

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

**Resistência genética à ferrugem-da-folha e ferrugem-do-colmo nas  
variedades brasileiras de trigo Toropi e BRS 194**

Mônica Bossardi Coelho

Passo Fundo  
2021

Mônica Bossardi Coelho

Resistência genética à ferrugem-da-folha e ferrugem-do-colmo nas variedades  
brasileiras de trigo Toropi e BRS 194

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 Doutor  
em Agronomia.

Orientadora:

Prof. Dra. Nadia Canali Lângaro

Coorientadora:

Dra. Sandra Maria Mansur Scagliusi

Passo Fundo  
2021

CIP – Catalogação na Publicação

---

C672r Coelho, Mônica Bossardi

Resistência genética à ferrugem-da-folha e ferrugem-do-colmo nas variedades brasileiras de trigo Toropi e BRS 194 / Mônica Bossardi Coelho. – 2021.

140 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Nadia Canali Lângaro.

Coorientadora: Profa. Dra. Sandra Maria Mansur Scagliusi.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2021.

1. Trigo - Resistência a doenças e pragas - Aspectos genéticos. 2. Puccinia triticina. 3. Puccinia graminis tritici. 4. pragas agrícolas - Controle. I. Lângaro, Nadia Canali, orientadora. II. Scagliusi, Sandra Maria Mansur, coorientadora. III. Título.

CDU: 633.11

## ATA DE DEFESA DE TESE



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

“Resistência genética à ferrugem-da-folha e ferrugem-do-colmo nas variedades brasileiras de trigo Toropi e BRS 194”

Elaborada por

Mônica Bossardi Coelho

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

Aprovada em: 06/05/2021  
Pela Comissão Examinadora

**Dra. Nadia Canali Lângaro**  
Presidente da Comissão Examinadora  
Orientadora

**Dra. Sandra Patussi Brammer**  
Comissão examinadora – Embrapa Trigo

**Dra. Sandra Maria Mansur Scagliusi**  
Comissão examinadora – Embrapa Trigo  
Coorientadora

**Dr. Alexandre Augusto Nienow**  
Coordenador do PPGAgro

**Dra. Jaqueline Huzar Novakowiski**  
Comissão examinadora – UPF

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

**Dra. Márcia Chaves**  
Comissão examinadora – Embrapa Clima Temperado

Aos meus pais, Jane e Danilo,

dedico.

## AGRADECIMENTOS

Esta não é somente uma lista de agradecimentos. É, sobretudo, o meu amor, a minha admiração, o meu reconhecimento e o meu respeito, que declaro em palavras...

Ao meu pai, Danilo, por me ensinar tantas coisas, dentre elas, a ser uma pessoa ética e comprometida. Obrigada por me ensinar que a educação é a maior herança que se pode deixar, e, por incansavelmente, ter me dado seu inteiro suporte ao longo de tantos anos durante minha formação. A realização dos meus sonhos se deve grandemente a você.

À minha mãe, Jane, por ser exemplo de determinação e por sempre estar ao meu lado, me amparando incondicionalmente. Obrigada pela sua compreensão e paciência nos momentos que não foram fáceis. Obrigada por acreditar em mim, se orgulhar da minha trajetória e vibrar pelas pequenas e grandes conquistas que eu alcancei até aqui.

Ao meu irmão, Maurício, meu companheiro da vida. Obrigada pelo exemplo de ser humano de valor que é, no qual eu posso me espelhar. Obrigada por zelar por mim, mesmo que de longe.

À minha primeira orientadora acadêmica, prof. Dra. Lizete Augustin (*in memoriam*), que me cativou com seu amor e encantamento pela ciência e me concedeu a oportunidade de iniciar nesse universo. Meu profundo agradecimento.

À minha coorientadora Dra. Sandra Mansur Scagliusi pela sua valiosa orientação e confiança. Obrigada pelas trocas, pelos conselhos e por tanto me ensinar nesse caminho. Obrigada pelas oportunidades oferecidas ao longo desses anos, por me encorajar e me desafiar a ir além.

À equipe de técnicos e estagiários da Biotecnologia da Embrapa Trigo. Obrigada por todo o suporte durante a realização de meus ensaios. Obrigada pela amizade. Obrigada pelo convívio diário leve e alegre, marcado pelos nossos “pedágios” gastronômicos.

À equipe da casa de apoio da Embrapa Trigo, Alceu Vicari e Marcos Copetti, pelo auxílio técnico nos experimentos com ferrugens.

Às professoras: Dra. Magali Grando, Dra. Eunice Calvete e Dra. Nadia Lângaro por terem sido minhas orientadoras e por me apoiarem em diferentes momentos dessa jornada.

À Dra. Sandra Brammer, por sua disponibilidade, pelo auxílio e referências teóricas para o meu projeto.

À Dra. Amarilis Barcellos e Ms. Camila Turra, por compartilhar conhecimento e suporte técnico.

Aos professores do PPGAgro, pelos ensinamentos e convivência agregadora que contribuíram para a minha formação.

Aos meus colegas do PPGAgro, pelo laço de amizade e por estarmos juntos nos apoiando no decorrer de nossas caminhadas.

À Dra. Márcia Chaves, pela gentileza do seu suporte, pelas valiosas sugestões e por agregar seu conhecimento a este trabalho.

Ao meu supervisor Dr. Tom Fetch, que me abriu portas, e, juntamente com sua esposa Jennifer, me acolheu de maneira impecável no Canadá. Obrigada pela honra de realizar parte de minha pesquisa com um grupo de cientistas tão qualificado. Obrigada pelo exemplo de retidão profissional, por sua preciosa orientação e ensinamentos.

Ao Dr. Brent McCallum por todo o suporte, por me receber de forma tão hospitaleira e pelas oportunidades de aprendizado. Agradeço grandemente pela honra de ter trabalhado com sua equipe. Obrigada por ter me guiado sabiamente durante a execução da minha pesquisa no exterior.

Ao Dr. Colin Hiebert, pela imensa contribuição e ensinamentos na área de genética molecular. Obrigada pela sua receptividade e pela chance, a mim concedida, de trabalhar em diferentes projetos.

À equipe Taye Zegeye, Maurice Penner, Elsa Reimer, Winnie McNabb, Mira Popovic e Gus Mardli por sua amizade, instruções e auxílio durante a condução da minha pesquisa no exterior.

Ao meu namorado, Ricardo, que me encontrou em meio a um momento muito especial da minha vida, e, que mesmo na distância esteve presente. Obrigada por me fazer acreditar. Obrigada pelo cuidado e pelo carinho.

À Linda Sandercock, que, como uma segunda mãe, me acolheu na sua família durante meu período no Canadá. Meu enorme agradecimento por tanto amor e carinho. Obrigada por me dar força e tornar o caminho mais suave quando mais precisei. Obrigada por se tornar minha “Canadian family”.

À Universidade de Passo Fundo, por me aprovar como acadêmica de doutorado.

À Embrapa Trigo, por viabilizar a realização de minha pesquisa.

À CAPES, pela bolsa de estudos a mim concedida.

Ao Agriculture and Agri-Food Canada, por me receber e permitir a realização de importante parte deste trabalho.

À todas as pessoas queridas que estiveram comigo nesta valiosa jornada.

*“Agir, eis a inteligência verdadeira.*

*Serei o que quiser, mas tenho que querer o que for.*

*O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito.*

*Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”*

(Fernando Pessoa, 1913)



## RESUMO

COELHO, Mônica Bossardi. Resistência genética à ferrugem-da-folha e ferrugem-do-colmo nas variedades brasileiras de trigo Toropi e BRS 194. 140 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2021.

A ferrugem-da-folha (*Puccinia triticina* Erikss) (*Pt*) e a ferrugem-do-colmo (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *Tritici* Eriks. & E. Henn) (*Pgt*) representam importantes gargalos à produção de trigo em todo o mundo. Como os patógenos se disseminam e desenvolvem novas virulências, a resistência genética durável é a estratégia mais eficaz de controle. A variedade brasileira ‘Toropi’ mantém resistência durável à *Pt* por mais de 50 anos, e é considerada um valioso recurso genético para resistência às doenças causadas por ferrugens. Além de ‘Toropi’, a variedade ‘BRS 194’, desenvolvida em 2000, também apresentava resistência a todas as raças de *Pt* ocorrentes no Brasil e em países da América do Sul, até que sua resistência qualitativa foi superada cinco anos após seu lançamento, pela raça MFP-CT, uma nova virulência de *Pt*. Este trabalho foi realizado em dois locais (Brasil e Canadá) e teve como objetivo investigar a resistência à ferrugem-da-folha e do colmo de ambas as variedades. Foi desenvolvida uma população duplo-haploide (DH) oriunda de ‘Toropi’ x ‘BRS 194’ e inoculada em fase de plântula com a raça MCJ-HN (*Pt*) no Brasil. No estágio de planta adulta, a população foi inoculada com MFP-CT (*Pt*) no Brasil e CCDS (*Pt*) no Canadá. As linhagens e os parentais também foram genotipados para translocação de centeio 1BL.1RS, em busca de genes de resistência conhecidos presentes neste segmento, e, para o gene *Sr36*. As plântulas dos genótipos parentais foram inoculadas com os isolados de *Pgt*: TTKSK (Ug99), TPMK, TMRT, RHTS, MCCF, QTHJF e RTHJ. Os resultados obtidos, para *Pt*, no estágio de plântula, mostraram resistência para ‘BRS 194’ (TI = 1) e suscetibilidade para ‘Toropi’ (TI = 3). A proporção de 1:1 do fenótipo encontrado na população DH indicou um único gene de resistência de ‘BRS 194’. No teste de planta adulta no Brasil com MFP-CT, ‘BRS 194’ exibiu suscetibilidade (TI = 3) e ‘Toropi’ apresentou resistência (TI= 0;0;1). No teste realizado no Canadá com CCDS, ‘BRS 194’ foi suscetível (TI = 3) e ‘Toropi’ resistente (IT = 1-). A variedade ‘Toropi’ revelou não possuir o segmento cromossômico 1BL.1RS, ao contrário de ‘BRS 194’, que mostrou sua presença. ‘BRS 194’ expressou resistência a todas as raças de *Pgt*, e, para o isolado Ug99 (TTKSK) (TI = 0), foi sugerida a presença do gene *Sr36*, que foi confirmada pelo marcador STM773-2 (+) e pela variedade ‘Arthur 71’ (portador *Sr36*) em seu pedigree. A variedade ‘Toropi’ foi resistente a RHTS, MCCF, QTHJF e RTHJ, sugerindo a presença de um gene de resistência a *Pgt*. Os resultados encontrados geraram novas perspectivas em relação às variedades brasileiras de trigo ‘Toropi’ e ‘BRS 194’. Ambos os genótipos fornecem fontes eficazes de resistência contra *Pt* e *Pgt* e são preciosos para a expansão da base genética em programas de melhoramento genético do trigo. Em especial, este trabalho apresenta ‘BRS 194’ como uma variedade adaptada e resistente à Ug99, contribuindo para que os melhoristas estejam à frente na batalha contra este patógeno, ainda não detectado no Brasil.

Palavras-chave: 1. *Puccinia triticina*. 2. *Puccinia graminis tritici*. 3. Resistência de planta adulta (RPA). 4. Resistência de plântula. 5. Ug99.

## ABSTRACT

COELHO, Mônica Bossardi. Resistance to leaf and stem rusts in Brazilian wheat varieties Toropi and BRS 194. 140 f. Thesis (Doctor in Agronomy) – University of Passo Fundo, Passo Fundo, 2021.

Leaf rust (*Puccinia triticina* Erikss) (*Pt*) and stem rust (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks. & E. Henn) (*Pgt*) characterize important bottlenecks in wheat production throughout the world. As pathogens spread and develop new virulences, durable genetic resistance is the most effective control strategy. The Brazilian variety ‘Toropi’ has maintained durable resistance to *Pt* for over 50 years, and has been studied and considered a valuable genetic resource for rust diseases. In addition to ‘Toropi’, ‘BRS 194’ variety, developed in 2000, was also resistant to all *Pt* races occurring in Brazil and in South American countries, until its qualitative resistance was overcome five years later by a new *Pt* virulence, MFP-CT race. This study was carried out in two locations (Brazil and Canada) and aimed to investigate leaf and stem rust resistance in both varieties. A double-haploid population was developed from ‘Toropi’ x ‘BRS 194’ and inoculated in the seedling stage with the MCJ-HN (*Pt*) race in Brazil. In adult plant stage, the population was inoculated with MFP-CT (*Pt*) in Brazil and CCDS (*Pt*) in Canada. The population and parents were also genotyped for rye translocation 1BL.1RS, segment known to possess rust resistance genes, and for the presence of *Sr36* gene. For stem rust, parental seedlings were inoculated with isolates TTKSK (Ug99), TPMK, TMRT, RHTS, MCCF, QTHJF and RTHJ. For leaf rust, in the seedling stage, ‘BRS 194’ exhibited resistance (TI = 1) and ‘Toropi’ displayed susceptibility (TI = 3). The 1:1 proportion observed in the population indicated a single resistance gene from ‘BRS 194’. In the adult plant test in Brazil with MFP-CT isolate, ‘BRS 194’ exhibited susceptibility (TI = 3) and ‘Toropi’ showed resistance (TI = 0; / 0; 1). In the test carried out in Canada, ‘BRS 194’ was susceptible (TI = 3) and ‘Toropi’ resistant (IT = 1-). Regarding 1BL.1RS translocation, ‘Toropi’ was negative and ‘BRS 194’ was positive. ‘BRS 194’ was resistant to all *Pgt* races, and IT=0 to TTKSK suggested the presence of gene *Sr36*, which was supported by molecular marker STM773-2 (+) and variety ‘Arthur 71’ (*Sr36* carrier) in its pedigree. The variety ‘Toropi’ was resistant to RHTS, MCCF, QTHJF and RTHJ, suggesting that ‘Toropi’ has a *Pgt* resistance gene. These results provide new perspectives regarding the Brazilian wheat varieties ‘Toropi’ and ‘BRS 194’. Both genotypes provide effective resistance sources against *Pt* and *Pgt* and are valuable for expanding the genetic base in wheat breeding programs. This study presents ‘BRS 194’ as an adapted and resistant variety against Ug99, contributing for breeders to be at the forefront in the battle against this pathogen, which has not yet been detected in Brazil.

Key words: 1. *Puccinia triticina*. 2. *Puccinia graminis tritici*. 3. Adult plant resistance (APR). 4. All stage resistance (ASR). 5. Ug99.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>17</b>
2.1 <i>Origem e evolução do trigo</i>	17
2.2 <i>Início do melhoramento genético do trigo</i>	18
2.3 <i>Melhoramento genético do trigo no Brasil</i>	18
2.4 <i>Tecnologia duplo-haploide no melhoramento genético</i>	20
2.5 <i>Duplo-haploides e o estudo de caracteres agronômicos</i>	22
2.6 <i>As ferrugens do trigo</i>	23
2.6.1 <i>Ciclo de vida generalizado das ferrugens do trigo</i>	25
2.6.2 <i>Condições de desenvolvimento</i>	27
2.6.3 <i>Etiologia</i>	28
2.6.4 <i>Disseminação do patógeno</i>	29
2.7 <i>Ferrugem-da-folha</i>	30
2.7.1 <i>Sintomas</i>	30
2.7.2 <i>Danos e efeitos no rendimento</i>	32
2.8 <i>Ferrugem-do-colmo</i>	33
2.8.1 <i>Sintomas</i>	33
2.8.2 <i>Danos e efeitos no rendimento</i>	34
2.9 <i>Controle de ferrugens do trigo</i>	36
2.9.1 <i>Resistência genética da planta hospedeira</i>	37
2.9.2 <i>Mecanismos de resistência</i>	39
2.9.2.1 <i>Genes de resistência - Ferrugem-da-folha</i>	40
- <i>Toropi</i>	41
2.9.2.2 <i>Genes de resistência - Ferrugem-do-colmo</i>	42
- <i>Ug99</i>	43

2.9.2.3 Genes de resistência em espécies relacionadas	46
- <i>Secale cereale</i> e a translocação 1BL.1RS	47
- <i>Triticum timopheevii</i> e Sr36	48
2.9.2.4 BRS 194	49
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>51</b>
3.1 Material vegetal	51
3.2 Testes com <i>Puccinia triticina</i> – Brasil	52
3.2.1 Plântula	52
3.2.2 Planta adulta	55
3.3 Extração de DNA	57
3.4 Análises moleculares	58
3.4.1 Marcador PE122	58
3.4.2 Marcador STM773-2	59
3.4.3 Análise de segregação de locos	60
3.5 Testes com <i>Puccinia triticina</i> – Canadá	61
3.5.1 Plântula	61
3.5.2 Planta adulta	65
3.6 Determinação da herança genética da resistência à Ferrugem-da-folha	66
3.7 Testes com <i>Puccinia graminis</i> em plântula	67
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>70</b>
4.1 Testes com <i>P. triticina</i> – Brasil	70
4.1.1 Plântula	70
4.1.2 Planta adulta	75
4.2 Identificação da translocação 1BL.1RS	79
4.3 Testes com <i>P. triticina</i> – Canadá	82
4.3.1 Plântula	85
4.3.2 Planta adulta	89
4.4 Testes com <i>P. graminis</i> em plântula	95
4.5 Identificação do Sr36	103
<b>5 CONCLUSÃO</b>	<b>111</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>112</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>113</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>134</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O trigo é um dos cereais mais consumidos no mundo, utilizado como ingrediente principal em diversos produtos alimentícios. Embora o Brasil seja reconhecido mundialmente como uma potência do agronegócio, o trigo lidera a lista de importações da balança comercial brasileira, uma vez que a sua produção é insuficiente para o seu consumo anual. Para suprir essa demanda interna, em fevereiro de 2020, foram importadas 526,1 mil toneladas do grão, sendo 87,5% de origem argentina, 6,9% de trigo norte-americano, 4,7% de trigo proveniente do Paraguai e 0,7% da França (CONAB, 2020).

Em direção oposta à alta produtividade necessária, uma gama de estresses bióticos e abióticos ameaça continuamente o suprimento de trigo no Brasil e no mundo. Os fungos patogênicos representam uma restrição significativa à produção, levando a sérios prejuízos aos produtores do cereal. A giberela, causada por *Fusarium graminearum* Schwabe [teleomorfo: *Gibberella zeae* (Schw.) Petch] é amplamente conhecida, e por se manifestar principalmente nas espigas, é considerada uma das mais importantes doenças fúngicas que ocorre na cultura do trigo.

Contudo, dentro deste panorama, tal limitação não se restringe à giberela. A ocorrência de outras importantes doenças fúngicas tem impedido a produção global de trigo desde a sua domesticação. A ferrugem-da-folha e a ferrugem-do-colmo causadas por *Puccinia triticina* Eriks (*Pt*) e *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks. & E. Henn. (*Pgt*), respectivamente, são as mais conhecidas nas principais regiões produtoras de trigo do mundo por seus efeitos agressivos.

Historicamente, a ferrugem-da-folha é a mais importante doença do trigo no Brasil, presente em todas as regiões em que o cereal é cultivado. As perdas atribuídas à *P. triticina* podem ser graves se a cultura for infectada precocemente, podendo comprometer até 50% do rendimento de grãos de cultivares suscetíveis, caso não seja efetuado o controle com fungicidas.

Muito embora a ferrugem-do-como não seja a doença mais importante na América Latina, a mesma é considerada a mais prejudicial da cultura, cujo patógeno possui capacidade de transformar uma safra de aparência saudável, a poucas semanas de colheita, em um emaranhado de hastes pretas e grãos enrugados na colheita. Em condições extremas, as perdas de rendimento podem ultrapassar 70%.

A ferrugem-do-como tem sido motivo de grande preocupação mundial. Em 1999, o surgimento de uma nova raça de *Pgt* (Ug99), em Uganda, na África Oriental, despertou um grande alerta devido ao seu potencial de causar danos altamente destrutíveis à cultura do trigo. Cerca de 85 a 95% das variedades de trigo são suscetíveis ao grupo de raças Ug99 ao redor do mundo. Até o momento, a Ug99 não foi detectada em países como o Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai e Chile. No entanto, a possível introdução desta raça representa uma ameaça nas mais diversas regiões tritícolas, havendo, portanto, urgência no sentido de deter o seu avanço.

De maneira geral, novas raças e virulências dos patógenos podem facilmente superar a resistência do hospedeiro, o que estabelece um desafio à segurança alimentar. Neste contexto, o emprego estratégico de resistência genética apresenta-se como medida mais assertiva no impedimento e controle tanto da ferrugem-do-colmo como para ferrugem-da-folha.

A cultivar brasileira de trigo ‘Toropi’ (Frontana / Quaderna A // Petiblanco 8) lançada como uma variedade comercial em 1965, destaca-se como um importante recurso genético em relação à ferrugem-da-folha. Sua resistência raça não-específica ao patógeno permanece efetiva há mais de 50 anos e vem sendo estudada extensivamente ao redor de todo o mundo.

Devido às suas características agronômicas (planta extremamente alta e menor número de perfilhos), ‘Toropi’ foi gradualmente substituída por novas variedades de porte mais baixo e de alto rendimento, produzidas pelos programas de melhoramento de trigo brasileiros. Entre as novas variedades de trigo estava ‘BRS 194’ (CEP14 / BR 23 // CEP 17), lançada em 2000. Esta variedade rústica e de alto rendimento de grãos teve cada vez mais aceitação no campo e foi amplamente cultivada nas regiões Sul e Centro-Oeste do Brasil, tornando-se a segunda cultivar com maior disponibilidade de sementes para plantio no Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Até 2004, ‘BRS 194’ apresentava

resistência qualitativa a todas as raças de *P. triticina* ocorrentes no Brasil e em outros países da América do Sul, característica pouco comum em variedades comerciais no momento de seu lançamento. Contudo, em 2005, sua resistência foi superada por uma nova raça de *P. triticina* (MFP-CT) no Brasil.

Em razão da rápida evolução dos fitopatógenos, os melhoristas de plantas buscam sempre incorporar novos traços de resistência em novas variedades, fazendo uso da diversidade existente do trigo domesticado e também de suas espécies relacionadas.

O centeio (*Secale cereale* L.) é utilizado no mundo todo como fonte para o melhoramento genético do trigo, por ser uma rica fonte de resistência a pragas e patógenos. Até hoje, todos os sete cromossomos do centeio foram transferidos para o genoma do trigo. No entanto, o cromossomo 1R carrega a maioria de suas características de interesse, e por esse motivo, a translocação de centeio-trigo "1BL.1RS" foi usada nos mais variados programas de melhoramento de trigo. O segmento 1BL.1RS carrega genes de resistência a vários patógenos, incluindo ferrugem-do-colmo (*Sr31*), ferrugem-da-folha (*Lr26*), ferrugem linear (*Yr9* e *YrCn17*), oídio (*Pm8* e *PmCn17*), percevejo (*Gb2*) e pulgão do trigo (*Dn7*).

O gene *Sr31* foi amplamente difundido entre as variedades de trigo em todo o mundo, porém sua resistência foi superada pelo surgimento da raça de *Pgt* (Ug99). Como muitas cultivares possuem o *Sr31*, a iminência de uma ameaça global tem movido esforços na identificação de novas fontes de resistência e produção de novas variedades de trigo com resistência ao Ug99 e suas variantes.

Outro gene de resistência amplamente utilizado é o *Sr36*, derivado de *Triticum timopheevii*, espécie também relacionada ao trigo cultivado. Este gene confere resistência a diversas raças de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Embora *Sr36* não forneça um alto nível de resistência contra uma ampla gama de raças de *Pgt*, este é um gene valioso por ser a melhor fonte disponível de resistência à Ug99, fornecendo imunidade às raças TTKSK e TTKST em estágio de plântula e planta adulta.

De maneira geral, o surgimento de novas raças virulentas pode levar à ineficácia dos genes de resistência às ferrugens, e, portanto, o conhecimento do fundo genético do germoplasma disponível é crucial aos melhoristas.

Uma abordagem bastante utilizada para o estudo da resistência é o uso de populações biparentais, originadas do cruzamento entre dois genótipos contrastantes. Neste caso, quanto maior o grau de divergência entre ambos os parentais, maior é a variabilidade encontrada na população segregante a ser estudada. Assim, uma vez havendo a condição homozigótica contrastante dos parentais para a característica de resistência, é possível inferir sobre o seu controle genético através dos indivíduos que compõem a população.

Neste processo, a obtenção da população via tecnologia duplo-haploide permite a fixação de genes de resistência de genitores de forma acelerada e viabiliza o desenvolvimento de materiais ideais para estudos genéticos e moleculares. A busca por materiais resistentes ainda pode ser auxiliada pelo emprego de marcadores moleculares, que permitem identificar polimorfismos genéticos diretamente no DNA, em qualquer estágio de desenvolvimento da planta e sem interferência ambiental. A associação destas ferramentas biotecnológicas consiste numa estratégia valiosa, pois encurta o caminho pela busca e identificação de materiais resistentes, que, dentro do possível, deve transcorrer de forma dinâmica, assim como ocorre com a evolução do patógeno.

A elucidação da resistência genética de cultivares brasileiras às ferrugens do trigo é extremamente importante na identificação contínua de genes de resistência eficazes, permitindo a expansão da base genética em programas de melhoramento do trigo. Deste modo, considerando a preocupação global com as ferrugens do trigo e suas consequências, o objetivo geral deste estudo foi ampliar o entendimento atual sobre a resistência aos patógenos de ferrugem expressos em ‘Toropi’ e ‘BRS 194’, apresentando tipos únicos de resistência a *Pt* e *Pgt*.

Como objetivos específicos, buscou-se: 1) Avaliar a reação de linhagens DH de trigo quanto à ferrugem-da-folha quando inoculadas com o fungo *P. triticina*; 2) Realizar o estudo genético da população duplo-haploide, verificando o número de genes de resistência frente à ferrugem-da-folha; 3) Identificar se há a presença da translocação 1BL.1RS e do gene *Sr36* no genoma de ‘Toropi’ e ‘BRS 194’; e 4) Investigar se ‘Toropi’ e ‘BRS 194’ apresentam resistência de plântula à ferrugem-do-colmo quando inoculadas com o fungo *P. graminis tritici*.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Origem e evolução do trigo

Historicamente, o trigo (*Triticum aestivum* L.) foi uma das primeiras espécies a ser cultivada pelo homem. Nos primórdios do seu consumo, seus grãos eram misturados com outros alimentos e consumidos em forma de papa. A qualidade de fermentação do trigo foi descoberta somente por volta de 4.000 a.C., pelos egípcios, que passaram então a produzir o pão. O cereal espalhou-se ao redor do mundo, quando, cerca de 2.000 a.C., os chineses começaram a para preparar farinha, utilizada em macarrão e pastéis (FLANDRIN; MONTANARI, 1998). Sua produção global aumentou consideravelmente desde a revolução verde, na década de 1960, e ajudou diretamente a minimizar a fome e a desnutrição. Hoje, o cereal consiste num item básico da alimentação humana que cumpre grande parte das demandas de calorias do mundo (KHAN et al., 2013).

O trigo pertence à tribo Triticeae e à família Poaceae e teve como centro de origem o Oriente Médio, sendo obtido do cruzamento de outras plantas silvestres nativas das proximidades dos rios Tigre e Eufrates (COOPER, 2015). De natureza autógama, o trigo hexaploide é oriundo de hibridizações interespecíficas seguidas de duplicações cromossômicas que ocorreram de forma espontânea ao longo de muitos anos, resultando na sua constituição genômica “AABBDD”. A primeira poliploidização aconteceu entre 500.000 a 150.000 anos atrás, envolvendo *T. urartu* ( $2n=2x=14$  cromossomos, genoma AA) e uma espécie desconhecida (provavelmente extinta), estreitamente relacionada com *Aegilops speltoides*, surgindo, então, uma nova espécie, denominada *T. turgidum* L. ssp. *dicoccoides* (ou *T. dicoccoides*,  $2n=4x=28$  cromossomos, genoma AABB). A espécie *T. turgidum* L. ssp. *dicoccoides* foi domesticada, evoluindo como *T. turgidum* ssp. *dicoccum* Schübl. (ou *T. dicoccum*), que é “pai” do trigo duro (*T. turgidum* subsp. *durum*). Após muito tempo, ocorreu o segundo evento de poliploidização (há cerca de 10.000 anos atrás), que envolveu o cruzamento do tetraploide domesticado *T. turgidum* e uma espécie

selvagem diploide, *T. tauschii* (DD), originando, assim, o trigo hexaploide hoje cultivado *T. aestivum* ( $2n=6x=42$  cromossomos, de genoma AABBDD) (CHARMET, 2011).

## **2.2 Início do melhoramento genético do trigo**

A elevada adaptabilidade do trigo permitiu seu amplo desfrute pelo homem, que se beneficiou da possibilidade de armazenar os seus grãos. O trigo passou a ser ingrediente para os mais diversos usos, consistindo em um alimento rico em carboidratos, proteínas, vitaminas e apresentando sua singular propriedade elástica do glúten (DUBCOVSKY; DVORAK, 2007; SHEWRY, 2009). Frente à crescente demanda pelo cereal, com o passar do tempo, o trigo foi sendo cultivado e localmente selecionado pelo homem, muito possivelmente, devido ao rendimento e outras características interessantes, ocorrendo dessa forma, as primeiras ações do processo de melhoramento vegetal na história, ainda que de maneira não científica (SHEWRY, 2009).

Por volta de 1790, empiricamente, se deu início ao melhoramento “intencional” de trigo. O primeiro relato de cruzamentos bem-sucedidos entre diferentes tipos de plantas veio da Inglaterra, onde Knight pode verificar características melhoradas nas progênes, especialmente no que se tratava à resistência a doenças (LUPTON, 1987). Muitos anos depois, com a redescoberta das leis de Mendel, houve o início do melhoramento genético, desta vez, com bases científicas. A primeira descrição de resistência à ferrugem (linear) do trigo de natureza mendeliana foi contribuição de Biffen, um cientista pioneiro em validar tal conhecimento, enquanto buscava introduzir programas de melhoramento para resistência à ferrugem no trigo (BIFFEN, 1905).

## **2.3 Melhoramento genético do trigo no Brasil**

As primeiras sementes de trigo vieram para o Brasil através de europeus, em 1534, sendo as lavouras de São Vicente, iniciantes no cultivo do cereal (FLANDRIN; MONTANARI, 1998; ROSSI; NEVES, 2004). Alguns séculos depois, no ano de 1919, foram desenvolvidas as estações experimentais no Brasil, as quais deram início ao melhoramento de trigo na região. As estações, por sua vez, foram criadas pelo Ministério

da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo situadas em Alfredo Chaves (atualmente Veranópolis, Rio Grande do Sul) e em Ponta Grossa, Paraná (CAIERÃO et al., 2014).

No ano de 1924, o geneticista Iwar Beckman conduziu os primeiros trabalhos na Estação de Seleção de Sementes de Alfredo Chaves, concretizando a primeira hibridização de trigo no Brasil, entre as linhagens Alfredo Chaves e Polysu. Este cruzamento originou a cultivar ‘Frontana’, sendo esta, considerada uma das maiores contribuições do melhoramento genético brasileiro para o trigo no mundo. Dentre suas características importantes, destaca-se a resistência de planta adulta à ferrugem-da-folha, à debulha e à germinação na espiga (SOUSA, 2004). Em razão de tais características vantajosas, ‘Frontana’ passou a ser explorada em programas de melhoramento não só no Brasil, mas também no mundo, constituindo o pedigree de diversas cultivares atuais (PIANA; CARVALHO, 2008).

No início da década de 1970, a criação de novos centros de pesquisa, como a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), impulsionou expressivamente o desenvolvimento da pesquisa em trigo (CAIERÃO et al., 2014). A partir daí, o aperfeiçoamento do potencial genético vem sendo realizado de forma constante, levando a criação de diversas novas variedades e linhagens (EMBRAPA, 2006).

O trigo, inicialmente classificado como cultura de inverno, devido às condições climáticas foi primeiramente produzido na Região Sul do país. Com o passar dos anos, devido ao melhoramento genético, o cereal foi então difundido para outras regiões do Brasil, como Sudeste e Centro Oeste, contribuindo ativamente para a produção nacional (EMBRAPA, 2006). Atualmente, o trigo irrigado tem importância estratégica e pode ser produzido em Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul e Bahia (CONAB, 2017).

O decorrer de mais de um século de pesquisa no Brasil retrata hoje um grandioso progresso no melhoramento de trigo, sendo a introdução de novas cultivares com maior potencial de rendimento, um dos fatores que levou ao crescimento da produção de grãos no país (SOUSA; CAIERÃO, 2014; CONAB, 2017). Outros aspectos relevantes também foram aprimorados, como a resistência/tolerância a doenças e estresses ambientais, as características agrônômicas, bem como a qualidade tecnológica (SOUSA; CAIERÃO,

2014). Possivelmente, as contribuições mais importantes do melhoramento à agricultura sejam a criação e disponibilização de cultivares tolerantes à estresses e resistentes à pragas e doenças (MACHADO, 2014).

Nas últimas três ou quatro décadas, o melhoramento intensivo levou a um enorme avanço na resistência às ferrugens do trigo, contudo, paradoxalmente, vem sendo causado um estreitamento na base genética do germoplasma atualmente disponível, aumentando sua vulnerabilidade a doenças. Além da limitação da base genética, há constantemente a superação da efetividade da resistência pelo surgimento de novas raças do patógeno (ALMEIDA et al., 2007).

Muito embora a incidência da ferrugem-do-colmo no Continente Sul-Americano seja mais esporádica, a doença já causou altos níveis de danos no passado e também é considerada destrutiva no Brasil, Paraguai, Uruguai, norte do Chile e nas regiões norte e central da Argentina (ANTONELLI, 2000). Diante deste quadro, a busca por genótipos com resistência às ferrugens tem recebido grande ênfase, exigindo dos pesquisadores a investigação contínua de novas fontes de resistência e de cultivares de trigo com formas de resistência mais durável (CHAVES et al., 2013; SAPKOTA et al., 2019).

## **2.4 Tecnologia duplo-haploide no melhoramento genético**

Muitos anos são necessários até que novas cultivares comerciais sejam disponibilizadas ao mercado. Isso se deve em consequência do longo processo envolvido no estabelecimento de linhagens puras (SMIT, 2013). De modo geral, os programas de melhoramento de trigo requerem plantas homozigotas puras para garantir a fixação de genes individuais antes que seja feita a seleção de uma potencial nova cultivar. Através dos métodos convencionais de pedigree, descendência de semente única (SSD) e retrocruzamento, são necessárias entre quatro e seis gerações para obter o que pode ser considerado como indivíduos homozigotos. No entanto, a tecnologia duplo-haploide (DH) permite que esse processo seja acelerado. Cem por cento de homozigose pode ser alcançada em apenas uma geração quando se utiliza desta metodologia, em comparação com as várias gerações exigidas ao empregar os métodos convencionais (GERMANÀ, 2011).

As plantas DH (geneticamente fixas) podem ser produzidas por meio de diferentes métodos. O método preferido difere entre as espécies e depende da disponibilidade do protocolo, bem como da eficiência em termos de investimentos e rendimentos (FERRIE; CASWELL, 2011).

A exemplo do trigo, na hibridização intergenérica ou interespecífica, embriões haploides são originados de plantas emasculadas (de trigo) e polinizadas com pólenes de espécies distantes (por exemplo, milho). Após a polinização, os cromossomos paternos são eliminados espontaneamente do embrião híbrido. Os embriões haploides são então excisados do endosperma e cultivados *in vitro*, e por fim é realizado tratamento com colchicina para induzir a duplicação dos cromossomos (EUDES; CHUGH, 2009).

Por meio da androgênese, o cultivo de anteras foi amplamente utilizado em trigo, com a vantagem de produzir mais de cem plantas a partir de uma única espiga (LIU et al., 2002). No entanto, este método foi sendo substituído pela cultura de micrósporos isolados, cuja técnica é promissora para a produção de duplo-haploides.

Visando a aceleração no processo de obtenção de linhagens e a melhoria das condições de seleção em materiais homocigotos, a produção duplo-haploides foi implementada na Embrapa Trigo (Empresa de Pesquisa Brasileira Agropecuária) (SCHEEREN et al., 1999), a qual se tornou pioneira na aplicação da técnica de obtenção de duplo-haploides em trigo e cevada na América do Sul.

Desde então, a cultura de anteras tem sido utilizada com sucesso em projetos de melhoramento genético de cevada pela Embrapa Trigo. Contudo, diferentes espécies podem requerer técnicas diferentes. Na cultura do trigo, a haploidização foi inicialmente introduzida na Embrapa Trigo a partir de cultura de anteras, passando por transições que deram espaço à aplicação da hibridização intergenérica. Aos poucos, ambos os métodos foram sendo substituídos, estabelecendo-se então a técnica de cultura de micrósporos isolados.

Embora a cultura de micrósporos isolados seja tecnicamente mais desafiadora, é preferível à cultura de anteras devido à sua maior eficiência (FERRIE; CASWELL, 2011). Este método é baseado na embriogênese dessas células jovens (micrósporos). Nesse processo, um estresse induz a reprogramação de gametófitos masculinos imaturos de plantas, que por sua vez desenvolvem estruturas embrionárias, podendo então dar origem

às plantas DHs. Este mecanismo é de grande interesse tanto para a pesquisa quanto para o melhoramento de plantas (SEIFERT et al., 2016).

O mecanismo de produção de haploides geralmente se baseia pela regeneração de uma nova planta (*in vitro*), a partir de uma célula gamética não fecundada, possuindo a metade do número de cromossomos da espécie (haploide). Para que essa planta seja fértil, é necessário haver a duplicação dos seus cromossomos, tornando-se duplo-haploide. Após essa etapa, as plantas tornam-se homozigotas e uniformes para todos os *loci* de seus cromossomos em apenas uma geração (MORAES-FERNANDES, 1990; MORAES-FERNANDES et al., 1999).

## 2.5 Duplo-haploides e o estudo de caracteres agronômicos

De modo geral, através do processo de obtenção de linhas homozigotas em uma geração, é possível alcançar maior eficiência de seleção de características de interesse, uma vez que somente duas opções de genótipos podem ocorrer para um determinado par de alelos (A e a), com a frequência de  $\frac{1}{2}$  AA e  $\frac{1}{2}$  aa, diferentemente do método convencional, onde há três tipos de genótipos, com a frequência de  $\frac{1}{4}$  AA,  $\frac{1}{2}$  Aa e  $\frac{1}{4}$  aa. Neste caso, se o que se buscasse fosse um genótipo “aa”, este, seria mais facilmente obtido através de DHs do que pelo método convencional. (BADU et al., 2017; MORAES-FERNANDES et al., 1999).

Devido à completa homozigose e uniformidade, a haploidização seguida de duplicação cromossômica consiste num recurso valioso para estudos genéticos e moleculares. As vantagens únicas da tecnologia DH fazem da haploidização uma ferramenta ideal na construção de mapas genéticos em populações, na localização de genes de relevância agronômica e econômica e na identificação de marcadores de seleção de características (PATIAL et al., 1989). Além disso, a técnica tem o diferencial de permitir a rápida fixação de caracteres agronômicos recessivos úteis, aumentando a eficiência de seleção (MISHRA; RAO, 2016).

Por serem consideradas “imortais” devido à sua total homozigose, populações duplo-haploides possuem a grande vantagem de serem replicadas indefinidamente em diversos locais de estudo. Grande parte das características agronômicas importantes como a

resistência durável a doenças são conferidas por *QTLs* (do inglês *Quantitative Trait Loci*), que são altamente influenciados pelo ambiente. Esse aspecto exige precisão e uma fenotipagem cuidadosa, sendo necessário mais de um ensaio, realizados em diferentes ambientes. Esta replicação se torna possível devido à natureza dos DHs e à conveniência da produção em larga escala (MISHRA; RAO, 2016).

