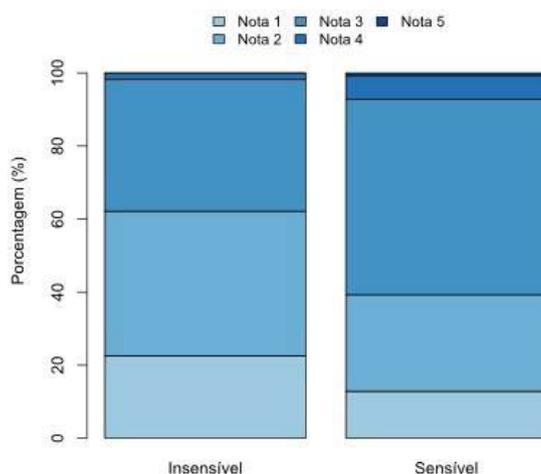


Figura 5 - Comparação em porcentagem do tipo de lesão para as categorias sensível e insensível em relação à infiltração de Ptr ToxA pelo teste Exato de Fisher ( $p < 0,05$ ). Passo Fundo, 2018

Fonte: Dados do autor.

Em relação a comparação dos componentes de resistência quantitativos com a sensibilidade à infiltração de Ptr ToxA (Tabela 19), houve diferença significativa da ERI entre as categorias insensível e sensível, sendo que, a ERI na categoria sensível foi maior

que na categoria insensível. Não houve diferença significativa para as variáveis NFL, CFL e r entre as categorias insensível e sensível. Dessa forma, observa-se que a sensibilidade à Ptr ToxA está relacionada ao tipo de lesão e a ERI, e indica que essas associações merecem ser pesquisadas com maior intensidade para melhor descrever as funções fenotípicas deste importante fator de virulência.

Tabela 19 - Comparação dos componentes de resistência com a sensibilidade à infiltração de Ptr ToxA. Passo Fundo – 2018

Variáveis		N <sup>1</sup>	Média	Valor-p <sup>2</sup>
ERI <sup>3</sup>	Insensível	280	29,34	0,044
	Sensível	140	33,32	
Número final de lesões	Insensível	280	2,32	0,964
	Sensível	140	2,26	
Comprimento final de lesão	Insensível	280	1,50	0,871
	Sensível	140	1,56	
Expansão da lesão	Insensível	280	0,15	0,097
	Sensível	140	0,16	

Fonte: Dados do autor.

<sup>1</sup>Número de observações. <sup>2</sup>Teste de Mann Whitney ( $p < 0,050$ ). <sup>3</sup>Eficiência relativa de infecção.

#### 4.5 Discussão

O trabalho avaliou 38 cultivares de trigo comum para resistência as raças 1 e 2 de *Ptr* e a duas TSHs, *Ptr ToxA* e *Ptr ToxB*, e mostrou a existência de cultivares com diferentes reações, desde resistência as raças ou insensibilidade as toxinas até suscetibilidade as raças e sensibilidade as toxinas. Dentre as cultivares avaliadas, apenas Salamouni não é brasileira, todas as outras são cultivares comerciais adaptadas e indicadas para o cultivo no Brasil, facilitando o desenvolvimento de cultivares com bons níveis de resistência genética a MAF.

A avaliação dos componentes de resistência permite quantificar e/ou descrever o comportamento das plantas frente aos patógenos. Nesse sentido, o trabalho avaliou os componentes quantitativos ERI, NFL, CFL, r, PI e o componente qualitativo tipo de lesão. Estes componentes foram estudados e permitiram descrever genótipos com diferentes

reações para cada uma das variáveis estudadas de acordo com a raça inoculada. Em relação aos componentes de resistência quantitativos, trabalhos com maior similaridade na metodologia foram recentemente publicados (PAZDIORA et al., 2017; DORNELES et al., 2018). As cultivares Fundacep Horizonte e Quartzo foram comparadas para componentes de resistência no desenvolvimento da MAF, com e sem fornecimento de Si. Fundacep Horizonte mostrou um PI mais curto que Quartzo nos tratamentos sem silício (60,2 h e 73,4 h, respectivamente). Além disso, a ERI foi superior na cultivar Fundacep Horizonte (86,1%) em relação a Quartzo (77,3%) (PAZDIORA et al., 2017). Dorneles et al. (2018) confirmaram a diferença estatística no PI (Fundacep Horizonte = 78,4 h, Quartzo = 83,5 h) e mostraram diferença também na r (Fundacep Horizonte = 0,010; Quartzo = 0,0075). Além disso, o tamanho final de lesão sem fornecimento de Si foi estatisticamente diferente (Fundacep Horizonte = 3,2 mm; Quartzo = 2,1 mm), bem como o número final de lesões (Fundacep Horizonte = 5; Quartzo = 2,5). O PI encontrado pelos autores nas cultivares Fundacep Horizonte e Quartzo divergiu do presente trabalho, no qual todas as cultivares estudadas com 48 horas após inoculação apresentavam lesões extremamente pequenas nas folhas (<0,5 mm), 72 horas após a inoculação já era possível observar lesões pequenas (>0,5 mm), e 96 horas após inoculação foi possível observar lesões inclusive com halo amarelado. O aparecimento de clorose a partir do quarto dia após inoculação foi observado também por Lamari e Bernier (1989a). Apesar da diferença com o PI, os valores encontrados para ERI, r, CFL, NFL nos trabalhos de Pazdiora et al. (2017) e Dorneles et al. (2018) estão dentro da faixa de valores médios encontrados neste trabalho, e as divergências em relação específica aos números encontrados para a cultivar Quartzo se devem provavelmente as condições ambientais de inoculação e ao isolado utilizado.

Apesar da descrição de diversos genes e *QTLs* de resistência a MAF em plantas de trigo (FARIS et al., 1996; FARIS et al., 1997; FARIS et al., 2012; LI et al., 2011; GURUNG et al., 2011; PATEL et al., 2013; KARIYAWASAM et al., 2016), a caracterização dos genótipos para resistência vai além dos genes e *QTLs* conhecidos, e o uso apenas de marcadores moleculares não é suficiente para descrever a resistência de genótipos. Da mesma forma, a avaliação de materiais no campo nem sempre é confiável

por depender muito das condições ambientais para representar a reação de uma determinada cultivar, necessitando de repetições de ensaios no tempo. Nesse sentido, os trabalhos com inoculações em plântulas em casa de vegetação são importantes, mostram correlação positiva com o desenvolvimento da doença em condições de campo (TADESSE et al., 2011), e permitem a antecipação das avaliações sob condições uniformes de pressão da doença. Assim, o sistema de escala de notas (LAMARI; BERNIER, 1989a) para classificar as reações das plantas aos isolados de *Ptr* em condições controladas, é utilizado até hoje nas avaliações fenotípicas das reações de genótipos de trigo inoculados com isolados de *Ptr*, com a intenção de validar ferramentas moleculares, descrever raças, e/ou identificar genótipos resistentes (ALI et al., 2010; KARIYAWASAM et al., 2016; SINGH et al., 2016). O tipo de lesão, utilizado neste trabalho, é uma ferramenta biológica extremamente estudada na interação trigo-*Ptr*, que ajuda descrever o comportamento das cultivares frente ao inóculo com bastante precisão. Nesse sentido, a frequência de 55,5% de notas inferiores a 3 indica o predomínio de cultivares com resistência na população avaliada, facilitando o desenvolvimento futuro de genótipos resistentes.

Além da caracterização de isolados com base na inoculação, também foi realizada a técnica de infiltração de *Ptr ToxA* e *Ptr ToxB* em folhas de trigo. A técnica de infiltração de toxinas é muito importante para complementar estudos de inoculação em que se deseja descrever a sensibilidade de cultivares as TSHs, identificando fontes de resistência específica as toxinas, como neste estudo. Até agora foram completamente purificadas as toxinas *Ptr ToxA* e *Ptr ToxB*, podendo ser infiltradas em folhas de trigo (BALLANCE et al., 1989; TOMAS et al., 1990; STRELKOV; LAMARI; BALLANCE, 1999; TUORI; WOLPERT; CIUFFETTI, 1995). *Ptr ToxC* apesar de também ser um importante fator de virulência relacionado ao desenvolvimento da MAF (EFFERTZ et al., 2001, 2002), não foi completamente caracterizada e purificada, e por isso, não é infiltrada como *Ptr ToxA* e *Ptr ToxB*. Além disso, os genes que codificam *Ptr ToxA* e *Ptr ToxB* foram clonados e expressos de forma heteróloga na estirpe da levedura *P. pastoris* X33 (ABEYSEKARA et al., 2010; LIU et al., 2009), facilitando a produção das toxinas para infiltração. O uso de toxinas/filtrados de cultura gera reação claramente distinta para genótipos sensíveis e

insensíveis, e depende pouco da experiência do avaliador, das condições ambientais, e, pode ser facilmente combinada com avaliações de resistência para outras doenças foliares (SINGH; HUGHES, 2006; SINGH et al., 2010). Assim, através deste ensaio, foi possível perceber novamente boas fontes de resistência a TSHs em genótipos brasileiros, tanto para Ptr ToxA quanto para Ptr ToxB, gerando otimismo para os programas de melhoramento genético de trigo no controle da MAF.

Alguns trabalhos foram conduzidos com genótipos brasileiros no intuito de avaliar a resistência a MAF, e assim, também mostraram cultivares brasileiras com bons níveis de resistência. Rees e Platz (1990) realizaram estudos para identificar fontes de resistência a MAF em um total de 1400 acessos de trigo pão. Os autores encontraram genótipos com resistência parcial à *Ptr*, e dentre esses, foi observado uma alta frequência de trigos brasileiros com níveis satisfatórios de resistência ao patógeno. Dos trigos brasileiros avaliados com base no tipo de lesão e severidade, BH1146, CNT 3, PEL 13737.68, Colotana 296-52, CNT 2, Trintecino, Iassul (IAS 20) e IAS 63 mostraram ser as melhores fontes de resistência a *Ptr*, tanto nas avaliações com plântulas em ambiente controlado como nas avaliações de campo.

Riede et al. (1996) realizaram um trabalho para identificar fontes de resistência a MAF em três grupos de genótipos de trigo, genótipos que anteriormente exibiram resistência à mancha-marrom (*Cochliobolus sativus* (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur), genótipos indicados para o cultivo no Paraná e genótipos de trigo sintético hexaplóide. Assim, puderam mostrar através de inoculações em plântulas, plantas adultas, através do tipo de lesão e severidade, e infiltração da cultura pura oriunda do isolado 86-124 (raça 2), genótipos com diferentes níveis de resistência a MAF, tanto em trigos adaptados quanto em trigos sintéticos, e puderam confirmar a resistência dos trigos IAS 63 e BH1146 (REES; PLATZ, 1990), pois os inocularam com quatro isolados, inclusive da raça 1, a qual contém Ptr ToxA e Ptr ToxC. Outro estudo mais tarde, mostrou que a cultivar BR 34 (insensível a Ptr ToxA e altamente resistente as raças 1, 2, 3 e 5 de *Ptr*) armazena mecanismos de resistência não específico as raças de *Ptr*, com um possível potencial em diminuir a atividade de Ptr ToxA e de tornar a planta resistente antes mesmo da manifestação da necrose pela toxina (FARIS; FRIESEN, 2005). Além desses,

trabalhos mostraram que Quartzo se destaca na resistência quando comparada a cultivar suscetível Fundacep Horizonte (PAZDIORA et al., 2017; DORNELES et al., 2018). O mesmo pode ser observado também neste trabalho, visto que a cultivar Quartzo apresenta importantes componentes de resistência a MAF quando comparada a outras cultivares. Assim, os estudos descritos nesta discussão, bem como os resultados deste trabalho divergem do trabalho de Moschen (2008), no qual foram observados poucos genótipos com resistência moderada e um elevado número de genótipos suscetíveis à doença em uma coleção de genótipos provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Trigo (BAG), incluindo 63 cultivares e linhagens desenvolvidas de 1930 até 2005, 18 genótipos dihaploidizados e 18 genótipos de trigo sintético (derivados de *Triticum tauschii* (Coss.) Schmalh.).