A tecnologia duplo-haploide oferece enorme potencial para estudos genéticos de herança quantitativa, como por exemplo, o estudo da resistência à estresses bióticos, determinada por um ou poucos genes. Neste caso, o número de genes de resistência à determinada doença, segregantes em um único cruzamento (envolvendo parentais contrastantes), pode ser estimado com base em uma população duplo-haploide produzida a partir de plantas da geração F1 deste cruzamento.

## 2.6 As ferrugens do trigo

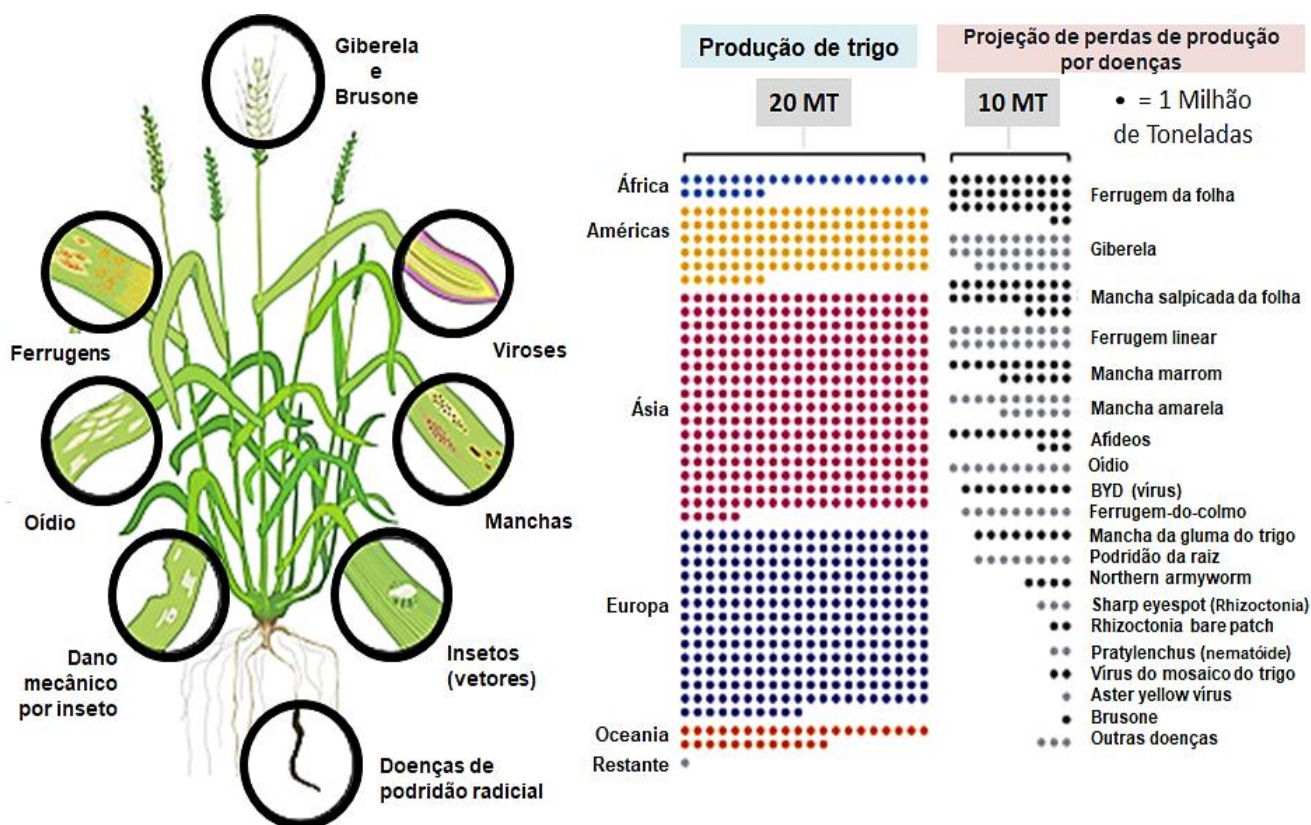
Dentre os estresses bióticos que afetam a cultura do trigo, os mais notórios são as doenças do tipo ferrugens. As ferrugens têm como agentes causais fungos do gênero *Puccinia*, parasitas obrigatórios que levam a uma variedade de sintomas na planta hospedeira (DADKHODAIE et al., 2011). Existem três variações de ferrugem na cultura do trigo, sendo elas: ferrugem-da-folha, ferrugem-amarela ou linear e ferrugem-do-colmo, causadas por *Puccinia triticina*, *P. striiformis* e por *P. graminis* f. sp. *tritici*, respectivamente. Neste trabalho, são abordadas as ferrugens provocadas por *P. triticina* e por *P. graminis* f. sp. *tritici*.

A ferrugem-da-folha é considerada a mais comum, de forma que seu patógeno causal se desenvolve com sucesso em todas as regiões produtoras de trigo com temperatura e condições de umidade amenas. Já o patógeno da ferrugem-do-colmo *P. graminis* f. sp. *tritici* é favorecido por condições quentes e úmidas (FIGUEROA et al., 2018). De modo geral, a ocorrência epidêmica das ferrugens é resultante da combinação de fatores como presença de inóculo primário no início da safra, condições ambientais favoráveis incluindo temperatura e molhamento foliar, bem como o cultivo de genótipos suscetíveis ao patógeno (OLIVEIRA et al., 2015). Essas moléstias podem atingir patamares destrutivos

na lavoura, afetando a cultura globalmente e resultando em grandes perdas de produtividade (Figura 1).

Devido às variadas condições de desenvolvimento, as ferrugens do trigo podem ser encontradas nas mais diversas áreas do mundo onde há cultivo do cereal. A ferrugem-da-folha já provocou sérias perdas no sul da Ásia, norte da África, sudeste da Ásia e América do Sul, enquanto que a ferrugem-do-colmo tem sido uma doença importante na América do Norte, Austrália, norte da África, África do Sul e, em algumas extensões da Europa (ROELFS et al., 1992).

Figura 1 - Principais pragas e patógenos que ocorrem mundialmente na cultura do trigo. Sintomas por eles provocados à esquerda e perdas de produção à direita. Fonte: <https://bgri.cornell.edu/wheat-r-gene-atlas/> (Figura reproduzida de Hafeez et al. 2021, com base nos dados de Savary et al. 2019)





### 2.6.1 Ciclo de vida generalizado das ferrugens do trigo

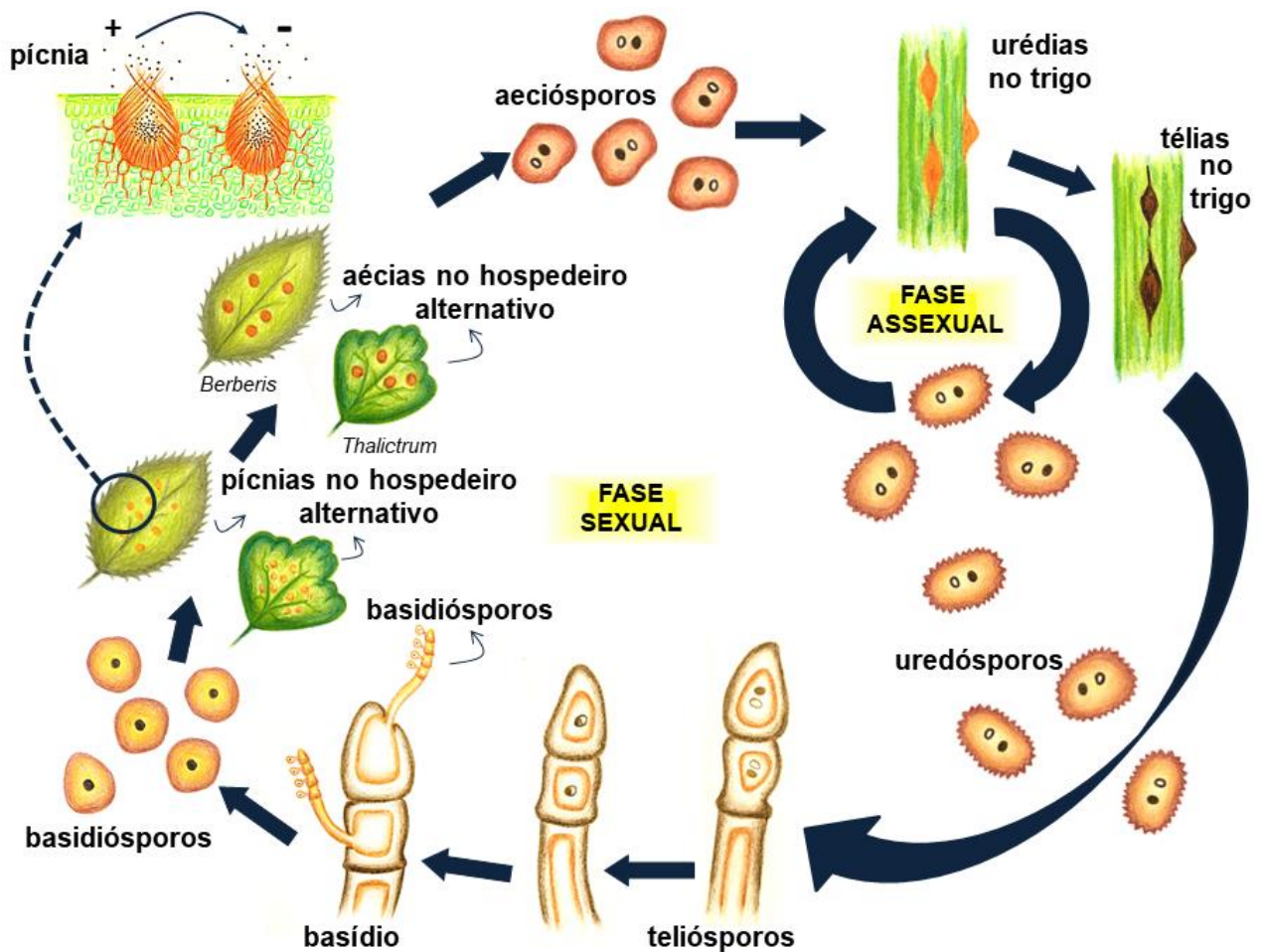
Os agentes causais da ferrugem-da-folha do trigo (*P. triticina*) e ferrugem-do-colmo (*P. graminis*) pertencem ao filo Basidiomycota, família Pucciniaceae, ordem Uredinales e classe Basidiomicetos (AGRIOS, 2005). Os ciclos de vida de ambas as ferrugens são semelhantes e estão entre os mais complexos de todos os fungos. Possuem vida macrocíclica, isto é, abrangendo cinco tipos distintos de esporos e estágios sexuais e assexuais. Estes estágios ocorrem em duas situações: durante a reprodução assexuada em trigo (ou em outros hospedeiros Poaceae) e durante a reprodução sexual em hospedeiros alternativos (KNOTT, 1989).

Ambas as espécies são heteroécias, o que significa que possuem um ciclo sexual que depende de hospedeiros alternativos (KNOTT, 1989). Contudo, cada um apresenta sua especificidade. Enquanto *P. triticina* se estabelece em espécies como *Thalictrum speciosissimum* (= *T. flavum glaucum*) ou *Isopyrum fumaroides* (BOLTON et al., 2008), *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* necessita de *Berberis vulgaris* L. ou outras espécies de Berberidaceae (SINGH et al., 2008).

Na fase assexual, sob condições onde se tem apenas o trigo como hospedeiro, a frutificação é do tipo pústula, urédia ou uredínia e os esporos denominados de uredósporos. Ao final do ciclo (Figura 2), quando a planta entra em senescência, surge outro tipo de frutificação, a télia com teliósporos (AGRIOS, 2005). Considerando o ciclo de vida completo, cinco tipos de esporos produzidos são: uredósporos (únicos produzidos no ciclo assexual do patógeno); teliósporos (estruturas de resistência); basidiósporos (formados na germinação do teliósporo); picniósporos e aeciósporos (formados no hospedeiro secundário, que dispersos, chegam até o trigo infectando-o e completando o ciclo da ferrugem) (KOLMER, 2013).

As pústulas da ferrugem-da-folha são pequenas e redondas, de coloração laranja-avermelhada, e se manifestam na superfície superior da folha. Seus uredósporos, pequenos e esféricos, são distinguíveis daqueles da ferrugem-do-colmo, que apresentam formato oblongo (KNOTT, 1989). Os teliósporos da ferrugem-da-folha são arredondados ou achatados na ponta, diferentemente dos teliósporos da ferrugem-do-colmo, que no ápice apresentam formato de cunha (SINGH; HUERTA-ESPINO; ROELFS, 2002).

Figura 2 - Ciclo generalizado das ferrugens do trigo compreendendo fase sexual e assexual



Fonte: Autora, 2020.

Durante a formação do teliósporo, a cariogamia ocorre entre dois núcleos haploides para formar o núcleo diploide. O núcleo diploide de cada teliósporo sofre meiose para formar um promicélio contendo quatro núcleos haploides. Cada um desses núcleos haploides entra em um basidiósporo recém-formado. Após uma única divisão mitótica, o resultado final são quatro basidiósporos, cada um contendo dois núcleos idênticos (BOLTON et al., 2008).

Os basidiósporos não têm a capacidade de reinfetar o trigo, portanto, é essencial um hospedeiro alternativo para completar a fase sexual do ciclo de vida (BOLTON et al., 2008). Estes tipos de esporos são transportados pelo ar para chegar até o hospedeiro alternativo, sobre o qual germinam para infectar as células epidérmicas do hospedeiro,

onde produz estruturas especializadas conhecidas como pícnia na superfície superior da folha (BAILEY et al., 2003).

Cada pícnia consiste em dois tipos diferentes (+/-) e dá origem a picniósporos. Dentro das pícneas há a elevação de hifas masculinas "+" e femininas "-", as quais passam por recombinação genética, como resultado da interação sexual, (RIAZ, 2018). Após a fertilização cruzada, estruturas de frutificação (aécias) se formam na superfície inferior da folha hospedeira alternativa, dentro da qual os aeciósporos produzidos são capazes de reinfectar o trigo. A ferrugem é considerada heterotática porque os picniósporos não são capazes de fertilizar a mesma pícnia a partir da qual são produzidos (BOLTON et al., 2008). Apesar disso, a fase sexual não é essencial e a infecção e propagação em trigo através da reinfecção dos uredósporos constituem o ciclo assexual mais familiar, que assim mesmo pode levar a epidemias (SONG et al., 2011).

No Brasil, a ferrugem-da-folha do trigo é caracterizada como uma doença autoécia. Isto porque o patógeno é incapaz de desenvolver a sua fase sexual, pela falta de hospedeiro alternativo na região (KOU; WANG, 2010). O mesmo ocorre para ferrugem-do-colmo, que pode sobreviver inteiramente no estágio assexual em vários países onde o hospedeiro alternativo não ocorre. Na América do Norte, a implementação de iniciativas de erradicação de Barberry (*Berberis* sp.) para controlar a reprodução sexual de *P. graminis* f. sp. *tritici* forçam o patógeno a sobreviver em fase assexuada (minimizando as recombinações gênicas do patógeno) na área de inverno nos estados do sul. Como não há estágio de dormência, a ferrugem sobrevive a períodos de estresse, frio ou calor, como micélio vivo no tecido vivo de plantas de trigo ou em alguns outros hospedeiros, como gramíneas perenes (KNOTT, 1989).

## 2.6.2 Condições de desenvolvimento

A sobrevivência e desenvolvimento de *P. triticina* dependem de condições ambientais adequadas. Para isto, temperatura média de 20 °C e mais de 6 horas de molhamento foliar contínuo são tidas como ideais (KIMATI et al., 2005). A faixa de temperatura ótima para a germinação de uredósporos de *P. triticina* está entre 10 e 25°C (ROELFS et al., 1992).

As condições de *P. graminis* f. sp. *tritici* são semelhantes (Quadro 1), onde, as temperaturas mínimas, ótimas e máximas requeridas para a germinação dos uredósporos (2 °C, 15 °C a 24 °C e 30 °C, respectivamente) e para esporulação (15 °C, 30 °C e 40 °C respectivamente) são mais elevadas (ROELFS et al., 1992). Essa característica faz com que a ferrugem-do-colmo seja mais importante no final do ciclo do trigo, em cultivares de maturação tardia ou quando a semeadura é tardia (LAU et al., 2011).

Um importante aspecto que difere a ferrugem-do-colmo do trigo da ferrugem-da-folha é a necessidade de alta intensidade luminosa. *P. graminis* f. sp. *tritici* requer um período de três horas de luminosidade, a qual é essencial para a penetração. A infecção máxima é obtida com 8 h a 12 h de molhamento a 18 °C, seguidos por luminosidade igual ou superior a 10.000 lux e temperatura de 30 °C (ROWEL, 1984).

Quadro 1 - Condições ambientais exigidas para a ferrugem-da-folha e do colmo do trigo

Estádio	Temperatura (°C)			Luz	Água
	Mínima	Ótima	Máxima		
<b>Ferrugem-da-folha</b>					
Germinação	2	20	30	Baixa	Essencial
Apressório	-	15-20	-	Sem efeito	Essencial
Penetração	10	20	30	Sem efeito	Essencial
Crescimento	2	25	35	Alto	Não
Esporulação	10	25	35	Alto	Não
<b>Ferrugem-do-colmo</b>					
Germinação	2	15-24	30	Baixa	Essencial
Apressório	-	16-27	-	Não	Essencial
Penetração	15	29	35	Alto	Essencial
Crescimento	5	30	40	Alto	Não
Esporulação	15	30	40	Alto	Não

Fonte: Modificado de Roelfs et al. (1992).

### 2.6.3 Etiologia

Os patógenos das ferrugens são organismos parasitas biotróficos, ou seja, só podem sobreviver em uma planta hospedeira viva. Ao chegarem à planta hospedeira, os uredósporos são depositados na superfície, nos sítios de infecção. Quando há estímulo

(hidratação e absorção de material iônico de baixo peso molecular e disponibilidade de nutrientes), este sinal é percebido pelo esporo. Em resposta, a estrutura patogênica mobiliza suas reservas armazenadas e direciona-se para a rápida síntese de membrana e parede celular para formar o tubo germinativo. O tubo germinativo é uma estrutura especializada que cresce para se diferenciar em um apressório (AGRIOS, 2005).

Os apressórios se aderem firmemente à superfície da folha e então formam uma estrutura de penetração que empurra os estômatos fechados, permitindo a entrada na folha (AGRIOS, 2005; BOLTON et al., 2008). Por pressão do turgor, e uma vez dentro da folha, hifas infecciosas se espalham pelo espaço intercelular. Assim, sob condições favoráveis, dentro de 24 horas após a penetração há formação das células mãe de haustório ao lado do mesófilo foliar ou células epidérmicas (SONG et al., 2011).

No caso de uma reação de doença compatível (em hospedeiro suscetível), é estabelecida uma interface haustorial, onde há a diferenciação da célula-mãe-de-haustório em haustório. O haustório forma uma estrutura de alimentação parasitária especializada, captando nutrientes da célula hospedeira viva. Nesta etapa de colonização, há o desenvolvimento de micélio intercelular e emissão de haustórios para dentro das células, exercendo o parasitismo com a manifestação dos sintomas. Sob condições favoráveis, o fungo continuará a se espalhar dentro da folha produzindo inúmeros haustórios (DYCK; SAMBORSKI, 1968; VOEGELE et al., 2003).

#### **2.6.4 Disseminação do patógeno**

No Brasil, a principal fonte de inóculo primário das ferrugens pode ser encontrada em plantas de trigo voluntárias (plantas dispersas pelo campo, beiras de estradas e rodovias), sendo esta, a estratégia utilizada pelo patógeno para sobreviver durante o verão-outono (KIMATI et al., 2005; REIS; CASA, 2007). Quando desprendidos da planta hospedeira, os principais agentes disseminadores dos esporos são o vento, água e insetos (Figura 3). A disseminação entre plantas vizinhas ocorre principalmente através dos respingos de água. Porém, o vento se caracteriza como o agente disseminador de maior importância, capaz de promover a dispersão entre plantas vizinhas e levar esporos a longas distâncias (BEDENDO, 1995).

Figura 3 - Esporulação intensa de *Puccinia triticina* em folha de trigo (à esquerda) e desprendimento e liberação de esporos (à direita)



Fonte: Autora (2020).

Na forma de uredósporos dicarióticos produzidos clonalmente, estas estruturas podem ser dispersas através do vento por longas distâncias, ajudando a doença a se espalhar por grandes áreas geográficas. Facilmente os esporos alcançam milhares de quilômetros do local inicial da infecção, podendo chegar a diferentes continentes e oceanos (KNOTT 1989; KHAN et al., 2013).

## 2.7 Ferrugem-da-folha

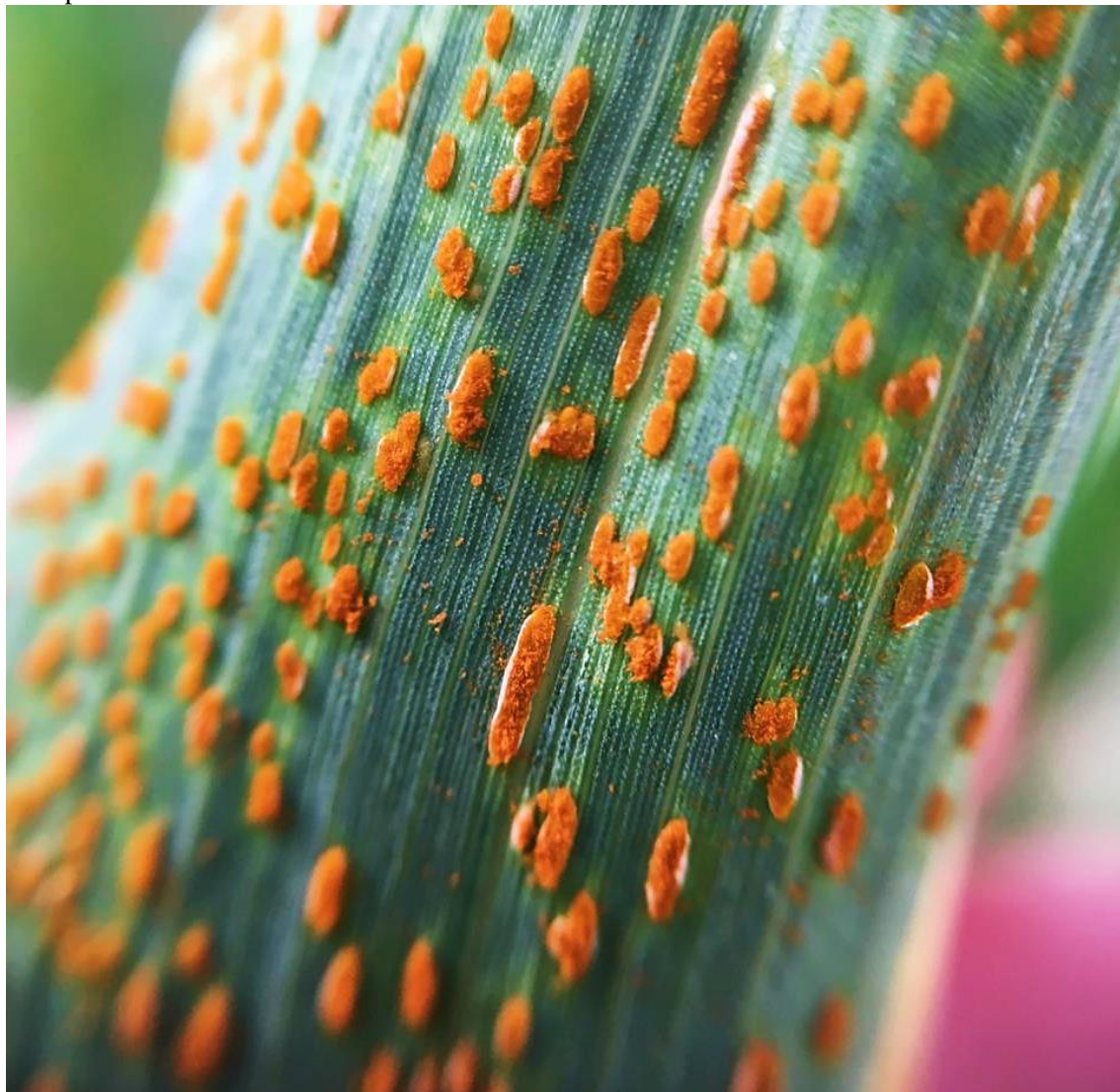
### 2.7.1 Sintomas

Uma vez havendo o contato do patógeno com o a planta hospedeira, dois tipos de interações podem ocorrer: a compatível e a incompatível. A interação compatível acontece com cultivares suscetíveis e caracteriza-se pela formação de pústulas grandes com urédias e não há formação de clorose ou necrose no tecido do hospedeiro (BOLTON et al., 2008; CHAVES et al., 2008).



As pústulas, que ocorrem predominantemente nas folhas da planta de trigo, surgem após a ruptura da epiderme da folha e medem em torno de 1,5 mm, dispendo-se geralmente na face adaxial da folha, sem padrão definido (Figura 4). Sua morfologia é arredondada, de coloração marrom-alaranjada, contendo massas de uredósporos (ALVES et al., 2015; BOLTON et al., 2008).

Figura 4 - Sinais visíveis de ruptura da epiderme adaxial da folha de trigo e liberação de uredósporos de *Puccinia triticina*



Fonte: Autora (2020).

Em casos de condições epidêmicas extremas, as pústulas, além de estarem na lâmina foliar da planta, também se distribuem nas bainhas das folhas, aristas, glumas,

pedúnculos e entrenós (KNOTT, 1989).

Ao contrário da interação compatível, a interação do tipo incompatível se dá em cultivares resistentes. Visualmente, pode se notar desde pequenas pontuações claras a urédias de tamanho pequeno a moderado. Isto é, pode ou não haver uredínia, junto com halos cloróticos e necróticos. Uma interação incompatível se caracteriza por reações de hipersensibilidade de graus variados (BOLTON et al., 2008; CHAVES et al., 2008).

### **2.7.2 Danos e efeitos no rendimento**

Quando as plantas hospedeiras são expostas ao patógeno, seus processos morfo-fisiológicos são afetados, havendo decréscimo no teor de clorofila, na área foliar, no teor de água, no peso seco relativo, na permeabilidade da membrana e no peso específico da folha. Também há redução em componentes como o comprimento da espiga, número de espiguetas e de grãos por espiga. Juntos, esses efeitos resultam na baixa qualidade do produto final e em perdas de rendimentos (KHAN et al., 2013).

Em lavouras de trigo da região sul do Brasil, Uruguai e Argentina, a doença é a mais severa e predominante. Quando adotadas cultivares suscetíveis sem o uso de fungicidas, as perdas por ferrugem-da-folha podem ultrapassar 50% (DRAZ et al., 2015; GERMÁN et al., 2007). Como exemplo de prejuízo que pode ser causado, uma epidemia particularmente grave no noroeste do México durante 1976-1977 levou a perdas de produção estimadas em até 70% (DUBIN; TORRES, 1981). Em casos extremos, foram observadas perdas de 32, 86 e 170 milhões de dólares, no México no período de 2000 a 2003 (SINGH et al., 2004), no Paquistão em 1978 (HUSSEIN et al., 1980) e na América do Sul entre 1996 e 2003 (GERMAN et al., 2004), respectivamente. Embora nem sempre ocorra em níveis epidêmicos, o patógeno se faz presente e ameaça a produção em praticamente todos os anos de cultivo entre os materiais suscetíveis (OLIVEIRA et al., 2013).

No Brasil, o primeiro grande desafio envolvendo a ferrugem-da-folha se deu em meados do século 19, quando ocorreu uma severa redução no cultivo do trigo em consequência do surgimento da doença. Houve assim, a necessidade de reintrodução de novas variedades. Foi então, a partir dessa época, que a união de esforços deu início ao lançamento de novas cultivares de trigo com maior resistência, principalmente à ferrugem-



da-folha (CONAB, 2017).

## **2.8 Ferrugem-do-colmo**

### **2.8.1 Sintomas**

A ferrugem-do-colmo pode ser considerada a mais prejudicial das ferrugens do trigo. Embora as infecções em cereais ou gramíneas ocorram principalmente na região dos caules e bainhas das folhas, ela pode atacar todas as partes da planta acima do solo, como folhas, e espigas, incluindo até as aristas. O primeiro sintoma visível é geralmente um pequeno grão clorótico, visto alguns dias após a infecção. Esses uredósporos são facilmente distinguíveis em relação à ferrugem-da-folha. No caso da ferrugem-do-colmo, seus uredósporos são de coloração marrom-avermelhada escura e possuem formato oblongo ao invés de esférico (KNOTT, 1989).

Dependendo amplamente da temperatura, as infecções geralmente se tornam visíveis em 5 a 8 dias e a esporulação começa em 7 a 14 dias. O período mais curto ocorre com a temperatura ideal de cerca de 30 °C (KNOTT, 1989). Se torna evidente então a pústula, formada pela ruptura da epiderme do hospedeiro, devido à pressão da massa de uredósporos. Essas pústulas urediniais podem atingir até 10 mm de comprimento (LEONARD; SZABO, 2005).

Nos caules ou nas bainhas das folhas, as pústulas da ferrugem-do-colmo têm aspecto alongado (Figura 5). Nas folhas, as pústulas podem ter vários tamanhos e formas, mas nas folhas jovens de plantas suscetíveis, elas geralmente são em forma de diamante. Nas folhas mais velhas, as pústulas tendem a ser restringidas pelas nervuras. A pústula esporula em ambas as superfícies foliares, mas tende a ser mais pesada na superfície inferior. A disseminação secundária do fungo pode produzir um anel secundário de esporulação fora de uma pústula primária da folha (KNOTT, 1989).

Quando presente no hospedeiro alternativo (Figura 5), as infecções de pícias surgem inicialmente como áreas claras e cloróticas na superfície adaxial das folhas, tornando-se lesões marrom-alaranjadas claras, consistindo em pequenas erupções individuais em forma de cone (a pícnia), que aparecem geralmente em grupos (SINGH et al., 2002). No final da temporada ou com condições desfavoráveis, a infecção cessa a

produção de uredósporos avermelhados e passa a produzir teliosporos pretos brilhantes, dando um aspecto enegrecido aos caules (KNOTT, 1989; LEONARD; SZABO, 2005).

Figura 5 - A) Planta de trigo infectada por *Puccinia graminis* apresentando caule com lesões de formato alongado. Fonte: <https://cropprotectionnetwork.org>. B) Aécia com aéciosporos de *Puccinia graminis* distribuídas na face abaxial de folhas no hospedeiro alternativo (*Berberis*)



Fonte: <https://globalrust.org>.

### 2.8.2 Danos e efeitos no rendimento

Uma série de danos está relacionada às perdas de rendimento causadas pela ferrugem-do-colmo do trigo. Os primeiros danos advêm da perda da área fotossintética e da interrupção do transporte de água e de nutrientes. Isso acontece porque o patógeno utiliza-se dos tecidos do hospedeiro, havendo desvio das moléculas que seriam utilizadas para compor os grãos em formação, na planta sadia. Adicionalmente, as pústulas danificam a região epidérmica de proteção, o que acaba comprometendo o controle da transpiração da

planta e faz com que seu metabolismo se torne menos eficiente. A vulnerabilidade da planta infectada pode ainda ocasionar problemas secundários, de maneira que, de forma indireta, facilita a infecção por outros fungos e bactérias (KNOTT, 1989; SCHUMANN; LEONARD, 2000).

Os danos estendem-se também à redução do crescimento radicular, ao acamamento e quebra do caule, que resulta do enfraquecimento dos colmos do trigo, que se tornam muito vulneráveis na presença de ventos fortes e chuva. Uma vez ocorrendo o acamamento, este pode se tornar um empecilho e dificultar a colheita, que, dependendo da gravidade, não pode ser feito mecanicamente (KNOTT, 1989; SCHUMANN, LEONARD, 2000).

As mesmas condições ambientais que favorecem o crescimento das culturas, principalmente a umidade, também favorecem o desenvolvimento da ferrugem. Assim, uma colheita particularmente promissora pode ser destruída pela ferrugem-do-colmo em questão de semanas. Dependendo da rapidez e gravidade do ataque, pode resultar em grandes quantidades de sementes murchas e perda de rendimento. Graves ataques (infecções) iniciais podem causar perda total de uma colheita (KNOTT, 1989).

Grandes perdas de rendimento do trigo devido à ferrugem-do-colmo foram relatadas na Europa, Ásia, Austrália e Estados Unidos antes de meados do século 20 (ROELFS, 1978; SAARI; PRESCOTT, 1985), sendo referida historicamente, como um sério problema em toda a África, Oriente Médio, toda a Ásia (exceto Ásia Central), Austrália e Nova Zelândia, Europa e Américas (do Norte e do Sul) (SAARI, PRESCOTT, 1985).

Muito embora a ferrugem-da-folha seja mais predominante na América do Sul, em 1950, uma epidemia muito severa de ferrugem-do-colmo ocorreu na Argentina e em outros países Sul-Americanos. Em 1975 - 1976, vastas epidemias ocorreram no Brasil, Argentina e Uruguai, mesmo sob condições de ambiente pouco favoráveis. Entre 1975-2003, duas ocorrências em nível epidêmico foram observadas no Brasil e surtos localizados ocorreram durante o ano de 1990 em algumas cultivares amplamente cultivadas no Paraguai (GERMAN et al., 2007).

Segundo Shank (1994), na Etiópia, nos anos 1993 e 1994 houve a última grande epidemia de ferrugem-do-colmo. Nestes anos, a variedade de trigo "Enkoy" era muito

cultivada, e foram observadas perdas devastadoras. Outras epidemias mundiais passaram a ser mais frequentes nos últimos anos, envolvendo, porém, as doenças de ferrugem-da-folha e ferrugem-linear. Houve então uma grande mudança de prioridade, e, esta demanda levou ao desvio do foco (que era antes voltado à ferrugem-do-colmo) a tal ponto que em alguns países, os testes e melhoramentos para resistência à ferrugem-do-colmo foram suspensos (SINGH et al., 2008).

Mesmo que a ferrugem-do-colmo esteja sob controle em diversos países, estudos preveem a ausência de resistência durável e apontam que, em condições de epidemias graves, as perdas mundiais poderiam atingir cerca de 6,2 milhões de toneladas métricas por ano (PARDEY et al., 2013).

Mais recentemente, a ferrugem-do-colmo vem ganhando cada vez mais importância, visto que as populações do patógeno estão evoluindo e adquirindo novas características de virulência. O surgimento de novas virulências pode superar a resistência das cultivares amplamente utilizadas em todo o mundo e estabelece um sério risco à segurança alimentar global (PRETORIUS et al., 2000; SINGH et al., 2015).

## **2.9 Controle de ferrugens do trigo**

Com a finalidade de minimizar o quadro das doenças de ferrugens, existem diferentes abordagens que podem ser adotadas. As principais maneiras de controlar a ferrugem em cereais são o controle químico e a resistência genética. A aplicação de fungicidas auxilia no controle da doença, contudo, reflete no aumento de custos de produção e em efeitos ambientais, principalmente considerando-se que múltiplas aplicações do produto podem ser necessárias. Além disso, pode ocorrer perda de eficácia do produto, devido ao desenvolvimento de resistência dos agentes patogênicos contra os químicos utilizados em sua composição (JØRGENSEN et al., 2014; OLIVER, 2014).

Importantes desvantagens como estas fornecem ainda mais argumentos a favor do controle genético, por meio da utilização de cultivares com genes efetivos de resistência a doenças. A resistência genética é uma abordagem limpa, economicamente mais vantajosa e benéfica ao meio ambiente, apresentando-se como uma ferramenta sustentável de controle das ferrugens do trigo (HERRERA-FOESSEL et al., 2012).

### 2.9.1 Resistência genética da planta hospedeira

Resistência genética consiste na capacidade da planta hospedeira em impedir o crescimento e o desenvolvimento do patógeno (QUIRINO et al., 2010). Seu emprego estratégico e diversificado em diferentes cultivares e a manutenção de seus níveis constituem uma importante meta em programas de melhoramento de trigo (LI et al., 2018). Neste sentido, muitos esforços têm sido direcionados para isolar os genes de resistência e entender como implantá-los da melhor maneira para que a resistência duradoura seja alcançada. A resistência às ferrugens no trigo pode ser classificada em dois tipos: 1) resistência raça-específica, que normalmente é detectada no estágio de plântula, e 2) resistência raça-não-específica, que é detectada no estágio de planta adulta (JOHNSON, 1988; KOLMER, 2013).

Em geral, a resistência raça-específica é conferida por um ou poucos genes (também chamados genes “R”). Na literatura, são encontrados diversos termos para essa classe, que é conhecida também como resistência qualitativa, vertical ou monogênica. Nela, há a expressão de genes de efeitos maiores e funcionam principalmente desde o estágio de plântula até o de planta adulta (VANDERPLANK, 1963). Os genes R são geralmente de grande efeito no fenótipo e herdados de maneira simples, e, por isso, considerados pouco complexos de se trabalhar em programas de melhoramento. Através de simples cruzamentos, estes genes são rapidamente transferidos de um material para outro (MATIELLO et al., 1997). Em linhas gerais, como são específicos, os genes R de resistência não são eficazes a todas as raças ou estirpes do patógeno e se adaptam ao modelo clássico gene-a-gene de Flor (1971). Neste modelo, a resistência depende de uma interação entre genes de resistência do hospedeiro e genes de avirulência do patógeno. Quando há adaptação dos fungos e as cultivares que antes eram resistentes tornam-se suscetíveis, ocorre a chamada “quebra-da-resistência”.

Variedades com genes de efeito maior baseados em resistência específica à raça normalmente apresentam pouca estabilidade e geralmente não possuem vida longa, perdendo eficiência após 4-5 anos (KHAN et al., 2013; VANDERPLANK, 1982). Contudo, quando utilizados estrategicamente e em combinação, a vida útil de cultivares resistentes à ferrugem pode ser prolongada (SILVA et al., 2018).

Paralelamente, existem genes que expressam resistência na fase adulta da planta, sendo funcionais somente nesta fase (daí a definição resistência de planta adulta – RPA). Geralmente têm efeito menor no fenótipo ou, quando têm efeito maior, dependem da interação com outros genes (poligênica) para uma boa expressão da resistência, caracterizando a resistência como horizontal ou quantitativa. Estes genes podem estar em diferentes loci ou *QTLs*, que correspondem à pelo menos dois genes localizados em diferentes locos de cromossomos contribuindo para a característica da resistência, segundo Poehlman (1987). Quando a resistência à doença é conferida por diversos genes, a probabilidade de o patógeno neutralizar ou "quebrar" a resistência por seus mecanismos naturais de geração de variabilidade é muito pequena, o que gera fundamental interesse aos melhoristas (MATIELLO et al., 1997).

De modo geral, a RPA caracteriza-se por ser raça não-específica e de amplo espectro, não havendo interação diferencial entre as raças do patógeno e as variedades do hospedeiro (MATIELLO et al., 1997). Frequentemente, por codificarem uma faixa de proteínas mais heterogênea, esses genes podem levar a resistência a vários patógenos fúngicos (ELLIS et al., 2014).

A maioria dos genes de RPA confere efeito parcial de resistência, com níveis variáveis de gravidade da doença (Figura 6), e, ao levarem a um tipo incompleto de resistência a todas as raças, tem provado ser mais durável (KOLMER et al., 2018a). Estes genes estão relacionados a um período latente mais longo, menor frequência de infecção, menor tamanho uredinial, duração reduzida da esporulação e menor produção de esporos por local de infecção (CALDWELL, 1968). Neste caso, genes de RPA até permitem o desenvolvimento da doença, no entanto sua progressão é mais lenta (ELLIS et al., 2014).