As raças 1 e 2 de *Ptr* divergem para virulência em relação as TSHs que apresentam. A raça 1 apresenta *Ptr ToxA* e *Ptr ToxC*, ao passo que a raça 2 apresenta apenas *Ptr ToxA* (LAMARI; BERNIER, 1989b; LAMARI et al., 1995; FARIS; LIU; XU, 2013). *Ptr ToxA* e *Ptr ToxC* são importantes fatores de virulência (FARIS et al., 2012; EFFERTZ et al., 2001; EFFERTZ et al., 2002; CHU et al., 2010). No entanto, Faris et al. (2012) sugerem a existência de uma possível variabilidade no gene que regula a produção *Ptr ToxA*, causando diferentes níveis de doença na planta. Além disso, Chu et al. (2010) discutem que apesar destas toxinas serem consideradas importantes fatores para gerar danos na planta, a sua associação com o desenvolvimento da doença nem sempre é significativa, e depende da composição genética do genótipo. Nesse sentido, o fato de um isolado ter duas TSHs não precisa estar associado a agressividade do patógeno em relação aos componentes de resistência, como observado com ERI, CFL e r para algumas cultivares neste trabalho, devido à complexidade da interação trigo-*Ptr* descrita por diversos autores (FARIS; FRIESEN, 2005; FARIS et al., 2012; FARIS; LIU; XU, 2013).

Mecanismos de resistência específicos e não específicos as raças foram descritos em genótipos de trigo (FRIESEN; FARIS, 2004; FARIS; FRIESEN, 2005; GURUNG et al., 2011; FARIS et al., 2012; PATEL et al., 2013; KARIYAWASAM et al., 2016), e assim, diferenças significativas observadas em relação as raças em algumas cultivares deste estudo podem indicar resistência específica. BRS Reponete foi a cultivar que

apresentou em maior frequência diferença estatística significativa entre raças, mostrando maior valor de ERI, CFL e r na raça 2 em comparação a raça 1. Este fato sugere a presença de mecanismo de resistência específico a raça 1 na cultivar BRS Reponde, porém são necessários estudos posteriores para a confirmação.

Dentre as cultivares estudadas que apresentaram melhor desempenho para os componentes de resistência quantitativos e qualitativo para as raças 1 e 2 de *Ptr*, e insensibilidade as toxinas *Ptr ToxA* e *Ptr ToxB*, destacam-se FPS Virtude, BRS Parrudo, LG Cromo, Quartzo, TBIO Sossego e Salamouni. Ao comparar a reação previamente descrita destas cultivares pelos obtentores com os resultados deste estudo observa-se que BRS Parrudo, Quartzo e TBIO Sossego corroboram com os resultados deste trabalho, pois foram descritas como moderadamente resistentes. FPS Virtude e LG Cromo, classificados como moderadamente resistente/moderadamente suscetível, foram identificados neste estudo com boa resposta de resistência, podendo ser substituídos por moderadamente resistente nas Informações Técnicas de Trigo e Triticale (REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 2017). Obviamente, outras cultivares também foram descritas no trabalho com respostas de resistência nos componentes avaliados, mas aqui estão discriminadas as que se mostraram mais consistentes para resistência na maior parte dos ensaios. Além disso, devido ao fato de Salamouni ter sido inserida no estudo como uma referência a resistência, pois há muito tempo vem sendo estudada (ABEYSEKARA et al., 2010; LAMARI; BERNIER, 1989a; LAMARI et al., 1995; 2003; TADESSE; HSAM; ZELLER, 2006), o trabalho valida seu desempenho de resistência também com isolados brasileiros, sendo um bom material para usar como referência em testes de resistência.

Tendo em vista que *Ptr ToxA* é por enquanto a principal TSH produzida por isolados brasileiros, pensar em cultivares que tenham insensibilidade a essa toxina e resistência as raças 1 e 2 de *Ptr* já seria suficiente, no momento, para o desenvolvimento de cultivares resistentes no Brasil. No entanto, ao pensar no desenvolvimento de cultivares com expansão para demais países deve-se levar em conta os resultados encontrados nesse trabalho para insensibilidade também a *Ptr ToxB*. Acrescenta-se ainda que, no desenvolvimento de genótipos resistentes a MAF três pontos devem ser levados

em consideração. Inicialmente as fontes de resistência precisam ser bem caracterizadas para TSHs e para isolados de diferentes raças de *Ptr*, após os genes de sensibilidade a TSHs devem ser removidos do parental recorrente e ao mesmo tempo *QTLs* de resistência não específico as raças do parental doador devem ser introduzidos, e por fim a utilização de marcadores moleculares é fundamental para acelerar o processo como um todo (FARIS et al., 2013). Nesse sentido, o trabalho apresenta o primeiro ponto crucial no desenvolvimento de cultivares resistentes a MAF, e detalha com qualidade a reação de cultivares, pois considerou as raças de *Ptr* encontradas em isolados brasileiros e as TSHs passíveis de infiltração, fazendo uso de importantes ferramentas para discriminar resistência em cultivares produtivas e atuais.

#### **4.6 Conclusões**

As cultivares comerciais adaptadas e produtivas em diferentes regiões tritícolas do Brasil FPS Virtude, BRS Parrudo, LG Cromo, Quartzo e TBIO Sossego apresentam resistência genética às raças 1 e 2 de *Ptr* e insensibilidade as toxinas *Ptr ToxA* e *Ptr ToxB*. Assim, o trabalho serve como base para programas de melhoramento genético de trigo que visam o desenvolvimento de cultivares resistentes a MAF e para aprofundar a pesquisa da resistência genética em cultivares brasileiras, justificando sua realização.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inicialmente isolados de *Ptr* foram caracterizados quanto a estrutura de raças com base fenotípica e genotípica. Após a identificação das raças, escolheu-se dois isolados de duas raças presentes no Brasil para verificar a reação de genótipos de trigo em relação ao patógeno, e conseqüentemente, descrever genótipos com bons níveis de resistência. Tudo isso, com o propósito futuro de serem estudados para descrição de genes e *QTLs* de resistência em genótipos brasileiros e para serem usados como fontes de resistência em programas de melhoramento genético de trigo.

Em relação as raças, foram encontradas as raças 1 e 2 de *Ptr*, as quais foram descritas pela caracterização fenotípica e asseguradas pela caracterização molecular. Assim, confirmou-se a presença do gene *ToxA* pela técnica de *PCR* e ausência de *ToxB* nos isolados avaliados. Já em relação a *Ptr ToxC*, ainda não há ferramenta capaz de sua detecção via molecular, visto que esta ainda não foi completamente caracterizada, e assim, sua descrição manteve-se restrita a caracterização fenotípica.

Em relação aos genótipos de trigo, foram observadas cultivares comerciais com diferentes reações a MAF, e, apesar de nenhuma ter apresentado resistência completa, genótipos com resistência foram identificados pela avaliação dos componentes de resistência. Além disso, a maior parte dos genótipos mostraram ser insensíveis a *Ptr ToxA* e a *Ptr ToxB*, tornando este resultado um ponto positivo para o desenvolvimento de cultivares resistentes. Assim, o fato deste trabalho utilizar isolados coletados em regiões tritícolas do Brasil e utilizar as duas raças existentes no país nos ensaios gerou maior confiabilidade e precisão nos resultados, permitindo a descrição segura de cultivares com resistência a MAF.

Este estudo traz novidades quanto à estrutura de raças de *Ptr* do país e ao comportamento de genótipos a MAF. Assim, fornece a base do conhecimento da interação *Ptr*-trigo para posteriores avanços na pesquisa e no desenvolvimento de resistência genética. Por isso, sugere-se a continuidade nos estudos de caracterização de isolados, pois a presença de outras raças permite a identificação de outras TSHs, e estas devem ser identificadas e caracterizadas para serem controladas por resistência genética. Além disso, sugere-se estudos em relação a herança de resistência nestas cultivares, bem como a identificação de genes e *QTLs* de resistência. Desta forma, almeja-se benefícios para a comunidade como um todo, com menor impacto ambiental e maior sustentabilidade econômica da atividade tritícola.

## 6 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados deste trabalho confirmam a hipótese de que a caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Ptr* associada a inoculações do fungo e infiltrações de toxinas permitem identificar resistência genética em cultivares de trigo brasileiras.

No Brasil estão presentes as raças 1 e 2 de *Ptr*, confirmadas pela caracterização fenotípica associada a molecular. Dessa forma, as TSHs presentes nos isolados são *Ptr ToxA* e *Ptr ToxC*, e por isso sugere-se que a busca pela resistência genética a curto prazo priorize estas toxinas. *Ptr ToxA* está presente em 100% dos isolados, enquanto *Ptr ToxC* está presente em 35% da população amostrada.

Há variabilidade em genótipos quanto a resistência a MAF inoculados com raças 1 e 2 de *Ptr*. BRS Sanhaço apresenta melhor desempenho para ERI, BRS Parrudo para NFL, LG Cromo, Quartzo, Salamouni e TBIO Sossego para número final de lesões. BRS Parrudo, BRS Sanhaço, Celebra, FPS Amplitude, FPS Certero, FPS Virtude, Inova, LG Cromo, LG Oro, ORS 1403, Quartzo, Salamouni, TBIO Sossego e TBIO Toruk apresentam melhor desempenho para tipo de lesão.

Há variabilidade em genótipos quanto a sensibilidade as TSHs *Ptr ToxA* e *Ptr ToxB*. A maior parte dos genótipos apresenta insensibilidade, 66,7 e 71% para *Ptr ToxA* e *Ptr ToxB*, respectivamente.

As cultivares FPS Virtude, BRS Parrudo, LG Cromo, Quartzo, Salamouni e TBIO Sossego destacam-se positivamente para resistência em relação as demais cultivares deste estudo pela consistência nos testes dos componentes de resistência com inoculações dos isolados das raças 1 e 2 de *Ptr*, e nos ensaios de infiltração de *Ptr ToxA* e *Ptr ToxB*.

Dessa forma, as cultivares de trigo descritas neste estudo com resistência a MAF podem ser usadas estrategicamente em estudos de resistência, e em programas de melhoramento genético de trigo, bem como, agricultores podem usar as cultivares brasileiras em anos e áreas com previsão e histórico de condições favoráveis à doença.

## REFERÊNCIAS

- ABEYSEKARA, N. S.; FRIESEN, T. L.; LIU, Z.; MCCLEAN, P. E.; FARIS, J. D. Marker development and saturation mapping of the tan spot Ptr ToxB sensitivity locus *Tsc2* in hexaploid wheat. **The Plant Genome**, v. 3, n. 3, p. 179-189, 2010.
- ADHIKARI, T. B.; JACKSON, E. W.; GURUNG, S.; HANSEN, J. M.; BONMAN, J. M. Association mapping of quantitative resistance to *Phaeosphaeria nodorum* in spring wheat landraces from the USDA National Small Grains Collection. **Phytopathology**, v. 101, n. 11, p. 1301-1310, 2010.
- AGRESTI, A. **Categorical data analysis**. 2. ed. Gainesville: John Wiley & Sons, 2003.
- ALI, S.; FRANCL, L. J. A New Race of *Pyrenophora tritici-repentis* from Brazil. **Plant Disease**, v. 86, n. 9, p. 1050, 2002.
- ALI, S.; FRANCL, L. J. Population race structure of *Pyrenophora tritici-repentis* prevalent on wheat and noncereal grasses in the Great Plains. **Plant Disease**, v. 87, n. 4, p. 418-422, 2003.
- ALI, S.; GURUNG, S.; ADHIKARI, T. B. Identification and characterization of novel isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from Arkansas. **Plant Disease**, v. 94, p. 229-235, 2010.
- AMEEN, G.; KARIYAWASAM, G.; SHI, G.; FRIESEN, T. L.; FARIS, J. D.; ALI, S.; RASMUSSEN, J. B.; LIU, Z.. Molecular manipulation of the mating-type system and development of a new approach for characterizing pathogen virulence in *Pyrenophora tritici-repentis*. **Fungal Genetics and Biology**, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.10.004>
- AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2011.
- ANDRIE, R. M.; PANDELOVA, I.; CIUFFETTI, L. M. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification. **Phytopathology**, v. 97, n. 6, p. 694 -701, 2007.

ANTONI, E. A.; RYBAK, K.; TUCKER, M. P.; HANE, J. K.; SOLOMON, P. S.; DRENTH, A.; SHANKAR, M.; OLIVER, R. P. Ubiquity of ToxA and absence of ToxB in Australian populations of *Pyrenophora tritici-repentis*. **Australasian Plant Pathology**, v. 39, p. 63–68, 2010.

ARAYA, C. M. Coevolução de interações hospedeiro patógeno em feijão comum. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 221-228, 2003.