Levando em consideração o dinamismo em que os patógenos desenvolvem novas virulências, é necessário definir quais combinações de genes dão origem a um efeito sinérgico (em conjunto) mais forte contra a infecção (HERRERA-FOESSEL et al., 2011). Para isso, a identificação de novas fontes de resistência deve ser contínua. Atualmente, mais de 70 genes de resistência tanto para ferrugem-da-folha (MCINTOSH et al., 2017; SILVA et al., 2018) quanto para ferrugem-do-colmo (AOUN, et al., 2019) já foram identificados em trigo.

Figura 6 - Plantas de trigo expressando resistência de planta adulta à ferrugem-da-folha. Observa-se a manifestação de níveis variáveis da severidade da doença



Fonte: Autora (2019).

### 2.9.2 Mecanismos de resistência

A observação e a investigação de diferentes tipos de reações às ferrugens levam a constatação de mecanismos de resistência atuando em diferentes estágios de infecção, que, quando combinados, fornecem às plantas múltiplas barreiras à infecção (RUBIALES et al., 2000). Em geral, na interação do hospedeiro com *Puccinia*, após a formação do apressório e de uma vesícula subestomatal, ocorrem dois principais mecanismos de resistência, sendo pré ou pós-haustorial (NIKS; DEKENS, 1991).

Na condição de resistência pós-haustorial ocorre a formação de pelo menos um haustório, no entanto, em seguida o crescimento do fungo é interrompido e as células do hospedeiro morrem após a formação do haustório. Normalmente, a resistência à ferrugem do tipo pós-haustorial está relacionada aos genes de maior efeito (raça-específica) (PARK, 2004).

A resistência pré-haustorial manifesta-se mais rapidamente e impede a formação de haustórios pelo fungo. Nesse caso, até são formadas células-mãe-de-haustório, porém não há o desenvolvimento de haustórios. Ao invés de haustórios, podem surgir papilas, na tentativa de penetrar a parede celular (NIKS; DEKENS, 1991). Possivelmente a resistência pré-haustorial seja mais durável, pois nesse tipo de resistência vários mecanismos de

defesa do hospedeiro são ativados em estágios iniciais, colaborando efetivamente para que não ocorra a colonização por parte do patógeno (PARK, 2004).

Wesp-Guterres et al. (2013), ao investigarem os componentes histológicos de resistência a *P. triticina* presentes no genótipo ‘Toropi’ (que apresenta resistência raça não-específica) verificaram a redução na extensão da formação de apressórios estomáticos e de todas as estruturas subsequentes. Durante a tentativa de penetração, houve produção de compostos autofluorescentes e morte celular tardia, mas não a formação de peróxido de hidrogênio. Portanto, os autores indicam que a resistência inespecífica à *P. triticina* envolve mecanismos pré-haustoriais e pós-haustoriais que podem ser responsáveis por manter a baixa severidade da doença neste genótipo (WESP-GUTERRES et al., 2013).

### **2.9.2.1 Genes de resistência – Ferrugem-da-folha**

Os genes de resistência à ferrugem-da-folha do trigo são designados *Lr* (do inglês “*Leaf rust*”). Há aproximadamente um século, foram desenvolvidos os primeiros estudos nesse sentido, envolvendo as cultivares de trigo “Malakof” e “Webster” (MAINS et al., 1926). Descobriu-se na ocasião, que ambas as cultivares possuíam genes que conferiam resistência ao patógeno, os quais mais tarde foram designados por *Lr1* e *Lr2* (AUSEMUS et al., 1946). Até o momento, mais de 100 genes *Lr* foram relatados em trigo e seus genomas relacionados (MCINTOSH et al., 2017), sendo que 79 deles foram mapeados para determinados locais de cromossomos da espécie e estão permanentemente catalogados (MCINTOSH et al., 2017; QURESHI et al., 2018).

Diversos genes para resistência às doenças de ferrugem foram transferidos para o trigo cultivado a partir de outros gêneros e espécies (BANSAL et al., 2017). Entre estes, incluem-se *Lr9* (*Aegilops umbellulata*); *Lr19*, *Lr24* e *Lr29* (*Thinopyrum ponticum*); *Lr37* (*A. ventricosa*); *Lr38* (*Thinopyrum intermedium*); *Lr28*, *Lr35*, *Lr36*, *Lr51* e *Lr66* (*A. speltoides*); *Lr21*, *Lr22a*, *Lr32* e *Lr39* (*A. tauschii*); *Lr57* (*A. geniculata*); *Lr58* (*A. triuncialis*); *Lr59* (*A. peregrina*); *Lr62* (*A. neglecta*); *Lr63* (*Triticum monococcum*) e *Lr53* e *Lr64* (*T. dicoccoides*); *Lr14a* e *Lr61* (*T. turgidum*) (MCINTOSH et al., 2013; BANSAL et al., 2017). Com o passar do tempo, alguns deles foram removidos do "Catálogo de Símbolos Genéticos do Trigo" por estarem duplicados ou redundantes, foi o caso de *Lr4* a



*Lr8*, *Lr39* (= *Lr21*), *Lr41* (= *Lr39*) e *Lr43* (MCINTOSH et al. 2013), que já haviam sido identificados previamente como outros genes *Lr*.

Grande parte dos genes *Lr* condiciona uma resistência altamente eficaz a raças específicas do fungo da ferrugem-da-folha em plântulas e em plantas adultas, mas não fornecem resistência a outras raças (KOLMER et al., 2018b).

Atualmente, existem diversos genes *Lr* formalmente catalogados que conferem RPA: *Lr12*, *Lr13*, *Lr22a/b*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr37*, *Lr46*, *Lr48*, *Lr49*, *Lr67*, *Lr68*, *Lr74*, *Lr75*, *Lr77* (MCINTOSH et al., 2017) e mais recentemente *Lr78* (KOLMER et al., 2018a) e *Lr79* (QURESHI et al., 2018). Dentro desta classe, oito genes (*Lr12*, *Lr13*, *Lr22a/b*, *Lr35*, *Lr37*, *Lr48*, *Lr49* e *Lr79*) são relatados como sendo específicos à raça (MCINTOSH et al., 1995, 2009) e oito (*Lr34*, *Lr46*, *Lr67*, *Lr68*, *Lr74*, *Lr75*, *Lr77* e *Lr78*) relatados por serem não-específicos, eficazes para múltiplas raças atuais de *P. triticina*. Nessa categoria, os genes *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* e *Lr68* são únicos porque além de conferirem resistência parcial, de evolução lenta da ferrugem-da-folha, também estão associados à ferrugem-do-colmo e outros patógenos em trigo (HERRERA-FOESSEL et al., 2012).

A cultivar brasileira ‘Frontana’ tem sido fonte dos genes de resistência de planta adulta *Lr13* e *Lr34* (DYCK et al., 1966; KOLMER et al., 2008). Embora o *Lr13* seja um gene de RPA específico à raça que já não oferece resistência muito eficaz em muitos países, o *Lr34* permaneceu efetivo por mais de 50 anos e continua sendo importante na resistência à ferrugem em cultivares de trigo na América do Norte (KOLMER et al., 2008; OELKE; KOLMER, 2005) e América do Sul (GERMÁN; KOLMER, 2012). Outras cultivares do Brasil (Westphal 12A e BH1146) (KOLMER; LIU, 2001), têm *Lr34* e, possivelmente, outros genes de RPA à ferrugem-da-folha que ainda não foram caracterizados (KOLMER et al., 2018b).

## **- Toropi**

A cultivar brasileira de trigo ‘Toropi’ (Frontana / Quaderna A // Petiblanco 8) foi lançada em 1965 e comercialmente cultivada por mais de 15 anos (ROSA et al., 2019). ‘Toropi’ caracteriza-se por apresentar resistência de planta adulta, a qual se mantém até hoje. Sua resistência mostra-se efetiva em diferentes países como Brasil, Canadá e Nova Zelândia (ROSA et al., 2016, KOLMER et al., 2018a). Embora possua ‘Frontana’ em sua

genealogia, é sabido que a cultivar ‘Toropi’ não possui alelos de *Lr34*, gene de RPA bem caracterizado pela evolução lenta da doença (BARCELLOS et al., 2000, MELLERS et al., 2020).

Estudos iniciais revelaram dois genes associados a RPA à ferrugem-da-folha em uma seleção da cultivar denominada ‘Toropi-6’, e assim, foram designados temporariamente como *Trp-1* e *Trp-2* (BARCELLOS et al., 2000, BRAMMER, 2000). Posteriormente, foi revelado que ambos são genes recessivos e estão localizados nos cromossomos 1AS e 4DS respectivamente (SILVA et al., 2012). Outro estudo envolvendo ‘Toropi’ mapeou um *QTL* de RPA à ferrugem-da-folha e ferrugem-linear no cromossomo 5AL (ROSA, 2013).

Além disso, mais recentemente, ao se estudar a seleção “PI 344200” de ‘Toropi’, foi apontado que sua resistência, que tem caráter aditivo, deve-se à combinação de um único gene de maior efeito (designado a partir de então como *Lr78*) localizado no cromossomo 5DS associado a três *QTLs* de menor efeito, localizados em 1BL, 3BS e 4BS (KOLMER et al., 2018a). Estes trabalhos demonstram em conjunto, a importância da variedade ‘Toropi’, e segundo Rosa et al., (2019), a durabilidade da sua resistência à ferrugem-da-folha provavelmente se deva a uma combinação de vários genes.

### **2.9.2.2 Genes de resistência - Ferrugem-do-colmo**

Vários genes de resistência à ferrugem-do-colmo (estes designados *Sr*, do Inglês *Stem rust*) foram descritos e catalogados. Assim como ocorre com a ferrugem-da-folha, estes genes têm como origem não só o trigo, mas também materiais selvagens e espécies cultivadas relacionadas, que são fontes valiosas de novos genes de resistência à doença (CHEN et al., 2020). Hoje, linhas monogênicas contendo genes *Sr* individuais estão disponíveis em vários backgrounds (fundos genéticos) de trigo (HAILE et al., 2013).

O gene de resistência de planta adulta *Sr2* foi transferido do trigo espelta “Yaroslav” para o trigo comum na década de 1920 e é o mais importante gene de resistência à ferrugem-do-colmo, amplamente distribuído em cultivares ao redor do mundo (MCINTOSH et al., 1995). No final dos anos 1940, os programas de melhoramento do

CIMMYT foram bem-sucedidos na introdução do *Sr2* da cultivar americana ‘Newthatch’, que combinaram resistência dos parentais ‘Hope’ e ‘Thatcher’ (ELLIS et al., 2014).

A partir da década de 1950, os genes de resistência à ferrugem-do-colmo foram implantados com sucesso em cultivares comerciais em todo o mundo, controlando efetivamente a doença (HAILE et al., 2013). Durante o período de 1965 a 1985, o programa de melhoramento do CIMMYT incorporou uma diversidade de genes. A maioria dos materiais disponibilizados nessa época continha o gene *Sr2* combinado com dois a quatro genes adicionais para resistência a ferrugem-do-colmo. Esses genes adicionais incluem *Sr5*, *Sr6*, *Sr7a*, *Sr7b*, *Sr8a*, *Sr9b*, *Sr9d*, *Sr9e*, *Sr9g*, *Sr10*, *Sr11*, *Sr12*, *Sr17*, *Sr24*, *Sr26*, *Sr30*, *Sr31* e *Sr36* (KNOTT, 1988).

Dos 60 genes de resistência à ferrugem-do-colmo nomeados oficialmente, apenas dez foram clonados até agora e oito deles são genes tipo raça-específicos (ABOUKHADDOUR et al., 2020). A clonagem dos genes *Sr* contribuiu para o desenvolvimento de marcadores moleculares e acelerou a piramidização e a implantação desses genes de resistência em programas de melhoramento de trigo (CHEN et al., 2020). Os genes do tipo raça-específica são a fonte de resistência predominantemente utilizada para desenvolver variedades de trigo resistentes às raças de *Pgt* (HAILE et al., 2013), sendo desejável um conjunto extenso de genes para diversificar as pirâmides dos genes de resistência e aumentar sua durabilidade (CHEN et al., 2020).

Vários *QTL*'s identificados nos cromossomos 3BS, 6BS, 5BL, e 2BL para resistência a ferrugem-do-colmo vêm sendo identificados (YU et al., 2014). Das novas descobertas, muitas são frutos de esforços na identificação de novas fontes de resistências para controlar principalmente formas mais agressivas da doença, como a raça Ug99 (KHAN et al., 2013).

## **- Ug99**

Com exceção a epidemias que ocorreram na Etiópia em 1993 e 1994, a incidência de ferrugem-do-colmo nas safras de trigo em todo o mundo permaneceu baixa desde o início dos anos 1970 até o final dos anos 1990, quando a doença ressurgiu como um problema sério na África Oriental (PARK, 2016). Em 1999, uma nova raça virulenta de

*Pgt* foi identificada em campos de trigo em Uganda (PRETORIUS et al., 2000), sendo então denominada Ug99.

Este patótipo é motivo de preocupação, pois exhibe padrões de virulência notavelmente únicos (FAO, 2021) e tem a capacidade de superar muitos dos genes de resistência conhecidos, incluindo *Sr31*, um gene para o qual a virulência não havia sido detectada anteriormente (PARK, 2016). Muitos dos genótipos cultivados possuem o gene *Sr31*, e, por isso, após sua detecção em Uganda, a Ug99 disseminou-se rapidamente para outros países do leste Africano como Quênia, Etiópia e Iêmen (CHAVES et al., 2005; SINGH et al., 2006). Como consequência, no Quênia, foram relatadas perdas de rendimentos de até 80%. Considerando que a raça é virulenta em grande parte das cultivares de trigo, as perdas podem ser ainda mais severas, com risco de chegar a 100% (KHAN et al., 2013).

A maioria das variedades cultivadas na Europa, Ásia e Estados Unidos são suscetíveis a Ug99, o que alimenta a urgência da pesquisa na descoberta de genes de resistência eficazes contra o patógeno (SINGH et al., 2015). Além disso, uma proporção considerável do germoplasma de trigo desenvolvido na América Latina como Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai e Chile possui o gene *Sr31*, mas, felizmente, a raça Ug99 ainda não foi detectada na região (CHAVES et al., 2005).

A Ug99 foi inicialmente designada como TTKS por Wanyera et al. (2006), baseando-se no sistema de nomenclatura norte-americana (ROELFS; MARTENS, 1988). Porém, mais recentemente, recebeu uma quinta letra (TTKSK) após um quinto conjunto de séries diferenciais ter sido adicionado para expandir ainda mais a caracterização deste isolado (JIN et al., 2008). Depois do surgimento desta raça, novas variantes derivadas de Ug99 passaram a ser identificadas (Figura 7), virulentas a genes adicionais de resistência ao trigo (SINGH et al., 2015).

As diferentes variantes que constituem o complexo Ug99 possuem o mesmo “fingerprint”, porém expressam padrões de virulência diferentes. Esta alta capacidade de especialização fisiológica coloca mundialmente em risco o cultivo de trigo (BARCELLOS, 2011), já que o grupo de raça Ug99 é virulento para aproximadamente 90% das cultivares contemporâneas ao redor do mundo (SINGH et al., 2008).

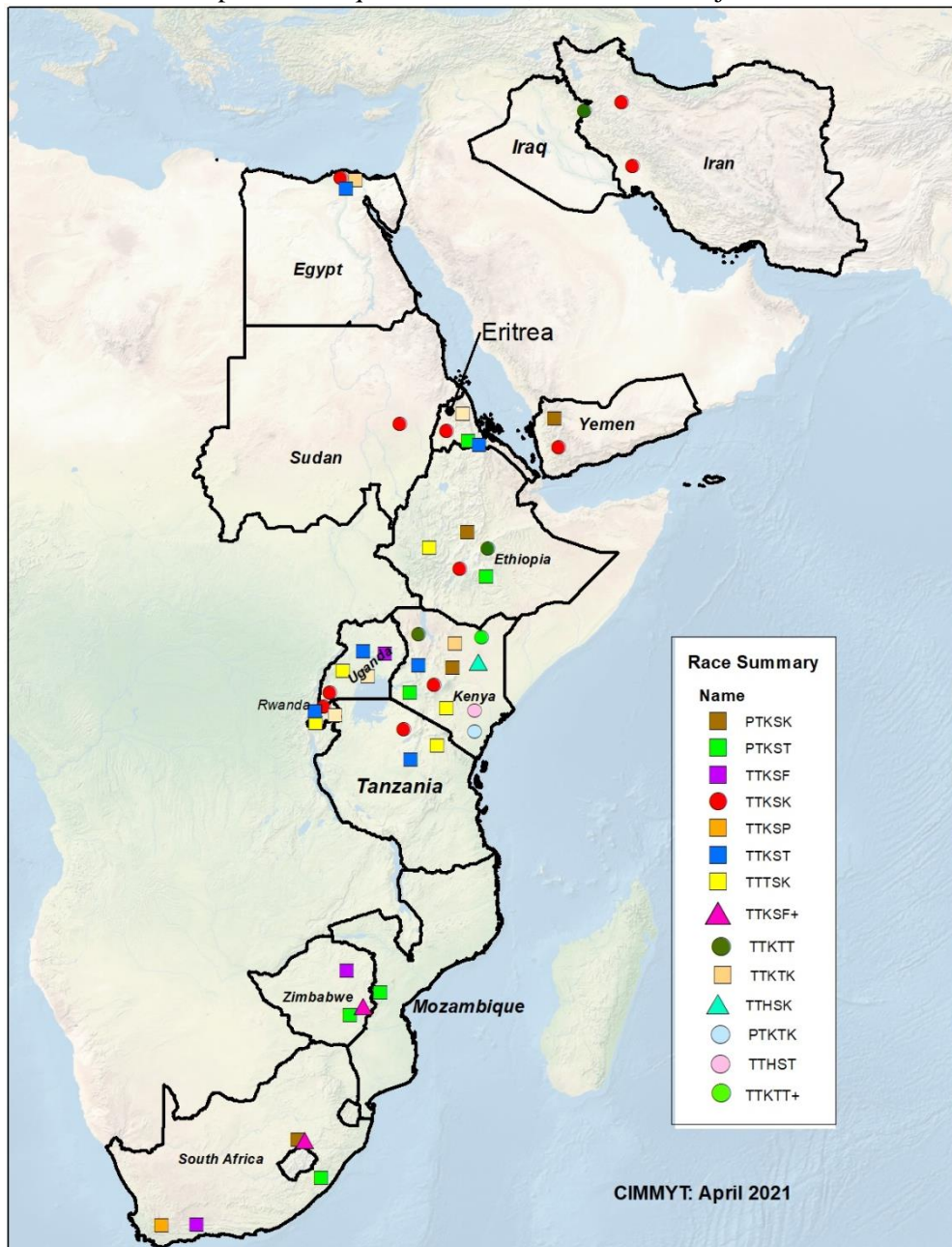
Depois do surgimento da Ug99 (TTKSK), as variantes mais recentes são: TTKSF+, coletada na África do Sul e no Zimbábue em amostras coletadas no ano de 2010 (PRETORIUS et al., 2012); TTHST detectada no Quênia, em 2013 (NEWCOMB et al., 2016); TTKTT, TTKTK, PTKTK e TTHSK (PATPOUR et al., 2016, FETCH et al., 2016), coletadas no Quênia em 2014; e PTKSK, encontrada pela primeira vez na África do Sul, em 2017 (TEREFE et al., 2018).

Todas as variantes são consideradas mutações de etapa única (<https://rusttracker.cimmyt.org>), originadas devido à alterações pontuais no genoma do patógeno. A virulência adquirida para *Sr24* e *Sr36* (que são genes importantes) é conhecida no Quênia (*Sr24*, *Sr36*), Egito (*Sr24*), Eritreia (*Sr24*), Etiópia (*Sr24*, *Sr36*), Moçambique (*Sr24*), Ruanda (*Sr36*, *Sr24*), África do Sul (*Sr24*), Tanzânia (*Sr24*, *Sr36*), Uganda (*Sr24*, *Sr36*) e Zimbábue (*Sr24*). A raça TTKST, carregando virulência combinada *Sr31* + *Sr24*, causou epidemias no Quênia em 2007. Das variantes de Ug99, as que possuem virulência combinada *Sr31* + *Sr24* estão se espalhando rapidamente por toda a África e acredita-se que provavelmente se espalhem ainda mais no futuro. Além disso, a virulência para o gene *SrTnp* foi agora adquirida pelas últimas variantes detectadas no Quênia (isto é, raça TTKTT, raça TTKTK e raça PTKTK). Pelo menos uma dessas variantes (TTKTK) parece se espalhar rapidamente, também sendo detectada em 2014 no Egito, Eritreia, Ruanda e Uganda (PATPOUR et al., 2016).

Até o ano de 2019, 13 variantes de Ug99 haviam sido detectadas em 13 países da África Oriental (FETCH et al., 2016; BHAVANI et al., 2019). Estes números foram atualizados, e hoje, segundo o sistema global que monitora as ferrugens (<https://rusttracker.cimmyt.org>), existem 14 variantes distribuídas em 14 países, sendo o Iraque o local mais recente de detecção do patógeno (NAZARI et al., 2021), e TTKTT+ a mais recente variante identificada, com virulência adicional ao gene *Sr8155B1* (<https://rusttracker.cimmyt.org>).

As variantes de Ug99 continuam a emergir e se dispersar, carregando com seus esporos novas ameaças contra a produção de trigo (BHAVANI et al., 2019). Frente a este cenário, especialmente pelo surgimento da Ug99 e pela temeridade de suas variantes, tem sido constante a busca de novos genes *Sr* e a caracterização genética de fontes conhecidas de resistência (HIEBERT et al., 2016).

Figura 7 - Uganda como centro de origem da raça Ug99 (TTKSK) e países vizinhos afetados pela raça e suas variantes em dispersão. No quadro à direita, as 14 variantes já detectadas



Fonte: <https://rusttracker.cimmyt.org>

### 2.9.2.3 Genes de resistência em espécies relacionadas

Devido à rápida e constante evolução dos fitopatógenos, os melhoristas de plantas tentam continuamente incorporar novas características e melhorar os níveis de resistência

em novas variedades, fazendo uso não somente da diversidade do trigo domesticado, mas também de suas espécies relacionadas (CASASSOLA; BRAMMER, 2012; CRESPO-HERRERA et al., 2017)

### **- *Secale cereale* e a translocação 1BL.1RS**

Muitos genes de resistência conhecidos derivados de parentes selvagens de trigo que demonstraram ser eficazes contra Ug99 estão localizados em translocações cromossômicas (DUNDAS et al., 2007). Uma translocação cromossômica consiste na troca de segmentos cromossômicos dentro de indivíduos de uma mesma espécie ou entre espécies distintas.

A troca do braço curto (1RS) do cromossomo 1R do centeio (*Secale cereale* L.) (2n=14, composição do genoma RR) para o trigo é o meio mais comum pelo qual um segmento cromossômico do centeio foi introduzido no trigo (FRIEBE et al., 1996). O 1RS foi transferido na forma de diferentes translocações trigo-centeio: 1AL.1RS, 1BL.1RS e 1DL.1RS. Em termos de melhoramento e produção, 1AL.1RS e o 1BL.1RS são as que proporcionam maior impacto na cultura do trigo (GRAYBOSCH, 2001).

Na translocação 1BL.1RS ocorre a troca do braço longo (L) do cromossomo 1 do genoma B do trigo pelo braço curto do cromossomo 1 do centeio (R). Essa translocação teve origem espontânea e posteriormente foi artificialmente transferida através de cruzamentos para outros genótipos de trigo (ZELLER et al., 1983). A translocação 1BL.1RS hoje utilizada é derivada do centeio 'Petkus' via cultivares russas de trigo 'Kavkaz' e 'Avrora' (GRAYBOSCH, 2001).

Quando introduzidos no trigo, os segmentos 1RS são herdados como um bloco de genes não recombinados. Junto a esta troca de cromatina, são transferidos para o trigo caracteres como aumento na biomassa acima do solo, sistema radicular profundo, tolerância a estresse abióticos, particularmente a tolerância à seca, resistência aos principais estresses bióticos e contribui com 12 a 20% de aumento de rendimento de grãos (EHDAIE et al., 2003; SHARMA et al., 2009; HOWELL et al., 2014). Além disso, são carregados genes de resistência a diversos patógenos, incluindo ferrugem-do-colmo, ferrugem-da-folha e ferrugem-linear (*Sr31*, *Lr26*, *Yr9* e *YrCn17*, respectivamente), oídio

(*Pm8* e *PmCn17*), percevejo (*Gb2*) e ao pulgão russo do trigo (*Dn7*) (ZELLER, 1973; SINGH et al., 1990; FRIEBE et al., 1996; MAGO et al., 2002; BERZONSKY et al., 1991; MAGO et al., 2005; REN et al., 2009; HOLLENHORS; JOPPA, 1983; TYLER et al., 1987; MATER et al., 2004; MARAIS et al., 1994; LAPITAN et al., 2007).

Em razão dos diversos atributos associados à presença da translocação 1BL.1RS, o segmento cromossômico foi largamente implementado em programas de melhoramento de trigo em todo o mundo durante as décadas de 1980 e 1990 e introduzido em mais de 300 cultivares (RABINOVICH, 1998; LAN et al., 2017).

### - *Triticum timopheevii* e *Sr36*

Assim como o centeio, o trigo tetraploide *T. timopheevii* Zhuk ( $2n = 28$ , genoma AAGG) é uma excelente fonte de resistência a doenças, particularmente contra patógenos de ferrugem, carregando genes conhecidos e desconhecidos que atuam na determinação da resistência (LEONOVA et al., 2011). Os genes de resistência conhecidos que foram transferidos para o trigo comum do genoma de *T. timopheevii* são: *Lr18* e *Lr50* (ferrugem-da-folha), *Sr36*, *Sr37*, *Sr40* (ferrugem-do-colmo), *Pm6*, *Pm27* e *Pm37* (oídio) (MCINTOSH et al., 2008). Dentre esses genes, o *Sr36* foi primeiramente introgridido em duas linhas de trigo de primavera, e, em seguida, transferido para genótipos derivados destas linhas (como por exemplo 'Arthur 71' e 'TP-114-1965-A') (PURNHAUSER et al., 2011). No trigo, o *Sr36* está localizado no cromossomo 2BS, e é amplamente presente em germoplasma adaptado, sendo utilizado em cultivares de inverno americanas (JIN; SINGH, 2006), bem como cultivares da Austrália e de vários outros países (BARIANA et al., 2001).

Embora sejam comuns raças de *P. graminis* f. sp. *tritici* virulentas ao *Sr36*, este gene tem sido considerado uma fonte valiosa de resistência à ferrugem-do-colmo. Sua importância se dá por conferir um tipo de resistência imune a diversas raças de *Pgt*, mostrando-se altamente eficaz à TTKSK (Ug99) em ambos os estágios de plântula e planta adulta (JIN et al., 2007; JIN et al., 2008; JIN et al., 2009).

O gene *Sr36* é um dos 18 genes que fornecem a principal fonte de resistência ao grupo de ferrugem-do-colmo TTKS (WANYERA et al., 2006). Nenhum desses 18 genes



ocorre em alta frequência em materiais de melhoramento, exceto *Sr36*, que está presente em diversos germoplasmas de trigo (TSILO et al., 2008).

#### **2.9.2.4 BRS 194**

A variedade brasileira de trigo ‘BRS 194’ é oriunda do cruzamento CEP14/BR 23//CEP 17 e foi lançada pela Embrapa Trigo em 2000. As duas últimas variedades utilizadas na sua genealogia foram as mais semeadas no Rio Grande do Sul no período de 1988 a 1994 (REUNIÃO, 2000). Ao ser lançada, apresentava características de rusticidade e elevado rendimento de grãos (CHAVES et al., 2009). Na época, este genótipo foi idealizado com o objetivo de reunir características favoráveis de boa adaptação ao cultivo do trigo no Sul do Brasil sendo recomendada para cultivo em todas as regiões produtoras de trigo nos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (REUNIÃO, 2000).

Seus grãos apresentam coloração vermelha, com elevado peso de hectolitro (em média 78 kg/hl). Pela força de glúten (média de 245 x 10<sup>-4</sup>J), foi classificada preliminarmente no Paraná, como trigo da classe comercial Pão, indicada então para a fabricação de pães, folhados, massas alimentícias, bem como para uso doméstico (DEL DUCA et al., 2005).

Com a crescente aceitação na lavoura, ‘BRS 194’ passou a ser a segunda cultivar com maior disponibilidade de sementes para plantio no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina em 2005 (CHAVES et al., 2009). Adicionalmente, em razão da sua ampla adaptação demonstrada nas regiões produtoras de trigo, em 2005 foi indicada para cultivo em regiões do Mato Grosso do Sul e do Paraná (DEL DUCA et al., 2005). Na época em que foi desenvolvida, ‘BRS 194’ apresentava-se resistente ao vírus-do-mosaico-do-trigo (VMT), ao oídio e à ferrugem-do-colmo; moderadamente resistente à mancha da gluma (septoriose-da-gluma), à ferrugem-da-folha e à mancha bronzeada (DEL DUCA et al., 2005).

Até o ano de 2004, ‘BRS 194’ possuía resistência qualitativa a todas as raças de *P. triticina* que estavam presentes no Brasil e em outros países do Cone Sul. Até então, em campo, a cultivar apresentava reação de resistência e moderada resistência (R-MR). Todavia, no ano seguinte, pústulas de ferrugem-da-folha com tipos de infecção de

suscetibilidade foram observadas, tanto em lavouras quanto em campos experimentais. Foi então confirmado que em 2005 houve superação de sua resistência à ferrugem-da-folha em decorrência de uma nova virulência do patógeno, correspondente ao código MFP-CT (designação brasileira: B56), que foi a primeira raça de ferrugem-da-folha considerada virulenta a variedade ‘BRS 194’ (CHAVES et al., 2009).

Paralelamente, apesar da sua perda de resistência à ferrugem-da-folha, há registros de que, também em 2005, ‘BRS 194’ foi avaliada para Ug99 no Quênia, sob condições naturais de infecção. Foram encontrados resultados promissores, indicando que ‘BRS 194’ mostrou resistência a Ug99 em condições de campo (CHAVES et al., 2006).

A elucidação da resistência genética de variedade de trigo a doenças como ferrugem-do-colmo e ferrugem-da-folha é um processo essencial para programas de melhoramento, pois permite expandir a base genética de novas cultivares, que é imperativa frente à crescente demanda por novas combinações de fontes de resistências duradouras.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Com o objetivo de estudar a resistência genética de trigo à ferrugem-da-folha e à ferrugem-do-colmo, foi realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Trigo) em Passo Fundo, Rio Grande do Sul, o cruzamento entre duas variedades de trigo ('Toropi' e 'BRS 194'), com respostas contrastantes a ambos os patógenos. Deste cruzamento, seguiu-se a construção de uma população duplo-haploide (DH), desenvolvida pela técnica de cultura de micrósporos isolados no Laboratório de Biotecnologia da unidade. Para a produção das linhagens DH, foi seguido o protocolo de Scagliusi (2014). Deste cruzamento, 65 linhagens foram produzidas, formando a população para estudos genéticos. A realização deste trabalho contou com parte dos seus experimentos conduzidos no Brasil (Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS), onde foram realizados ensaios de inoculação e fenotipagem, envolvendo *P. triticina*, e extração de DNA dos genótipos de trigo. Os demais ensaios foram desenvolvidos no Canadá, no centro de pesquisa Morden Research and Development Centre (Agriculture and Agri-Food Canada), em Morden, Manitoba, e incluíram inoculação e fenotipagem com *P. triticina* e *P. graminis* e testes moleculares.

#### 3.1 Material vegetal

A população DH teve como origem plantas da geração F<sub>1</sub> do cruzamento entre 'Toropi' x 'BRS 194', cujo material foi disponibilizado pela Embrapa Trigo. Este cruzamento baseou-se numa cuidadosa escolha de genitores, entre os quais os genótipos brasileiros 'Toropi' e 'BRS 194' são altamente contrastantes.

A variedade 'Toropi' foi lançada em 1965 e é fruto do cruzamento "Frontana/Quaderna A// Petiblanco 8". Apesar de 'Toropi' ser suscetível à ferrugem-da-folha no estágio de plântula, esta variedade destaca-se por apresentar resistência de planta adulta ao patógeno, a qual se mantém estável desde que foi desenvolvida.

‘BRS 194’, variedade lançada em 2000, é resultante do cruzamento “CEP 14/BR 23//CEP 17” que reuniu características favoráveis de boa adaptação ao cultivo do trigo no Sul do Brasil. A variedade ‘BRS 194’ apresenta rusticidade, ciclo médio e rendimento elevado de grãos (DEL DUCA et al., 2005). ‘BRS 194’ é resistente a oídio, no entanto apresenta suscetibilidade à fusariose (*Fusarium graminearum* Schwabe) e é altamente suscetível à ferrugem-da-folha, motivo pelo qual a sua escolha como um dos genitores foi baseada.

### 3.2 Testes com *Puccinia triticina* - Brasil

#### 3.2.1 Plântula

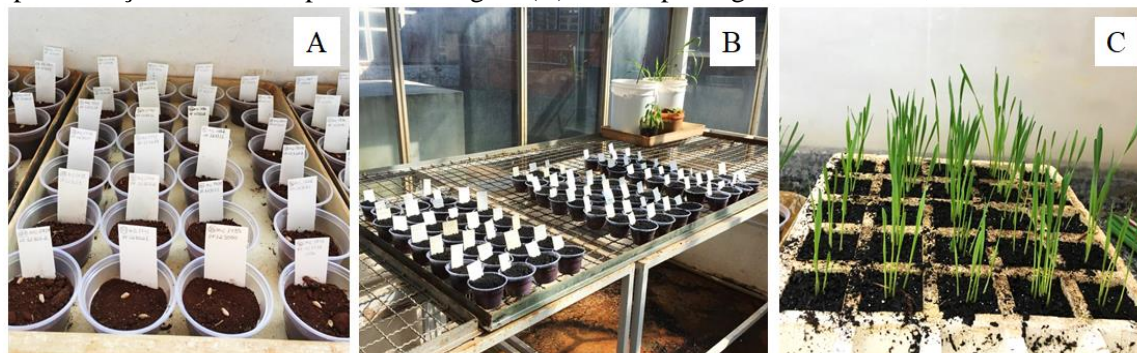
O teste de plântula para *P. triticina* foi conduzido na Embrapa Trigo. As sementes dos parentais e de 65 linhagens DHs foram vernalizadas a 4 °C por sete dias e a semeadura foi feita em recipientes plásticos de 60 ml, contendo uma camada de solo e uma camada de substrato Mecplant (proporção 1:1) (Figura 8A). Duas sementes de cada linhagem foram utilizadas. Para os parentais ‘Toropi’ e ‘BRS 194’, dez sementes foram distribuídas em seis recipientes. Adicionalmente, foram semeadas as variedades suscetíveis à ferrugem-da-folha ‘Morocco’ e ‘Umbu’ (controles positivos). A série diferencial (Quadro 2), de acordo com Long e Kolmer (1989), mais o quarto e quinto grupos adicionais de genes compostos por *Lr10*, *Lr18*, *Lr21* e *Lr23*; e *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr26* e *Lr20* (CHAVES; BARCELLOS, 2006) também foram incluídas (Figura 8C). A série diferencial é utilizada para checar a pureza e confirmar o código de quatro letras do isolado, de acordo com a nomenclatura Norte-Americana (LONG; KOLMER, 1989) que determina o fenótipo de virulência.

Quadro 2 - Série diferencial de linhas isogênicas (cada uma portadora de um gene) de acordo com Long e Kolmer (1989) (três primeiros conjuntos) e Chaves e Barcellos (2006) (quarto e quinto conjuntos) para checagem de isolados de *Puccinia triticina*.

<b>Conjunto 1</b>	<i>Lr1</i>	<i>Lr2a</i>	<i>Lr2c</i>	<i>Lr3</i>
<b>Conjunto 2</b>	<i>Lr9</i>	<i>Lr16</i>	<i>Lr24</i>	<i>Lr26</i>
<b>Conjunto 3</b>	<i>Lr3ka</i>	<i>Lr11</i>	<i>Lr17</i>	<i>Lr30</i>
<b>Conjunto 4</b>	<i>Lr10</i>	<i>Lr18</i>	<i>Lr21</i>	<i>Lr23</i>
<b>Conjunto 5</b>	<i>Lr14a</i>	<i>Lr14b</i>	<i>Lr26</i>	<i>Lr20</i>

As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação, sob condições naturais de luminosidade, umidade relativa de 60 a 80% e temperatura de aproximadamente 22°C até a fase adequada de primeira folha completamente emergida para inoculação com *P. triticina* (Figura 8B).

Figura 8 - Semeadura e identificação de genótipos (A); Cultivo em casa-de-vegetação por sete dias, até estágio adequado para inoculação com ferrugem-folha. (B); Série diferencial com sete dias, apta à pulverização com uredósporos de ferrugem (C). Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2019



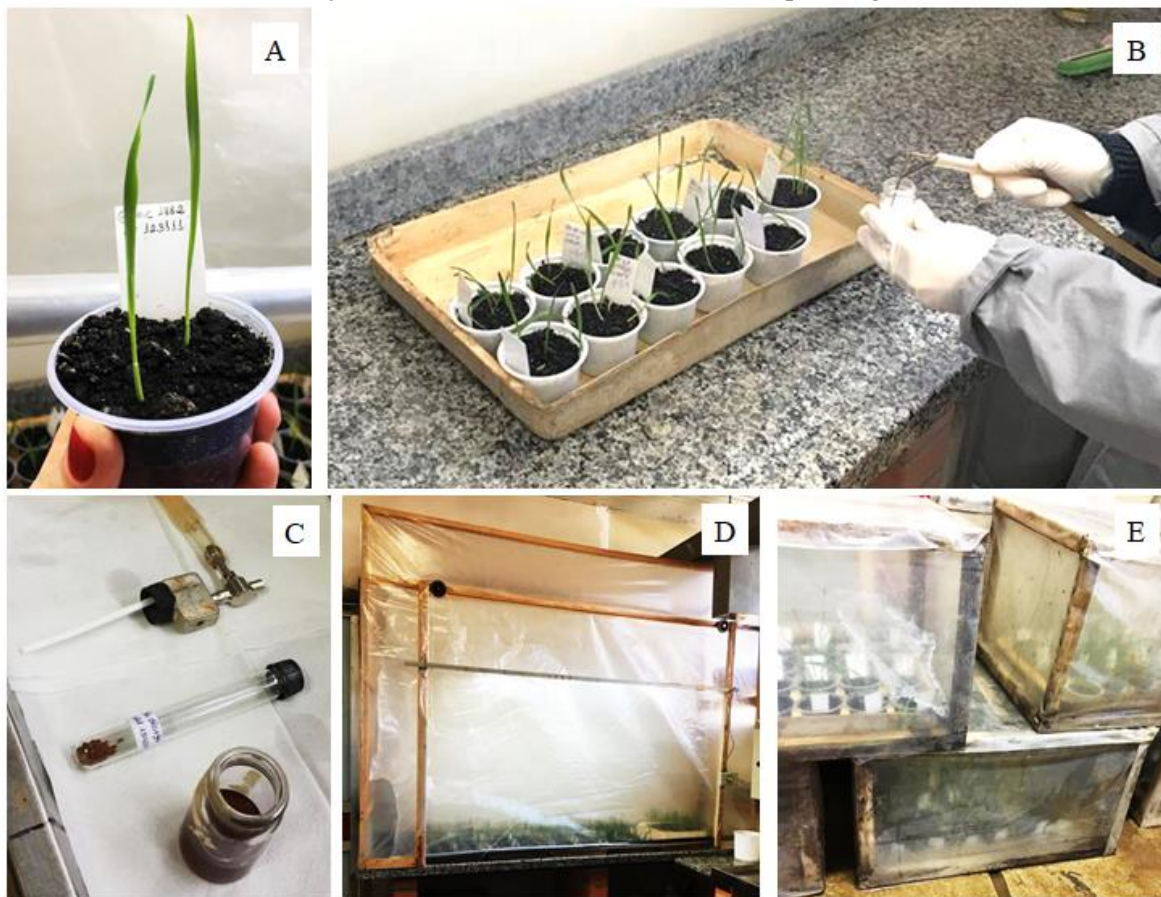
Fonte: Autora.