BALLANCE, G. M.; LAMARI L.; BERNIER C. C. Purification and characterization of a host-selective necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 35, n. 3, p. 203-213, 1989.

BENSLIMANE, H. Virulence phenotyping and molecular characterization of a new virulence type of *Pyrenophora tritici-repentis* the causal agent of tan spot. **Plant Pathology Journal**, v. 34, n. 2, p. 139-142, 2018.

BENSLIMANE, H. Virulence phenotyping and molecular characterization of a new virulence. **Plant Pathology Journal**, v. 34, n. 2, p. 139-142, 2018.

BERTAGNOLLI, V. V. **Detecção de fungos em sementes, inoculação em sementes, identificação de raças e controle químico de *Drechslera tritici-repentis* em trigo**. 2015. 121f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2015.

BERTAGNOLLI, V. V.; BERTAGNOLLI NETO, P.; RIVA, G.; CORÁ, J.; DEUNER, C. C. Caracterização fenotípica de raças de *Drechslera tritici-repentis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 50, 2017a, Uberlândia. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <[http://www.cbfito.com.br/cd/Resumos/Resumo50CBFito\\_0639.pdf](http://www.cbfito.com.br/cd/Resumos/Resumo50CBFito_0639.pdf)>. Acesso em: 25 jun. 2018.

BERTAGNOLLI, V. V.; DEUNER, C. C.; FRIZON, P.; GHISSI, V. C. Water potential and time of *Pyrenophora tritici-repentis* inoculation in wheat seeds. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 1681-1690, 2017b.

BHATHAL, J. S.; LOUGHMAN, R.; SPEIJERS, J. Yield reduction in wheat in relation to leaf disease from yellow (tan) spot and septoria nodorum blotch. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 435-443, 2003.

BRASIL. **Registro Nacional de cultivares**. Brasília: MAPA, 2018. Disponível em: <[http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares\\_registradas.php](http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php)>. Acesso em: 10 jul. 2018.

CAMARGO, C. E. O.; FERREIRA FILHO, A. W. P. Cultivo de trigo duro no Brasil. **O Agrônomo**, v. 52, n. 1, p. 13-18, 2000.

CAMPONOGARA, A.; GALLIO, E.; BORBA, D. F. de; GEORGIN, J. O atual contexto da produção de trigo no Rio Grande do Sul. **Revista eletrônica em gestão, educação e tecnologia ambiental**, v. 19, n. 2, p. 246-257, 2015.

CHU, C. G.; CHAO, E. S.; FRIESEN, T. L.; FARIS, J. D.; ZHONG, S.; XU, S. S. Identification of novel tan spot resistance *QTLs* using an SSR-based linkage map of tetraploid wheat. **Molecular Breeding**, v. 25, p. 327–338, 2010.

CIUFFETTI, L. M.; MANNING, V. A.; PANDELOVA, I.; BETTS, M. F.; MARTINEZ, J. P. Host-selective toxins, Ptr ToxA and Ptr ToxB, as necrotrophic effectors in the *Pyrenophora tritici-repentis*–wheat interaction. **New Phytologist**, v. 187, p. 911–919, 2010.

CIUFFETTI, L. M.; TUORI, R. P.; GAVENTA, M. A single gene encodes a selective toxin causal to the development of tan spot on wheat. **Plant Cell**, v. 9, p. 135-144, 1997.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABSTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília: CONAB, 2017. (Levantamento Agrícola, v. 5, n. 4). Disponível em: <[www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos](http://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos)>. Acesso em: 30 abr. 2018.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABSTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília: CONAB, 2018. (Levantamento Agrícola, v. 5, n. 5). Disponível em: <[www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos](http://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos)>. Acesso em: 30 abr. 2018.

DORNELES, K. R.; DALLAGNOL, L. J.; PAZDIORA, P. C.; HOFFMANN, J. F.; CHAVES, F. C.; MONTE, L. G.; RODRIGUES, F. A. Wheat leaf resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* induced by silicon activation of phenylpropanoid metabolism. **Plant Pathology**, 2018, doi: <https://doi.org/10.1111/ppa.12876>.

EFFERTZ, R. J.; ANDERSON, J. A.; FRANCL, L. J. Restriction fragment length polymorphism mapping of resistance to two races of *Pyrenophora tritici-repentis* in adult and seedling wheat. **Phytopathology**, v. 91, p. 572-578, 2001.

EFFERTZ, R. J.; MEINHARDT, S. W.; ANDERSON, J. A.; JORDAHL, J. G.; FRANCL, L. J. Identification of a chlorosis-inducing toxin from *Pyrenophora tritici-repentis* and the chromosomal location of an insensitivity locus in wheat. **Phytopathology**, v. 92, p. 527-533, 2002.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO Statistical Pocketbook 2015**: World food and agriculture. Roma: FAO, 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4691e.pdf>>. Acesso em: 20 abri. 2018.

- FARIS, J. D.; ABEYSEKARA, N. S.; MCCLEAN, P. E.; XU, S. S.; FRIESEN, T. L. Tan spot susceptibility governed by the *Tsn1* locus and race-nonspecific resistance quantitative trait loci in a population derived from the wheat lines Salamouni and Katepwa. **Molecular Breeding**, v. 30, p. 1669-1678, 2012.
- FARIS, J. D.; ANDERSON, J. A.; FRANCL, L. J.; JORDAHL, J. G. Chromosomal location of a gene conditioning insensitivity in wheat to a necrosis-inducing culture filtrate from *Pyrenophora tritici-repentis*. **Phytopathology**, v. 86, n. 5, p. 459-463, 1996.
- FARIS, J. D.; ANDERSON, J. A.; FRANCL, L. J.; JORDAHL, J. G. RFLP mapping of resistance to chlorosis induction by *Pyrenophora tritici-repentis* in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, p. 98-103, 1997.
- FARIS, J. D.; FRIESEN, T. L. Identification of quantitative trait loci for race-nonspecific resistance to tan spot in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 111, p. 386-392, 2005.
- FARIS, J. D.; LIU, Z.; XU, S. S. Genetics of tan spot resistance in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 9, p. 2197-2217, 2013.
- FRIESEN, T. L.; FARIS, J. D. Molecular mapping of resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* race 5 and sensitivity to Ptr ToxB in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, p. 464-471, 2004.
- GAMBA, F. M.; LAMARI, L. Mendelian inheritance of resistance to tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) in selected genotypes of durum wheat (*Triticum turgidum*). **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 20, p. 408-414, 1998.
- GAMBA, F. M.; LAMARI, L.; BRÜLÉ-BABEL, A. L. Inheritance of race-specific necrotic and chlorotic reactions induced by *Pyrenophora tritici-repentis* in hexaploid wheats. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 20, n. 4, p. 401-407, 1998.
- GAMBA, F. M.; STRELKOV, S. E.; LAMARI, L. Virulence of *Pyrenophora tritici-repentis* in the Southern Cone Region of South America. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 34, n. 4. P. 545-550, 2012.
- GOMES, D. P.; ROCHA, V. S.; PEREIRA, O. L.; SOUZA, M. A. de. Sanidade de sementes de trigo provenientes do programa de melhoramento da UFV. In: XIV ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E X ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2011, São José dos Campos. Anais eletrônicos... São José dos Campos. Disponível em: <[http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC\\_2011/anais/arquivos/RE\\_0279\\_0277\\_01.pdf](http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2011/anais/arquivos/RE_0279_0277_01.pdf)>. Acesso em: 20 jun. 2018.

GURUNG, S.; MAMIDI, S.; BONMAN, J. M.; JACKSON, E. W.; RÍO, L. E. del; ACEVEDO, M.; MERGOUM, M.; ADHIKARI, T. B. Identification of novel genomic regions associated with resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* races 1 and 5 in spring wheat landraces using association analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 123, p. 1029-1041, 2011.

HOLLANDER, M.; WOLFE, D. A. **Nonparametric Statistical Methods**. New York: John Wiley & Sons, 1999.

HOLM, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. **Scandinavian Journal of Statistics**, v. 6, n. 2, p. 65-70, 1979.

HOSFORD Jr., R. M. A form of *Pyrenophora trichostoma* pathogenic to wheat and other grasses. *Phytopathology*, v. 61, p. 28-32, 1971.

JESUS JÚNIOR, W. C. DE; POZZA, E. A.; VALE, F. X. R. DO; MORA-AGUILERA, G. Análise temporal de epidemias. In: VALE, F. X. R. do; JESUS JÚNIOR, W. C. de. **Epidemiologia Aplicada ao Manejo de Doenças de Plantas**. Belo Horizonte: Editora Perfil, p.159 -166, 2004.

JØRGENSEN, L. N.; OLSEN L. V. Control of tan spot (*Drechslera tritici-repentis*) using cultivar resistance, tillage methods and fungicides. **Crop Protection**, v. 26, p. 1606-1616, 2007.

KARIYAWASAM, G. K.; CARTER, A. H.; RASMUSSEN, J. B.; FARIS, J.; XU, S. S.; MERGOUM, M.; LIU, Z. Genetic relationships between race-nonspecific and race-specific interactions in the wheat–*Pyrenophora tritici-repentis* pathosystem. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, p. 897-908, 2016.

KOBAYASTI, L.; PIRES, A. P. Levantamento de fungos em sementes de trigo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 4, p. 572-578, 2011.

KRUPINSKY, J. M. Grass hosts of *Pyrenophora tritici-repentis*. **Plant Disease**, v. 76, n. 1, p. 92-95, 1992.

LAMARI, L., SAYOUD, R., BOULIF, M.; BERNIER, C. C. Identification of a new race of *Pyrenophora tritici-repentis*: Implications for the current pathotype classification system. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 17, p. 312-318, 1995.

LAMARI, L.; BERNIER, C. C. Evaluation of wheat lines and cultivars to tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) based on lesion type. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 11, p. 49-56, 1989a.

\_\_\_\_\_. Virulence of isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* on 11 wheat cultivars and cytology of the differential host reactions. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 11, p. 284-290. 1989b.

\_\_\_\_\_. Toxin of *Pyrenophora tritici-repentis*: host-specificity, significance in disease, and inheritance of host reaction. **Phytopathology**, v. 79, p. 740-744, 1989c.

LAMARI, L.; STRELKOV, S.; YAHYAOU, A.; ORABI, J.; SMITH, R. B. The identification of two new races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the host center of diversity confirms a one-to-one relationship in tan spot of wheat. **Phytopathology**, v. 93, p. 391-396, 2003.

LEISOVÁ, L.; HANZALOVÁ, A.; KUCERA, L. Genetic diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates as revealed by AFLP analysis. **Journal of Plant Pathology**, v. 90, n. 2, p. 233-245, 2008.

LEPOINT, P.; RENARD, M. -E; LEGRÈVE, A.; DUVEILLER, E.; MARAITE, H. Genetic diversity of the mating type and toxin production genes in *Pyrenophora tritici-repentis*. **Phytopathology**, v. 100, p. 474-483, 2010.

LI, H. B.; YAN, W.; LIU, G. R.; WEN, S. M.; LIU, C. J. Identification and validation of Quantitative Trait Loci conferring tan spot resistance in the bread wheat variety Ernie. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 122, p. 395-403, 2011.

LIU, Z.; FARIS, J. D.; OLIVER, R. P.; TAN, K-C.; SOLOMON, P. S.; MCDONALD, M. C.; MCDONALD, B. A.; NUNEZ, A.; LU, S.; RASMUSSEN, J. B.; FRIESEN, T. L. SnTox3 Acts in effector triggered susceptibility to induce disease on wheat carrying the *Snn3* gene. **Plos Pathogens**, v. 5, n. 9, 2009.

LIU, Z.; EL-BASYONI, I.; KARIYAWASAM, G.; ZHANG, G.; FRITZ, A.; HANSEN, J.; MARAIS, F.; FRISKOP, A.; CHAO, S.; AKHUNOV, E.; BAENZIGER, P. S. Evaluation and association mapping of resistance to tan spot and Stagonospora nodorum blotch in adapted winter wheat germplasm. **Plant disease**, v. 99, p. 1333-1341, 2015.

MANNING, V. A.; ANDRIE, R. M.; TRIPPE, A. F.; CIUFFETTI, L. M. Ptr ToxA requires multiple motifs for complete activity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, 491-501, 2004.

MANNING, V. A.; CHU, A. L.; STEEVES, J. E.; WOLPERT, T. J.; CIUFFETTI, L. M. A host selective toxin of *Pyrenophora tritici-repentis*, Ptr ToxA, induces photosystem changes and reactive oxygen species accumulation in sensitive wheat. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, p. 665-676, 2009.