Para este ensaio, foi escolhida a raça MCJ-HN (ou B35, conforme nomenclatura brasileira) com base na disponibilidade de inóculo fresco para garantir inoculação bem-sucedida e produção de sintomas. É conhecido que MCJ-HN é avirulenta aos genes *Lr2a*, *Lr2c*, *Lr3ka*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr16*, *Lr18*, *Lr20*, *Lr21*, *Lr24*, *LrAld* e *Lr30*.

Sete dias após a sementeira, quando a primeira folha estava completamente emergida (Figura 9A) os materiais foram então submetidos à inoculação. Os uredósporos foram suspensos em solução de óleo mineral Soltrol 170, com concentração aproximada de  $10^6$  por ml, e foram pulverizados sobre as plântulas por sistema de ar comprimido, dentro de uma capela revestida por plástico (Figuras 9B, 9C). Após a inoculação, a capela foi fechada por uma cortina plástica, onde as plântulas ficaram em repouso por 15 minutos (Figura 9D).

Ao saírem da capela, as plantas foram umidificadas com borrifador e foram incubadas em câmara úmida a 20 °C, no escuro, por 18 a 20 horas (Figura 9E). Após a etapa de incubação, as plântulas foram transferidas para casa-de-vegetação e mantidas em condições naturais de luminosidade, umidade relativa de 60 a 80% e temperatura de cerca de 22°C para desenvolvimento da doença.

Figura 9 - Estádio de plântula adequado para inoculação com *Puccinia triticina* MCJ-HN (B35), de folha única completamente emergida (A); Processo de inoculação conduzido dentro da capela (B); De cima para baixo: pulverizador com sistema de ar comprimido, frasco contendo uredósporos viáveis e óleo mineral Soltrol 170 (C); Capela fechada logo após as plântulas receberem o inóculo (D); Material em incubação em câmara úmida (E). Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2019



Fonte: Autora.

A avaliação de reações foi realizada 14 dias após a inoculação, seguindo escala de acordo com Roelfs e Martens (1988) e Long e Kolmer (1989) (Quadro 3, Figura 10). Os tipos de infecção de 0, ponto-e-vírgula (;) e 1 foram considerados resistentes, os de 2 e 3 moderadamente resistentes e moderadamente suscetíveis, respectivamente, e o de 4 altamente suscetível.

Quadro 3 - Escala utilizada para classificação das reações das plantas à ferrugem-da-folha de acordo com Roelfs e Martens (1988) e Long e Kolmer (1989).

Tipo de Infecção	Sintomas na planta	Classificação
0	sem uredinia nem manchas hipersensíveis	Resistente
;	sem uredinia, mas necrosado hipersensível ou manchas cloróticas	Resistente
1	uredinia pequena cercada por necrose distinta	Resistente
2	uredinia pequena a média cercada por necrose ou clorose	Moderadamente Resistente
3	uredinia de tamanho moderado sem clorose	Moderadamente Suscetível
4	uredinia de grande porte sem clorose	Altamente Suscetível

Figura 10 - Tipos de infecção provocados por *Puccinia triticina*. Da esquerda para direita: 0, (;), 1, 2, 3 e 4



Fonte: Adaptado de Lee et al. (2020).

### 3.2.2 Planta adulta

Para o teste de planta adulta, também realizado na Embrapa Trigo, foram semeados os parentais ‘Toropi’ e ‘BRS 194’ e as plantas da população DH. Para uma germinação homogênea, antes da semeadura as sementes foram mantidas a 4 °C por 20 dias. A semeadura foi realizada em vasos de sete litros em uma mistura homogênea de solo,



substrato Mecplant e vermiculita (1:1:1), onde, para cada genótipo, havia dois vasos, cada um contendo quatro plantas. As plantas foram cultivadas inicialmente em câmara de crescimento (16 horas de luz à  $\pm 24$  °C) para manter a sanidade de plantas e evitar qualquer contaminação por patógenos em estádios iniciais. Aproximadamente dez dias antes da inoculação, as plantas foram então transferidas para casa-de-vegetação, sob condições naturais de iluminação.

Para a inoculação, foi selecionado o isolado MFP-CT (nomenclatura brasileira B56) (Figura 11A). A variedade ‘Toropi’ é resistente a esse isolado, o que determinou sua escolha. Além disso, MFP-CT é avirulento aos genes *Lr2a*, *Lr2c*, *Lr9*, *Lr16*, *Lr11*, *Lr10*, *Lr18* e *Lr21*.

Figura 11 - Uredósporos de ferrugem-da-folha da raça MFP-CT (B56) (A); Uredósporos inoculados por aspersão em fase de folha bandeira completamente expandida (estádio 47 da escala Zadoks) (B); Material após a inoculação com MFP-CT (B56) transferido para câmara úmida (C); Plantas inoculadas em câmara úmida no escuro por 16 horas (D); Transferência das plantas inoculadas para casa-de-vegetação para o desenvolvimento de ferrugem-da-folha (E). Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2019



Fonte: Autora.

Dentro da população, alguns genótipos tiveram desenvolvimento mais tardio, e, por isso a inoculação foi realizada em dois momentos. Depois de 55 dias de plantio, com folha



bandeira totalmente expandida em estágio 47 da escala Zadoks (ZADOKS et al., 1974) foi realizada a inoculação do primeiro grupo, que teve desenvolvimento mais acelerado. Após 62 dias da emergência de plantas foi inoculado o segundo grupo (ao atingir estágio 47 da escala Zadoks) que se desenvolveu mais tardiamente.

Uma suspensão de óleo mineral Soltrol contendo os uredósporos de MFP-CT foi pulverizada na folha bandeira totalmente expandida das plantas (Figura 11B). As plantas foram então transferidas para câmara úmida onde permaneceram por 16 horas, na ausência de luz, com saturação de umidade sem escorrimento, à temperatura de 20 °C (Figura 11C e 11D). O material foi transferido para a casa-de-vegetação e distribuído neste ambiente ao acaso. Foram mantidas condições naturais de luminosidade, umidade relativa de 60 a 80% e temperatura de  $22 \pm 2$  °C (Figura 11E).

Aos 14 dias após a inoculação, foram avaliados os parentais e as linhagens DH de acordo com Roelfs e Martens (1988) e Long e Kolmer (1989). Todas as plantas de cada genótipo foram avaliadas, sendo selecionadas aleatoriamente cinco folhas de cada uma.

Para a checagem do isolado B56, foi adotada a série diferencial, seguindo o procedimento descrito anteriormente em plântula. A classificação de tipos de infecção também se baseou pelo sistema desenvolvido por Roelfs e Martens (1988) e Long e Kolmer (1989).

### **3.3 Extração de DNA**

Para o teste de planta adulta, aos 30 dias de semeadura, cada vaso teve uma planta selecionada para a extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico. Visualmente, foi escolhida a planta que melhor representava a homogeneidade dentro de cada genótipo, e esta, foi marcada com uma estaca, destacando-a das demais (Figura 12A e 12B).

O DNA genômico foi extraído de acordo com o método CTAB (Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) (Figura 12C), descrito por Saghai-Marroof et al. (1984). As amostras de DNA obtidas foram quantificadas em gel de agarose 0,8 % e o volume de cada amostra foi ajustado para uma concentração final de  $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . Por fim, as amostras de DNA tiveram seu volume final distribuído em dois tubos e estes foram armazenados a -20° C até o momento do uso. No Canadá, as amostras foram quantificadas novamente em um

leitor de microplacas Infinite F500 (TECAN Austria GMBH) e a concentração final das amostras de DNA foi ajustada para  $60 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .

Figura 12 - Material vegetal dos parentais e linhas duplo-haploides, com cerca de 30 dias de cultivo em câmara de crescimento (A); Seleção visual de plantas para extração de DNA de cada linhagem (B); DNA genômico extraído pelo método CTAB (C). Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2019



Fonte: Autora.

### 3.4 Análises moleculares

#### 3.4.1 Marcador PE122

Para a detecção do braço cromossômico 1BL.1RS na população DH, foi selecionado o marcador PE122, cujos primers (iniciador: GAGCGATCAATGCTGCATTC e terminador: GGAAACTGGATCAGTCTCTG) foram projetados da EST (marcador de sequência expressa, do inglês *expressed sequence tag*) ID BG313657 (LEE; SEO, 2015).

A reação de polimerase em cadeia (PCR) para o marcador PE122 foi conduzida nas condições descritas por Lee e Seo (2015):  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 minutos; 28 ciclos de  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 segundos,  $64 \text{ }^\circ\text{C}$  por 45 segundos,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  por 45 segundos; e a extensão final a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  por 10 minutos. Cada reação de PCR continha  $25 \text{ } \mu\text{L}$  da seguinte solução:  $2,5 \text{ } \mu\text{L}$  de buffer (10x) para PCR,  $1,5 \text{ } \mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mM),  $2 \text{ } \mu\text{L}$  dntp (10 mM),  $2 \text{ } \mu\text{L}$  de primer forward ( $10 \text{ pm} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ),  $2 \text{ } \mu\text{L}$  primer reverse ( $10 \text{ pm} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ),  $0,5 \text{ } \mu\text{L}$  de Taq Polimerase ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ),  $11,5 \text{ } \mu\text{L}$  de ddH<sub>2</sub>O e  $3 \text{ } \mu\text{L}$  de DNA ( $60 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ).

Para o screening com o marcador PE122, em outra placa foram transferidos  $5 \text{ } \mu\text{L}$  da mistura de reação de PCR de cada uma das amostras e adicionado  $1 \text{ } \mu\text{L}$  de Flash Gel

Loading Dye 5x e homogeneizado. Esta mistura (6  $\mu\text{L}$ ) foi então depositada em um cassete de eletroforese (FlashGel™ DNA Cassette) de 32 poços (Figura 13A), que na última amostra recebeu 4  $\mu\text{L}$  do marcador (FlashGel™ DNA Marker, 100 bp – 4 kb, 500  $\mu\text{L}$  Lonza). Este sistema de eletroforese contém gel de agarose pré-corado e tampão. As amostras foram migradas a 140 volts (Figura 13B) e os fragmentos puderam ser observados no cassete em aproximadamente quatro minutos de corrida na bancada, sem utilização de luz ultravioleta.

Figura 13 - Sistema cassete de eletroforese (A) utilizado para leitura rápida dos produtos de PCR de cada amostra, conectado a uma carga elétrica de 140 volts (B). Morden Research and Development Centre, Morden, 2020



Fonte: Autora.

### 3.4.2 Marcador STM773-2

A fim de rastrear a presença do gene *Sr36* na população DH e nos parentais, foi adotado o marcador microssatélite STM773-2. Para isso, foi utilizado o primer iniciador: GAGCGATCAATGCTGCATTC e o primer terminador: GGAAACTGGATCAGTCTCTG, de acordo com Hayden e Sharp (2001).

Para as reações de PCR com o marcador STM773-2, as amostras foram distribuídas em placas de 96 poços. Cada amostra continha, por sua vez, 10  $\mu\text{L}$  de uma mistura de reação final contendo: 2.75  $\mu\text{L}$  de ddH<sub>2</sub>O, 1  $\mu\text{L}$  de PCR buffer (10x), 0.6  $\mu\text{L}$  de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1.6  $\mu\text{L}$  de dNTPs (1.25 mM), 1  $\mu\text{L}$  de cada primer (1  $\mu\text{M}$ ), 0.05  $\mu\text{L}$  de DNA Taq

polymerase 5 U. $\mu\text{L}^{-1}$  (Applied Biosystems, Branchburg, NJ), e 3  $\mu\text{L}$  de DNA genômico (60 ng. $\mu\text{L}^{-1}$ ).

A reação de PCR foi conduzida pelo seguinte programa: Desnaturação inicial de dez minutos a 94 °C, sete ciclos de 92 °C por 1 minuto, 64 °C por um minuto e 72 °C por um minuto. Após, seguiram-se cinco ciclos de 92 °C por um minuto, 57 °C por um minuto e 72 °C por um minuto. No seguinte passo, a amplificação teve 20 ciclos de 92 °C, por 30 segundos, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, e por fim, extensão por 72 °C, durante 10 minutos. Para a detecção visual das bandas, foi adotado o mesmo sistema usado para o marcador anterior, de forma que foram transferidos 5  $\mu\text{L}$  da mistura de reação de PCR de cada uma das amostras em outra placa e adicionado 1  $\mu\text{L}$  de Flash Gel Loading Dye (5x). Esta mistura homogênea de 6  $\mu\text{L}$  foi depositada no sistema de eletroforese (FlashGel™ DNA Cassette), onde, a última amostra continha 4  $\mu\text{L}$  do marcador (FlashGel™ DNA Marker, 100 bp – 4 kb, 500  $\mu\text{L}$  Lonza). O sistema foi ligado a 140 volts e os fragmentos foram então observados no cassete.

### 3.4.3 Análise de segregação de locos

Para a análise dos dados genéticos gerados para ambos os marcadores moleculares (PE122 e STM773-2), a leitura dos resultados foi realizada através da detecção visual de bandas, onde foram atribuídos padrões específicos para cada marcador.

No ensaio com o marcador PE122, as bandas obtidas para cada indivíduo foram codificadas obtendo-se uma matriz de dados binários (de presença ou ausência). Já a partir dos resultados gerados com o marcador STM773-2, a matriz de dados recebeu diferentes códigos: Atribui-se o código “R” quando presente o alelo; “S” para ausência do alelo; “HET” na presença de ambos os alelos R e S; e “N/A” quando observada a ausência de amplificação.

De acordo com tais dados obtidos nas análises genótípicas da população duplo-haploide, a razão de segregação dos marcadores moleculares foi verificada através do teste aderência de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), com nível de significância a 5%, conforme a seguinte fórmula:

$\chi^2 = \sum[(\text{observado} - \text{esperado})^2 / \text{esperado}]$ , com  $n-1$  graus de liberdade

Em que:

$\Sigma$ : somatório dos valores da expressão.

**observado**: corresponde ao número de linhas DHs observadas de uma classe genotípica.

**esperado**: corresponde ao número de linhas DHs esperadas de uma classe genotípica, conforme o modelo de segregação Mendeliana 1:1. **n**: número de classes fenotípicas ( $n=2$ ).

### 3.5 Testes com *Puccinia triticina* - Canadá

#### 3.5.1 Plântula

Este experimento foi projetado para identificar a resistência de planta adulta na população de estudo. Assim, um ensaio inicial foi realizado em fase de plântula com os parentais na finalidade de identificar o isolado mais adequado para fenotipar a população DH. Os testes em estágio de plântula foram conduzidos no centro de pesquisa Morden Research and Development Centre, em casa-de-vegetação conforme o método descrito por McCallum et al. (2018). Neste ensaio, os parentais ('BRS 194' e 'Toropi') e 'Thatcher' (variedade altamente suscetível à ferrugem-da-folha) foram semeados em grupos de duas sementes em pequenos vasos de aproximadamente 500 ml (Figura 14A).

Figura 14 - Semeadura dos genótipos parentais e 'Thatcher' em vasos (A); Os genótipos de trigo 'Toropi', 'BRS 194', 'Thatcher' e séries diferenciais com primeira folha completamente emergida, prontos para serem inoculados com os isolados de *Puccinia triticina* (B). Morden Research and Development Centre, Morden, 2020



Fonte: Autora.

Com objetivo de aumento de inóculo, para cada isolado foram distribuídas 15-20 sementes de ‘Thatcher’ em dois vasos individuais. A variedade ‘Thatcher’ foi escolhida para este propósito por ser altamente suscetível à ferrugem-da-folha. Adicionalmente, foi semeada a série diferencial para cada isolado. Foi adotado o conjunto de 19 séries diferenciais (Quadro 4), de acordo com Long e Kolmer (1989) e McCallum et al. (2018).

Quadro 4 - Conjuntos de séries diferenciais adotadas para confirmar a informação de virulência dos isolados, gerando o código de 4 letras.

<b>Conjunto 1</b>	<i>Lr1</i>	<i>Lr2a</i>	<i>Lr2c</i>	<i>Lr3</i>
<b>Conjunto 2</b>	<i>Lr9</i>	<i>Lr16</i>	<i>Lr24</i>	<i>Lr26</i>
<b>Conjunto 3</b>	<i>Lr3ka</i>	<i>Lr11</i>	<i>Lr17</i>	<i>Lr30</i>
<b>Conjunto 4</b>	<i>LrB</i>	<i>Lr10</i>	<i>Lr14a</i>	<i>Lr18</i>
<b>Conjunto 5</b>	<i>LrTc</i>	<i>LrCen</i>	<i>Lr21</i>	-

Aproximadamente sete dias após o plantio (estádio de primeira folha totalmente emergida), todas as plântulas foram inoculadas (Figura 14B). As inoculações foram conduzidas separadamente com uredósporos de dez isolados de *P. triticina*, sendo que sua escolha foi baseada na sua diversidade e por serem virulentos ao *Lr26*. Foram utilizados os seguintes isolados: CCDS 18-96-1, MCTN 18-213-1, TPBG 18-58-2, MCQH 18-210-1, MKJS 16-173-1, TFBJ 18-35-1, TFTS 16-99-2, FCPR 18-208-2, TCSQ 17-430-2 e MCPS 17-421-1.

Os dez isolados foram inoculados, buscando-se nas reações resultantes uma raça virulenta a ambos os parentais (‘Toropi’ e ‘BRS 194’) em fase de plântula. Essa foi uma etapa preliminar importante realizada para que posteriormente, ao se testar toda a população DH, a identificação de resistência de planta adulta não fosse confundida com resistência de plântula.

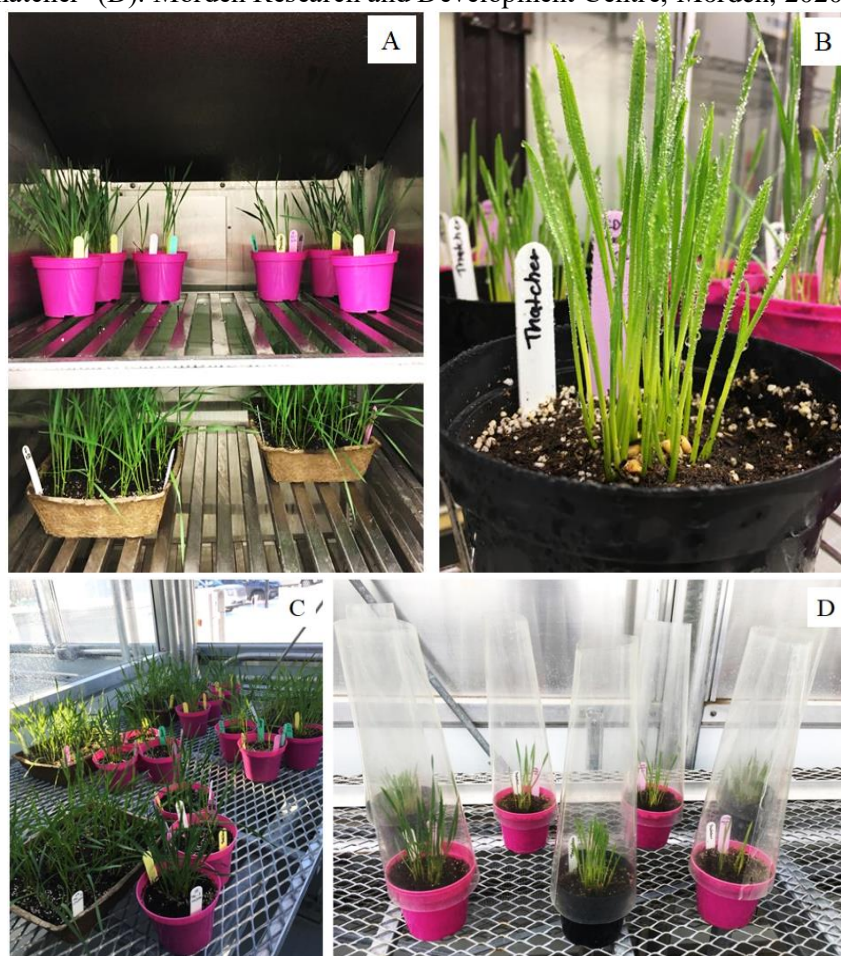
Assim sendo, para a inoculação com cada isolado, os uredósporos foram misturados em óleo mineral leve, Soltrol 170, em uma cápsula de gelatina (Chevron Phillips Chemical Company, The Woodlands, TX, USA), e aplicados sobre as folhas de maneira uniforme utilizando-se um pulverizador de ar comprimido.

As plantas foram mantidas a  $20 \pm 4^{\circ}\text{C}$  por 1 hora para que o óleo mineral evaporasse, e então transferidas para uma câmara úmida, mantendo-se 100% de umidade



relativa por aproximadamente 19 horas (Figura 15A). As plantas foram retiradas da umidade e secas naturalmente em temperatura ambiente e em seguida transferidas para uma estufa (20 ± 4 °C) com iluminação suplementar para desenvolvimento dos sintomas até que os mesmos fossem avaliados (Figura 15B e 15C). Os vasos contendo somente plantas de ‘Thatcher’, para aumento de inóculo, foram mantidos com um cone de plástico no topo, para que não houvesse mistura de isolados (Figura 15D).

Figura 15 - Transferência para câmara úmida das plantas de ‘Toropi’, ‘BRS 194’, ‘Thatcher’ e séries diferenciais inoculadas com ferrugem-da-folha (A); Plantas saindo da câmara úmida, em processo de secagem (B); Transferência das plantas para casa-de-vegetação para desenvolvimento dos sintomas de ferrugem-da-folha (C); Multiplicação de inóculos de *Puccinia triticina* na variedade ‘Thatcher’ (D). Morden Research and Development Centre, Morden, 2020



Fonte: Autora.

Após 13 dias de inoculação, as plântulas foram avaliadas baseando-se na mesma escala descrita anteriormente, que varia de ‘0’ a ‘4’. Aos 17 dias após a inoculação, os

vasos destinados para aumento de inóculo tiveram seus uredósporos coletados e armazenados a vácuo para inoculações subsequentes.

Para o estudo da população, do total de dez isolados que foram testados nos parentais, apenas um foi utilizado (isolado CCDS 18-96-1). Este isolado de *P. triticina* foi escolhido para esse experimento por provocar reações claras de suscetibilidade em ambos parentais ('Toropi' e 'BRS 194') no teste anterior. Em uma bandeja plástica dividida em 32 células (30 × 15 cm) foram semeadas as linhas DH, separadamente, em pequenos grupos de 2-3 sementes. Sete dias após o plantio, em estágio de primeira folha completamente emergida, as plântulas foram inoculadas pelo mesmo método anterior, com uredósporos do isolado CCDS 18-96-1 (Figura 16A e 16B) e avaliadas 13 dias depois, conforme descrito acima.

Figura 16 - Umidificação de plântulas de trigo após inoculação com o isolado CCDS 18-96-1 (A); Secagem em temperatura ambiente para a transferência das plântulas para casa-de-vegetação (B). Morden Research and Development Centre, Morden, 2020



Fonte: Autora.



### 3.5.2 Planta adulta

Após as avaliações do ensaio anterior, as plântulas foram transplantadas em vasos maiores, que foram transferidos para câmaras de crescimento para que as mesmas plantas se desenvolvessem (Figura 17). A temperatura inicial foi regulada a 18 °C durante o dia e 16 °C à noite, com respectivo fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, condição na qual as plantas foram mantidas por 22 dias.

Figura17 - Transferência de plântulas (linhagens DH, ‘Toropi’ e ‘BRS 194’) para vasos maiores em câmara de crescimento. Os materiais foram mantidos em câmara de crescimento até atingirem estágio de planta adulta para posterior inoculação com CCDS 18-96-1. Morden Research and Development Centre, Morden, 2020



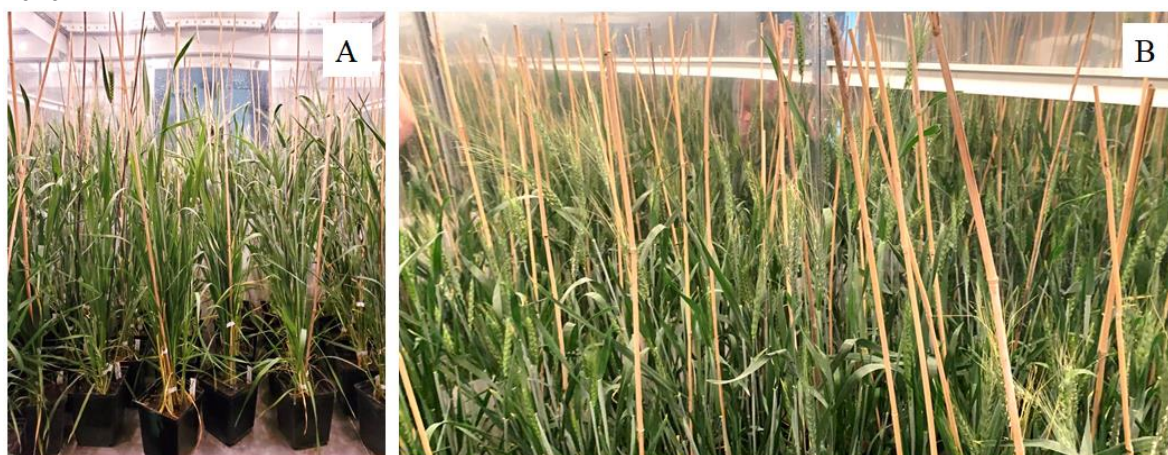
Fonte: Autora.

Devido à dificuldade de acesso ao centro de pesquisa Morden Research and Development Centre durante a pandemia do COVID-19, a temperatura foi alterada para 14 °C dia e 12 °C noite, para tornar o desenvolvimento das plantas mais lento. O material permaneceu na câmara de crescimento nessas condições, por 41 dias, até o momento da inoculação.

Foi inoculado o mesmo isolado de ferrugem CCDS 18-96-1, multiplicado em ‘Thatcher’ anteriormente. As folhas verdes e expandidas foram inoculadas entre estágio 45 e 50 da escala Zadoks (Zadoks et al., 1974) (Figura 18A e 18B), conforme o mesmo método descrito acima. As plantas foram colocadas à temperatura ambiente ( $20 \pm 4$  °C) por uma hora para evaporação do óleo mineral.

As plantas foram incubadas em uma câmara de orvalho a 100% de umidade, por aproximadamente 17 horas. As plantas foram então transferidas para estufa (20 ± 4 °C) com condições naturais de iluminação, onde permaneceram por 14 dias e tiveram suas reações à ferrugem-da-folha avaliadas. As reações foram avaliadas conforme a escala descrita anteriormente para os ensaios de plântula.

Figura 18 - Aspecto das linhagens DH no momento da inoculação com *Puccinia triticina* (CCDS 18-96-1), em fase de planta adulta (A e B). Morden Research and Development Centre, Morden, 2020



Fonte: Autora.

### 3.6 Determinação da herança genética da resistência à Ferrugem-da-folha

A partir dos dados coletados nas leituras de reações fenotípicas, foi estimado o número de genes que condicionam os caracteres de resistência de plântula e de planta adulta à ferrugem-da-folha, conforme o padrão de segregação na população de estudo. Para isso, foi adotado o teste de aderência de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), com nível de significância a 5%, conforme a fórmula descrita anteriormente:

$$\chi^2 = \sum \left[ \frac{(\text{observado} - \text{esperado})^2}{\text{esperado}} \right], \text{ com } n-1 \text{ graus de liberdade}$$

Em que:

$\Sigma$ : somatório dos valores da expressão.

**observado**: corresponde ao número de linhas DHs observadas de uma classe fenotípica.

**esperado**: corresponde ao número de linhas DHs esperadas de uma classe fenotípica, neste

caso, conforme o modelo de segregação Mendeliana. **n**: número de classes fenotípicas (n=2).

Foram então avaliadas as proporções fenotípicas (entre as plantas resistentes e suscetíveis) observadas e esperadas. O número de genes envolvidos na expressão do caráter foi determinado baseando-se no modelo de segregação mendeliana.

### 3.7 Testes com *Puccinia graminis* em plântula

Os ensaios de ferrugem-do-colmo também foram conduzidos no centro de pesquisa Morden Research and Development Centre, em casa-de-vegetação. Para o primeiro grupo de testes, apenas os genótipos parentais foram utilizados ('Toropi' e 'BRS 194') e seguiu-se o método descrito por Hiebert et al. (2011). Em fase de plântula, foram testados os isolados TTKSK (Ug99), TPMK, TMRT, RHTS, MCCF, QTHJF e RTHJ. O isolado TTKSK foi escolhido pela sua virulência conhecida e por ser mundialmente ameaçador à cultura do trigo. A escolha dos isolados TPMK, TMRT, RHTS baseou-se na virulência ao gene *Sr36*, enquanto que, de maneira oposta, MCCF, QTHJF e RTHJ foram selecionados por serem avirulentos ao *Sr36*. O conjunto de 20 linhas diferenciais (Quadro 5) de padrão internacional para a ferrugem-do-colmo foi utilizado para análise e checagem de cada um dos isolados.

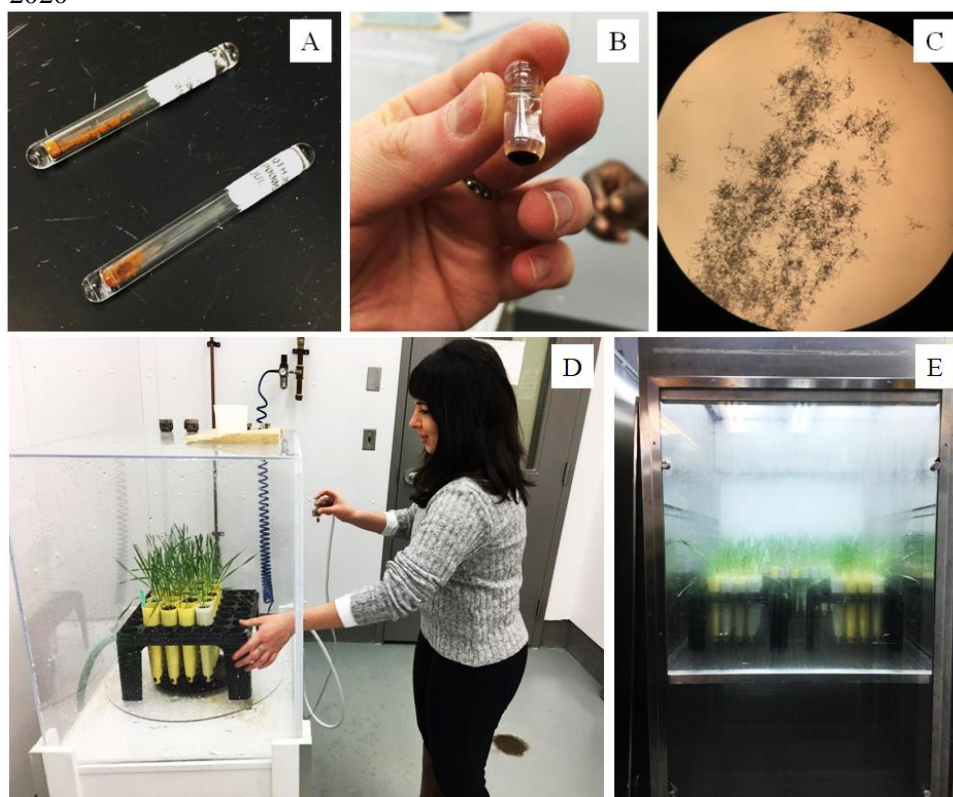
Quadro 5 - Padrão internacional das séries diferenciais de linhas isogênicas adotadas para confirmação dos isolados de *Puccinia graminis*, gerando o código de 5 letras.

<b>Conjunto 1</b>	<i>Sr5</i>	<i>Sr21</i>	<i>Sr9e</i>	<i>Sr7b</i>
<b>Conjunto 2</b>	<i>Sr11</i>	<i>Sr6</i>	<i>Sr8a</i>	<i>Sr9g</i>
<b>Conjunto 3</b>	<i>Sr36</i>	<i>Sr9b</i>	<i>Sr30</i>	<i>Sr17</i>
<b>Conjunto 4</b>	<i>Sr9a</i>	<i>Sr9d</i>	<i>Sr10</i>	<i>SrTmp</i>
<b>Conjunto 5</b>	<i>Sr24</i>	<i>Sr31</i>	<i>Sr38</i>	<i>SrMcn</i>

Foram então distribuídas de 3 a 4 sementes de cada um dos parentais, individualmente, em recipientes plásticos em formato de cones contendo mistura homogênea de solo e substrato (proporção 1:1). As plântulas foram mantidas em casa-de-

vegetação até atingirem o estágio de primeira folha completamente emergida. Antes da pulverização com cada isolado, os uredósporos dessecados armazenados em frascos a -80 °C foram submetidos a “choque térmico”, colocando o frasco em banho-maria a 45 °C por 5 minutos. Depois do choque, foram misturados com óleo mineral leve e pulverizados uniformemente sobre as folhas jovens (Figura 19).

Figura 19 - Isolados de *Puccinia graminis* armazenados e conservados em tubos de vidro vedados (A); Cápsula de gelatina contendo óleo Soltrol e uredósporos a ser homogeneizado e aplicado nas plantas (B); Uredósporos viáveis do patógeno com germinação próxima a 100% (C); Processo de inoculação com os esporos de *Puccinia graminis* suspensos em óleo, por sistema compressor (D); Material após ser inoculado, em câmara úmida (E). Morden Research and Development Centre, Morden, 2020

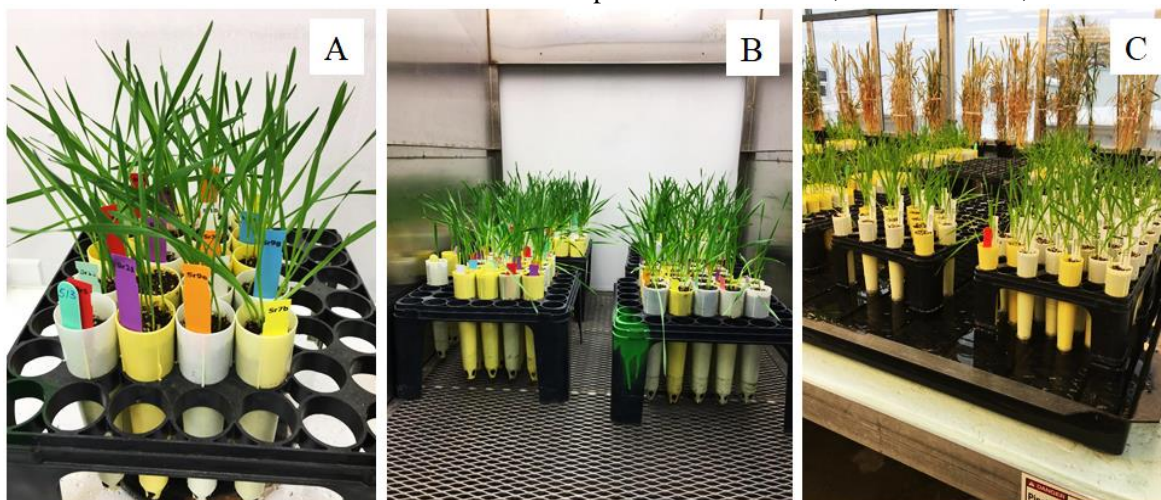


Fonte: Autora.

Após a inoculação, as plantas ficaram pelo menos 20 minutos em repouso para que o óleo evaporasse das folhas. Ao secar, as plântulas inoculadas foram incubadas *overnight* em câmara de orvalho com 100% de umidade, à 19 °C por 17 horas (Figura 19E). Em seguida, foram submetidas à secagem lentamente à luz, transferidas para câmaras de crescimento e cultivadas à 20 °C com 16 horas de luz diariamente (Figura 20).



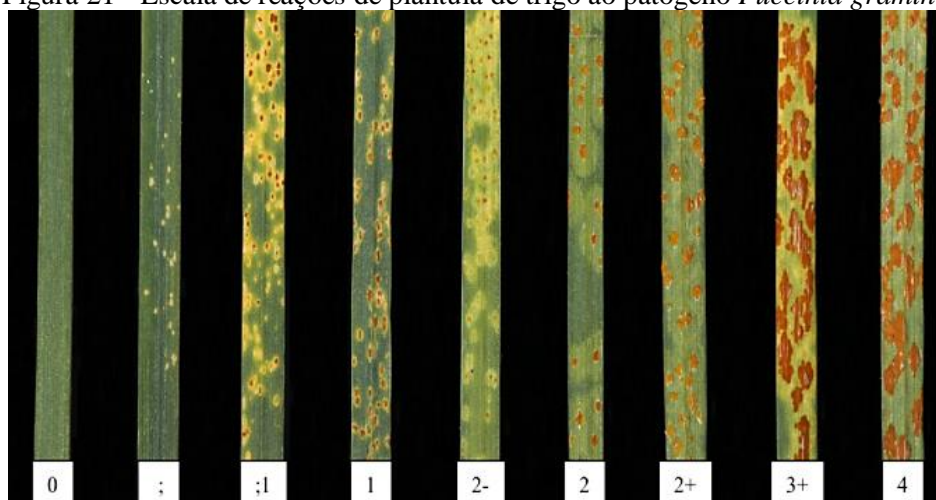
Figura 20 - Série diferencial de linhas isogênicas de trigo após passar pelo processo de inoculação com *Puccinia graminis* (A); Plantas de trigo ao serem retiradas da câmara úmida (B); Monitoramento do surgimento dos sintomas de ferrugem-do-colmo em casa-de-vegetação (C). Morden Research and Development Centre, Morden, 2020



Fonte: Autora.

No 14º dia após a inoculação, foi realizada a leitura das reações conforme a escala de 0 a 4 descrita por Stakman et al. (1962) modificada. Infecções do tipo “0”, “;”, “1” e “2” foram considerados resistentes e “3” e “4” foram considerados suscetíveis (Figura 21). Conforme o tamanho da pústula de um dado tipo de infecção foi adotado os sinais “+” e “-”, de acordo com Roelfs e Martens (1988).

Figura 21 - Escala de reações de plântula de trigo ao patógeno *Puccinia graminis*



Fonte: <https://www.ars.usda.gov>.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Testes com *P. triticina* – Brasil**

#### **4.1.1 Plântula**

Este ensaio foi conduzido na Embrapa Trigo com a finalidade de investigar a resistência à ferrugem-da-folha em estágio de plântula da população DH em conjunto com os parentais ‘Toropi’ e ‘BRS 194’. Para isso, sob condições controladas de desenvolvimento em casa-de-vegetação, as sementes germinaram uniformemente, originando plântulas com boa sanidade. No entanto, a linhagem “PF123023” após diferentes tentativas, não germinou, e deste modo não foi possível incluí-la para a realização deste ensaio.

Ao sétimo dia após a semeadura, quando a primeira folha de cada um dos genótipos se apresentava completamente emergida, foi realizada a inoculação com a raça MCJ-HN (B35) para avaliação da população em fase de plântula. Com 14 dias de inoculação, quando as variedades suscetíveis ‘Morocco’ e ‘Umbu’ apresentavam sintomas visíveis e bem definidos, as plantas foram avaliadas fenotipicamente. As reações da população e dos parentais em resposta à raça MCJ-HN são apresentadas na Tabela 1.

O genótipo ‘BRS 194’ mostrou reação de resistência do tipo “;1”, indicando manchas hipersensíveis e pequenas uredínias com necrose. ‘Toropi’ teve reação de suscetibilidade, apresentando tipo de reação ‘3’ à mesma raça, caracterizando-se por apresentar uredinia de tamanho moderado sem clorose (Figura 22).

Figura 22 - Aspecto das plântulas de trigo no momento da avaliação quando inoculadas com *Puccinia triticina*. A: ‘BRS 194’ com sutis manchas cloróticas; B: Uredínias bem desenvolvidas e sem manchas cloróticas em ‘Toropi’. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2019



Fonte: Autora.

Tabela 1 - Dados fenotípicos obtidos de ‘Toropi’, ‘BRS 194’ e da população DH em estágio de plântula quando inoculados com a raça de *Puccinia triticina* MCJ-HN, em casa-de-vegetação.

Genótipo	Tipo de infecção	Classificação
<b>BRS 194</b>	;1 (26pl) ;1 3Pu (3pl)	R
<b>Toropi</b>	3 (28 pl)	S
PF 113210	; (2pl)	R
PF 113239	3; (2pl)	S
PF 113240	3 (2pl)	S
PF 113242	3 (2pl)	S
PF 113254	3 (2pl)	S
PF 113265	21;3PU (1pl) 32 (1pl)	Segregando
PF 113272	21;3PU (2pl)	R
PF 113276	21;3PU (2pl)	R
PF 113290	3 (2pl)	S
PF 113354	0; (1pl) ;1(1pl)	R
PF 113361	3 (1pl) 1; (1pl)	Segregando
PF 113438	21;3PU (2pl)	R

Continuação...

PF 113439	3 (2pl)	S
PF 113440	3 (1pl) 21; (1pl)	Segregando
PF 113441	3 (1pl)	S
PF 113442	3 (2pl)	S
PF 113479	3 (2pl)	S
PF 113605	; (1pl) ;3PU (1pl)	R
PF 113610	21;3PU (2pl)	R
PF 113611	3 (1pl) 213PU (1pl)	Segregando
PF 113642	;1 (1pl) ;13PU (1pl)	R
PF 123007	21;3PU	R
PF 123008	3 (2pl)	S
PF 123010	;1 (2pl)	R
PF 123012	3 (2pl)	S
PF 123014	3 (2pl)	S
PF 123115	3 (1pl) 21;3PU	Segregando
PF 123018	3 (2pl)	S
PF 123019	3;1 (1pl) 21;3PU	Segregando
PF 123021	3 (2pl)	S
PF 123022	;1 (1pl) ;13PU (1pl)	R
PF 123023	Não germinou	-
PF 123031	0;1 (1pl) 321(1pl)	Segregando
PF 123032	3 (2pl)	S
PF 123033	21;3PU	R
PF 123050	3 (2pl)	S
PF 123111	21;3PU (2pl)	R
PF 123112	21; (2pl)	R
PF 123113	3; (2pl)	S
PF 123114	21;3PU (2pl)	R
PF 123116	32; (2pl)	S
PF 123121	3 (2pl)	S
PF 123123	0; (2pl)	R
PF 123124	3 (2pl)	S
PF 123126	3 (2pl)	S
PF 123127	21;3PU (2pl)	R
PF 123143	0; (1pl) ;1 (1pl)	R
PF 123145	21;3PU (2pl)	R
PF 123149	;1 (1pl) ;13PU (1pl)	R
PF 123150	21;3PU (2pl)	R



Continuação...

PF 133005	3 (2pl)	S
PF 133006	3 (2pl)	S
PF 133007	21;3PU (2pl)	R
PF 133010	21;3PU (2pl)	R
PF 133011	;13PU (2pl)	R
PF 143043	3 (2pl)	S
PF 143046	0; (1pl) 21; (1pl)	R
PF 143055	; (1pl)	R
PF 183101	3 (2pl)	S
PF 183111	3 (1pl) 32 (1pl)	S
PF 183114	21;3PU (1pl)	R
PF 183115	3 (1pl)	S
PF 183116	1+1; (2pl)	R
PF 183118	3 (1pl) 21;(1pl)	Segregando
PF 183119	21; (1pl) 21;3PU (1pl)	R

Pl: planta; Pu: pústula; R: resistente; S: suscetível.

A resposta fenotípica das linhagens DH, revelou reações de resistência e suscetibilidade. A partir das plantas que apresentaram resposta de resistência, seis linhagens DH (PF 113210, PF 113605, PF 123123, PF 123143, PF 143046 e PF 143055) exibiram tipos de infecção mais baixos (0; /;). Outras linhagens DH, como PF113642, PF 123010, PF 123022 e PF 123149 mostraram o mesmo tipo de reação que ‘BRS 194’ (IT =; 1). Um terceiro grupo de plantas, também classificadas como resistentes, apresentou maiores tipos de infecção (IT = 21;), quando comparadas a ‘BRS 194’. Em relação às linhagens suscetíveis, de maneira geral, as reações foram iguais a ‘Toropi’ (IT = 3).

A fim de avaliar o conjunto de dados gerados para a raça MCJ-HN, foi empregado o teste estatístico de aderência de Qui-quadrado. Para isso, através dos dados obtidos das leituras fenotípicas, a população foi subdividida em duas categorias, sendo elas: resistente (R) e suscetível (S). Para este teste específico de plântula com a raça MCJ-HN, a linhagem DH (PF 123023) que não germinou, não pôde ser incluída nesta análise. Também foram excluídas desta análise as linhagens identificadas como “segregantes”. A exclusão justifica-se pelo fato de ter sido verificadas reações bastante divergentes entre plantas de uma mesma linhagem (por ex. uma planta resistente e outra

suscetível), o que não era esperado dentro de uma população DH homozigota, considerando principalmente o total de duas plantas para cada genótipo. São desconhecidas as razões que levaram ao fenômeno de segregação nas linhagens desta população DH, uma vez que sua produção foi realizada cuidadosamente, evitando-se contaminação com pólen exógeno bem como mistura de sementes.

Do total de 65 linhas DH da população 'Toropi' x 'BRS 194', nove não foram incluídas (n=56). Assim, a análise genética pelo Qui-quadrado foi conduzida com os números totais de resistentes e suscetíveis, em que a proporção adotada se distribuiu em 29 R para 27 S (Tabela 2). O teste foi empregado através da comparação dos valores observados das categorias "resistentes" e "suscetíveis" com os valores esperados das mesmas categorias. Foi então testada a hipótese de um gene conferindo resistência, na razão 1 R:1 S, em que, no total de 56 linhagens, a proporção esperada foi de 28 R: 28 S.

A proporção observada (29 R: 27 S) apresentou-se muito próxima da proporção esperada (28 R: 28 S), e numa probabilidade de 5%, o teste não revelou diferença significativa entre esses valores. O resultado dessa fenotipagem se ajusta à razão de segregação "1 R: 1 S" (com um valor de  $p = 0.7893$ ), revelando adequação ao modelo. Isso explica a proporção fenotípica que foi observada no teste em fase de plântula e, que a hipótese, portanto, é aceita, assumindo-se que a resistência de 'BRS 194' à raça MCJ-HN possui herança monogênica.

Tabela 2 - Razão de segregação observada e esperada na população em estágio de plântula à raça de ferrugem-da-folha MCJ-HN em casa-de-vegetação em Passo Fundo, Brasil, 2019.

N° de linhas DHs	Estádio	Razão de segregação resistentes: suscetíveis			$\chi^2$ Calculado	$\chi^2$ Tabelado	Valor de p
		N° de linhas observadas	N° de linhas esperadas	Razão			
56	Plântula	29:27	28:28	1:1	0.0714	3.841	0.789

Ao nível de significância de 5%

Até o ano de 2004, a variedade 'BRS 194' que foi amplamente cultivada, apresentava resistência qualitativa (em nível de plântula e planta adulta) a todas as raças de *P. triticina* ocorrentes no Brasil e em outros países da América do Sul (CHAVES et al., 2006). Apesar de sua resistência em plântula ser mantida até hoje (para vários

isolados do patógeno), o surgimento de uma nova raça no Brasil de *P. triticina* (MFP-CT) em 2005, levou à quebra da resistência qualitativa, tornando-a suscetível à ferrugem-da-folha em condições de campo (CHAVES et al., 2009).

#### 4.1.2 Planta adulta

Nesse experimento, que também foi realizado na Embrapa Trigo, foi avaliada a população DH em conjunto com os parentais ‘Toropi’ e ‘BRS 194’ na fase de planta adulta em resposta à raça MFP-CT (B56). MFP-CT é avirulenta aos genes *Lr2a*, *Lr2c*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr11*, *Lr16*, *Lr18* e *Lr21*, e virulenta a *Lr1*, *Lr3*, *Lr3ka*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr17*, *Lr20*, *Lr23*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr30* e Alondra, e foi escolhida para este ensaio por ter superado a resistência qualitativa antes existente na variedade ‘BRS 194’ (CHAVES et al., 2009). Dessa forma, sem a interferência da resistência de ‘BRS 194’, seria possível a identificação da resistência de planta adulta de Toropi na população de estudo.

Durante o cultivo da população DH, alguns genótipos apresentaram falhas na germinação. Devido a esta limitação, o número de plantas disponíveis para a fenotipagem foi desuniforme. Contudo, as plantas cresceram saudáveis ao serem cultivadas em câmara de crescimento (16 horas/luz à  $\pm 24$  °C) e, na ausência de contaminação por patógenos durante seu desenvolvimento, se mantiveram com boa sanidade até o momento da inoculação. A inoculação foi realizada em dois momentos distintos, uma vez que houve atraso no desenvolvimento de algumas plantas. Em razão disso, o primeiro grupo (de desenvolvimento mais avançado) foi inoculado depois de 55 dias de plantio, e, o segundo grupo, após 62 dias da emergência das plantas.

Os resultados das avaliações de planta adulta em resposta a inoculação com a raça MFP-CT são demonstrados na Tabela 3. O parental ‘Toropi’ respondeu ao inóculo de *P. triticina* com reações do tipo “0;” (três plantas com essa reação) e uma quarta planta apresentou reação “0;1”, revelando, portanto, resistência (R) à raça MFP-CT (Figura 23).

De maneira diferente de ‘Toropi’, o parental ‘BRS 194’ respondeu ao patógeno com tipos de infecção “3”, onde todas as plantas exibiram o mesmo padrão uredinial de tamanho moderado sem clorose, caracterizando seu fenótipo suscetível (S).

Figura 23 - Reação de suscetibilidade e de resistência de ‘BRS 194’ e ‘Toropi’, respectivamente, à raça MFP-CT após avaliação dos tipos de infecção. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2019



Fonte: Autora.

Tabela 3 - Reações da população DH ‘Toropi’ x ‘BRS194’ em resposta à raça de *Puccinia triticina* MFP-CT em estágio de planta adulta em casa-de-vegetação.

Genótipo	Tipo de Infecção	Classificação
<b>BRS 194</b>	8pl (3)	S
<b>Toropi</b>	3pl (0;) 1pl (0;1 1PU)	R
PF 113210	1pl (3) 2 pl (3-) 1 pl (23;)	3pl S 1pl R int.
PF 113239	2pl (;12) 1pl (;123) 2pl (;1)	R *
PF 113240	3pl (3) 1pl (3+)	S
PF 113242	3pl (32)	S
PF 113254	8pl (3)	S
PF 113265	4pl (3) 1pl (32) 1pl (;N1) 1pl (;)	Segregando
PF 113272	4pl (3)	S
PF 113276	2pl (32) 4pl (3) 1pl (3+)	S

Continuação...

PF 113290	4pl (3)	S
PF 113354	1pl (;N1) 2pl (;N13PU) 1pl (21;) 1pl (;1)	1pl (R *) 4pl (R)
PF 113361	1pl (0;1) 1pl (0) 1pl (;12) 1pl (;13(1PU)) 1pl(;1)	R
PF 113438	1pl (21;3 na base) 1pl (21;) 1pl (;) 1pl (;13 na base)	3pl R 1pl (R)
PF 113439	1pl (32) 1pl (21;3PU) 3pl (3)	2pl (S) 1 pl R int.
PF 113440	1pl (;12) 1pl (21;) 1pl(;1) 1pl(1;)	3pl (R) 1pl (R)
PF 113441	3 pl (3) 1pl (213PU)	3pl (S) 1pl R int.
PF 113442	9 pl (3) 1pl (2)	9pl (S) 1 pl R int.
PF 113479	3pl (21;3PU) 1pl (;12)	R *
PF 113605	5pl (3)	S
PF 113610	3 pl (21;3PU)	R
PF 113611	3 pl (21;3PU) 1 pl (1;3PU)	R *
PF 113642	1 pl(32) 1pl (23)	R
PF 123007	3pl (32)	S
PF 123008	8pl (3)	S
PF 123010	1pl (3+) 1pl (32) 1pl (3)	S
PF 123012	2pl (3)	S
PF 123014	4pl (3)	S
PF 123115	6 pl (3) 1pl (32)	S
PF 123018	6pl (3)	S
PF 123019	1pl (23;) 1pl (32;) na base	R
PF 123021	8pl (3)	S
PF 123022	6pl (3) 1pl (32)	S
PF 123023	1pl (21;3 na base) 1pl (;)	R
PF 123031	8pl (3)	S
PF 123032	4pl (3)	S
PF 123033	1pl (1;2) 3pl (21;) 4pl (21;3PU)	R *
PF 123050	3pl (23;) 2pl(21;) 5pl (32)	R * e 5pl R int.
PF 123111	1pl (1;3 na base) 2pl (21;3 na base) 1pl (32 na base)	R
PF 123112	5pl (3)	S
PF 123113	8pl (3)	S
PF 123114	5pl (3) 2pl (3+)	S
PF 123116	10pl (3)	S
PF 123121	4pl (21;) 3pl (;13PU) 1pl (;1) 1pl (21;3PU)	R
PF 123123	3pl (3) 1pl (3;) 1pl (33-;)	S
PF 123124	3pl (3)	S
PF 123126	9pl (3)	S
PF 123127	1pl (3+) 3pl (3)	S

Continuação...

PF 123143	1 pl (;) 4pl (3) 1pl (21;) 1pl (;1) 1pl (1;)	Segregando
PF 123145	1pl (32) 1pl (3) 1pl (33+)	S
PF 123149	1pl (3)	S
PF 123150	8pl (3)	S
PF 133005	4pl (3)	S
PF 133006	2 pl (213PU) 1 pl (21;3PU)	R
PF 133007	4 pl (21;3PU) 1pl (1;23PU)	R *
PF 133010	1pl (213PU) 2pl (32) 1 pl(3)	Segregando
PF 133011	5pl (3)	S
PF 143043	4pl (3)	S
PF 143046	1pl (3) 1pl(32) 1 pl(3)	S
PF 143055	1pl (21;)	R *
PF 183101	3pl (3) 1pl (32)	S
PF 183111	4pl (3)	S
PF 183114	2pl (3)	S
PF 183115	2pl (3)	S
PF 183116	8pl (3)	S
PF 183118	1pl (3) 1pl (32)	S
PF 183119	5pl (3)	S

Pl: planta; Pu: pústula; N: mais necrose que o normal para o tipo de infecção em questão; R: resistente; R \* Toropi: resistência diferente de Toropi (nota mais alta que o parental Toropi); S: suscetível; Na base: pústulas na região foliar próxima à inserção das folhas; Int: Intermediário.

Em comparação com Toropi, a linhagem DH PF 113361 apresentou as reações de resistência mais próximas (“0”, “0; 1”, “; 1”, “; 12”, “; 13”). Enquanto as demais linhas DH resistentes apresentaram tipo de reação maior que ‘Toropi’. De acordo com a literatura, este padrão de resistência apresentado pelas linhagens (diferente de ‘Toropi’ e ‘BRS 194’), poderia ser decorrente de diversos mecanismos, tais como a complementação de alelos aditivos, interações epistáticas de atributos parentais únicos, desmascaramento de alelos recessivos de um parental heterozigoto ou uma possível associação desses fatores, ocasionando então uma segregação transgressiva na população DH. Em outras palavras, a resistência observada poderia ser explicada pela ocorrência de trocas pelas quais os genomas de ambos os parentais geneticamente divergentes poderiam ser embaralhados na recombinação genética (REYES, 2019).

Em relação à suscetibilidade, as linhas em geral seguiram o padrão e tipo de infecção de ‘BRS 194’, com variações sutis (como “32” e “3+”). De um total de 65 linhas DH da população ‘Toropi’ x ‘BRS 194’, três mostraram reações segregantes, as quais não foram incluídas no teste estatístico, da mesma forma que no ensaio anterior em plântula. Assim, do total de 62 linhas, 18 apresentaram-se resistentes e 44 suscetíveis. Com base nesses dados fenotípicos, foi dado segmento ao estudo genético com o teste de aderência de Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ), a fim de se estimar a herança genética a partir da distribuição das categorias “resistentes” e “suscetíveis”.

Conforme a comparação dos valores observados das duas categorias (18 R: 44 S) e valores esperados pelo teste de Qui-quadrado (15.5 R: 46.5 S), considerando-se o total de 62 indivíduos, não houve diferença significativa desses valores em relação ao valor teórico ( $\chi^2$  0.05 a 1 Grau de Liberdade = 3,841). Esses resultados (18 R: 44 S) se ajustam a uma taxa de segregação de 1:3 ( $p = 0.4634$ ) (Tabela 4), o que sugere que a herança da resistência de planta adulta de ‘Toropi’ à raça MFP-CT é conferida por dois genes complementares.

Tabela 4 - Análise de aderência do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) da taxa de segregação da população DH ‘Toropi’ x ‘BRS 194’ obtida em fase de planta adulta para a raça MFP-CT, Passo Fundo, Brasil.

N° de linhas DHs	Estádio	Razão de segregação resistentes: suscetíveis			$\chi^2$ Calculado	$\chi^2$ Tabelado	Valor de p
		N° de linhas observadas	N° de linhas esperadas	Razão			
62	planta adulta	18: 44	15.5: 46.5	1: 3	0.5376	3.8415	0.4634

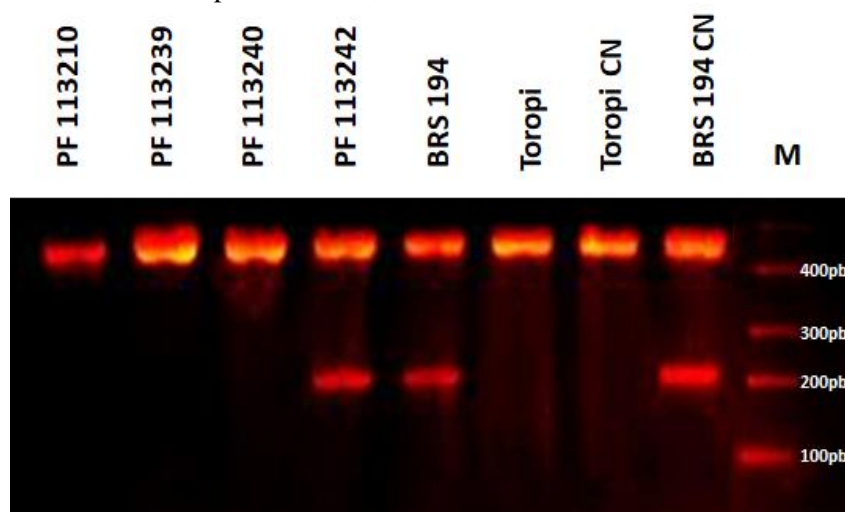
Ao nível de significância de 5%

#### 4.2 Identificação da translocação 1BL.1RS

A partir do DNA genômico, numa concentração final de 60 ng/ $\mu$ L, a mistura da reação de PCR foi utilizada para a genotipagem com o marcador PE122. As amostras foram submetidas a uma carga elétrica de 140 volts e os fragmentos foram observados após aproximadamente quatro minutos, no equipamento cassete portátil de eletroforese. Juntamente com todas as linhagens DH, foram genotipados os parentais usados nos

cruzamentos, e, adicionalmente, outras amostras de ‘BRS 194’ e de ‘Toropi’ originadas de coleção de sementes purificadas identificadas como “Coleção Nuclear - CN”, fornecidas pela Embrapa Trigo. A leitura dos resultados foi feita por meio da detecção visual de bandas correspondentes às amplificações da translocação 1BL.1RS (Figura 24 e 25). Os cassetes de eletroforese foram então codificados obtendo-se uma matriz de dados binários (presença ou ausência) das bandas nos indivíduos. Assim, considerou-se que na presença das bandas há a translocação 1BL.1RS, onde o braço curto do cromossomo 1B de trigo é substituído pelo braço curto do cromossomo 1R de centeio (MORENO-SEVILLA, 1995).

Figura 24 - Produtos da amplificação por PCR com primers específicos de PE122 da translocação 1BL/1RS de centeio em trigo, nos parentais ‘BRS 194’ e ‘BRS 194 Coleção Nuclear’; Ausência de amplificação em ‘Toropi’ e ‘Toropi Coleção Nuclear’; Os quatro primeiros genótipos (esquerda para direita) correspondem à linhagens da população DH; M = marcador de peso molecular (FlashGel™ DNA Marker, 100 bp – 4 kb, 500 µL Lonza ®). Morden Research and Development Center, Morden, 2020



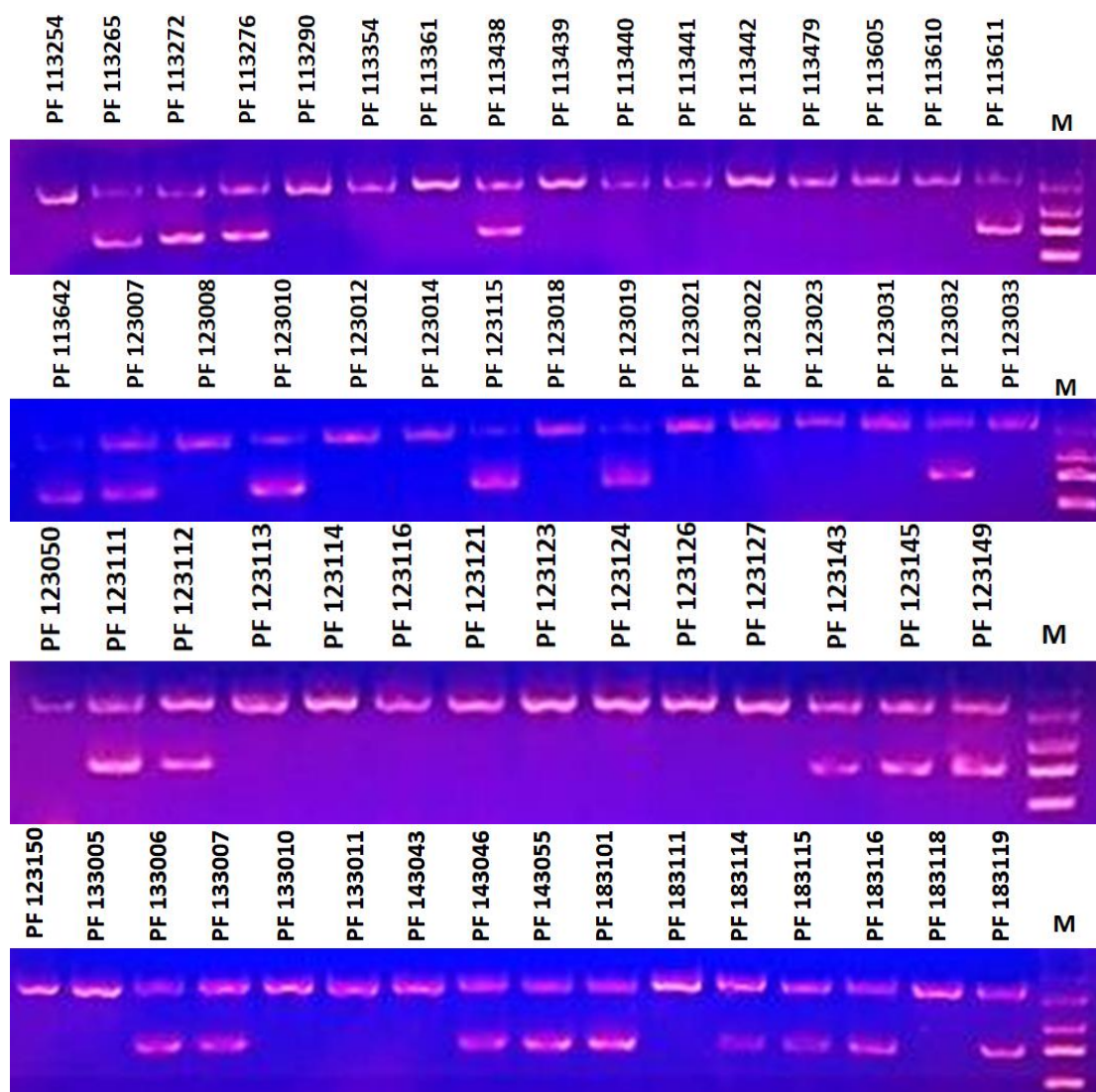
Fonte: Autora.

O marcador PE122 reproduziu fragmentos entre 200 e 300 pares de bases, e está de acordo com o que foi reportado por Lee e Seo (2015). Assim sendo, em relação aos parentais, as bandas referentes à translocação 1BL.1RS foram visualizadas nos genótipos ‘BRS 194’ e ‘BRS 194 CN’. De maneira oposta, nas amostras de ‘Toropi’ e ‘Toropi CN’ não houve amplificação, o que aponta ausência deste segmento cromossômico neste genótipo. A partir destes dados, foi possível inferir a presença dos genes *Sr31*, *Lr26*, *Yr9* e *Pm8* em ‘BRS 194’ (presentes na translocação) e ausência em



‘Toropi’. Dentre os indivíduos da população DH, foi possível observar amplificação em 26 linhagens, enquanto 39 delas demonstraram não possuir a translocação 1BL.1RS (Figura 25). Esta proporção de segregação se ajustou ao modelo 1:1 ( $\chi^2 = 2.6$ ;  $\chi^2$  tabelado = 3.841; valor de  $p = 0.1069$ ), revelando assim que o segmento cromossômico se distribui na população conforme o modelo de segregação Mendeliana.

Figura 25 - Presença e ausência de produtos da amplificação por PCR com primers específicos de PE122 da translocação 1BL/1RS de centeio em trigo, nos indivíduos da população ‘Toropi’ x ‘BRS 194’; M = marcador de peso molecular (FlashGel™ DNA Marker, 100 bp – 4 kb, 500  $\mu$ L Lonza ®). Morden Research and Development Center, Morden, 2020



Fonte: Autora.

Os fragmentos ou cromossomos de espécies relacionadas, quando introduzidos no trigo carregam consigo genes “estranhos”, que são capazes de expressar características de interesse no novo fundo genético. O braço 1RS carrega para o genoma do trigo os genes *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, que fornecem resistência à ferrugem-da-folha, ferrugem-do-colmo, ferrugem linear e oídio, respectivamente (HEUN; FRIEBE, 1990; SINGH et al., 1990). Este é um indício de que, devido à translocação presente em ‘BRS 194’, os genes *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8* estejam segregando na população DH, originada de ‘Toropi’ x ‘BRS 194’.

Em razão da resistência a múltiplas doenças e outros benefícios agrônômicos, o braço cromossômico 1RS foi amplamente introduzido em programas de melhoramento de trigo em todo o mundo durante as décadas de 1980 e 1990, adicionando *Lr26* e *Sr31* a muitas variedades de trigo (LAN et al. 2017; RABINOVICH 1998). Os genótipos ‘BR23’ e ‘CEP17’, que são pais da variedade ‘BRS194’, contêm ‘Alondra Sib’ em seu pedigree. Uma vez que ‘Alondra’ é um portador conhecido de *Sr31*, este é o provável doador de *Sr31* em ‘BRS194’.

Desde as últimas décadas não ocorrem epidemias graves de ferrugem-do-colmo no Cone Sul da América Latina, principalmente devido à implantação de cultivares resistentes, sendo *Sr24* e *Sr31* os genes mais importantes que fornecem resistência no germoplasma desta região (GERMÁN et al. 2007). Contudo, é bem conhecido que *Sr31* é suscetível a Ug99 (PRETORIUS et al. 2000). Esta raça altamente virulenta é capaz de causar infecção em cultivares contendo apenas *Sr31* e tem a capacidade de superar muitos dos genes de resistência já conhecidos (JIN et al. 2007), conforme relatado para o gene de resistência *Sr24* (JIN et al. 2008). Muito embora esta raça não tenha sido detectada na região, devido à ameaça globalmente iminente, esforços estão sendo feitos para produzir novas variedades de trigo com resistência à Ug99 e suas variantes.

#### **4.3 Testes com *P. triticina* - Canadá**

Uma vez confirmado que há a translocação no parental ‘BRS 194’ (que também carrega o gene *Lr26*) e com o intuito de estudar a resistência de planta adulta à

ferrugem-da-folha nesta população, este ensaio foi desenhado para detectar esta resistência e assim verificar seu padrão de herança genética.

Para isso, foi conduzido o teste preliminar com os genótipos parentais ('Toropi' e 'BRS 194') em fase de plântula, utilizando-se os dez isolados virulentos ao *Lr26* (CCDS 18-96-1, MCTN 18-213-1, TPBG 18-58-2, MCQH 18-210-1, MKJS 16-173-1, TFBJ 18-35-1, TFTS 16-99-2, FCPR 18-208-2, TCSQ 17-430-2 e MCPS 17-421-1). Como estratégia, buscou-se então, através das reações resultantes de 'Toropi' e 'BRS 194', um isolado virulento a ambos os parentais. Dessa maneira, uma vez que os parentais se mostraram totalmente suscetíveis em fase de plântula, não haveria interferência de nenhum gene na identificação da resistência em fase de planta adulta.

A inoculação com os dez isolados selecionados levou a respostas variáveis entre os parentais (Tabela 5), revelando características tanto de suscetibilidade quanto de resistência. Com base nesses resultados, o isolado escolhido e considerado mais adequado para fenotipar a população DH foi o CCDS 18-96-1 (virulento aos dois parentais).

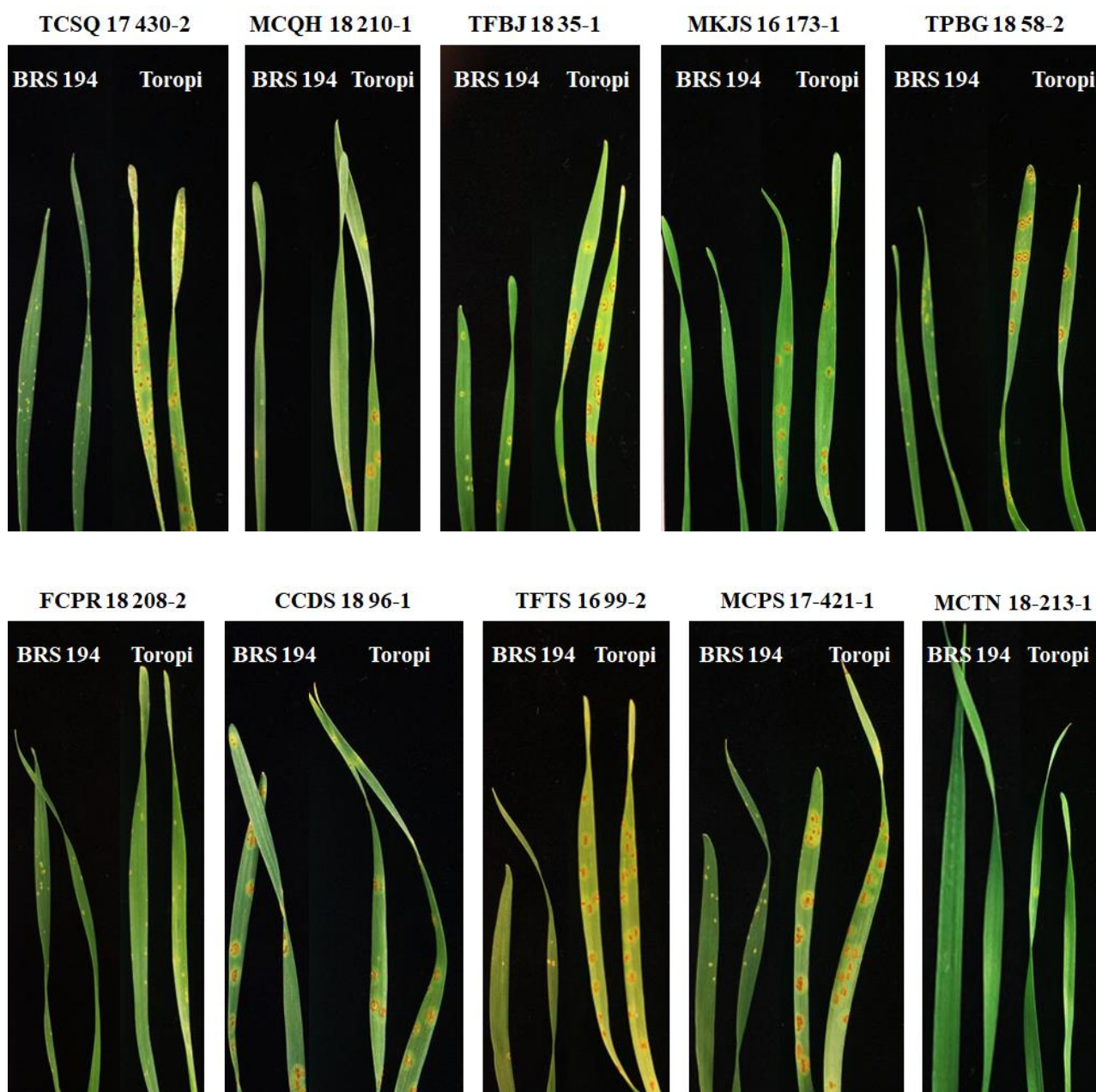
Tabela 5 - Reações observadas nos parentais 'Toropi' e 'BRS 194' em fase de plântula aos isolados selecionados virulentos à *Lr26*.

Genótipo	Isolados									
	CCDS	MCTN	TPBG	MCQH	MKJS	TFBJ	TFTS	FCPR	TCSQ	MCPS
<i>Lr26</i>	3+	Sem infecção	2+	3	2+3	2+	3	3	3	2+
Toropi	3+	3	3+	3	3+	3+	3+	1;	3+	3
BRS 194	33+	Sem infecção	1;	13	1+	2+1+	1;	;	;1	;1

O isolado CCDS 18-96-1 foi virulento para 'Toropi' e 'BRS 194', que mostraram sintomas claros de uredinia de tamanho médio a grande, sem clorose ou necrose (Figura 26), condição que corresponde ao tipo de infecção "33+ e 3+". A partir

deste resultado foi dado segmento ao ensaio de fenotipagem da população DH em estágio de plântula e planta adulta, os quais são discutidos a seguir.

Figura 26 - Sintomas distintos (resistência e suscetibilidade) entre os ‘Toropi’ e ‘BRS 194’ em resposta aos nove isolados de *Puccinia triticina* MCTN 18-213-1, TPBG 18-58-2, MCQH 18-210-1, MKJS 16-173-1, TFBJ 18-35-1, TFTS 16-99-2, FCPR 18-208-2, TCSQ 17-430-2 e MCPS 17-421-1; Pústulas de suscetibilidade tipo 3+ (‘Toropi’) e 33+ (‘BRS 194’) em reação ao isolado CCDS 18-96-1 em fase de plântula. Morden Research and Development Centre, Morden, 2020



Fonte: Autora.

#### 4.3.1 Plântula

Em fase de plântula, quando todos os genótipos da população apresentavam folha completamente emergida, foi feita a inoculação com CCDS 18-96-1. As plântulas foram monitoradas até que foram avaliadas as reações no 13º dia após a inoculação. As notas de tipo de infecção de ferrugem-da-folha e as respectivas classificações estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Notas correspondentes ao tipo de infecção e classificação em resposta ao isolado de ferrugem-da-folha CCDS 18-96-1 quando inoculados nos parentais e na população DH.

<b>Genótipo</b>	<b>Tipo de infecção</b>	<b>Classificação</b>
<b>BRS 194</b>	3+	S
<b>Toropi</b>	3+	S
PF 113210	;1	R
PF 113239	3	S
PF 113240	3	S
PF 113242	3 2+	S
PF 113254	3+	S
PF 113265	3	S
PF 113272	3	S
PF 113276	3	S
PF 113290	3	S
PF 113354	;1	R
PF 113361	1;	R
PF 113438	3+	S
PF 113439	3+	S
PF 113440	3	S
PF 113441	2 pl (3) 1 pl (;1)	Segregando
PF 113442	3	S
PF 113479	3	S
PF 113605	;1	R
PF 113610	3	S
PF 113611	3+	S
PF 113642	2+	R
PF 123007	3	S
PF 123008	3	S
PF 123010	3	S
PF 123012	3+	S

PF 123014	3+	S
PF 123115	3+	S
PF 123018	3	S
PF 123019	3	S
PF 123021	3	S
PF 123022	3	S
PF 123023	3	S
PF 123031	;1+	R
PF 123032	3+	S
PF 123033	3+	S
PF 123050	3+	S
PF 123111	3	S
PF 123112	3	S
PF 123113	3	S
PF 123114	3 2+	S
PF 123116	3 2+	S
PF 123121	3	S
PF 123123	;1	R
PF 123124	3+	S
PF 123126	3+	S
PF 123127	3	S
PF 123143	2+ 3	S
PF 123145	3	S
PF 123149	;1	R
PF 123150	3+	S
PF 133005	3	S
PF 133006	3	S
PF 133007	32+	S
PF 133010	3	S
PF 133011	3+	S
PF 143043	3	S
PF 143046	1 pl (3) 1 pl (;)	Segregando
PF 143055	1 pl (3) 1 pl (1)	Segregando
PF 183101	3+	S
PF 183111	3+	S
PF 183114	3+	S
PF 183115	1 pl (3) 1 pl (;1)	Segregando
PF 183116	3	S

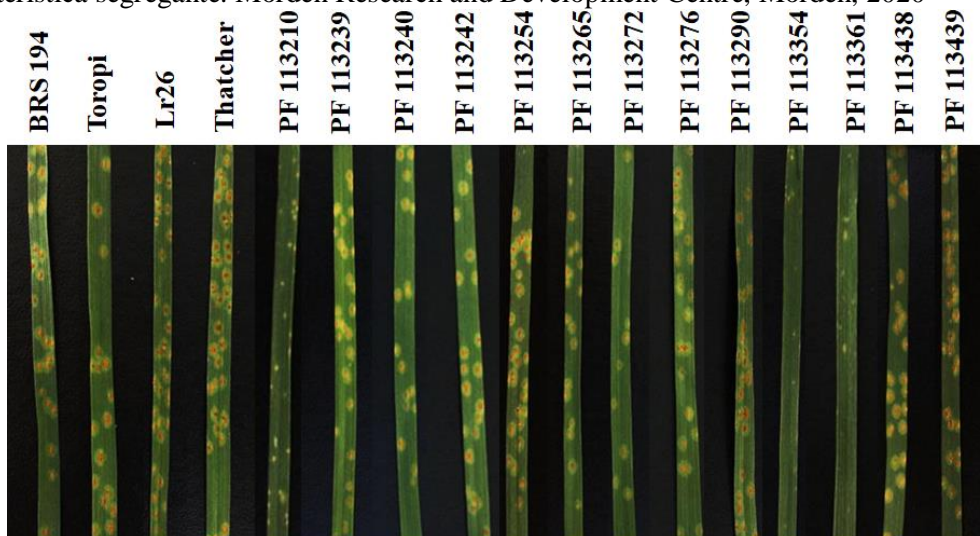
Continuação...