MARTINEZ, J. P.; OESCH, N. W.; CIUFFETTI, L. M. Characterization of the multiple-copy host-selective toxin gene, ToxB, in pathogenic and nonpathogenic isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 4, p. 467-474, 2004.

MARTINEZ, J. P.; OTTUM, S. A.; ALI, S.; FRANCL, L. J.; CIUFFETTI, L. M. Characterization of the ToxB gene from *Pyrenophora tritici-repentis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 5, p. 675-677, 2001.

MCCULLAGH, P.; NELDER, J. A. **Generalized linear models**. 2 ed. Boca Raton: CRC press, 1989.

MEHTA, Y. R. **Manejo integrado de enfermedades del trigo**. Santa Cruz de la Sierra: Imprenta Landivar S.R.L., 1973.

MISRA, A. P.; SINGH, R. A. Pathogenic differences among three isolates of *Helminthosporium tritici-repentis* and the performance of wheat varieties against them. **Indian Phytopathology**, v. 25, p. 350-353, 1972.

MOMENI, H.; ABOUKHADDOUR, R.; JAVAN-NIKKHAH, M.; RAZAVI, M.; NAGHAVI, M. R.; AKHAVAN, A.; STRELKOV, S. E. Race identification of *Pyrenophora tritici-repentis* in Iran. **Journal of Plant Pathology**, v. 96, n. 2, p. 287-294, 2014.

MORENO, M. V.; STENGLEIN, S.; PERELLÓ, A. E. Distribution of races and Tox genes in *Pyrenophora tritici-repentis* isolates from wheat in Argentina. **Tropical plant pathology**, v. 40, p. 141-146, 2015.

MOSCHEN, F. **Produção de esporos, densidade de inóculo e caracterização de genótipos de trigo para resistência à mancha amarela, causada por *Pyrenophora tritici-repentis***. 2008. 135 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2008.

OROLAZA, N. P.; LAMARI, L.; BALLANCE, G. M. Evidence of a host-specific chlorosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 3, p. 221-224, 1995.

PATEL, J. S.; MAMIDI, S.; BONMAN, J. M.; ADHIKARI, T. B. Identification of *QTL* in spring wheat associated with resistance to a novel isolate of *Pyrenophora tritici-repentis*. **Crop science**, v. 53, p. 842-852, 2013.

PAZDIORA, P. C.; DORNELES, K. R.; FORCELINI, C. A.; DEL PONTE, E. M.; DALLAGNOL, L. J. Silicon suppresses tan spot development on wheat infected by *Pyrenophora tritici-repentis*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 150, p. 49-56, 2017.

PERELLÓ, A.; MORENO, V.; SIMÓN, M. R.; SISTERNA, M. Tan spot of wheat (*Triticum aestivum* L.) infection at different stages of crop development and inoculum type. **Crop Protection**, v. 22, p. 157-169, 2003.

PIRES, J. L. F. **A importância do trigo para a sustentabilidade da agricultura brasileira**. Brasília: Embrapa, 2017. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/23416523/artigo---a-importancia-do-trigo-para-a-sustentabilidade-da-agricultura-brasileira>>. Acesso em: 20 abr. 2018.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2018. Disponível em: <[www.R-project.org](http://www.R-project.org)>. Acesso em: 02 jun. 2018.

RANZI, C.; FORCELINI, C.A.; DEUNER, C.C. Efeito de temperaturas na expansão, número de lesões e severidade da mancha-amarela da folha do trigo. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 4, p. 311-314, 2015.

RAYMOND, P. J.; BOCKUS, W. W.; NORMAN, B. L. Tan spot of winter wheat: procedures to determine host response. **Phytopathology**, v. 75, p. 686-690, 1985.

REES, R. G.; PLATZ, G. J. Sources of resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* in bread wheats. **Euphytica**, v. 45, p. 59-69, 1990.

REES, R. G.; PLATZ, G. J.; MAYER, R. J. Yield losses in wheat from yellow spot: comparison of estimates derived from single tillers and plots. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 33, p. 899-908, 1982.

REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE. **Informações técnicas para trigo e triticale – safra 2017**. Brasília: Embrapa, 2017. 240 p. Disponível em: <<http://www.iapar.br/arquivos/File/banner%20pequeno/TrigoeTriticale2017.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2018.

RIEDE, C. R.; FRANCL, L. J.; ANDERSON, J. A.; JORDAHL, J. G.; MEINHARDT, S. W. Additional sources of resistance to tan spot of wheat. **Crop Science**, v. 36, p. 771-777, 1996.

SANTANA, F. M.; CLEBSCH, C. C.; FRIESEN, T. L. **Caracterização de raças de *Pyrenophora tritici-repentis*, agente etiológico da mancha-amarela do trigo, no sul do Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Online, 60). Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p\\_bp60.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp60.htm)>. Acesso em: 05 dez. 2017.

SANTOS, A. M. P. V. dos; MATSUMURA, A. T. S.; VAN DER SAND, S. T. Intraspecific genetic diversity of *Drechslera tritici-repentis* as detected by a random amplified polymorphic DNA analysis. **Genetic and Molecular Biology**, v. 25, n. 2, p. 243-250, 2002.

SINGH, P. K.; CROSSA, J.; DUVEILLER, E.; SINGH, R. P.; DJURLE, A. Association mapping for resistance to tan spot induced by *Pyrenophora tritici-repentis* race 1 in CIMMYT's historical bread wheat set. **Euphytica**, v. 207, p. 515-525, 2016.

SINGH, P. K.; GONZALEZ-HERNANDEZ, J. L.; MERGOUM, M.; ALI, S.; ADHIKARI, T. B.; KIANIAN, S. F.; ELIAS, E. M.; HUGHES, G. R. Identification and molecular mapping of a gene conferring resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* race 3 in tetraploid wheat. **Phytopathology**, v. 96, n. 8, p 885-889, 2006.

SINGH, P. K.; HUGHES, G. R. Inheritance of insensitivity to culture filtrate of *Pyrenophora tritici-repentis*, race 2, in wheat. **Plant Breeding**, v. 125, p. 206–210, 2006.