PF 183118	3	S
PF 183119	3	S

Pl: planta; R: resistente; S: suscetível.

Considerando o total de 65 linhagens, 53 delas foram suscetíveis, 8 resistentes e 4 apresentaram respostas segregantes. As linhagens identificadas como “segregantes” não foram as mesmas que segregaram nas fenotipagens anteriores com MCJ-HN (B35) e MFP-CT (B56). Ainda, neste ensaio com CCDS em fase de plântula, a leitura das reações (Figura 27 a/b) gerou resultados divergentes daqueles que eram esperados. Isto é, pelo fato de ‘Toropi’ e ‘BRS 194’ serem claramente suscetíveis (3+), esperava-se que todas as linhagens DH (oriundas deste cruzamento e totalmente homocigotas) seguissem o mesmo padrão de resposta fenotípica que os parentais (3+) frente ao isolado. No entanto, oito linhagens apresentaram reação de resistência.

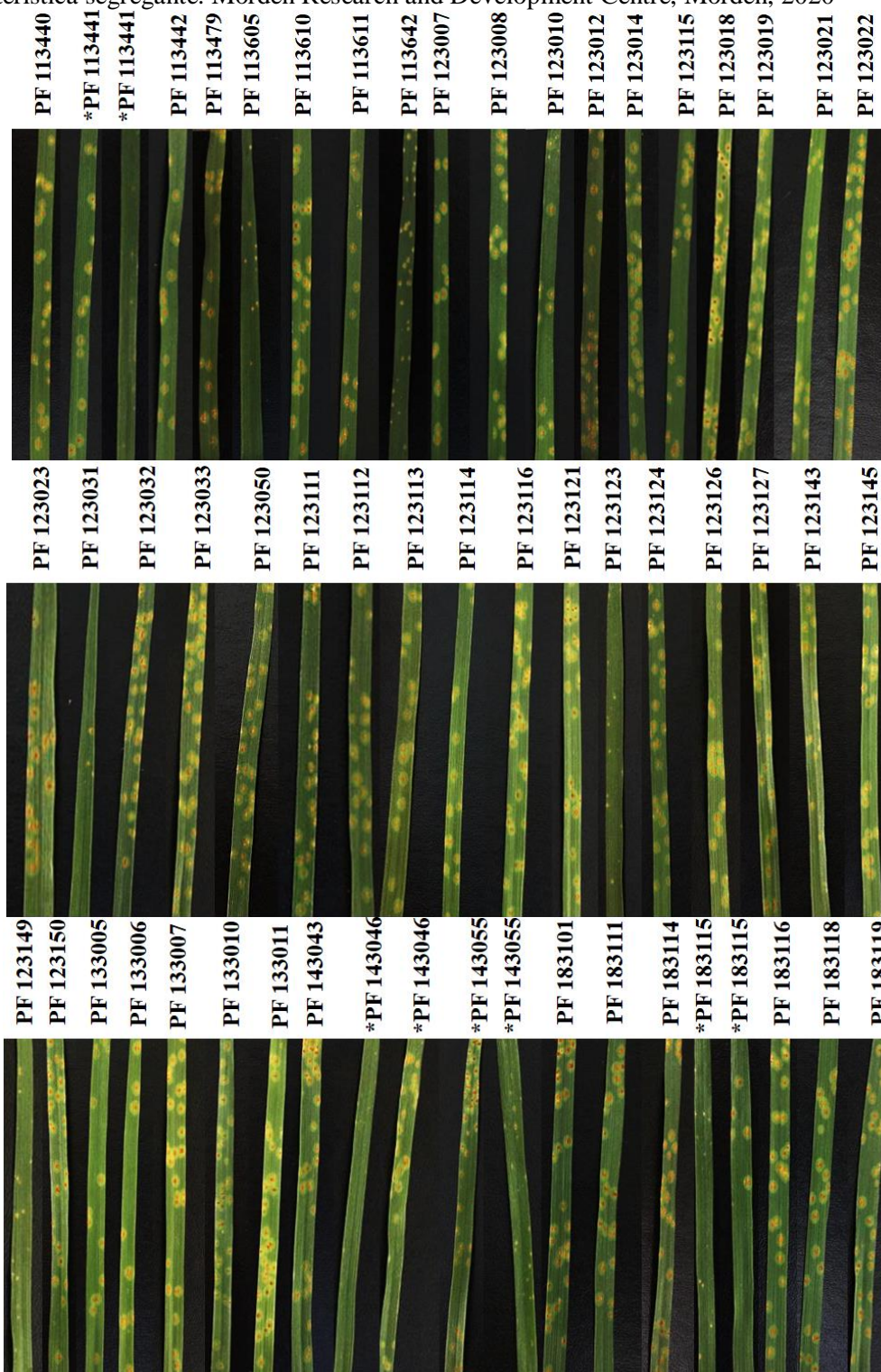
Figura 27a - Reação da população DH ‘Toropi’ x ‘BRS 194’, ‘BRS 194’, ‘Toropi’, ‘Lr26’ e ‘Thatcher’ ao isolado de *Puccinia triticina* CCDS em fase de plântula; \* genótipos com característica segregante. Morden Research and Development Centre, Morden, 2020



Fonte: Autora.



Figura 27b - Reação da população DH 'Toropi' x 'BRS 194', 'BRS 194', 'Toropi', 'Lr26' e 'Thatcher' ao isolado de *Puccinia triticina* CCDS em fase de plântula; \* genótipos com característica segregante. Morden Research and Development Centre, Morden, 2020



Fonte: Autora.

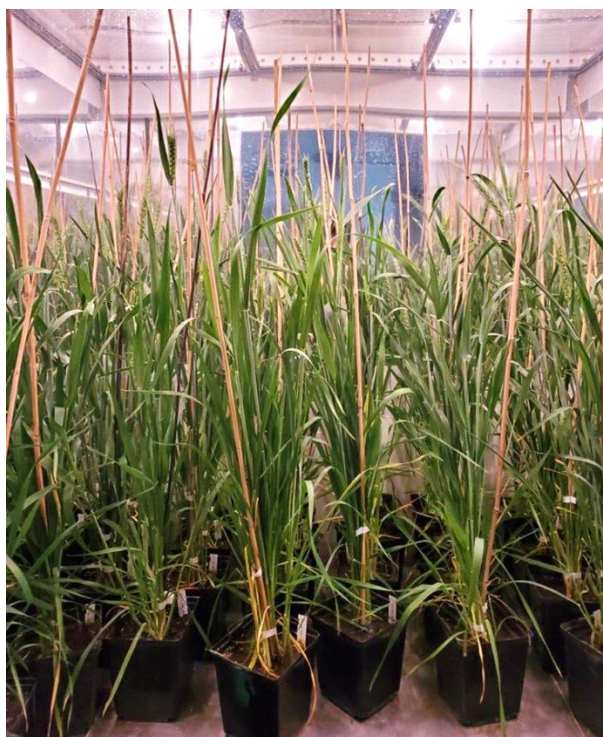


### 4.3.2 Planta adulta

Após o teste de plântula, o mesmo material foi utilizado para o ensaio em fase de planta adulta. As plântulas, que foram então transferidas para vasos maiores, se desenvolveram com boa sanidade em câmara de crescimento na condição de 18 °C/16 horas de luz e 16 °C/8 horas de escuro, onde foram mantidas por 22 dias.

Por motivos externos e adversos a este trabalho (pandemia Covid-19), o acesso ao centro de pesquisa Morden Research and Development Centre foi dificultado, impedindo a condução dos próximos ensaios da forma originalmente planejada. Isto posto, foi necessária a alteração da temperatura para 14 °C dia e 12 °C noite, com o objetivo de retardar o desenvolvimento das plantas (Figura 28). Assim, a população e os parentais permaneceram na câmara de crescimento nessas condições por 41 dias, até que o acesso à casa-de-vegetação fosse novamente permitido e que as plantas pudessem ser inoculadas.

Figura 28 - População em fase de planta adulta, sob condições controladas em câmara de crescimento. Morden Research and Development Centre, Morden, 2020



Fonte: Autora.

O mesmo isolado CCDS 18-96-1 foi multiplicado e coletado na variedade suscetível ‘Thatcher’. Mesmo com a redução da temperatura para o desenvolvimento mais lento das plantas, o inóculo foi pulverizado durante os estádios 45 e 50 da escala Zadoks (ZADOKS et al., 1974), encontrando-se com 121 dias (após o plantio) no momento da inoculação. Ao 14º dia após a inoculação, foi realizada a leitura das reações, que está demonstrada na Tabela 7. Neste momento, algumas das plantas começavam a iniciar a fase de maturação, e, por isso algumas das folhas apresentavam aspecto amarelado característico.

Tabela 7 - Avaliação fenotípica de ‘Toropi’ x ‘BRS 194’ em resposta ao isolado de ferrugem-da-folha CCDS em estágio de planta adulta, após desenvolvimento dos sintomas sob condições controladas em casa-de-vegetação.

<b>Genótipo</b>	<b>Tipo de infecção</b>	<b>Classificação</b>
<b>BRS 194</b>	3	S
<b>Toropi</b>	1-	R
PF 113210	0	R
PF 113239	1-	R
PF 113240	3	S
PF 113242	3+	S
PF 113254	23 (3 1Pu)	S
PF 113265	3	S
PF 113272	3	S
PF 113276	3	S
PF 113290	3	S
PF 113354	0/1-	R
PF 113361	;1-	R
PF 113438	;1-	R
PF 113439	1-3/3	Segregando
PF 113440	3	S
PF 113441	3+ (1- 1Pu)	S
PF 113442	3	S
PF 113479	1-	R
PF 113605	;1- (poucas)	R
PF 113610	3	S
PF 113611	3	S
PF 113642	;	R
PF 123007	3	S

Continuação...

PF 123008	3-	S
PF 123010	3/1-	Segregando
PF 123012	1-	R
PF 123014	3/23	S
PF 123115	1-/3	Segregando
PF 123018	3	S
PF 123019	3+	S
PF 123021	3	S
PF 123022	23	S
PF 123023	3/23	S
PF 123031	0	R
PF 123032	3/1-3	Segregando
PF 123033	3	S
PF 123050	3	S
PF 123111	3+ (1- 1 Pu)	S
PF 123112	2- (3 1Pu)	R
PF 123113	3	S
PF 123114	23	S
PF 123116	3	S
PF 123121	1-	R
PF 123123	0	R
PF 123124	3	S
PF 123126	23	S
PF 123127	3+	S
PF 123143	3+	S
PF 123145	3+	S
PF 123149	0	R
PF 123150	3+	S
PF 133005	3+	S
PF 133006	3-	S
PF 133007	2- (3 1Pu)	R
PF 133010	23	S
PF 133011	2 (3 1 Pu)	R
PF 143043	3+	S
PF 143046	1-/3	Segregando
PF 143055	3/1-	Segregando
PF 183101	3	S
PF 183111	3	S

Continuação...

PF 183114	3+	S
PF 183115	3+	S
PF 183116	3+	S
PF 183118	3+	S
PF 183119	3-	S

Pu: pústula; R: resistente; S: suscetível.

Os resultados demonstraram que quando inoculado em planta adulta, 'BRS 194' manteve-se suscetível ao isolado CCDS, apresentando infecções do tipo "3". Já 'Toropi', que frente ao isolado CCDS em fase de plântula se apresentava bastante suscetível, reagiu ao mesmo isolado com reação do tipo "1-", expressando um tipo de infecção baixo, assim como observado frente à raça brasileira MFP-CT. Ao analisar as respostas da população (total de 65 indivíduos), um total de 59 linhagens foi considerado, onde se observou 16 resistentes (R) e 43 suscetíveis (S) em reação ao isolado CCDS, em fase de planta adulta. Do total de 65 indivíduos, 6 linhagens manifestaram plantas com reações divergentes, e, devido a esta característica segregante não foram incluídas nas análises desses dados.

De modo geral, é possível verificar que nos três experimentos de fenotipagens houve segregação em linhagens DH da população 'Toropi' x 'BRS 194'. Esta segregação, por sua vez, não necessariamente corresponde aos mesmos genótipos de um ensaio para outro. Como mencionado anteriormente, este padrão de respostas obtidos neste trabalho é divergente do comportamento esperado em uma população DH, que, devido a sua natureza, espera-se que os indivíduos possuam a condição de total homozigose. Apesar disso, de acordo com os dados fenotípicos obtidos neste ensaio e com base no número de indivíduos resistentes e suscetíveis, foi realizado o estudo genético com o teste de aderência de Qui-quadrado, estimando-se assim o padrão de herança genética. A taxa dos valores observados (16 R: 43 S) foi confrontada com a dos valores esperados (14.75: 44.25) (Tabela 8), e, ao considerar o total de 59 linhagens, o teste estatístico não detectou diferença significativa desses valores ( $\chi^2$  0.05 a 1 Grau de Liberdade = 3,841). A não significância implica na adequação dos números (resistentes e suscetíveis) ao modelo de taxa de segregação de 1:3 ( $p = 0.707$ ), o que indica a adesão a este modelo mendeliano de herança genética.

Tabela 8 - Proporção de segregação e análise genética da população DH em estágio de planta adulta frente o isolado CCDS, Morden, Canadá.

N° de linhas DHs	Estádio	Razão de segregação resistentes: suscetíveis			$\chi^2$ Calculado	$\chi^2$ Tabelado	Valor de p
		N° de linhas observadas	N° de linhas esperadas	Razão			
59	planta adulta	16:43	14.75:44.25	1: 3	0.1412	3.8415	0.707

Ao nível de significância de 5%

Mesmo havendo incoerência ao observado (a presença de indivíduos segregantes em uma população DH), e verificando a disparidade de genótipos nessa condição em relação aos diferentes isolados (onde cada um dos ensaios revelou linhagens diferentes/ desiguais com essa característica), os resultados estatísticos deste ensaio (com o isolado CCDS) são consistentes ao que foi constatado no teste para a raça MFP-CT.

Alguns genes de RPA são de amplo espectro e conferem resistência a uma ampla gama de isolados de *P. triticina*. É o caso do gene *Lr34*, que faz parte do complexo gênico *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38/Ltn1* que confere resistência a múltiplos patógenos. *Lr34* fornece resistência parcial aparente apenas em fase de planta adulta (RINALDO et al., 2017), a qual permanece durável para todas as raças do patógeno por muitas décadas (DYCK et al., 1966; KOLMER et al., 2008).

Grande parte das cultivares com resistência durável a ferrugem-da-folha tem como origem a Argentina, Brasil e Uruguai, e, suspeita-se que pelo menos uma parte da resistência nestas cultivares é comum. Muitas delas compartilham um pouco da resistência da variedade brasileira ‘Frontana’, que é portadora do *Lr34* (BARCELLOS et al., 2000). Embora ‘Toropi’ seja descendente de ‘Frontana’ (Frontana 1971.37/Quaderna A//Petiblanco 8), testes genotípicos confirmaram a ausência de alelos de *Lr34* na variedade ‘Toropi’ (BARCELLOS et al., 2000; MELLERS et al., 2020), indicando que a variedade brasileira não é portadora desse gene.

No presente trabalho, ao realizar o teste para herança genética com as raças MFP-CT e CCDS, houve ajuste à proporção 1:3 em ambas as situações. Teoricamente, esses resultados sugerem que a resistência genética observada em ‘Toropi’ seja comandada por dois genes complementares, no entanto, esses dados devem ser

observados com cautela. A resistência de planta adulta de ‘Toropi’ é considerada complexa por muitos autores, e, ao longo dos trabalhos realizados pela literatura, uma diversidade de resultados é apresentada. Neste contexto, determinar uma proporção mendeliana simples para ‘Toropi’, tomando-se como base apenas o tipo de infecção, pode ser uma asserção equivocada.

Estudos realizados por Barcellos et al. (2000) identificaram dois genes recessivos complementares em uma seleção denominada ‘Toropi-6’, porém, diferentemente do presente trabalho, este resultado foi encontrado em uma população F2 onde as plantas foram avaliadas com base na severidade (porcentagem de área foliar com pústulas e clorose ou necrose), ajustando-se a uma taxa de segregação de 7: 9. Posteriormente, foi verificado que estes genes recessivos localizam-se nos cromossomos 1AS e 4DS (DA-SILVA et al., 2012).

Em trabalho subsequente, uma população DH derivada de ‘Toropi-6’ e ‘Thatcher’ também foi avaliada quanto à severidade, e, verificou-se que a resistência de ‘Toropi’ expressa no Canadá e no Brasil seguiram o mesmo modelo de 1: 3, revelando dois genes complementares de planta adulta (ROSA et al., 2016).

O mesmo estudo realizado por Rosa et al. (2016), com ensaios na Nova Zelândia revelou ainda dois genes complementares mais um gene não complementar (5 R: 3 S). Esses dois genes complementares foram eficazes em todos os locais, enquanto o gene raça-específico conferiu resistência apenas na Nova Zelândia à raça avirulenta BBBD (ROSA et al., 2016). Além disso, em ‘Toropi’ foi identificado um *QTL* associado à resistência à ferrugem-da-folha (*QLr.crc-5AL.1*) no cromossomo 5AL, que se sobrepôs a um *QTL* para ferrugem linear (*QStr.crc-5AL.1*) (ROSA, 2013). Adicionalmente, em um mapeamento mais recente, foi revelado que a resistência à ferrugem da folha de planta adulta de ‘Toropi’ se deve a muitos *QTLs* (ROSA et al., 2019).

Controversamente, Kolmer et al. (2018a) ao estudarem uma população de retrocruzamento derivada de ‘Toropi’ (seleção PI 344200) reportaram um gene de RPA no cromossomo 5DS, que foi designado como *Lr78*. No mesmo trabalho, os autores também identificaram três *QTLs* de pequeno efeito no cromossomo 1BL (*Lr46/Yr29*), 3BL, 4BS em outra população recombinante originada de ‘Toropi’.

Como é possível observar, no que se trata da resistência genética de ‘Toropi’, os resultados reportados pela literatura são diversos e discordam entre si. Kolmer et al., (2018a) acreditam que provavelmente ‘Toropi’ é heterogêneo e, nesse contexto, diferentes seleções da variedade foram utilizadas. Além disso, os mesmos autores levantam a possibilidade de que talvez todo o genótipo resistente à ferrugem-da-folha de Toropi não tenha sido avaliado no estudo por eles realizado, pois apenas duas linhagens de retrocruzamento com resistência de planta adulta foram utilizadas como parentais.

Rosa et al. (2019) concordam que a pureza genética de ‘Toropi’ tem sido questionada, uma vez que essa variedade vem sendo estudada por grupos diversos ao redor do mundo, e, portanto, suas sementes têm passado por muitas mãos. A exemplo disso, além das seleções de ‘Toropi’ denominadas ‘Toropi-6’, ‘Toropi-6.3’ (também oriunda de Toropi-6) e ‘Toropi-6.4’ e ‘PI 344200’ estudadas por Barcellos et al. (2000), Rosa et al. (2016) e Kolmer et al. (2018), respectivamente, também vem sendo estudada a seleção ‘Toropi-Ur’ originada do aumento de sementes no Uruguai. Essa rotatividade de materiais indicaria que níveis significativos de diversidade genética residual podem existir em qualquer lote de sementes de qualquer variedade de trigo (que é uma espécie endogâmica homozigótica) e isso facilitaria a divergência genética dentro da variedade durante os procedimentos padrão de multiplicação de sementes (ROSA et al., 2019).

#### **4.4 Testes com *P. graminis* em plântula**

Os testes com *P. graminis* foram conduzidos no centro de pesquisa Morden Research and Development Centre (Canadá). Em razão da limitação do número de sementes, o planejamento destes ensaios foi voltado aos testes preliminares com os parentais para posterior fenotipagem da população DH. Contudo, devido a fatores adversos durante a realização dos experimentos (Pandemia Covid-19), a fenotipagem da população não pôde ser conduzida.

Conforme foi demonstrado anteriormente neste trabalho, ‘BRS 194’ possui a translocação 1BL.1RS, o que leva ao entendimento que esta variedade carrega *Sr31*, gene que foi amplamente implantado para resistência à ferrugem-do-colmo. Nessa perspectiva, sabendo-se que a raça Ug99 possui como característica a virulência para

*Sr31* (PRETORIUS et al., 2000), decidiu-se fenotipar os parentais ‘Toropi’ e ‘BRS 194’ para Ug99.

Para este experimento em específico, por se tratar de isolado altamente virulento e ainda restrito a poucas regiões geográficas, os ensaios foram feitos no laboratório de biocontenção de nível 3 (Morden Research and Development Centre - Canada). Neste local, ‘Toropi’ e ‘BRS 194’ foram semeados, inoculados e avaliados em fase de plântula para o isolado Ug99 (TTKSK). Em resposta à inoculação com Ug99 em condições controladas, distintas reações foram observadas nos parentais. ‘Toropi’ desenvolveu sintomas claros de suscetibilidade, com tipos de infecção “34” apresentando pústulas grandes em formato anguloso de diamante. Diferentemente de ‘Toropi’, o genótipo ‘BRS 194’ reagiu ao inóculo TTKSK sem evidência de qualquer sintomatologia em suas folhas, revelando assim sua resistência do tipo imune.

Um número bastante limitado de genes reage a este isolado com resposta “0”, como foi verificado em ‘BRS 194’. Dentre os genes que conferem uma resposta imune (IT = 0) de resistência ao isolado TTKSK em fase de plântula, está o *Sr36* (Tabela 9).

Tabela 9 - Genes de resistência efetivos a Ug99 (TTKSK) em fase de plântula ou planta adulta e seus respectivos tipos de infecção.

<b>Genes efetivos</b>	<b>Tipo de infecção</b>	<b>Referência</b>
<i>Sr28</i>	;13	Jin et al., 2007
<i>Sr29</i>	2 a 3	Jin et al., 2007
<i>SrTmp</i>	2+	Olivera et al., 2012
<i>Sr13</i>	2 a 2+	Jin et al., 2007
<i>Sr22</i>	1 a 1;	Jin et al., 2007
<i>Sr35</i>	;	Jin et al., 2007
<i>Sr36</i>	0	Olivera et al., 2012
<i>Sr37</i>	;1-	Jin et al., 2007
<i>Sr32</i>	1 a 1+	Jin et al., 2007
<i>Sr39</i>	;1	Jin et al., 2007
<i>Sr33</i>	2, 2+ a 3	Jin et al., 2007
<i>Sr45</i>	0;	<a href="http://www.globalrust.org/gene/sr45">http://www.globalrust.org/gene/sr45</a>



<i>Sr40</i>	1	Jin et al., 2007
<i>Sr24</i>	2-	Olivera et al., 2012
<i>Sr25</i>	2 a 2+	Jin et al., 2007
<i>Sr26</i>	1	Jin et al., 2007
<i>Sr43</i>	;2-	Xu, et al., 2009
<i>Sr44</i>	1+	Jin et al., 2007
<i>Sr27</i>	;	Jin et al., 2007

Assim sendo, para verificar tal condição, decidiu-se testar os parentais novamente para novas raças virulentas e avirulentas ao *Sr36* e adicionar ao plantio a linha diferencial *Sr36*. O intuito desses novos testes foi comparar as reações de ‘BRS 194’ com a linha diferencial *Sr36*, para verificar se as respostas entre ambos seriam idênticas. Os resultados obtidos para ‘BRS 194’, *Sr36* e ‘Toropi’ frente aos isolados TPMK, TMRT, RHTS (virulentas ao *Sr36*) e MCCF, QTHJF e RTHJ (avirulentos ao *Sr36*) estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10 - Reações dos parentais e da linha diferencial *Sr36* quando inoculados (*Pgt*) em fase de plântula aos isolados virulentos e avirulentos ao gene *Sr36*, em casa-de-vegetação, Morden, Canadá.

<b>Isolado</b>	<b>Toropi</b>	<b>BRS 194</b>	<b><i>Sr36</i></b>
TPMK*	33+ 1	1	34
TMRT*	3+	0	4
RHTS*	1	0;	33+
MCCF**	;1-	0	0
QTHJF**	1-	0	0
RTHJ**	1-	0	0

\* virulência ao *Sr36*

\*\* avirulência ao *Sr36*

O parental ‘BRS 194’ apresentou respostas idênticas à linha diferencial *Sr36* quando inoculados com os isolados avirulentos MCCF, QTHJF e RTHJ (Tabela 10).

Estes dados apontam que ambos têm o mesmo grau de resistência a todos os três isolados e sugerem a presença de *Sr36* em ‘BRS 194’.

No entanto, mesmo havendo o pareamento das reações (de ‘BRS 194’ com a linha diferencial *Sr36*) frente aos isolados avirulentos ao *Sr36*, esta concordância não foi observada para os demais isolados, virulentos ao *Sr36* (TPMK, TMRT e RHTS). Nesse caso, diferentemente da linha diferencial *Sr36* que mostrou alta suscetibilidade, ‘BRS 194’ revelou reações claras de resistência com tipos de infecção “1”, “0” e “0;” aos isolados TPMK, TMRT e RHTS, respectivamente (Tabela 10 e Figura 29). Em conjunto, esses dados sugerem que o gene *Sr36* provavelmente está presente em ‘BRS 194’, porém, que a avirulência de TPMK, TMRT e RHTS é controlada por outro gene de resistência de plântula, diferente de *Sr36*.

No que se refere a variedade ‘BRS 194’, Costamilan et al. (2016) demonstraram que a mesma possui resistência à oídio em estágio de plântula. No entanto, estudos disponíveis pela literatura envolvendo sua genética de resistência às ferrugens são incomuns, e, se tornaram ainda mais escassos após a quebra da resistência de planta adulta de ‘BRS 194’ à *P. triticina* (isolado MFP-CT).

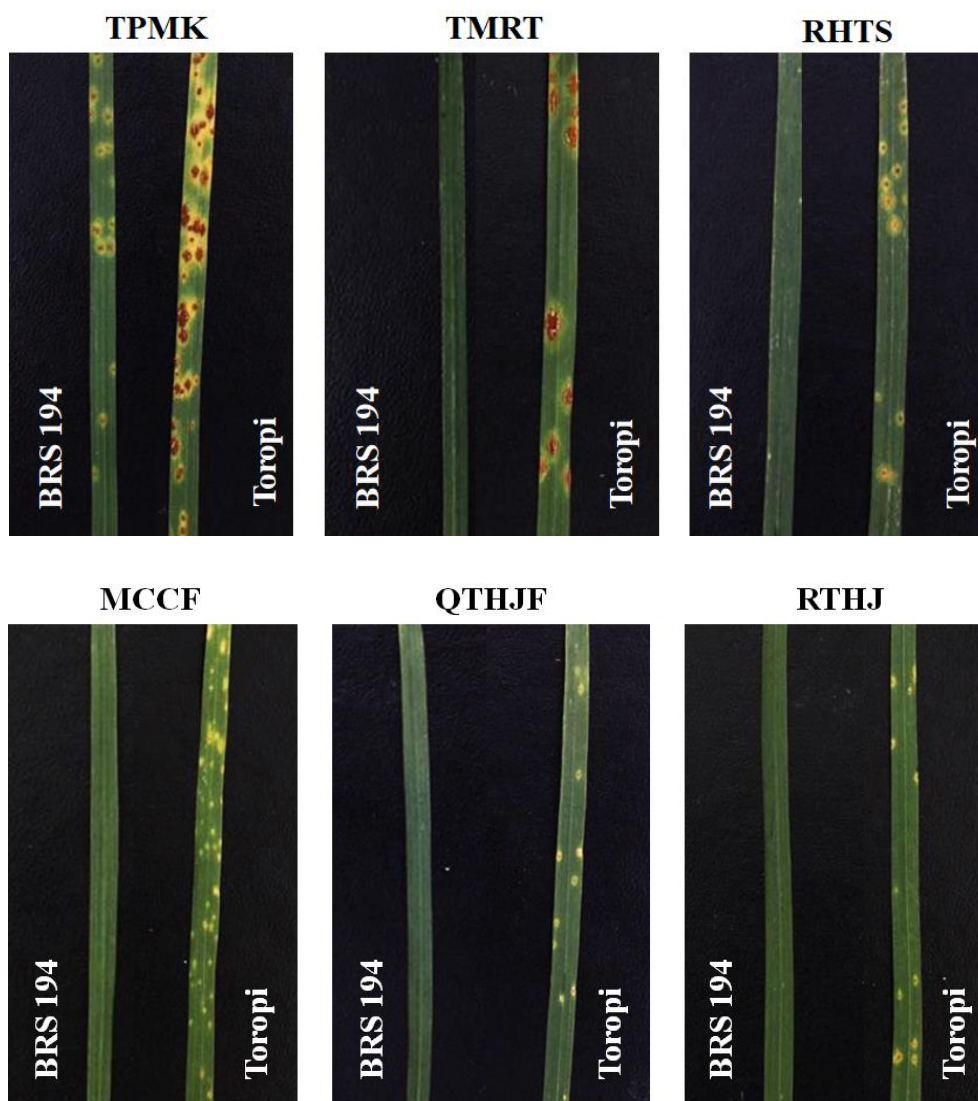
Há registros que no ano de 2005, no campo experimental do Kenya Agricultural Research Institute (no Quênia), foi testada a reação da variedade ‘BRS 194’ à raça Ug99, sob condições naturais de infecção. Este ensaio preliminar realizado juntamente com outros genótipos brasileiros de trigo indicou que em condições de campo, ‘BRS 194’ mostrou resistência a Ug99 (CHAVES et al., 2006). Mas, até onde se tem conhecimento, a resistência de plântula de ‘BRS 194’ a Ug99 até então não havia sido explorada em maiores detalhes.

Dentro da diversidade de raças de *P. graminis*, Ug99 é a mais devastadora. Enquanto a perda de grãos por epidemias de ferrugem-do-colmo pode chegar geralmente a 50%, para infecções causadas por variantes da Ug99, pode alcançar até 90% (EJAZ et al., 2012). Esta raça, que foi inicialmente detectada em Uganda, hoje ameaça mundialmente a produção global de trigo. Assim, à medida que novas raças virulentas surgem e se dispersam (especialmente variantes de Ug99), mais do que nunca, o conhecimento de genes de resistência no germoplasma disponível é importante para os melhoristas de trigo (PURNHAUSER et al., 2011). Diante deste panorama, a

descoberta da resistência de ‘BRS 194’ neste trabalho é promissora e digna de ser aprofundada.

Interessantemente, ‘Toropi’, que havia se apresentado altamente suscetível à Ug99 (TTKSK), revelou resistência de plântula aos isolados MCCF, QTHJF, RTHJ, RHTS. Apenas dois isolados (TPMK e TMRT) foram virulentos em ‘Toropi’, e mesmo sendo suscetível a TPMK (33+), também respondeu a este isolado com algumas poucas reações do tipo “1” (Figura 29).

Figura 29 - Sintomatologia de ‘BRS 194’ e ‘Toropi’ frente à ferrugem-do-colmo em fase de plântula. Acima: TPMK, TMRT e RHTS (virulentos ao *Sr36*); Abaixo: MCCF, QTHJF e RTHJ (avirulentos ao *Sr36*). Morden Research and Development Centre, Morden, 2020



Fonte: Autora.

Em termos de ferrugem-da-folha, a resistência de ‘Toropi’ é considerada diferente de outras fontes de resistência durável e por isso tem sido extensivamente estudada. Novas perspectivas demonstram que sua resistência não se limita apenas à ferrugem-da-folha. Recentemente, três *QTLs* para resistência à ferrugem linear (QYr.crc-1BL, QYr.crc-4BL e QYr.crc-5AL) foram identificados em ‘Toropi-6.4’. Tal como acontece com QLr.crc-1BL, QYr.crc-1BL foi localizado na região do braço longo do cromossomo 1A, onde o *locus* de múltipla resistência *Lr46/Yr29* está localizado (ROSA et al., 2019).

Por consequência, *Lr46* e *Yr29* fazem parte do complexo gênico (*Lr46/Yr29/Sr58/Pm39/Ltn2*) que também carrega resistência de amplo espectro a mais dois patógenos fúngicos biotróficos, como *P. graminis* f. sp. *tritici* (*Sr58*), e *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Pm39*) (HERRERA-FOESSEL et al., 2014).

As recentes descobertas envolvendo ‘Toropi’ demonstram a complexidade genética da sua resistência a doenças, que, no aspecto de ferrugens em geral, ainda há muitas lacunas a serem exploradas. Isto é, de acordo com os resultados obtidos para ‘Toropi’, nesta variedade também está envolvida a resistência genética à *P. graminis* em nível de plântula.

Levando em consideração a chave de código de letras norte americana que confere a nomenclatura das raças de *P. graminis*, é possível hipotetizar genes que poderiam estar envolvidos em ‘Toropi’ na resistência aos isolados testados (Tabela 11).

Tabela 11 - Tipos de infecção de linhas diferenciais (genes) resistentes a RHTS, MCCF, QTHJF, RTHJ utilizados em patotipagem de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Adaptado de Fetch et al. (2009).

<b>GENE</b>	<b>Tipo de infecção</b>	<b>Origem</b>
<i>Sr9e</i>	1- a 2-	Vernstein
<i>Sr7b</i>	2	ISr7b-Ra; Hope/Chinese Spring
<i>Sr11</i>	; a 2-	Yalta
<i>Sr6</i>	0;	ISr6-Ra; Red Egyptian/Chinese Spring
<i>Sr8a</i>	2- a 2	Mentana
<i>Sr36</i>	;0	W2691/SrTt-1 (CI 12632)
<i>Sr9b</i>	2	Prelude*4/2/Marquis*6/Kenya 117 <sup>a</sup>
<i>Sr30</i>	1- a 2	Festiguay

<i>Sr9a</i>	1- a 2-	ISr9a-Ra Red Egyptian/Chinese Spring
<i>Sr9d</i>	1- a 1	ISr9d-Ra Hope/Chinese Spring
<i>SrTmp</i>	2-	Triumph 64 (CI 13679)/Chinese Spring
<i>Sr24</i>	1- a 2	Little Club/Agent (CI 13523)
<i>Sr31</i>	1- a 2	Federation*4/ Kavkaz

Baseado nas respostas dos conjuntos de linhas diferenciais (cada uma contendo um gene em específico), o isolado RHTS é avirulento ao gene *Sr9e*, *Sr11*, *Sr8a* e *SrTmp*, MCCF é avirulento a *Sr21*, *Sr9e*, *Sr11*, *Sr6*, *Sr8a*, *Sr36*, *Sr9b*, *Sr30*, *Sr9a* e *Sr9d*, enquanto que o isolado QTHJF é avirulento para *Sr9e*, *Sr7b*, *Sr36*, *Sr30*, *Sr9a*, *SrTmp*, *Sr24*, e *Sr31*, e, RTHJ avirulento para *Sr9e*, *Sr36*, *Sr30*, *Sr9a* e *SrTmp*. Diante desse ponto de vista, verifica-se que todos os quatro isolados são avirulentos ao gene *Sr9e*. Nota-se que *Sr9e* apresentou tipo de infecção idêntico ao de ‘Toropi’ para RHTS (1), QTHJF (1-) e RTHJ (1-), e, no caso de MCCF, as reações foram muito similares (*Sr9e* “1-“ e ‘Toropi’ “;1-”) (Tabela 12).

Segundo Dubin et al. (1989), se a linha monogênica para um determinado gene conhecido e a variedade /linhagem apresentam o mesmo padrão, quanto ao tipo de infecção, alto (susceptibilidade) e baixo (resistência), com uma série de isolados, esta variedade é então portadora do gene e postula-se a presença do mesmo. Isso demonstra, que o gene em questão, presente em ‘Toropi’, pode ser o *Sr9e*.

Neste trabalho, contudo, essa associação não é determinante, já que o número de isolados testados de ferrugem-do-colmo é limitado. Até hoje, mais de 70 genes de resistência à ferrugem-do-colmo já foram caracterizados em trigo (AOUN et al., 2019), e continuam sendo descobertos. Portanto, é indicado testar diversos isolados abrangendo uma maior variabilidade de reações para identificar se a resistência envolve um gene conhecido ou não. Além disso, juntamente com a fenotipagem, o uso de marcadores moleculares já validados associados aos genes de resistência frente à ferrugem-do-colmo pode confirmar se o gene envolvido já foi caracterizado com base no genótipo.

Tabela 12 - Respostas fenotípicas obtidas para os parentais da população DH em comparação com as linhas monogênicas para os isolados de *Puccinia graminis* testados. Morden Research and Development Centre, Canadá, 2020

<b>Genótipo</b>	<b>TPMK</b>	<b>TMRT</b>	<b>RHTS</b>	<b>MCCF</b>	<b>QTHJF</b>	<b>RTHJ</b>
<b>Toropi</b>	33+ 1	3+	1	;1-	1-	1-
<b>BRS194</b>	1	0	0;	0	0	0
<b>Tmp</b>	4	4	22+	4	11+	22+
<b>Sr24</b>	12-	1	1	1-	1-	1
<b>Sr31</b>	1-	1-	1-	1-	1-	1
<b>Sr38</b>	1-	34	1	1-	2	0;
<b>McN</b>	4	4	34	4	4	4
<b>Sr5</b>	4	4	3-	34	34	4
<b>Sr21</b>	34	4	3-3	2	33+	34
<b>Sr9e</b>	34	4	1	1-	1-	1-
<b>Sr7b</b>	34	4	33+	4	22+	4
<b>Sr11</b>	4	4	1-	1-	4	4
<b>Sr6</b>	0;	;1-	3	0	34	4
<b>Sr8a</b>	34	1	1	1	34	34
<b>Sr9g</b>	4	4	34	4	4	4
<b>Sr36</b>	34	4	33+	0	0	0
<b>Sr9b</b>	22+	3+4	4	1	4	34
<b>Sr30</b>	2-2	11+	33-	33 1	1-	1
<b>Sr17</b>	4	4	3+	4	34	34
<b>Sr9a</b>	2-	4	34	1	22+	2+3-
<b>Sr9d</b>	34	4	3-	1	34	4
<b>Sr10</b>	4	4	33+	34	33-	4

#### 4.5 Identificação do *Sr36*

Os parentais e a população DH foram testados usando o marcador microssatélites STM773-2 a fim de detectar a presença de *Sr36*. O marcador produziu fragmentos de aproximadamente 155 bp, o que está de acordo com o que foi reportado por Tsilo et al. (2008). Assim, a genotipagem dos parentais e da população foi realizada a partir do padrão de bandas geradas. Com a interpretação visual, os dados (bandas) foram codificados conforme descrito a seguir: “R” (resistente) quando presente o alelo associado a *Sr36* na região de 155 pb; “S” (suscetível) quando presente o suscetível e eventualmente, “HET” (heterozigoto) quando presente ambos os alelos.

Os dados polimórficos gerados nesta genotipagem revelaram que ‘BRS 194’ reproduziu fragmentos na região de 155 pares de bases, apresentando banda “R” correspondente ao gene *Sr36*. Por outro lado, ‘Toropi’ apresentou banda “S”, apontando pela ausência de *Sr36*. Estes dados sustentam os fenótipos observados nos ensaios com *P. graminis*, onde foi demonstrado que ‘BRS 194’ e a isolinha *Sr36* possuem graus de resistência idênticos quando comparados entre si em resposta aos isolados MCCF, QTHJF e RTHJ (Tabela 10). O comparativo da análise molecular com os dados obtidos em casa-de-vegetação confirma que esta resistência observada em ‘BRS 194’ se deve ao gene *Sr36*. Além disso, a variedade ‘Arthur 71’, que é conhecida por possuir o *Sr36*, é um pai de ambos ‘CEP14’ e ‘CEP17’, presentes do pedigree de ‘BRS194’, sendo o provável doador de *Sr36*.

O gene *Sr36* é valioso por conferir uma reação de imunidade às raças de Ug99 TTKSK e TTKST durante os estágios de plântula e planta adulta (JIN et al., 2008; JIN et al., 2007) e foi amplamente utilizado na África para o controle do patógeno (SINGH et al., 2007). No entanto, sua eficácia foi comprometida pela detecção da nova variante “TTTKS”, que demonstrou ser virulenta ao gene (JIN et al., 2009). Assim, mesmo que *Sr36* se mantenha resistente a vários isolados de Ug99, devido à quebra de resistência, sua aplicação requer o uso da piramidização, buscando-se assim a associação com outros genes para promover a resistência durável (TSILO et al., 2008).

Com relação à variedade ‘Toropi’, os ensaios de fenotipagem de ferrugem-do-colmo, frente aos isolados RHTS MCCF, QTHJF e RTHJ, mostraram respostas de

resistência distintas de ‘BRS 194’ e *Sr36*. Esta diferença de reações fenotípicas está associada à ausência do *Sr36* em ‘Toropi’, sustentada pelos dados genotípicos (“S”).

Em relação às linhagens DH, embora as mesmas não tenham sido inoculadas e fenotipadas para ferrugem-do-colmo, foi possível verificar através dos dados moleculares que o gene *Sr36* se distribuiu na população (Tabela 13). Das 65 linhagens DH, um total de 42 indivíduos apresentou amplificação do tipo “R”, correspondente ao alelo de resistência *Sr36* de ‘BRS 194’, enquanto 15 linhas revelaram bandas “S” de ‘Toropi’. Considerando estas duas classes (“R” e “S”, que somam um total de 57 indivíduos), foi realizado o teste de Qui-quadrado ( $n = 57$ ), o qual revelou que a proporção de segregação observada (42 R : 15 S) não se ajustou ao modelo Mendeliano de 1:1 (onde:  $\chi^2 = 12.7895$ ;  $\chi^2$  tabelado = 3.841; valor de  $p = 0.0003486$ ). Aspectos relacionados a não adequação a este modelo serão discutidos a seguir.

A seleção de plantas doadoras heterozigotas (como geração F1 de um cruzamento entre parentais contrastantes) é um aspecto importante na produção de uma população DH. Neste caso, a linhagem DH regenerada deve conter apenas um dos dois alelos possíveis da planta doadora, comprovando assim que o homocigoto se originou da diploidização de estruturas haploides. De maneira adversa, quando os regenerantes são originados de estruturas somáticas, são herdados ambos os alelos da planta doadora (MUROVEC et al., 2007).

A aplicação de marcadores moleculares codominantes, como os microssatélites, permite a distinção do perfil de bandas de cada indivíduo da população, que, conforme descrito acima, quando são duplo-haploides, apresentam o perfil de bandas somente de um dos parentais (BATTISTELI et al., 2013). De maneira adversa, cinco linhagens (PF 113439, PF 123115, PF 123123, PF 143046 e PF 143046) apresentaram amplificação concomitante dos alelos “R” e “S” e, portanto, foram consideradas heterozigotas (HET).

Assim como é desconhecido o motivo pelo qual foi observado segregação em algumas linhagens nos ensaios de fenotipagem (mencionado anteriormente), também é desconhecido o motivo pelo qual houve a detecção de heterozigotos nesta população de estudo. No entanto, duas hipóteses (que poderiam estar ocorrendo durante o desenvolvimento das linhagens) poderiam explicar os genótipos das plantas heterozigotas em um locus ou em loci ligados: (1) alteração do pareamento



cromossômico e migração de dois cromossomos homólogos para o mesmo sítio polar durante a meiose, levando a um gameta trissômico e (2) citomixia, que teria transferido apenas um cromossomo de um gameta para outro, ambos seguidos por duplicação cromossômica nas plantas diploides espontâneas (MURANTY et al., 2002).

Dentre as demais linhagens, a amplificação foi nula em três delas (PF 113610, PF 183111 e PF 183114) não apresentando assim nenhum tipo de banda (N/A: não amplificação). Segundo Santos (2010), a ausência de amplificação em alguns genótipos pode significar diferenças nas sequências que flanqueiam os microssatélites, produzindo, assim, alelos considerados nulos. Esses alelos poderiam ser detectados mediante diversas repetições do experimento, certificando-se então que não houve falha na reação.

Tabela 13 - Dados genotípicos obtidos para ‘BRS 194’, ‘Toropi’ e a população duplo-haploide, de acordo com a visualização de bandas de amplificação para o marcador microssatélite STM773-2, utilizado para detecção do gene *Sr36*.

<b>Genótipo</b>	<b>Alelo</b>
<b>BRS 194</b>	R
<b>Toropi</b>	S
PF 113210	R
PF 113239	S
PF 113240	R
PF 113242	R
PF 113254	S
PF 113265	S
PF 113272	R
PF 113276	R
PF 113290	S
PF 113354	S
PF 113361	R
PF 113438	R
PF 113439	HET
PF 113440	R
PF 113441	S
PF 113442	R
PF 113479	S
PF 113605	S
PF 113610	N/A
PF 113611	S

Continuação...

PF 113642	S
PF 123007	R
PF 123008	R
PF 123010	R
PF 123012	R
PF 123014	R
PF 123115	HET
PF 123018	R
PF 123019	R
PF 123021	R
PF 123022	R
PF 123023	R
PF 123031	R
PF 123032	R
PF 123033	R
PF 123050	R
PF 123111	R
PF 123112	R
PF 123113	R
PF 123114	R
PF 123116	R
PF 123121	R
PF 123123	HET
PF 123124	R
PF 123126	R
PF 123127	R
PF 123143	R
PF 123145	R
PF 123149	R
PF 123150	R
PF 133005	R
PF 133006	R
PF 133007	S
PF 133010	R
PF 133011	S
PF 143043	S
PF 143046	HET
PF 143055	R
PF 183101	S
PF 183111	N/A
PF 183114	N/A

Continuação...

PF 183115	HET
PF 183116	R
PF 183118	S
PF 183119	R

R = resistente, presença do *Sr36*;  
S = suscetível, ausência do *Sr36*; HET = presença do alelo R e S; N/A = não houve amplificação.

Neste trabalho, a duplicação dos cromossomos das plantas originadas (via micrósporos) para a produção da população DH, ocorreu de maneira natural ou induzida. Em ambas as situações, quando é finalizado o processo de obtenção DHs, cada linhagem obtida passa a apresentar dois cromossomos homólogos idênticos, representando a variabilidade genética encontrada no indivíduo parental que produziu os micrósporos (gametas). Ao passo que os cromossomos são duplicados, as plantas homozigotas com os genótipos possíveis para cada loco, “AA” e “aa” por exemplo, ocorrem na mesma proporção, de maneira que a segregação ocorre somente na taxa de 1:1. Como consequência deste processo, com todos loci homozigóticos, a informação obtida com marcadores dominantes e codominantes neste tipo de população deve ser a mesma (1:1), (BRITO, 2012).

Devido à natureza duplo-haploide desta população, esperava-se que a mesma apresentasse segregação de 1:1 para locos individuais, entretanto, este padrão não foi observado quando o marcador STM773-2 foi testado. Este desbalanço na proporção de segregação Mendeliana esperada é denominado “distorção de segregação” (YAMAGISHI et al., 2010).

Para diversas espécies a distorção de segregação observada em diferentes marcadores moleculares é relativamente comum em populações de linhagens homozigotas produzidas especialmente via androgênese (FOISSET; DELOURME, 1996; ADAMSKI et al., 2014). Foi demonstrado (em trigo e cevada) que este fenômeno é notavelmente maior em populações obtidas por androgênese, tanto pelo método de cultura de anteras quanto por micrósporos, do que naquelas obtidas por hibridização interespecífica (FOSTER et al., 2007; GUZY-WRÓBELSKA; SZAREJKO, 2003; SAYED et al., 2002).

Em plantas, a origem, extensão, e efeito genético da distorção de segregação variam grandemente de acordo com a espécie em questão, a população segregada, os cruzamentos e os marcadores moleculares utilizados (XIAN-LIANG; XUE-ZHEN; TIAN-ZHEN, 2006). Existe uma diversidade de aspectos que podem estar relacionados à distorção. Um desses aspectos, principalmente quando a segregação não mendeliana ocorre de maneira extrema, consiste na presença de genes letais recessivos. Isso porque, durante o processo de duplicação cromossômica, muitos destes genes passam a se tornar homocigotos e assim se expressar, levando então a distorção de segregação (XIAN-LIANG et al., 2006).

Outra possível causa de distorção em populações DH de origem androgênica, pode ser a transmissão preferencial de alelos em favor do parental com desempenho superior na cultura *in vitro* (FOISSET; DELOURNE, 1996; SAYED et al., 2002). Segundo Henry et al. (1993) há genótipos que possuem componentes genéticos que modificam fortemente sua capacidade de regeneração. Esses genótipos determinam a "qualidade" dos embriões, ou seja, "a aptidão para uma organização embrionária normal" e, portanto, sua capacidade de regeneração (HENRY et al., 1993).

Diversos estudos apontam que variedades que carregam 1BL.1RS possuem uma alta taxa de regeneração via androgênese (AGACHE et al., 1989; DEVAUX et al., 1990; FOROUGHWEHR; ZELLER, 1990; HENRY; DE BUYSER, 1985). Cruzamentos envolvendo um parental responsivo à cultura de anteras, possuindo a translocação 1BL.1RS (HENRY; DE BUYSER, 1985), possibilitam a recuperação indireta de plantas haploides de genótipos considerados recalcitrantes. Entretanto, as plantas regeneradas são distorcidas na direção do parental contendo a translocação pelo desenvolvimento seletivo de micrósporos ou embriões derivados de seus micrósporos (AGACHE et al., 1989; DEVAUX et al., 1990).

Neste sentido, a distorção de segregação observada na população de estudo em relação ao marcador STM773-2 poderia ter sido influenciada pela presença da translocação 1BL.1RS em 'BRS 194', onde a maior proporção das linhagens (n = 42) apresentou o alelo desta variedade. A variedade brasileira 'BRS 194' é conhecida por sua alta resposta androgênica, que se caracteriza pela expressiva produção de embriões (COELHO et al., 2018). Por outro lado, este fator pode não ser determinante para a

regeneração final de plantas, visto que a taxa de conversão dos embriões de ‘BRS 194’ em plântulas albinas foi reportada como 45,38% enquanto que apenas 0,65% desses embriões regeneraram plântulas verdes (COELHO, 2017).

De acordo com KAMMHOLZ et al. (2001), que estudaram cruzamentos contendo vários segmentos de cromatina “alienígena”, introgrididos de alguma espécie relacionada distante do trigo (*Agropyron* syn. *Thinopyrum* syn. *Lophopyrum*) ou trigo tetraploide, os segmentos de cromatina alienígena podem introduzir um bloco de novos genes no genoma do trigo. Esses blocos, por sua vez, substituem regiões cromossômicas portando loci que determinam aspectos de todo o fenótipo da planta, influenciando também o desenvolvimento da população DH. Os autores constataram que a segregação não mendeliana é geralmente associada a pontos críticos dentro do genoma e verificaram associação com regiões cromossômicas de translocações alienígenas. Na população DH ‘Sunco x Tasman’ houve distorção favorecendo o parental ‘Sunco’. O cromossomo 2B em ‘Sunco’ contém uma translocação de *Triticum timopheevii* que inclui *Sr36*, e, nesta região foi observado um grande bloco de marcadores distorcidos (KAMMHOLZ et al., 2001).

Embora se desconheça as causas que levaram às distorções observadas na população do presente estudo, é possível que, assim como no trabalho descrito acima por Kammholz e colaboradores (2001), a introdução do gene *Sr36* em ‘BRS 194’ teria ocorrido através de um bloco de cromatina de *T. timopheevii*. Este bloco por sua vez, estaria carregando novos genes dessa espécie para o genoma do trigo, o qual supostamente, assim como a translocação envolvendo o centeio (1BL.1RS), poderia estar diretamente interligado às causas da segregação não Mendeliana observada na população DH ‘Toropi’ x ‘BRS 194’.

A resistência genética encontrada em ‘BRS 194’ e em ‘Toropi’ é de grande potencial ao melhoramento do trigo. Porém, é importante enfatizar que as linhagens DH resultantes deste cruzamento são ainda mais preciosas, pois, ao serem desenvolvidas, combinaram as qualidades (resistência) de ambos os parentais à ferrugem-da-folha e do colmo. Dentre os genótipos obtidos, a linhagem DH PF113438 se destaca, de maneira que ao ser fenotipada, mostrou reunir as mais completas camadas de proteção, provenientes de ambos os parentais.

Além disso, a utilização desse germoplasma permite que a introgressão de genes-alvo seja facilitada, diferentemente da dificultosa transferência direta a partir de espécies relacionadas (como *T. timopheevii* e *S. cereale*) para o genoma do trigo comum. Ou seja, devido à constituição genômica das linhas DHs (de trigo hexaploide), a aplicação dos genes de resistência (como *Sr36* e *Sr31*) é imediata em programas de melhoramento genético de trigo.

## 5 CONCLUSÃO

Os estudos de ferrugem-da-folha revelam a resistência de planta adulta de ‘Toropi’, exibindo baixos tipos de infecção nesta variedade. Para ferrugem-do-colmo, até onde se tem conhecimento, este é o primeiro relato demonstrando resistência de plântula em ‘Toropi’, sendo esta, possivelmente, conferida pelo gene *Sr9e*.

O ensaio de ferrugem-da-folha com a raça MCJ-HN revelou que ‘BRS 194’ possui resistência de plântula do tipo monogênica, cujo gene precisa ser investigado em trabalhos futuros. O presente estudo também demonstra que ‘BRS194’, portador da translocação 1BL.1RS, carrega o gene *Sr31*, cuja resistência foi quebrada com o surgimento da raça supervirulenta de ferrugem-do-colmo Ug99. Mesmo possuindo *Sr31*, ‘BRS 194’ expressa resistência do tipo imune frente à Ug99. Foi demonstrada a presença de *Sr36* em ‘BRS 194’, o que é então sustentado pela análise molecular e pelo pedigree desta variedade. Para algumas raças norte americanas, a resposta de ‘BRS 194’ difere da linha diferencial *Sr36*, indicando um gene adicional envolvido na resistência à *P. graminis*.

A produção das linhagens duplo-haploides do cruzamento ‘Toropi’ x ‘BRS 194’ demonstra a combinação dos tipos de resistência de ambas as variedades em graus variados. Dentre as linhagens produzidas, PF113438 se destaca por ser a mais completa, oferecendo traços diversificados de proteção contra ferrugem-da-folha e ferrugem-do-colmo. Esta combinação única de resistência faz da linhagem PF113438 um material precioso, cuja condição de trigo hexaploide viabiliza sua aplicação direta em programas de melhoramento genético de trigo.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A velocidade de evolução dos patógenos comparada aos progressos obtidos nos programas de melhoramento genético vegetal denota uma grande vantagem do primeiro em relação às plantas, principalmente quando envolvem a criação de cultivares com poucos genes de resistência. Logo, é imperativo que no melhoramento genético de trigo haja a busca constante de novas fontes de resistência contra patógenos. Esta urgência permanente motivou a realização do presente trabalho, levando a novas descobertas no que diz respeito às variedades brasileiras de trigo ‘Toropi’ e ‘BRS 194’.

Este estudo abre perspectivas para a incorporação de novas fontes de resistência às ferrugens-da-folha e do colmo. Embora trabalhos futuros ainda sejam necessários para a caracterização completa desses genes, com o auxílio de ferramentas biotecnológicas, as resistências genéticas encontradas em ‘Toropi’ e BRS 194’ poderão ser direcionadas e aplicadas estrategicamente em programas de melhoramento de trigo.

A construção de maneira acelerada de cultivares resistentes e modernas contribuirá para que os melhoristas estejam um passo à frente na batalha contra os patógenos de *Puccinia*. Neste cenário, especialmente no que se refere à raça Ug99, foi possível apresentar antecipadamente uma variedade brasileira adaptada e resistente, sendo esta, uma circunstância ímpar em que a pesquisa se coloca antes do advento do patógeno, uma vez que a Ug99 ainda não foi detectada no Brasil.



## REFERÊNCIAS

- ABOUKHADDOUR, R.; FETCH, T.; MCCALLUM, B. D.; HARDING, M. W.; BERES, B. L.; GRAF, R. J. Wheat diseases on the prairies: A Canadian story. **Plant Pathology**, v. 69, n. 3, p. 418-432, 2020.
- ADAMSKI, T.; KRYSKOWIAK, K.; KUCZYŃSKA, A.; MIKOŁAJCZAK, K.; OGRODOWICZ, P.; PONITKA, A.; SURMA, M.; ŚLUSARKIEWICZ-JARZINA, A. Segregation distortion in homozygous lines obtained via anther culture and maize doubled haploid methods in comparison to single seed descent in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 6-13, 2014.
- AGACHE, S.; BACHELIER, B.; DE BUYSER, J.; HENRY, Y.; SNAPE, J. W. Genetic analysis of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 77, p. 7-11, 1989.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2005.
- ALLARD, R. W.; SHANDS, R. G. Inheritance of resistance to stem rust and powdery mildew in cytologically stable spring wheats derived from *Triticum timopheevi*. **Phytopathology**, v. 44, p. 266-274, 1954.
- ALMEIDA, A. B.; CHAVES, M. S.; BRAMMER, S. P.; BAGGIO, M. I. Identificação de fontes de resistência à ferrugem-da-folha do trigo em acessos de *Aegilops tauschii*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 349-352, 2007.
- ALVES, G. C. S.; SANTOS, L. C.; DUARTE, H. S. S.; DIAS, V.; ZAMBOLIM, L.; ROCHA, M. R. Escala diagramática para quantificação da ferrugem da folha do trigo. **Multi Science Journal**, v. 1, n. 1, p. 128-133, 2015.
- ANTONELLI, E. F. **La roya negra dei tallo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*). Una illustre ausente de los campos de trigo. Por quanto tiempo más?** 1. ed. Buenos Aires: Editado por Antonelli, E. F., 2000.
- AOUN, M.; KOLMER, J. A.; ROUSE, M. N.; ELIAS M. E.; BREILAND, M.; BULBULA W. D.; CHAO, S.; ACEVEDO, M. Mapping of novel leaf rust and stem rust resistance genes in the Portuguese durum wheat landrace PI 192051. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 9, n. 8, p. 2535-2547, 2019.
- AUSEMUS E. R.; HARRINGTON, J. B.; REITZ, L. P.; WORZELLA, L. L. A summary of genetic studies in hexaploid and tetraploid wheats. **Journal of American Society Agronomy**, v. 38, p. 1082-1099, 1946.

- BADU, M.; TRIPATHY, B.; SAHU, G. S.; JENA, A. K. Role of doubled haploids in vegetable crop improvement. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 6, p. 384-389, 2017.
- BAILEY, K. L.; GOSSEN, B. D.; GUGEL, R. K.; MORRALL, R. A. A. **Diseases of field crops in Canada**. 3. ed. Saskatoon: Canadian Phytopathological Society, 2003.
- BANSAL, M. KAUR, S.; DHALIWAL, H. S.; BAINS, N. S.; BARIANA, H. S.; CHHUNEJA, P.; BANSAL, U. K. Mapping of *Aegilops umbellulata*-derived leaf rust and stripe rust resistance loci in wheat. **Plant Pathology**, v. 66, n. 1, p. 38-44, 2017.
- BARCELLOS, A. L.; ROELFS, A. P.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. de. Inheritance of adult plant leaf rust resistance in the Brazilian wheat cultivar Toropi. **Plant Disease**, v. 84, n. 1, p. 90-93, 2000.
- BARCELLOS, A. Raça do agente causal de ferrugem-do-colmo assusta países produtores de trigo. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 122, 2011. Documento online. Disponível em: < [http://www.plantiodireto.com.br/?body=cont\\_int&id=1036](http://www.plantiodireto.com.br/?body=cont_int&id=1036)>. Acesso em: 28 dez. 2020.
- BARIANA, H. S.; HAYDEN, M. J.; AHMED, N. U.; BELL, J. A.; SHARP, P. J.; MCINTOSH, R. A. Mapping of durable adult plant and seedling resistances to stripe rust and stem rust diseases in wheat. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 52, p. 1247-1255, 2001.
- BATTISTELLI, G. M.; VON PINHO, R. G.; JUSTUS, A.; COUTO, E. G. O.; BALESTRE, M. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4230-4242, 2013.
- BEDENDO, I. P. Ferrugens. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.872-880.
- BELDEROK, B.; MESDAG, H.; DONNER, D. A. **Bread-making quality of wheat: a century of breeding in Europe**. 1. ed. Netherlands: Springer Science & Business Media, 2013.
- BERZONSKY, W. A.; CLEMENTS, R. L.; LAFEVER, H. N. Identification of 'Amigo' and 'Kavkaz' translocations in Ohio soft red winter wheats (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 81, n. 5, p. 629-634, 1991.
- BHAVANI, S.; HODSON, D. P.; HUERTA-ESPINO, J.; RANDHAWA, M. S.; SINGH, R. P. Progress in breeding for resistance to Ug99 and other races of the stem rust fungus in CIMMYT wheat germplasm. **Frontiers of Agricultural Science and Engineering**, v. 6, n. 3, p. 210, 2019.

BIANCHIN, V.; BARCELLOS, A. L.; REIS, E. M.; TURRA, C. Genetic variability of *Puccinia triticina* Eriks. in Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 2, p. 113-118, 2012.

BIFFEN, R. H. Mendel's laws of inheritance and wheat breeding. **The Journal of Agricultural Science**, v. 1, n. 1, p. 4-48, 1905.

BOLTON, M. D.; KOLMER, J. A.; GARVIN, D. F. Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. **Molecular plant pathology**, v. 9, n. 5, p. 563-575, 2008.

BRAMMER, S. P.; BARCELLOS, A. L.; MORAES-FERNANDES, M. I. B.; MILACH, S. K. Bases genéticas da resistência durável à ferrugem da folha do trigo e estratégias biotecnológicas para o melhoramento no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 5-20, 2000.

BRAMMER, S. P.; BOYD, L. A.; CHAVES, M. S.; MARTINELLI, J. A.; SCAGLIUSI, S. M. M.; CASASSOLA, A.; SILVA, G. B. P.; EREFUL, N. Genetics of leaf rust resistance in the Brazilian wheat cultivar 'Toropi'. **Journal of Basic & Applied Genetics**, v. 27, n. 1, p. 61, 2016.

BRITO, S. G. de. **Otimização de mapeamento genético vegetal via simulação computacional**. 2012. 79f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

BROWN-GUEDIRA, G. L.; SINGH, S.; FRITZ, A. K. Performance and mapping of leaf rust resistance transferred to wheat from *Triticum timopheevii* subsp. *armeniacum*. **Phytopathology**, v. 93, p. 784-789, 2003.

CAIERÃO, E.; SCHEEREN, P. L.; SILVA, M. S.; CASTRO, R. L. D. History of wheat cultivars released by Embrapa in forty years of research. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 216-223, 2014.

CALDWELL, R. M. Breeding for general and/or specific plant disease resistance. In: Proceedings of the Third International Wheat Genetics Symposium, 3. ed., 1968, Canberra. **Proceedings...** Canberra: Australian Academy of Science, 1968. p. 263-72.

CASASSOLA, A.; BRAMMER, S. P. Translocações cromossômicas entre trigo e espécies relacionadas e seu potencial uso no melhoramento genético. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 2, p. 235-243, 2012.

CHARMET, G. Wheat domestication: lessons for the future. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, n. 3, p. 212-220, 2011.

CHAVES, M. S.; BARCELLOS, A. L. Especialização fisiológica de *Puccinia triticina* no Brasil em 2002. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 57-62. 2006.

CHAVES, M. S.; BARCELLOS, A. L.; WESP, C. L.; SCHEEREN, P. L.; DEL DUCA, L. J. A.; SÓ E SILVA, M. **Ferrugem da folha do trigo no Brasil: Levantamento de raças ocorrentes em 2002**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2005 (Embrapa Trigo. Comunicado Técnico Online, 146). Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p\\_co146.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co146.htm)>. Acesso em: 6 jan. 2021.

CHAVES, M. S.; MARTINELLI, J. A.; WESP, C. L.; GRAICHEN, F. A. S. The cereal rusts: an overview. **Pest Technology**. v. 2, p. 38-55, 2008.

CHAVES, M. S.; MARTINELLI, J. A.; WESP-GUTERRES C.; GRAICHEN, F. A. S.; BRAMMER, S. P. B.; SCAGLIUSI, S. M.; SILVA DA P. R.; WIETHÖLTER, P.; TORRES, G. A. M.; LAU, E. Y.; CONSOLI, L.; CHAVES, A. L. S. The importance for food security of maintaining rust resistance in wheat. **Food security**, v. 5, n. 2, p. 157-176, 2013.

CHAVES, M. S.; WANYERA, R.; KINYUA, M. G.; NJAU, P.; LIMBE, E.; WESP, C. DE L.; SCHEEREN, P. L.; DEL DUCA, L. DE J. A.; SÓ E SILVA, M.; CAIERÃO, E. Testes com ferrugem do colmo do trigo no Quênia em 2005. In: REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E DE TRITICALE, 38.; REUNIÃO DA COMISSÃO CENTRO-SUL BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E DE TRITICALE, 21., 2006, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 1 CD-ROM.

CHAVES, M. S.; WESP, C. L.; BARCELLOS, A. L.; SCHEEREN, P. L.; SILVA, M. S.; CAIERÃO, E. Superação da resistência qualitativa da cultivar de trigo "BRS 194" por uma nova raça de *Puccinia triticina*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 228-231, 2009.

CHEN, S.; ROUSE, M. N.; ZHANG, W.; ZHANG, X.; GUO, Y.; BRIGGS, J.; DUBCOVSKY, J. Wheat gene *Sr60* encodes a protein with two putative kinase domains that confers resistance to stem rust. **New Phytologist**, v. 225, n. 2, p. 948-959, 2020.

COELHO, M. B.; SCAGLIUSI, S. M. M.; LIMA, M. I. P. M.; CONSOLI, L.; GRANDO, M. F. Androgenic response of wheat genotypes resistant to fusariosis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 5, p. 575-582, 2018.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **A cultura do trigo**. Brasília: Conab, 2017. 218 p. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br> > Acesso em: 20 abr. 2020.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: Safra 2019/20 - Sexto levantamento**. Brasília, Conab, 2020. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/> >. Acesso em: 06 jan. 2021.

COOPER, R. Re-discovering ancient wheat varieties as functional foods. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 5, n. 3, p. 138-143, 2015.

COSTAMILAN, L. M.; SCHEEREN, P. L.; CAIERÃO, E.; SILVA, M. S.; CASTRO, R. L. **Avaliação de oídio em linhagens de trigo da Embrapa em 2015**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2016 (Embrapa Trigo. Comunicado Técnico Online, 157). Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1043063>>. Acesso em: 6 jan. 2021.

CRESPO-HERRERA, L. A.; GARKAVA-GUSTAVSSON, L.; ÅHMAN, I. A systematic review of rye (*Secale cereale* L.) as a source of resistance to pathogens and pests in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Hereditas**, v. 154, n. 1, p. 1-9, 2017.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 4 ed. Viçosa: Editora UFV, 2012.

DADKHODAIE, N. A.; KARAOGLU, H.; WELLINGS, C. R.; PARK, R. F. Mapping genes *Lr53* and *Yr35* on the short arm of chromosome 6B of common wheat with microsatellite markers and studies of their association with *Lr36*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 122, n. 3, p. 479-487, 2011.

DEL DUCA, L. de J. A.; SCHEEREN, P. L.; SÓ E SILVA, M.; SOUSA, C. N. A. de; NASCIMENTO do, J., A.; LINHARES, A. G.; EICHELBERGER, L.; CAIERÃO, E.; PIRES, J. L.; CHAVES, M. S.; COSTAMILAN, L. M.; PRESTES, A. M.; LIMA, M. I. P. M.; MIRANDA, M. Z. de; GUARIENTI, E. M.; VOSS, M.; LUZ da, W. C.; LHAMBY, J. C. B. **Cultivar de trigo BRS 194 testada e indicada para cultivo nas regiões de adaptação 7 e 8 do Paraná e 9 e 10 do Mato Grosso do Sul**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2005 (Embrapa Trigo. Comunicado Técnico Online, 153). Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p\\_co153.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co153.htm)>. Acesso em: 9 nov. 2020.

DEVAUX, P.; LONNET, P.; JEAN, R. Significant higher proportions of 1BL-1RS wheat-rye translocation lines among doubled haploid progenies derived from F1 hybrids between translocated and non-translocated wheat cultivars. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE CELL CULTURE, 7., 1990, Amsterdam. **Proceedings...** Amsterdam: Progress in Plant Cellular and Molecular Biology, 1990. p. 422-426.

DRAZ, I. S.; ABOU-ELSEOUD, M. S.; KAMARA, A. E. M.; ALAA-ELDEIN, O. A. E.; EL-BEBANY, A. F. Screening of wheat genotypes for leaf rust resistance along with grain yield. **Annual Agriculture Science**, v. 60, n. 1, p. 29-39, 2015.

DUBCOVSKY, J.; DVORAK, J. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. **Science**, v. 316, n. 5833, p. 1862-1866, 2007.

DUBIN, H. J.; JOHNSON, R.; STUBBS, R. W. Postulated genes for resistance to stripe rust in selected CIMMYT and related wheats. **Plant Disease**, v. 73, p.472-475. 1989.

DUBIN, H. J.; TORRES, E. Causes and consequences of the 1976-1977 wheat leaf rust epidemic in northwest Mexico. **Annual Review of Phytopathology**, v. 19, n. 1, p. 41-49, 1981.

DUNDAS, I. S.; ANUGRAHWATI, D. R.; VERLIN, D. C.; PARK, R. F.; BARIANA, H. S.; MAGO, R.; ISLAM, M. R. New sources of rust resistance from alien species: meliorating linked defects and discovery. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 58, n. 6, p. 545-549, 2007.

DYCK, P. L.; SAMBORSKI, D. J.; ANDERSON, R. G. Inheritance of adult-plant leaf rust resistance derived from the common wheat varieties Exchange and Frontana. **Canadian Journal of Genetic Cytology**, v. 8, n. 4, p. 665-671, 1966.

DYCK, P. L.; SAMBORSKI, D. L. Host-parasite interactions involving two genes for leaf rust resistance in wheat. In: INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM. 3., 1968, Canberra. **Proceedings...** Canberra: Australian Academy of Science, 1968. p. 245-250.

EHDAIE, B.; WHITKUS, R. W.; WAINES, J. G. Root biomass, water-use efficiency, and performance of wheat-rye translocations of chromosomes 1 and 2 in spring bread wheat 'Pavon'. **Crop Science**. v. 43, p. 710–717, 2003.

EJAZ, M.; IQBAL, M.; SHAHZAD, A.; REHMAN, A.; AHMED, I.; ALI, G. M. Genetic variation for markers linked to stem rust resistance genes in Pakistani wheat varieties. **Crop Science**, v. 52, p. 2638–2648, 2012.

ELLIS, J. G.; LAGUDAH, E. S.; SPIELMEYER, W.; DODDS, P. N. The past, present and future of breeding rust resistant wheat. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 641, 2014.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Características e cuidados com algumas doenças do trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006 (Embrapa Trigo. Documento Online, 64). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPT-2010/40682/1/p-do64.pdf>>. Acesso em: 6 jan. 2021.

FAO. Food and Agriculture Organization. **Wheat stem rust - ug99 (race ttksk)** Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 02 jan. 2021.

FERRIE, A. M. R.; CASWELL, K. L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 104, n. 3, p. 301-309, 2011.

FETCH, T.; JIN, Y.; NAZARI, K.; PARK, R.; PRASHAR, M.; PRETORIUS, Z. Race nomenclature systems: can we speak the same language. In: TECHNICAL WORKSHOP, 2009, Obregón. **Proceedings...** Obregón: BGRI, 2009. p. 61-64.

FETCH, T.; ZEGEYE, T.; PARK, R. F.; HODSON, D.; WANYERA R. Detection of wheat stem rust races TTHSK and PTKTK in the Ug99 race group in Kenya in 2014. **Plant Disease**, v. 100, n. 7, p. 1495-1495, 2016.

FIGUEROA, M.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; SOLOMON, P. S. A review of wheat diseases - a field perspective. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 6, p. 1523-1536, 2018.

FLANDRIN, J. L.; MONTANARI, M. **História da alimentação**. 10. ed. São Paulo: Estação Liberdade, 1998.

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

FOISSET, N.; DELOURME, R. Segregation distortion in androgenic plants. In: JAIN, S. M.; SOPORY, S. K.; VEILLEUX R. E. **In vitro haploid production in higher plants**. Dordrecht: Springer, 1996. p. 189-201.

FOROUGHI-WEHR, B.; ZELLER, F. J. In Vitro microspore reaction of different German wheat cultivars. **Theoretical Applied Genetics**, v. 79, p. 77-80, 1990.

FORSTER, B. P.; HEBERLE-BORS, E.; KASHA, K. J.; TOURAEV, A. The resurgence of haploids in higher plants. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 8, p. 368-375, 2007.

FRIEBE, B.; JIANG, J.; RAUPP, W. J.; MCINTOSH, R. A.; GILL, B. S. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: Current status. **Euphytica**, v. 91, n. 1, p. 59-87, 1996.

FRITZ, A. K., COX, T. S., GILL, B. S., SEARS, R. G. Molecular Marker-Facilitated Analysis of Introgression in Winter Wheat × *Triticum tauschii* Populations. **Crop Science**, v. 35, n. 6, p. 1691-1695, 1995.

GERMÁN, S.; BARCELLOS, A.; CHAVES, M.; KOHLI, M. M.; CAMPOS, P.; VIEDMA, L. Q. The situation of common wheat rusts in the Southern Cone of America and perspectives for control. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 58, n. 6, p. 620-630, 2007.

GERMAN, S.; KOHLI, M.; CHAVES, M.; BARCELLOS, A.; NISI, J.; ANNONE, J.; MADARIAGA, R.; DE VIEDMA, L. Breakdown of resistance of wheat cultivars and estimated losses caused by recent changes in the leaf rust population in South America. In: INTERNATIONAL CEREAL RUSTS AND POWDERY MILDEWS CONFERENCE, 11., 2004, Norwich. **Proceedings...** Norwich: John Innes Centre, 2004, p. 21.

GERMANÀ, M. A. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 5, p. 839-857, 2011.

GRAYBOSCH, R. A. Uneasy Unions: Quality Effects of Rye Chromatin Transfers to Wheat. **Journal of Cereal Science**, v. 33, n.1, p. 3-16, 2001.

GUZY-WRÓBELSKA, J.; SZAREJKO, I. Molecular and agronomic evaluation of wheat doubled haploid lines obtained through maize pollination and anther culture methods. **Plant Breeding**, v. 122, n. 4, p. 305-313, 2003.

HAFEEZ A. The Wheat R Gene Atlas – **Mapping The Way Towards Durable Resistance Genes**, BGRI, 2021. Disponível em: <<https://bgri.cornell.edu/wheat-r-gene-atlas/>>. Acesso em: 08 fev. 2021.

HAILE, J. K.; ROUML, M. S. Status of genetic research for resistance to Ug99 race of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*: A review of current research and implications. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 50, p. 6670-6680, 2013.

HENRY, Y.; BERNARD, S.; BERNARD, M.; GAY, G.; MARCOTTE, J.-L.; BUYSER, J. D. Nuclear gametophytic genes from chromosome arm 1RS improve regeneration of wheat microspore-derived embryos. **Genome**, v. 36, n. 5, p. 808–814, 1993.

HENRY, Y.; DE BUYSER, J. Effect of the 1B/1R translocation on anther culture ability in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Cell Reports**, v. 4, p. 307-310, 1985.

HERRERA-FOESSEL, S. A.; LAGUDAH, E. S.; HUERTA-ESPINO, J.; HAYDEN, M. J.; BARIANA, H. S.; SINGH, D.; SINGH, R. P. New slow-rusting leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr67* and *Yr46* in wheat are pleiotropic or closely linked. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 122, n. 1, p. 239-249, 2011.

HERRERA-FOESSEL, S. A.; SINGH, R. P.; HUERTA-ESPINO, J.; ROSEWARNE, G. M.; PERIYANNAN, S. K.; VICCARS, L.; CALVO-SALAZAR, V.; LAN, C.; LAGUDAH, E. S. *Lr68*: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 124, n. 8, p. 1475-1486, 2012.

HERRERA-FOESSEL, S. A.; SINGH, R. P.; LILLEMO, M.; HUERTA-ESPINO, J.; BHAVANI, S.; SINGH, S.; LAN, C.; CALVO-SALAZAR, V.; LAGUDAH, E. S. *Lr67/ Yr46* confers adult plant resistance to stem rust and powdery mildew in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 127, n. 4, p. 781-789, 2014.

HEUN, M.; FRIEBE, B. Introgression of powdery mildew resistance from rye into wheat. **Phytopathology**, v. 80, n. 3, p. 242-245, 1990.

HIEBERT, C. W.; FETCH, T. G.; ZEGEYE, T.; THOMAS, J. B.; SOMERS, D. J.; HUMPHREYS, D.; MCCALLUM, B. D.; CLOUTIER, S.; SINGH, D.; KNOTT, D. R. Genetics and mapping of seedling resistance to Ug99 stem rust in Canadian wheat cultivars ‘Peace’ and ‘AC Cadillac’. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 122, n. 1, p. 143-149, 2011.

HIEBERT, C. W.; KASSA, M. T.; MCCARTNEY, C. A.; YOU, F. M.; ROUSE, M. N.; FOBERT, P.; FETCH, T. G. Genetics and mapping of seedling resistance to *Ug99* stem



rust in winter wheat cultivar Triumph 64 and differentiation of *SrTmp*, *SrCad*, and *Sr42*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, n.11, p. 2171–2177, 2016.

HOLLENHORS, M. M.; JOPPA, L. R. Chromosomal location of the genes for resistance to greenbug in 'Lago' and 'Amigo' wheats. **Crop Science**, v. 23, p. 91–93, 1983.

HOWELL, T.; HALE, I.; JANKULOSKI, L.; BONAFEDE, M.; GILBERT, M.; DUBCOVSKY, J. Mapping a region within the 1RS. 1BL translocation in common wheat affecting grain yield and canopy water status. **Theoretical and applied genetics**, v. 127, n. 12, p. 2695-2709, 2014.

HUSSAIN, M.; HASSAN, S. F.; KIRMANI, M. A. S Virulence in *Puccinia recondita* Rob. ex. Desm. f. sp. tritici in Pakistan during 1978 and 1979. In: EUROPEAN AND MEDITERRANEAN CEREAL RUST CONFERENCE, 5., 1980, Bari, Italy. **Proceedings...** Bari: European and Mediterranean Cereal Rusts Foundation, 1980, p. 179-184.

JIN, Y., SINGH, R. P. Resistance in U.S. wheat to recent Eastern African isolates of *Puccinia graminis* f. sp. tritici with virulence to resistance gene *Sr31*. **Plant Diseases**, v. 90, p. 476-480, 2006.

JIN, Y.; PRETORIUS, Z. A.; SINGH, R. P.; FETCH, T. J. Detection of virulence to resistance gene *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. tritici. **Plant Disease**, v. 92, n. 6, p. 923-926, 2008.

JIN, Y.; SINGH, R.; WARD, R.; WANYERA, R.; KINYUA, M.; NJAU, P.; FETCH, T.; PRETORIUS, Z. A.; YAHYAOU, A. Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. tritici. **Plant Disease**, v. 91, n. 9, p. 1096-1099, 2007.

JIN, Y.; SZABO, L. J.; ROUSE, M. N.; FETCH, J. R. T.; PRETORIUS, Z. A.; WANYERA, R.; NJAU, P. Detection of virulence to resistance gene *Sr36* within the TTKS race lineage of *Puccinia graminis* f. sp. tritici. **Plant Disease**, v. 93, n. 4, p. 367-370, 2009.

JOHNSON, R. Durable resistance to yellow (stripe) rust in wheat and its implications in plant breeding. In: SIMMONDS, N. W.; RAJARAM, S. (Eds.), **Breeding strategies for resistance to the rusts of wheat**. 1. ed. Mexico: CIMMYT, 1988. p. 63–75.

JØRGENSEN, L. N.; HOVMØLLER, M. S.; HANSEN, J. G.; LASSEN, P.; CLARK, B.; BAYLES, R.; RODEMANND, B.; FLATHE, K.; JAHNE, M.; GORAL, T.; CZEMBORF, J. J.; CHEYRONG, P.; MAUMENEG, C.; DE POPEH, C.; BAN, R.; NIELSEN, G.; C.; BERG, G. IPM strategies and their dilemmas including an introduction to www. eurowheat. org. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, n. 2, p. 265-281, 2014.

KAMMHOLZ, S. J.; CAMPBELL, A. W.; SUTHERLAND, M. W.; HOLLAMBY, G. J.; MARTIN, P. J.; EASTWOOD, R. F.; BARCLAY, I.; WILSON, R. E.; BRENNAN, P. S.; SHEPPARD, J. A. Establishment and characterisation of wheat genetic mapping populations. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 52, n. 12, p. 1079-1088, 2001.

KHAN, M. H.; BUKHARI, A.; DAR, Z. A.; RIZVI, S. M. Status and strategies in breeding for rust resistance in wheat. **Agricultural Sciences**, v. 4, n. 6, p. 292, 2013.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: doenças do trigo**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.

KNOTT, D. R. **The wheat rusts: Breeding for resistance**. 1. ed. Berlin: Springer, 1989.

KNOTT, D. R. Using polygenic resistance to breed for stem rust resistance in wheat. In: SIMMONDS, N. W.; RAJARAM, S. **Breeding Strategies for Resistance to the Rusts of Wheat**. 1. ed. México: CIMMYT, 1988. p. 39-47.

KOLMER, J. A.; BERNARDO, A.; BAI, G.; HAYDEN, M. J.; CHAO, S. Adult Plant Leaf Rust Resistance Derived from Toropi Wheat is Conditioned by *Lr78* and Three Minor QTL. **Phytopathology**, v. 108, n. 2, p. 246-253, 2018a.

KOLMER, J. A.; GARVIN, D. F.; HAYDEN, M.; SPIELMEYER, W. Adult plant leaf rust resistance derived from the wheat landrace cultivar Americano 44d is conditioned by interaction of three QTL. **Euphytica**, v. 214, n. 3, p. 59, 2018b.

KOLMER, J. A.; LIU, J. Q. Simple inheritance of partial resistance to leaf rust in two wheat cultivars. **Plant Pathology**, v. 50, n. 5, p. 546-551, 2001.

KOLMER, J. Leaf rust of wheat: pathogen biology, variation and host resistance. **Forests**, v. 4, n. 1, p. 70-84, 2013.

KOU, Y.; WANG, S. Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance. **Current opinion in plant biology**, v. 13, p. 181-185, 2010.

LAN, C.; HALE, I. L.; HERRERA-FOESSEL, S. A.; BASNET, B. R.; RANDHAWA, M. S.; HUERTA-ESPINO, J.; DUBCOVSKY, J.; SINGH, R. P. Characterization and mapping of leaf rust and stripe rust resistance loci in hexaploid wheat lines UC1110 and PI610750 under Mexican environments. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1450, 2017.

LAPITAN, N. L. V.; PENG, J.; SHARMA, V. A high-density map and PCR markers for Russian wheat aphid resistance gene *Dn7* on chromosome 1RS/1BL. **Crop Science**, v. 47, n. 2, p. 811-818, 2007.

LAU, D.; SANTANA, F. M.; MACIEL, J. L. N.; FERNANDES, J. M. C.; COSTAMILAN, L. M., CHAVES, M. S.; LIMA, M. I. P. M. Doenças de trigo no Brasil. In: PIRES, J. L. F.; VARGAS, L.; CUNHA, G. R. da. **Trigo no Brasil: bases para produção competitiva e sustentável**. 1.ed. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2011. p. 283-324.

LEE, A.; TRINH, C. S.; LEE, W. J.; KIM, M.; LEE, H.; PATHIRAJA, D.; CHOI, I.; CHUNG, N.; CHOI, C.; LEE, B. C.; LEE, H. Characterization of two leaf rust-resistant *Aegilops tauschii* accessions for the synthetic wheat development. **Applied Biological Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 1-14, 2020.

LEE, Y. J.; SEO, Y. W. Development of gene-based markers for the identification of wheat-rye translocations possessing 1RS. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 43, n. 4, p. 241-248, 2015.

LEFEBVRE, D.; DEVAUX, P. Doubled haploids of wheat from wheat x maize crosses: genotypic influence, fertility and inheritance of the 1BL-1RS chromosome. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, n. 8, p. 1267-1273, 1996.

LEONARD, K. J.; SZABO, L. J. Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. **Molecular Plant Pathology**, v. 6, n. 2, p. 99-111, 2005.

LEONOVA, I. N., BUDASHKINA, E. B., KALININA, N. P., RÖDER, M. S., BÖRNER, A., SALINA, E. A. *Triticum aestivum* × *Triticum timopheevii* introgression lines as a source of pathogen resistance genes. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 47, p. 47-49, 2011.

LI, J.; SHI, L.; WANG, X.; ZHANG, N.; WEI, X.; ZHANG, L.; YANG, W.; LIU, D. Leaf Rust Resistance of 35 Wheat Cultivars (Lines). **Journal of Plant Pathology and Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 429, 2018.

LONG, D. L.; KOLMER, J. A. A North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. **Phytopathology**, v. 79, p. 525–529, 1989.

LUPTON, F. G. H. History of wheat breeding. In: LUPTON, F. **Wheat breeding**. 1. ed. Netherlands: Springer, 1987. p. 51-70.

MACHADO, A. Construção histórica do melhoramento genético de plantas: do convencional ao participativo. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 9, n. 1, p. 35-50, 2014.

MAGO, R.; MIAH, H.; LAWRENCE, G. J.; WELLINGS, C. R.; SPIELMEYER, W.; BARIANA, H. S.; MCINTOSH, R. A.; PRYOR, A. J.; ELLIS, J. G. High-resolution mapping and mutation analysis separate the rust resistance genes *Sr31*, *Lr26* and *Yr9* on the short arm of rye chromosome 1. **Theoretical and applied genetics**, v. 112, n. 1, p. 41-50, 2005.

MAGO, R.; SPIELMEYER, W.; LAWRENCE, G. J.; LAGUDAH, E. S.; ELLIS, J. G.; PRYOR, A. Identification and mapping of molecular markers linked to rust resistance genes located on chromosome 1RS of rye using wheat-rye translocation lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 8, p. 1317-1324, 2002.

MAINS, E. B.; LEIGHTY, C. E.; JOHNSTON, C. O. Inheritance of resistance to leaf rust *Puccinia triticina* Erikss, in crosses in common wheat *Triticum vulgare* Vill. **Journal of Agriculture Research**, v. 32, p. 931–971, 1926.

MARAIS, G. F.; HORN, M.; DU TORR, F. Intergeneric transfer (rye to wheat) of a gene (s) for Russian wheat aphid resistance. **Plant Breeding**, v. 113, n. 4, p. 265-271, 1994.

MARASAS, C. N.; SMALE, M.; SINGH, R. P. **The economic impact in developing countries of leaf rust resistance in CIMMYT- related spring wheat**. 1. ed. Mexico: CIMMYT. 2004.

MATER, Y.; BAENZIGER, S.; GILL, K.; GRAYBOSCH, R.; WHITCHER, L.; BAKER, C.; SPECHT, J., DWEIKAT, J. Linkage mapping of powdery mildew and greenbug resistance genes on recombinant 1RS from 'Amigo' and 'Kavkaz' wheat-rye translocations of chromosome 1RS.1AL. **Genome**, v. 47, n. 2, p. 292-298, 2004.

MATIELLO, R. R.; BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. D. Resistência das plantas a moléstias fúngicas. **Ciencia Rural**, v. 27, n. 1, p. 161-168, 1997.

MCCALLUM, B. D.; SETO-GOH, P.; FOSTER, A.; XUE A. Physiological specialization of *Puccinia triticina*, the causal agent of wheat leaf rust, in Canada in 2012. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 40, n. 3, p. 434-441, 2018.

MCINTOSH, R. A.; DUBCOVSKY, J.; ROGERS, J. W.; MORRIS, C. F.; APPELS, R.; XIA, X. C. Catalogue of gene symbols for wheat: 2013-14 Supplement. **Annual Wheat Newsletter**, v. 58, p. 52, 2013.

MCINTOSH, R. A.; DUBCOVSKY, J.; ROGERS, W. J.; MORRIS, C. F.; APPELS, R.; XIA, X. C. Catalogue of gene symbols for wheat: 2008 supplement. **Annual Wheat Newsletter**, v. 55, p. 256-278, 2009.

MCINTOSH, R. A.; DUBCOVSKY, J.; ROGERS, W. J.; MORRIS, C. F.; APPELS, R.; XIA, X. C. Catalogue of gene symbols for wheat: 2017-2018 supplement. **Annual Wheat Newsletter**, v. 63, p. 107-121, 2017.

MCINTOSH, R. A.; HART, G. E.; GALE, M. D. Catalogue of gene symbols for wheat. In: INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 8., 1995, Beijing. **Proceedings...** Beijing: China Agricultural Sciencetech Press, 1995. p. 1333–1500.

MELLERS, G.; AGUILERA, J. G.; BIRD, N.; BONATO, A. L. V.; BONOW, S.; CAIERÃO, E.; CONSOLI, L.; SANTANA, F. M.; SIMMONDS, J.; STEED, A.; TORRES, G. A. M.; UAUY, C.; WRIGHT, T. I. C.; SCHEEREN, P. L.; NICHOLSON, P.; COCKRAM J. Genetic Characterization of a Wheat Association Mapping Panel Relevant to Brazilian Breeding Using a High-Density Single Nucleotide Polymorphism Array. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 10, n. 7, p. 2229-2239, 2020.

MESSMER, M. M.; SEYFARTH, R.; KELLER, M.; SCHCHERMAYR, G.; WINZELER, M.; ZANETTI, S.; FEUILLET, C.; KELLER, B. Genetic analysis of durable leaf rust resistance in winter wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, n. 3, p. 419-431, 2000.

MISHRA, R.; RAO, G. J. N. In-vitro androgenesis in rice: advantages, constraints and future prospects. **Rice Science**, v. 23, n. 2, p. 57-68, 2016.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. de; STIVAL, A. L.; BRAMMER, S. P.; GRANDO, M. F Haplodiploidização: genética e melhoramento. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 1 ed. Brasília: Embrapa/CBAB, 1999. p. 569-612.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. Obtenção de Plantas Haploides através da cultura de anteras In: TORRES A. C.; CALDAS L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. 1 ed. Brasília: EMBRAPA/ABCTP, 1990. p. 311-332.

MORENO-SEVILLA, B.; BAENZIGER, P. S.; PETERSON, C. J.; GRAYBOSCH, R. A.; MCVEY, D. V. The 1BL/1RS translocation: agronomic performance of F3-derived lines from a winter wheat cross. **Crop Science**, v. 35, n. 4, p. 1051-1055, 1995.

MUROVEC, J.; STAJNER, N.; JAKSE, J.; JAVORNIK, B. Microsatellite marker for homozygosity testing of putative doubled haploids and characterization of *Mimulus* species derived by a cross-genera approach. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 132, n. 5, p. 659-663, 2007.

NAZARI, K.; AL-MAAROOF, E.; KURTULUS, E.; KAVAZ, H.; HODSON, D.; OZSEVEN I. First Report of Ug99 Race TTKTT of Wheat Stem Rust (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) in Iraq. **Plant Disease** (Online), 2021. Disponível em <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS-02-21-0404-PDN>> Acesso em: 23 abr. 2021.

NEWCOMB, M.; OLIVERA, P. D.; ROUSE, M. N.; SZABO, L. J.; JOHNSON, J.; GALE, S.; LUSTER, D. G.; WANYERA, R.; MACHARIA, G.; BHAVANI, S.; HODSON, D.; PATPOUR, M.; HOVMØLLER, M. S. FETCH, T. G.; JIN, Y. Kenyan isolates of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* from 2008 to 2014: virulence to *SrTmp* in the Ug99 race group and implications for breeding programs. **Phytopathology**. v. 106, n. 7, p. 729–736, 2016.

NIKS, R. E.; DEKENS, R. G. Prehaustorial and posthaustorial resistance to wheat leaf rust in diploid wheat seedlings. **Phytopathology**, v. 81, p. 847–851, 1991.

OELKE, L. M.; KOLMER, J. A. Genetics of leaf rust resistance in spring wheat cultivars Alsen and Norm. **Phytopathology**, v. 95, n. 7, p. 773-778, 2005.

OLIVEIRA, de G. M.; PEREIRA, D. D.; DE CAMARGO, L. C. M.; BALAN, M. G.; CANTERI, M. G.; IGARASHI, S.; ABI SAAB, O. J. G. Dose e taxa de aplicação de fungicida no controle da ferrugem da folha (*Puccinia triticina*) e da mancha amarela (*Pyrenophora tritici repentis*) do trigo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, p. 17-30, 2015.

OLIVEIRA, G. M. D.; PEREIRA, D. D.; CAMARGO, L. C. M. D.; BALAN, M. G.; CANTERI, M. G.; IGARASHI, S.; SAAB, O. J. G. A. Control of wheat leaf rust (*Puccinia triticina*) at diferente timings of fungicide application. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 4, p. 436-441, 2013.

OLIVER, R. P. A reassessment of the risk of rust fungi developing resistance to fungicides. **Pest Management Science**, v. 70, n. 11, p. 1641-1645, 2014.

OLIVERA, P. D.; JIN, Y.; ROUSE, M.; BADEBO, A.; FETCH T.; SINGH, R. P.; YAHYAOU, A. Races of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* with combined virulence to *Sr13* and *Sr9e* in a field stem rust screening nursery in Ethiopia. **Plant disease**, v. 96, n. 5, p. 623-628, 2012.

PARDEY, P.; BEDDOW, J.; KRITICOS, D.; HURLEY, T.; PARK, R.; DUVEILLER, E.; SUTHERST, R.; BURDON, J.; HODSON, D. Right-sizing stem rust research. **Science**, v. 340, n. 6129, p. 147-148, 2013.

PARK, O. K. Proteomic studies in plants. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 133-138, 2004.

PARK, R. F. Wheat: Biotrophic Pathogen Resistance. Reference Module in Food Science. In: PARK, R. F. **Agronomy of Grain Growing**. 1. ed. Online Elsevier. 2016. p. 1-9.

PATIAL, M.; PAL, D.; THAKUR, A.; BANA, R. S.; PATIAL S. Doubled haploidy techniques in wheat (*Triticum aestivum* L.): an overview. **The National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 89, p. 27-41, 2019.

PATPOUR, M.; HOVMØLLER, M. S.; JUSTESEN, A. F.; NEWCOMB, M.; OLIVERA, P.; JIN, Y.; SZABO, J.; HODSON, D.; SHAHIN, A.; WANYERA, R.; HABARUREMA, I.; WOBIBI, S. Emergence of virulence to *SrTmp* in the Ug99 race group of wheat stem rust, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, in Africa. **Plant Disease**, v. 100, n. 2, p. 522, 2016.

PIANA, C. F. B.; CARVALHO, F. I. F. Trigo. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. **Origem e evolução de plantas cultivadas**. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 821-852.

POEHLMAN, J. M. Reproduction in crop plants. In: POEHLMAN, J. M. **Breeding Field Crops**. 1 ed. Dordrecht: Springer, 1987. p. 16-37.

PRETORIUS, Z. A.; SINGH, R. P.; WAGOIRE, W. W.; PAYNE, T. S. Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr31* in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda. **Plant Disease**, v. 84, n. 2, p. 203-203, 2000.

PURNHAUSER, L.; BONA, L.; LANG, L. Identification of *Sr31* and *Sr36* stem rust resistance genes in wheat cultivars registered in Hungary. **Cereal Research Communications**, v. 39, n. 1, p. 53-66, 2011.

QUIRINO, B. F.; CANDIDO, E. S.; CAMPOS, P. F.; FRANCO, O. L.; KRÜGER, R. H. Proteomic approaches to study plant-pathogen interactions. **Phytochemistry**, v. 71, p. 351-362, 2010.

QURESHI, N.; BARIANA, H.; KUMRAN, V. V.; MURUGA, S.; FORREST, K. L.; HAYDEN, M. J.; BANSAL, U. A new leaf rust resistance gene *Lr79* mapped in chromosome 3BL from the durum wheat landrace Aus26582. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 131, n. 5, p. 1091–1098, 2018.

RABINOVICH, S. V. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivar of *Triticum aestivum* L. **Euphytica**, v. 100, n. 1, p. 323-340, 1998.

REIS, E. M.; CASA, R. T. **Doenças dos cereais de inverno** – diagnose, epidemiologia e controle. Lages: Graphel, 2007.

REN, T. H.; YANG, Z. J.; YAN, B. J.; ZHANG, H. Q.; FU, S. L.; REN, Z. L. Development and characterization of a new 1BL.1RS translocation line with resistance to stripe rust and powdery mildew of wheat. **Euphytica**, v. 169, n. 2, p. 207-213, 2009.

REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 32., 2000, Cruz Alta. **Ata...** Cruz Alta: Comissão Sul Brasileira de Pesquisa de Trigo, 2000. p.141.

REYES, B. G. Genomic and epigenomic bases of transgressive segregation - New breeding paradigm for novel plant phenotypes. **Plant Science**, v. 288, p. 110213, 2019.

RIAZ, A. **Unlocking new sources of adult plant resistance to wheat leaf rust**. 2018. 241f. Tese (Doutorado em Agronomia) – University of Queensland, Australia, 2018.

RINALDO, A.; GILBERT, B.; BONI, R.; KRATTINGER, S. G.; SINGH, D.; PARK, R. F.; LAGUDAH, E.; AYLIFFE, M. The *Lr34* adult plant rust resistance gene provides

seedling resistance in durum wheat without senescence. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 7, p. 894-905, 2017.

ROELFS, A. P. **Estimated losses caused by rust in small grain cereals in the United States - 1918-76**. Saint Paul: U.S. Department of Agriculture (USA), 1978.

ROELFS, A. P.; HUERTA-ESPINO, J; MARSHALL, D. Barley stripe rust in Texas. **Plant Disease**, v. 76, p. 538, 1992.

ROELFS, A. P.; MARTENS, J. W. An international system of nomenclature for *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. **Phytopathology**, v. 78, p. 525–533, 1988.

ROSA, S. B. **The genetics of leaf rust resistance in the durably resistant wheat cultivar ‘Toropi’**. 2013. 151f. Tese (Doutorado em Agronomia) Faculty of Graduate Studies, University of Manitoba, Winnipeg, 2013.

ROSA, S. B.; MCCALLUM, B.; BRULE-BABEL, A.; HIEBERT, C.; SHORTER, S.; RANDHAWA, H. S.; BARCELLOS, A. L. Inheritance of leaf and stripe rust resistance in the Brazilian wheat cultivar ‘Toropi’. **Plant Disease**, v. 100, n. 6, p. 1132-1137, 2016.

ROSA, S. B.; ZANELLA, C. M.; HIEBERT, C. W.; BRÛLÉ-BABEL, A. L.; RANDHAWA, H. S.; SHORTER, S.; BOYD, L. A.; MCCALLUM, B. D. Genetic Characterization of Leaf and Stripe Rust Resistance in the Brazilian Wheat Cultivar ‘Toropi’. **Phytopathology**. v. 109, n. 10, p. 1760-1768, 2019a.

ROSA, S.; ZANELLA, C. M.; HIEBERT, C. W.; FETCH, T.; BRULE-BABEL, A. L.; RANDHAWA, H. S.; SHORTER, S.; BRAMMER, S. P.; BOYD, L.; MCCALLUM, B. D. Novel source of resistances to leaf, stripe and stem rust in the Brazilian wheat cultivar ‘Toropi’. In: INTERNATIONAL WHEAT CONGRESS, 1., 2019, Saskatoon. **Proceedings...** Saskatoon: University of Saskatchewan, 2019b. p. 120.

ROSSI, R. M.; NEVES, M. F. **Estratégias para o trigo no Brasil**. 1 ed. São Paulo: Atlas, 2004.

ROWELL, J. B. Controlled infection by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* under artificial conditions. In: ROELFS, A. P.; BUSHNELL, W. R. **The cereal rusts, vol. 1: Origins, specificity, structure, and physiology**. 1 ed. Orlando: Academic Press, 1984. p. 291-332.

RUBIALES, D.; NIKS, R. E. Combination of mechanisms of resistance to rust fungi as a strategy to increase durability. **Options Mediterraneennes**, v. 40, p. 333-339, 2000.

SAARI, E. E.; PRESCOTT, J. M. World distribution in relation to economic losses. In: ROELFS, A. P.; BUSHNELL, W. R. **The Cereal Rusts: Diseases, Distribution, Epidemiology and Control**. 1 ed., v. 2, Orlando: Academic Press, 1985. p. 259-298.



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

SANTOS, F. F. dos. **Validação de marcadores microssatélites derivados de regiões funcionais do genoma de aveia**. 2010. 54f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

SAPKOTA, S.; HAO, Y.; JOHNSON, J.; BUCK, J.; AOUN, M.; MERGOUM, M. Genome-Wide Association Study of a Worldwide Collection of Wheat Genotypes Reveals Novel Quantitative Trait Loci for Leaf Rust Resistance. **The Plant Genome**, v. 12, n. 3, p. 1-14, 2019.

SAVARY, S.; WILLOCQUET, L.; PETHYBRIDGE, S. J.; ESKER, P.; MCROBERTS, N.; NELSON, A. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, n. 3, p. 430-439, 2019.

SAYED, H.; KAYYAL, H.; RAMSEY, L.; CECCARELLI, S.; BAUM, M. Segregation distortion in doubled haploid lines of barley (*Hordeum vulgare* L.) detected by simple sequence repeat (SSR) markers. **Euphytica**, v. 125, n. 2, p. 265-272, 2002.

SCAGLIUSI, S. M. Establishing isolated microspore culture to produce doubled haploid plants in Brazilian wheat (*Triticum aestivum* L). **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 6, p. 887, 2014.

SCHEEREN, P. L.; FERNANDES, M. I. B. de; BRAMMER, S. P.; ZANATTA, A. C. A.; IORCZESKI, E. J.; SO e SILVA, M.; MOREIRA, J. C. S; SOUSA, C. N. A de; DEL DUCA, L. J. A. de; SILVA, S. D. A. dos; DOTTO, S. R.; BRUNETTA, D.; PANDOLFI, V.; MARTINS, L. F.; GABRIEL, N. E.; LUZA, J. Melhoramento genético de trigo via linhagens duplo-haplóides, na Embrapa Trigo, no período 1995-1998. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE TRIGO, 18., 1999, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. p. 198-203.

SCHROEDER, H. W.; CHRISTENSEN, J. J. Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. **Phytopathology**, v. 53, n. 7, 1, p. 831-838, 1963.

SCHUMANN, G. L., LEONARD, K. J. **Stem rust of wheat (black rust)**. Saint Paul: The Plant Health Instructor, 2000. n. 930. Disponível em: <<https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalbasidio/pdlessons/Pages/StemRust.aspx>> Acesso em: 21 dez. 2020.

SEIFERT, F.; BÖSSOW, S.; KUMLEHN, J.; GNAD, H.; SCHOLTEN, S. Analysis of wheat microspore embryogenesis induction by transcriptome and small RNA sequencing using the highly responsive cultivar “Svilena”. **BMC Plant Biology**, v. 16, p. 1-16, 2016.

SHANK, R. **Wheat stem rust and drought effects on Bale agricultural production and future prospects**: Report on February 17–28 assessment. 1994. Addis Ababa: United Nations Emergencies Unit for Ethiopia, 1994. Disponível em: <[http://www.africa.upenn.edu/eue\\_web/Bale\\_mar.txt](http://www.africa.upenn.edu/eue_web/Bale_mar.txt)>. Acesso em: 15 nov. 2020.

SHARMA, S.; BHAT, P. R.; EHDAIE, B.; CLOSE, T. J.; LUKASZEWSKI, A. J.; WAINES, J. G. Integrated genetic map and genetic analysis of a region associated with root traits on the short arm of rye chromosome 1 in bread wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, n. 5, p. 783-793, 2009.

SHEWRY, P. R. Wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 6, p. 1537-1553, 2009.

SILVA, G. B. P. da; ZANELLA, C. M.; MARTINELLI, J. A.; CHAVES, M. S.; HIEBERT, C. W.; MCCALLUM, B. D.; BOYD, L. A. Quantitative Trait Loci Conferring Leaf Rust Resistance in Hexaploid Wheat. **Phytopathology**, v. 108, n. 12, p. 1344-1354, 2018.

SILVA, P. R. da; BRAMMER, S. P.; GUERRA, D.; MILACH, S. C. K.; BARCELLOS, A. L.; BAGGIO, M. I. Monosomic and molecular mapping of adult plant leaf rust resistance genes in the Brazilian wheat cultivar Toropi. **Genetic Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 2823-2834, 2012.

SILVA, P. R. da; BRAMMER, S. P.; GUERRA, D.; MILACH, S. C. K.; BARCELLOS, A. L.; BAGGIO, M. I. Monosomic and molecular mapping of adult plant leaf rust resistance genes in the Brazilian wheat cultivar Toropi. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 2823-2834, 2012.

SINGH, N. K.; SHEPHERD, K. W.; MCINTOSH, R. A. Linkage mapping of genes for resistance to leaf, stem and stripe rusts and  $\omega$ -secalins on the short arm of rye chromosome 1R. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 80, n. 5, p. 609-616, 1990.

SINGH, R. P., HODSON, D. P., HUERTA-ESPINO, J., JIN, Y., BHAVANI, S., NJAU, P.; HERRERA-FOESSEL, S.; SINGH, P. K.; SINGH, S.; GOVINDAN, V. The Emergence of Ug99 Races of the Stem Rust Fungus is a Threat to World Wheat Production. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 465–481, 2011.

SINGH, R. P.; HODSON, D. P.; HUERTA-ESPINO, J.; JIN, Y.; NJAU, P.; WANYERA, R.; HERRERA-FOESSEL S. A.; WARD, R. W. Will stem rust destroy the world's wheat crop? **Advances in Agronomy**, v. 98, p. 271-309, 2008.

SINGH, R. P.; HODSON, D. P.; JIN, Y.; HUERTA-ESPINO, J.; KINYUA, M.; WANYERA, R.; NJAU, P.; WARD, R. W. Current status, likely migration and strategies to mitigate the threat to wheat production from race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen. **CAB reviews: perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources**, v. 1, n. 54, p. 1-13, 2006.

SINGH, R. P.; HODSON, D. P.; JIN, Y.; LAGUDAH, E. S.; AYLIFFE, M. A.; BHAVANI, S.; ROUSE, M. N.; PRETORIUS, Z. A.; SZABO, L. J.; HUERTA-ESPINO, J.; BASNET, B. R.; LAN, C.; HOVMØLLER, M. S. Emergence and spread of new races of wheat stem rust fungus: continued threat to food security and prospects of genetic control. **Phytopathology**, v. 105, n. 7, p. 872– 884, 2015.

SINGH, R. P.; HUERTA-ESPINO, J.; PFEIFFER, W.; FIGUEROA-LOPEZ, P. Occurrence and Impact of a New Leaf Rust Race on Durum Wheat in Northwestern Mexico from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v. 88, p. 703-708, 2004.

SINGH, R. P.; HUERTA-ESPINO, J.; ROELFS, A. P. The wheat rusts. In: CURTIS, B.C.; RAJARAM, S.; GÓMEZ M. H. **Bread Wheat: Improvement and production**. n. 30. Roma: FAO, 2002.

SINGH, R. P.; KINYUA, M. G.; WANYERA, R.; NJAU, P.; JIN, Y.; HUERTA-ESPINO, J. Spread of a highly virulent race of *Puccinia Graminis Tritici* in eastern Africa: challenges and opportunities. In: BUCK, H. T.; NISI, J. E.; SALOMÓN, N. **Wheat Production in Stressed Environments**. v. 12. Mar del Plata: Springer, 2007. p. 51- 57.

SMIT, C. **Pyramiding of novel rust resistance genes in wheat, utilizing marker assisted selection and doubled haploid technology**. 2013. 123f. Dissertação (Mestrado em ciências agronômicas), Faculty of Agricultural Sciences, Stellenbosch University, Stellenbosch, 2013.

SONG, X.; RAMPITSCH, C.; SOLTANI, B.; MAUTHE, W.; LINNING, R.; BANKS, T.; MCCALLUM, B; BAKKEREN, G. Proteome analysis of wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina*, infection structures enriched for haustoria. **Proteomics**, v. 11, n. 5, p. 944-963, 2011.

SOUSA, C. A. N. de; CAIERÃO, E. **Cultivares de trigo indicadas para cultivo no Brasil e instituições criadoras - 1922 a 2014**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2014.

SOUSA, C. N. A. de. Classification of Brazilian wheat cultivars for aluminium toxicity in acid soils. **Plant Breeding**, v. 117, n. 3, p. 217-221, 1998.

SOUSA, C. N. A. de. **Cultivares de trigo indicadas para cultivo no Brasil e instituições criadoras**. 1 ed. Passo Fundo: Embrapa, 2004.

STAKMAN, E. C.; STEWART, D.M.; LOEGERING, W. Q. **Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici***. 1 ed. Columbia: USDA, 1962.

TEREFE, T.; PRETORIUS, Z. A.; VISSER, B.; BOSHOFF, W. H. P. First report of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* race PTKSK, a variant of wheat stem rust race Ug99 in South Africa. **Plant Disease**, v. 103, n. 6, p. 1421, 2019.

TSILO, T. J.; JIN, Y.; ANDERSON, J. A. Diagnostic microsatellite markers for the detection of stem rust resistance gene *Sr36* in diverse genetic backgrounds of wheat. **Crop Science**, v. 48, n. 1, p. 253-261, 2008.

TYLER, J. M.; WEBSTER, J. A.; MERKLE, O. G. Designations for genes in wheat germplasm conferring greenbug resistance. **Crop Science**, v. 27, p. 526–527, 1987.

VANDERPLANK J. E. **Plant diseases: Epidemics and control**. 1. ed. New York: Academic Press, 1963.

VANDERPLANK, J. E. **Host pathogen interaction in plant disease**. 1. ed. New York: Academic Press, 1982.

VOEGELE, R. T.; MENDGEN, K. Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. **New Phytology**, v. 159, p. 93–100, 2003.

WANYERA, R.; KINYUA, M. G.; JIN, Y.; SINGH, R. P. The spread of stem rust caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, with virulence on *Sr31* in wheat in Eastern Africa. **Plant Disease**, v. 90, n. 1, p. 113-113, 2006.

WESP-GUTERRES, C.; MARTINELLI, J. A.; GRAICHEN, F. A. S.; CHAVES, M. S. Histopathology of durable adult plant resistance to leaf rust in the Brazilian wheat variety Toropi. **European Journal of Plant Pathology**, v. 137, n. 1, p. 181-196, 2013.

WU, S.; PUMPHREY, M.; BAI, G. Molecular Mapping of Stem-Rust-Resistance Gene *Sr40* in Wheat. **Crop Science**, v. 49, n. 5, p. 1681-1686, 2009.

XIAN-LIANG, S.; XUE-ZHEN, S.; TIAN-ZHEN, Z Segregation distortion and its effect on genetic mapping in plants. **Chinese Journal of Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 163-169, 2006.

XU, S. S.; JIN, Y.; KLINDWORTH, D. L.; WANG, R. R.-C.; CAI, X. Evaluation and characterization of seedling resistances to stem rust Ug99 races in wheat–alien species derivatives. **Crop Science**, v. 49, n. 6, p. 2167-2175, 2009.

YAMAGISHI, M., TAKEUCHI, Y., TANAKA, I., KONO, I., MURAI, K., YANO, M. Segregation distortion in F2 and doubled haploid populations of temperate japonica rice. **Journal of Genetics**, v. 89, n. 2, p. 237-241, 2010.

YU, L. X.; BARBIER, H.; ROUSE, M. N.; SINGH, S.; SINGH, R. P.; BHAVANI, S.; HUERTA-ESPINO, J.; SORRELLS, M. E. A consensus map for Ug99 stem rust resistance loci in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 127, n. 7, p. 1561-1581, 2014.

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

ZELLER, F. J. 1B/1R wheat chromosome substitutions and translocations. In: INTERNATIONAL WHEAT GENETIC SYMPOSIUM, 4., 1973, Columbia. **Proceedings...** Columbia, University of Missouri, 1973. p. 209–221.

ZELLER, F. J.; HSAM, S. L. K. Broadening the genetic variability of cultivated wheat by utilizing rye chromatin. In: INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 6., 1983, Kyoto. **Proceedings...** Kyoto: Kyoto University, 1983. p. 161–173.

ZOLDAN, S. M.; BARCELLOS, A. L. Postulation of genes (*Lr*) for resistance to leaf rust in Brazilian wheat cultivars. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 5, p. 495-499, 2002.

## ANEXOS

Anexo I – Composição dos meios de cultura utilizados no desenvolvimento da população duplo-haploide

<b>Composição (mg/L)</b>	<b>NPB-99 (Indução)</b>	<b>GEM (Regeneração)</b>	<b>ROOTING (Enraizamento)</b>
<u>Sais</u>			
KNO <sub>3</sub>	1415	1900	1900
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	232	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200	170	170
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	83	440	440
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	93	370	370
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	165	1650
KI	0,4	-	0,83
MnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	5	22	22
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5	6,2	6,2
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	5	8,6	8,6
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,0125	0,2	0,2
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,0125	0,15	0,15
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,0125	0,25	0,25
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	37,3	37,3	37,3
Na <sub>2</sub> EDTA	27,8	27,8	27,8
<u>Carboidratos</u>			
Maltose	90.000	15.000	-
Sacarose	-	5.000	10.000
Xilose	-	350	-
Ribose	-	350	-
Mio-inositol	50	200	-
<u>Aminoácidos</u>			
L-Glutamina	500	750	-

Continuação...

L-Asparagina	-	60	-
L-Arginina	-	30	-
Ácido $\gamma$ -amino butírico	-	80	-
L-Serina	-	55	-
L-Alanina	-	30	-
L-Cistina	-	10	-
L-Leucina	-	10	-
L-Isoleucina	-	10	-
L-Prolina	-	10	-
L-Lisina	-	10	-
L-Fenilalanina	-	5	-
L-Triptofano	-	5	-
L-Metionina	-	5	-
L-Valina	-	5	-
L-Histidina	-	2,5	-
L-Treonina	-	2,5	-
L-Glicina	-	2,5	-
Vitaminas			
Piridoxina-HCl	0,5	1	-
Tiamina-HCl	5	1	-
Pantotenato	-	0,5	-
Ácido Nicotínico	0,5	1	-
Riboflavina	-	0,2	-
Ácido Fólico	-	0,2	-
Biotina	-	0,2	-
Betaína Clorada	-	7,9	-
Colina-HCl	-	10	-
Ácido Ascórbico	-	0,4	-
Ácidos Orgânicos			



Continuação...

Ácido Málico	-	1.000	-
Ácido Fumárico	-	200	-
Ácido Succínico	-	20	-
Ácido $\alpha$ -cetoglutárico	-	20	-
Ácido Pirúvico	-	5	-
Ácido Cítrico	-	5	-
Ágar	-	-	5.000
Gelrite	-	3.000	-
Reguladores de crescimento			
2,4-D	0,2	-	-
Kinetin	0,2	-	-
PAA	1	-	0,5
Outros			
Espermina	-	1	-
Espermidina	-	4	-
Cefotaxima	0,0857	-	-
Ph	7	5,8	6

---

Anexo II – Chave norte americana para nomenclatura de isolados de ferrugem-do-colmo do trigo

	Conjuntos diferenciais de 4 genes (Four gene differential sets)				
	<i>Sr5</i>	<i>Sr21</i>	<i>Sr9e</i>	<i>Sr7b</i>	Set 1
	<i>Sr11</i>	<i>Sr6</i>	<i>Sr8a</i>	<i>Sr9g</i>	Set 2
	<i>Sr36</i>	<i>Sr9b</i>	<i>Sr30</i>	<i>Sr17</i>	Set 3
	<i>Sr9a</i>	<i>Sr9d</i>	<i>Sr10</i>	<i>SrTmp</i>	Set 4
Letra <i>Pgt</i>	<i>Sr24</i>	<i>Sr31</i>	<i>Sr38</i>	<i>SrMcN</i>	Set 5
B	L	L	L	L	
C	L	L	L	H	
D	L	L	H	L	
F	L	L	H	H	
G	L	H	L	L	
H	L	H	L	H	
J	L	H	H	L	
K	L	H	H	H	
L	H	L	L	L	
M	H	L	L	H	
N	H	L	H	L	
P	H	L	H	H	
Q	H	H	L	L	
R	H	H	L	H	
S	H	H	H	L	
T	H	H	H	H	

H = Tipo de infecção alto (3-4)  
L = Tipo de infecção baixo (0-2)

Exemplo: Raça TTKSK (Ug99 original)

Set 1: H H H H = T (Nenhum gene no conjunto é efetivo)  
Set 2: H H H H = T (Nenhum gene no conjunto é efetivo)  
Set 3: L H H H = K (Apenas o gene *Sr36* é efetivo)  
Set 4: H H H L = S (Apenas o gene *SrTmp* é efetivo)  
Set 5: L H H H = K (Apenas o gene *Sr24* é efetivo)

Anexo III- Chave para nomenclatura de isolados de ferrugem-da-folha em trigo (de acordo com Long e Kolmer, adaptado por Bianchin et al. 2012).

**Table 1.** Reaction code of 19 genes of a differential cultivar set to *Puccinia triticina* (Pt), separated into five groups of four genes

Pt code	Type of symptoms produced by the pathogen in the isogenic lines with different <i>Lr</i> genes				
	Group 1	1	2a	2c	3
	Group 2	9	16	24	26
	Group 3	3ka	11	17	30
	Group 4	10	18	21	23
	Group 5	14a	14b	10 + 26	20
B		A	A	A	A
C		A	A	A	V
D		A	A	V	A
F		A	A	V	V
G		A	V	A	A
H		A	V	A	V
J		A	V	V	A
K		A	V	V	V
L		V	A	A	A
M		V	A	A	V
N		V	A	V	A
P		V	A	V	V
Q		V	V	A	A
R		V	V	A	V
S		V	V	V	A
T		V	V	V	V

The result of group 1 will lead to the first letter of the race code; group 2, the second letter; and group 3, the third letter. Similarly, for groups 4 and 5, the fourth and fifth letters, respectively.

A = avirulent; V = virulent.

Adapted from Long & Kolmer (9).



**PPGAgro**  
Programa de Pós-Graduação  
em Agronomia