SINGH, P. K.; SINGH, R. P.; DUVEILLER, E.; MERGOUM, M.; ADHIKARI, T. B.; ELIAS, E. M. Genetics of wheat–*Pyrenophora tritici-repentis* interactions. **Euphytica**, v. 171, p. 1-13, 2010.

STRELKOV, S. E.; LAMARI, L. Host–parasite interactions in tan spot [*Pyrenophora tritici-repentis*] of wheat. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 25, p. 339-349, 2003.

STRELKOV, S. E.; LAMARI, L.; BALLANCE, G. M. Characterization of a host-specific protein toxin (Ptr ToxB) from *Pyrenophora tritici-repentis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, p.728-732, 1999.

STRELKOV, S. E.; LAMARI, L.; BALLANCE, G. M.; OROLAZA, N. P. Isolation and mode of action of Ptr chlorosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. In: KOHMOTO, K.; YODER, O. C. **Molecular Genetics of Host-Specific Toxins in Plant Disease**. Totteri: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 137-138.

STRELKOV, S. E.; LAMARI, L.; SAYOUD, R.; SMITH, R. B. Comparative virulence of chlorosis-inducing races of *Pyrenophora tritici-repentis*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 24, p. 29-35, 2002.

TADESSE, W.; HSAM, S. L. K.; ZELLER, F. J. Evaluation of common wheat cultivars for tan spot resistance and chromosomal location of a resistance gene in the cultivar “Salamouni”. **Plant Breeding**, v. 125, p. 318-322, 2006.

TADESSE, W.; SCHMOLKE, M.; HSAM, S. L. K.; MOHLER, V.; WENZEL, G.; ZELLER, F. J. Chromosomal location and molecular mapping of a tan spot resistance gene in the winter wheat cultivar Red Chief. **Journal of Applied Genetics**, v. 51, n. 3, p. 235-242, 2010.

TADESSE, W.; REENTS, H. J.; HSAM, S. L. K.; ZELLER, F. J. Relationship of seedling and adult plant resistance and evaluation of wheat germplasm against tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 58, p. 339–346, 2011.

TOMAS, A.; BOCKUS, W. W. Cultivar specific toxicity of culture filtrate of *Pyrenophora tritici-repentis*. **Phytopathology**, v. 77, p. 1337-1366, 1987.

TOMAS, A.; FENG, G. H.; REECK G. R.; BOCKUS, W. W.; LEACH, J. E. Purification of a cultivar-specific toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 3, p. 221-224, 1990.

TREMACOLDI, C. G.; SOUZA FILHO, A. P. da S. **Toxinas produzidas por fungos fitopatógenos**: possibilidades de uso no controle de plantas daninhas. 1. ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. 22 p.

TUORI, R. P.; WOLPERT, T. J.; CIUFFETTI L. M. Purification and immunological characterization of toxin components from cultures of *Pyrenophora tritici-repentis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 8, n. 1 p. 41-48, 1995.

WEGULO, S. N. Tan spot of cereals. **The Plant Health Instructor**, 2011. Disponível em:  
<<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/TanSpot.aspx>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

WIESE, M. V. **Compendium of wheat diseases**. 2 ed. St. Paul: APS Press, 1987.

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

WOLF, E. D. de; EFFERTZ, R. J.; ALI, S.; FRANCL, L. J. Vistas of tan spot research. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 20, p. 349-370, 1998.

WOLF, E. de. **Tan spot**. 2008. Universidade do Estado do Kansas. Disponível em:  
<[www.oznet.ksu.edu](http://www.oznet.ksu.edu)>. Acesso em: 18 nov. 2017.

ANEXOS

Anexo I Comparação entre os genótipos para os componentes de resistência quantitativos nas raças 1 e 2 de *Pyrenophora tritici-repentis*







(Conclusão)

		Raça 2 - Comparações entre os genótipos (Valores-p)																																						
Genótipo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37			
QUARTZO(22)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-		
Safira(23)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	
SALAMOUNI(24)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-
SUPERA(25)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-
TBIO ALPACA(26)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-
TBIO AUDAZ(27)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-
TBIO CONSISTÊNCIA(28)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-
TBIO IGUAÇÚ(29)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-
TBIO ITAIPU(30)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-
TBIO MESTRE(31)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-
TBIO NOBLE(32)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-
TBIO SINTONIA(33)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-
TBIO SINUELO(34)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-
TBIO SONIC(35)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-
SOSSEGO(36)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-
TBIO TUBAGI(37)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-
TBIO TORUK(38)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-

Fonte: Dados do autor.

Notas: Em negrito diferença significativa entre cultivares de acordo com a análise de Regressões Log-Lineares Grama (valor-p<0,050).



(Conclusão)

Raça 1 - Comparações entre os genótipos (Valores-p)																																						
Genótipo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	
TBIO ALPACA(26)	1,0	1,0	1,0	1,0	0,00	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
TBIO AUDAZI(27)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,00	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
TBIO ) CONSISTÊNCIA(28)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,06	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
TBIO IGUAÇÚ(29)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
TBIO ITAIPU(30)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,00	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
TBIO MESTRE(31)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
TBIO NOBLE(32)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
TBIO ) SINTONIA(33)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,65	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
TBIO SINUELO(34)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
TBIO SONIC(35)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,31	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
TBIO SOSSEGO(36)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,49	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
TBIO TUBAGI(37)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,00	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
TBIO TORUK(38)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,01	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	

Fonte: Dados do autor.

Notas: Em negrito diferença significativa entre cultivares de acordo com a análise de Regressões Log-Lineares Gama (valor-p<0,050).















(Conclusão)

Raça 1 - Comparações entre os genótipos (Valores-p)																																						
Genótipo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	
TBIO ALPACA(26)	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
TBIO AUDAZ(27)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
TBIO CONSISTÊNCIA (28)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
TBIO IGUAÇÚ(29)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
TBIO ITAIPU(30)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
TBIO MESTRE(31)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
TBIO NOBLE(32)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
TBIO SINTONIA(33)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
TBIO SINUELO(34)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
TBIO SONIC(35)	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
TBIO SOSSEGO(36)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
TBIO TIBAGI(37)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
TBIO TORUK(38)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	

Fonte: Dados do autor.

Notas: Em negrito diferença significativa entre cultivares de acordo com a análise de Regressões Log-Lineares Grama (valor-p<0,050).







## **PPGAgro**

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

**Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV**