UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel

Dissertação

# Prospecção de marcadores moleculares associados à resistência à giberela em trigo

**Taiane Peres Viana**

Pelotas, 2013.

**TAIANE PERES VIANA**

# Prospecção de marcadores moleculares associados à resistência à giberela em trigo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em ciências.

Orientador: Prof. PhD. Antonio Costa de Oliveira

Co-Orientador: Prof. Dr. Luciano Carlos da Maia

Pelotas, 2013.

**Banca examinadora:**

Antonio Costa de Oliveira , Ph.D. - Dep. de Fitotecnia, FAEM/UFPel
Beatriz Helena Gomes Rocha Instituto de Biologia – DEZG/UFPel
Edemar Antonio Rossetto UFPel – Dep. De Fitossanidade, FAEM/UFPel
José Antonio González da Silva, Dr. - Dep. de Estudos Agrários, DEAG/UNIJUI

**Dedico ao meu amado marido Charles Gomes Pieper, aos meus pais, Janerlete de Lima Peres e Irineu Rodrigues Viana Filho e a minha irmã Bruna Peres Viana.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu amor incondicional, pelo carinho, por nunca desistir de mim e não deixar que eu o faça, por me amparar em meus momentos tristes.

Ao meu amado marido Charles Gomes por todo amor, amizade, compreensão e companheirismo, e acima de tudo incentivo, esta vitória também é sua.

Aos meus pais, Janerlete e Irineu pelo amor, pelo carinho e incentivos sem fim.

A minha irmã Bruna pelo carinho e amizade.

A grande amiga Michele Santiago pela amizade, pelo carinho, pelo incentivo, por ser sempre atenciosa e compreensiva, sem a qual o caminho com certeza teria sido muito mais difícil.

Aos colegas que me acompanharam desde a graduação Elisane Tesmann e Rodrigo Danielowski.

A todos amigos e estagiários do CGF. Em especial as amigas Glacy Jaqueline Silva e Tatiane Medeiros Sousa, que me acolheram e ampararam carinhosamente em momentos difíceis.

A estagiária Simone Dobner, fiel e dedicada companheira de laboratório.

Ao meu orientador o professor Antônio Costa de Oliveira pela oportunidade de fazer parte do grupo, pela orientação, pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos.

Ao professor Luciano Carlos da Maia, quero agradecer pela amizade, por todos ensinamentos, pelo tempo dedicado, pela compreensão e por todas oportunidades.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel-UFPel, e as instituições de pesquisa CAPES e CNPq por oportunizar minha formação profissional.

Ao Professor Valmor Bianchi e ao Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biolgia/Instituto de Botânica, sem os quais o terceiro capítulo desta dissertação não seria possível.

A todos amigos, familiares, professores e demais pessoas que de alguma forma contribuíram para a minha formação tanto profissional como pessoal.

**Obrigada!!!!!**

## Resumo

VIANA, Taiane Peres **Prospecção de marcadores moleculares associados à resistência a giberela em trigo**. 2013. 81f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Pelotas.

O cultivo do trigo no Brasil é marcado pelo elevado número de doenças capazes de causar danos à produção. Entre as principais doenças que afetam o trigo está a giberela ou fusariose da espiga, causada pelo agente etiológico *Gibberella zeae* (Schw.) Petch*,* (anamorfo *Fusarium graminearum* Schwabe*)* que causa impacto negativos não somente à produtividade mas também a qualidade dos grãos produzidos. As condições ambientais para que a infecção ocorra caracterizam-se com temperaturas de 20-25°C e duração do molhamento foliar de, no mínimo, 48 horas consecutivas. O controle químico é realizado via aplicação de fungicidas a partir do inicio da floração estendendo-se até o final do florescimento, sendo que este tipo de controle caracteriza-se pela sua menor eficiência quando comparado com o controle de doenças foliares. Caso as condições climáticas impeçam a realização das aplicações de fungicidas no período indicado, o controle fica muito dificultado, por outro lado, se não ocorrer clima favorável à infecção, não se justifica o tratamento. A ineficiência dos tratos culturais no controle de giberela, associado à natureza quantitativa da característica de resistência, e o fato de sofrer alta influência do ambiente resultam na necessidade de identificar fontes efetivas de resistência que possam ser utilizadas em programas de melhoramento de trigo. De fato, existem culturas onde o controle das doenças mais importantes ocorre, quase que exclusivamente, por meio da resistência sendo que a identificação de genotipos que contenham resistência é um dos primeiros passos para selicioná-los. Desta forma, é fundamental o conhecimento de cultivares que apresentem níveis de resistência a giberela e métodos que possam identificar estas cultivares. Frente ao exposto o objetivo deste trabalho foi: i) separar genótipos suscetíveis e que contenham diferentes níveis de resistência utilizando avaliações morfológicas e moleculares; ii) verificar a resistência à giberela nas cultivares Frontana e Pampeano. Para isso foram utilizadas avaliações de características morfológicas citadas na literatura e associadas a resistência à giberela, assim como, o meprego de *primers* descritos na literatura significativamente associados à QTL de resistência à giberela. Como resultado do estudo espera-se auxiliar no desenvolvimento de ferramentas que possam ser utilizadas em programas de melhoramento de trigo visando facilitar a identificação de fontes de resistência.



Palavras-chave: *Triticum aestivum* L., *Gibberella zeae* (Schw.) Petch, Fusariose da espiga, microssatélites, SSR.

## Abstract

VIANA , Taiane Peres **Prospection of molecular markers associated with resistance to Fusarium head blight in wheat.** 2013.81p. Dissertation (MSc in Agronomy) . Federal University of Pelotas.

The cultivation of wheat in Brazil is marked by the large number of diseases that can damage the production. Among the major diseases affecting wheat is wheat scab or Fusarium head blight (FHB), caused by the agent *Gibberella zeae* (Schw.) Petch (anamorph *Fusarium graminearum* Schwabe ) that causes negative impact not only on productivity but also the quality of the grain produced. The environmental conditions for infection are temperatures between 20-25°C and 48 consecutive hours of leaf wetness. Chemical control is performed via application of fungicides from the start extending until the end of flowering, and this type of control is characterized by its low efficiency when compared to the disease control. If the weather conditions prevent the aplication of fungicide applications within this period, there is no possibility control, on the other hand, if it does not favorable environment for infection treatment is not justified. The inefficiency of cultural control of FHB, associated with the quantitative trait (QTL- *Quantitative traits loci)*of resistance, and the fact of suffering high influence of the environment results in the need to identify effective sources of resistance that can be used in wheat breeding programs. In fact, there are cultures where control of major diseases occurs almost exclusively through resistance where the identification of genotypes containing resistance is one of the first steps in their selection. Thus it is crucial to understand cultivar present levels of resistance to FHB and methods that can identify these cultivars.The objective of this study was: i) separate susceptible and containing different levels of resistance using molecular and morphological evaluations; ii) determine FHB resistance using cultivars Frontana and Pampeano as a source of resistance. Using morphological assessments cited in the literature and associated with resistance to FHB, as, primers as described in the literature as significantly associated with QTL for resistance to FHB. As a result of the study one expects to develop tools that can be used to facilitate the identification of sources of resistance.



Keywords : *Triticum aestivum* L., *Gibberella zeae* (Schw.) Petch, scab, fusarium head blight, SSR.

## Lista de tabelas

Tabela 2.1 Genealogia das cultivares utilizadas.. ..... 37

Tabela 2.2 Resumo da análise de variância em cultivares de trigo no município de Capão do Leão. UFPel, Pelotas-RS, 2013. ..... 42

Tabela 2.3Resumo do desempenho médio dos caracteres adaptativos e agronômicos de rendimento em cultivares de trigo no município de Capão do Leão. UFPel, Pelotas-RS, 2013... ..... 43

Tabela 2.4 Dados agroclimatológidos da Estação agroclimatológica de Pelotas, do mês de outubro de 2012. ..... 45

Tabela 2.5 Coeficientes de correlação de fenotípica de caracteres de interesse agronômico e associados à infecção por giberela conduzidos no município de Capão do Leão no ano de 2012. FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2013.. ..... 59

Tabela 2.6 Estimativa dos efeitos diretos e indiretos dos coeficientes de trilha através de correlações fenotípicas severidade de giberela como variável dependente principal e os caracteres comprimento da espiga (CE); massa da espiga (ME); número de grãos por espiga (NGE); massa de grãos por espiga (MGE); densidade da espiga (DE); estatura da planta (EST); rendimento de grãos (RG); massa de cem grãos (M100); incidência de giberela (I); severidade de giberela (S); grãos giberelados (GG); dias da emergência a floração (DEF); e dias da emergência a maturação (DEM) como variáveis independentes explicativas, em cinco cultivares de trigo, Capão do Leão 2012. CGF-FAEM/UFPel, 2012.50

Tabela 3.1 Genealogia das cultivares utilizadas. ..... 63

Tabela 3.2 Parâmetros de variabilidade genética ..... 70

Tabela 3.3 Freqüência alélica dos *primers*: *Xdupw 227; Xgwm 293; Xbarc 147; Xgwm 493.* ..... 70

## Lista de Figuras

Figura 1.1 Giberela ou fusariose da espiga do trigo. Espiga com sintomas típicos da doença (A), grãos giberelados (B*), Gibberella zeae* em meio seletivo (C), macroconídios *de Fusarium graminearum* (D) ..... 21

Figura 2.1 Resumo das estatísticas descritivas através do gráfico de “box-plot” para a variável incidência de giberela (I). ..... 45

Figura 2.2 Dendrograma da análise de agrupamento de 5 cultivares de trigo utilizando a distância de Mahalanobis com base em 13 caracteres morfológicos no ano de 2012. Coeficiente de correlação cofenético r= 0,78. CGF-FAEM/UFPel – Pelotas-RS,2013.. ..... 51

Figura 2.3 Dendrograma da análise de agrupamento de 5 cultivares de trigo utilizando a UPGMA e o coeficiente de Dice, Coeficiente de correlação cofenético r =0,90. CGF-FAEM/UFPel – Pelotas-RS,2013. ..... 53

Figura 2.4 Dispersão tridimensional das cultivares, baseada na análise de Coordenadas Principais (PCoA). Os Eigenvalues obtidos atravéss da PCoA foram: PCoA1 62,34% e da PCoA2 foi de 16,41% ,obtidos pela análise Eigen a partir da matriz de similaridade genética Nei e Li (1979) ..... 54

Figura 3.1 Dendrograma da análise de agrupamento de 9 cultivares de trigo utilizando a UPGMA e o coeficiente de Dice, Coeficiente de correlação cofenético r = 0,70. CGF-FAEM/UFPel – Pelotas-RS,2013. ..... 67

Figura 3.2 Dispersão bidimensional das cultivares, baseada na análise de Coordenadas Principais (PCoA). Os Eigenvalues obtidos atravéss da PCoA foram: PCoA1 71,14% e da PCoA2 foi de 9,69% ,obtidos pela análise Eigen a partir da matriz de similaridade genética Nei e Li (1979). ..... 68

Figura 3.3 Segregação encontrada na população $F_2$. Alelo proveniente de Frontana representado como A, e alelo proveniente de Itaipú representado como

a. A) *Primer* Xdupw 227 B) *Primer* Xgwm 293; C) *Primer* Xbarc 147; e D) *Primer* Xgwm 493. ..... 70

Figura 3.4 Dendrograma da análise de agrupamento de duas cultivares de trigo Frontana e Itaipú e 88 indivíduos obtidos a partir do cruzamento destas cultivares, utilizando a UPGMA e o coeficiente de Dice, Coeficiente de correlação cofenético r = 0,70. CGF-FAEM/UFPel – Pelotas-RS,2013. ..... 71

Figura 3.5 Dispersão bidimensional das cultivares, baseada na análise de Coordenadas Principais (PCoA). Os Eigenvalues obtidos através da PCoA foram: PCoA1 72,74% e da PCoA2 foi de 5,93% e PCoA3 foi de 4,40%, obtidos pela análise Eigen a partir da matriz de similaridade genética Dice (1945). ..... 72

## Lista de Abreviaturas

A- Amplitude térmica

CE- comprimento da espiga, em centímetros

CGF- Centro de Genômica e Fitomelhoramento

CIA- Clorofórmio: Alcool Isoamílico

cm- centímetros

CTAB- Brometo de amônio cetiltrimetil

DE- densidade da espiga

DEF- dias da emergência a floração

DEM- dias da emergência a maturação

DNA- Ácido desóxiribonucléico

DON- Desoxinivalenol

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid

EST- Estatura da planta

FAEM- Faculdade de agronomia Eliseu Maciel

Fhb- Fusarium Head Blight

GG- grãos giberelados

I- incidência de giberela

M100- Massa de cem grãos

ME- massa da espiga em centímetros

µL - Microlitros

mL - Mililitros

mM - Milimolar

MGE- massa de grãos por espiga

NGE- Número de grãos por espiga

PCoA- análise de coordenadas principais

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês Polymerase Chain Reaction

PR- precipitação pluviométrica

Primers - Iniciadores para reação de PCR

PVP- polivinilpirrolidona

QTL- *Quantitative traits loci*

*RNAse - Ribonuclease que catalisa a degradação do RNA em pequenos compostos.*

RG- Rendimento de grãos

S- severidade de giberela

SAMM- Seleção Assistida por Marcadores Moleculares

SSR- *Simple Sequence Repeat*

TA- temperatura média diária

TM- temperatra máxima

Tm- temperatura mínima

UFPel- Universidade Federal de Pelotas

UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*

UR- umidade relativa do ar

UV- ultravioleta

**Sumário**

Abstract ..... 16
Lista de tabelas ..... 17
Lista de Abreviaturas ..... 20
Introdução geral ..... 14
Capítulo I: Resistência à giberela e seleção de plantas superiores de trigo ..... 16
(Revisão bibliográfica) ..... 16
1.1 A cultura do trigo ..... 17
1.2 Melhoramento genético de trigo no Rio Grande do sul ..... 18
1.3 Giberela ou fusariose da espiga ..... 19
1.4 Resistência de cultivares de trigo à giberela ..... 23
1.6 Os marcadores moleculares ..... 24
1.7 Fontes de resistência ..... 27
Referências bibliográficas ..... 29
Capítulo II: Experimento I: Avaliação de cultivares brasileiras de trigo quanto à presença de níveis de resistência à giberela ..... 33
2.1. Introdução ..... 35
2.2. Material e métodos ..... 38
2.3. Resultados e Discussão ..... 42
2. 4 Conclusões ..... 56
Referências bibliográficas ..... 57
Capítulo III:Experimento II: Segregação de marcadores SSR (*Single Sequence Repeats)* para resistência à giberela (*Giberela zeae*) em população $F_2$ de trigo (*Triticum aestivum* L.) ..... 61
3.1 Introdução ..... 62
3.2 Material e métodos ..... 63
3.3 Resultados e Discussão ..... 66
3.4 Conclusões ..... 74

Considerações finais ..... 77
APÊNDICE ..... 78
Vitae ..... 81

## Introdução geral

O melhoramento genético para resistência a doenças é um dos principais objetivos dos programas de melhoramento de plantas. Em um grande número de culturas o controle das doenças ocorre quase que exclusivamente, por meio da resistência, tais como as ferrugens e carvões dos cereais e da cana-de-açúcar, as murchas vasculares em hortaliças e as viroses na maioria das culturas (MICHEREFF, 2001).

A giberela ou fusariose da espiga, doença causada pelo fungo *Gibberella zeae* (Schwabe) Petch anamorfo *Fusarium graminearum* Schwabe, é uma das doenças mais destrutivas das culturas vegetais em todo o mundo (BAI e SHANER, 2004).

O controle da giberela pode ser realizado por meio do controle químico, rotação de culturas e resistência genética. A aplicação de agroquímicos apresenta baixa eficiência em seu controle, devido a vários fatores, principalmente a dificuldade de definição da época ideal de aplicação, pois o período reprodutivo, considerado como um dos mais críticos ao vegetal pode coincidir com condições de prolongada exposição das espigas ao molhamento e, conseqüentemente, favorecer o estabelecimento e a infecção do patógeno no vegetal. Devido isso, uma das alternativas para o controle da doença é o desenvolvimento de cultivares resistentes (ALVES, 2010).

O potencial epidêmico do fungo está intimamente ligado à estratégia reprodutiva do patógeno, o qual pode sobreviver em hospedeiros vivos ou em tecidos vegetais mortos, na forma de micélio, ascospóros, macroconídios e clamidósporos. Esta capacidade de sobreviver em tecidos mortos é considerado como agravente, pois no Brasil o principal sistema de cultivo de trigo é basicamente de Plantio Direto, o qual representa mais de 90% da área cultivada (CONAB, 2012). Assim os restos culturais utilizados na cobertura do solo podem funcionar como uma fonte de inóculo (SHANER, 2003), o que dificulta o controle da doença.

Dentre as culturas hospedeiras da giberela, o trigo destaca-se como sendo uma das quais a ocorrência da doença apresenta grandes impactos na qualidade e na produtividade de grãos. Dentre os fatores que influeciam a ocorrência da giberela na cultura do trigo estão a suscetibilidade genética das cultivares (presença ou

ausência de genes de resistência), estrutura e morfologia da espiga, estatura da planta, estádio de floração/ maturação da planta coincidindo com condições de ambiente favoráveis ao desenvolvimento da doença (umidade, ocorrência de chuva, temperatura, disperção e agressividade do patógeno) (MESTERHÁZY1995; BUERSTMAYR et al., 2002; BAI e SHANER, 2004; BUERSTMAYR et al., 2009).

A identificação de fontes de resistência é um dos primeiros passos para a obtenção de novas cultivares resistentes. No mercado brasileiro existem poucas cultivares de trigo com algum nível de resistência à giberela, talvez pela escassez de trabalhos no desenvolvimento de metodologias que busquem avaliar os níveis de resistência das cultivares nacionais (ALVES, 2010).

Em trigo a resistência à giberela é uma característica quantitativa, ou seja, é resultado da ação de vários genes em um loco (QTL - *Quantitative traits loci*) que contribui para a variância do caráter (SINGH et al., 1995; ANDERSON et al., 2001; BUERSTMAYR et al., 2002; STEINER et al., 2004; MARDI et al., 2006; CUTHBERT et al., 2006; SHI et al., 2008; CUTHBERT et al., 2007; XUE et al., 2010; XUE et al., 2011).

Devido a elevada relevância da giberela sobre os danos à produtividade e a qualidade do trigo nacional, o presente trabalho tem como objetivos: i) Caracterizar na cultura do trigo e análise de caracteres relacionados à resistência à giberela nas condições de cultivo da região de Pelotas; ii) identificar marcadores que possam ser utilizados na seleção, visando a obtenção de constituições genéticas superiores.

# Capítulo I: Resistência à giberela e seleção de plantas superiores de trigo (Revisão bibliográfica)

## 1.1 A cultura do trigo

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma espécie hexaplóide, com x=7 cromossomos (2n=42 cromossomos), pertence à tribo Triticeae da Família Poaceae. É uma planta anual e com reprodução por autogamia. Tem como centro de origem e domesticação a antiga região da Mesopotâmia. E, embora o trigo seja mais bem adaptado a regiões de clima temperado, existem variedades melhoradas que apresentam menor exigência de frio que são cultivadas em algumas regiões tropicais e subtropicais (PIANA e CARVALHO, 2008).

No Brasil, na safra 2012/2013, a área total cultivada com trigo foi de 1.895,4 mil hectares, com uma produção de 4.379,5 mil toneladas. A região Sul do Brasil destaca-se como a maior produtora 1.817,1 mil hectares plantados e uma produção de 4.148,9 mil toneladas. O Rio Grande do Sul produziu neste período 1894,8 mil toneladas, representando cerca de 45% da produção brasileira em uma área cultivada de 976,2 mil hectares (CONAB, 2013).

O constante aumento da população mundial requer um aumento na produtividade das culturas, uma vez que não há espaço disponível para expandir a área cultivada. Além disso, a produtividade do trigo é reduzida pela presença de diferentes estresses bióticos e abióticos durante o cultivo. Desta forma, para aumentar a produtividade do trigo nestas condições é necessária a obtenção de fontes de resistência, provenientes de trabalhos de biotecnologia e melhoramento genético.

A utilização da biotecnologia auxilia na identificação de genótipos com maior potencial de rendimento, maior estabilidade de produção e adaptabilidade as

mudanças climáticas globais, além de resistência durável a pragas e patógenos e tolerância a estresses abióticos.

Essa doença também afeta a qualidade dos grãos, reduzindo seu peso e prejudicando sua aparência. Além disto, a infecção resulta na produção de micotoxinas que são prejudiciais ao homem e aos animais que deles se alimentam (LIMA, 2004).

## 1.2 Melhoramento genético de trigo no Rio Grande do sul

No Rio Grande do Sul o cultivo do trigo desde o início foi afetado significativamente por fatores bióticos, foi introduzido no estado em 1737, com a chegada dos imigrantes açorianos, constituindo-se na principal cultura da região, na época, seguida pelo milho, pelo feijão, pela mandioca e pelo arroz. Em 1811 o surgimento da ferrugem marcou o primeiro problema biótico da cultura na região, com o ataque os trigais foram destruídos a tal ponto que, em 1823, o cereal não era mais cultivado no sul do País (SCHEEREN et al., 2011).

Em 1875, na região colonial de Caxias do Sul, a boa adaptação de algumas cultivares italianas introduzidas possibilitou a consolidação do trigo no sul do Brasil. No período entre as duas Guerras Mundiais os preços elevados no mercado mundial obrigaram o Governo Federal a tomar medidas para aumentar a produção nacional. Em 1914, o químico Jorge Polysú selecionou, em Nova Tirol, no Paraná, diversas linhagens a partir de sementes provenientes de lavouras comerciais da região de Guaporé, Rio Grande do Sul. Essas linhas passaram a ser conhecidas como Linhas Polyssú e foram extremamente importantes para o melhoramento genético de trigo no sul do Brasil. Em seguida, foi lançada a cultivar PG1 (Ponta Grossa 1), selecionada a partir das Linhas Polyssú (SCHEEREN et al., 2011).

Em 1919, foram criadas as primeiras estações experimentais para pesquisar o cereal. A primeira foi a estação experimental Alfredo Chaves, para qual foi contratado o agrônomo Carlos Gayer, originário da Tchecoslováquia, que fez várias seleções em germoplasma local, hoje identificadas como "Linhas Alfredo Chaves", e também introduziu grande quantidade de germoplasma de várias partes do mundo. Na mesma época, foi criada a estação Experimental de Ponta Grossa, no PR. As Linhas Polyssú, adaptadas ao sul do Brasil, foram levadas à nova estação em 1922.

Os genótipos selecionados em Alfredo Chaves e em Ponta Grossa deram origem ao melhoramento genético de trigo no Brasil (SCHEEREN et al., 2011).

Iwar Beckman na Estação Experimental Alfredo Chaves, em 1925, realizou os primeiros cruzamentos artificiais de trigo no Brasil. Ainda em 1925, Beckman foi transferido para a Estação Experimental de São Luiz Gonzaga, onde continuou a realizar cruzamentos artificiais em trigo até 1929, quando foi transferido para a estação Experimental da Fronteira, em Bagé, RS. Durante a sua carreira Beckman gerou diversas cultivares de trigo de ciclo mais precoce e com melhor potencial de rendimento de grãos. Dentre suas cultivares, Frontana foi sem dúvida, a mais importante, sendo indicada para cultivo no Rio Grande do Sul, desde 1942 até 1995 (SCHEEREN et al., 2011).

Frontana reuniu diversas características importantes para aquela época, como ciclo precoce, boa resistência ao crestamento e porte mais baixo (para os padrões da época), além de continuar sendo uma cultivar muito importante como fonte de resistência à germinação na espiga em pré-colheita ao desgrane natural e, o maior destaque a resistência à ferrugem da folha do trigo em planta adulta (Lr15 e Lr34) (SOUSA, 1995).

### 1.3 Giberela ou fusariose da espiga

No Japão, a ocorrência de um doença q fazia com que as plantas de arroz crescessem excepcionalmente e suprimia a produção de sementes. Fitopatologistas descobriram que a altura destas plantas era induzida por um composto secretado por um fungo. Este composto foi isolado a partir de filtrados das culturas de fungo e chamado de giberelina, em alusão ao nome do fungo, *Gibberella fujikuroi* (TAIZ e ZEIGER, 2009).

O primeiro relato de fusariose da espiga ocorreu em Nebraska em 1898. No Brasil a giberela ou fusariose da espiga é causada, principalmente, pelo fungo *Gibberella zeae* anamorfo *Fusarium graminearum* (ANGELOTTI et al., 2006).

Existe uma ampla gama de hospedeiros do fungo *G. zeae.* Além do trigo, o fungo pode infectar outras espécies de expressão econômica dentre estas estão: alfafa, arroz, aveia, centeio, cevada, milho trevo, triticale e sorgo (REIS e CASA, 2005).

Embora uma interação significativa entre genótipos de trigo e isolados de *F. graminearum* tenha sido observada, não há nenhuma evidência para raças estáveis do patógeno (BAI e SHANER, 1996). Isolados do patógeno podem variar em caracteres culturais, toxicidade, agressividade, e os grupos de compatibilidade vegetativa. Contudo, a resistência específica de isolados foi detectada (BAI e SHANER 1994; 1996).

O patógeno, durante o seu ciclo de vida, apresenta a fase saprofítica e a fase parasitária. Durante a fase saprofítica, pode sobreviver na forma teleomórfica, também chamada de sexual, em restos culturais, e recebe o nome de *G. zeae*, caracterizada pela produção de corpos de frutificação, os peritécios. Na presença do hospedeiro, a partir do espigamento (estádio inicial de suscetibilidade), e sob condições climáticas favoráveis, ocorre a liberação de ascospóros do interior dos peritécios, que, ao atingirem as espigas, germinam, dando início à fase parasitária, que se transforma na fase anamórfica ou assexual, denominada de *F. graminearum* patógeno (BAI e SHANER, 2004).

A ocorrência da doença causa prejuízos em todas as regiões do mundo onde se cultivam trigo e milho e as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento da doença. Devido às condições favoráveis passou a ocorrer em níveis epidêmicos e tornou-se um problema mais preocupante nas safras de trigo no Sul do Brasil, principalmente no estado do Rio Grande do Sul. As epidemias mais recentes de giberela na região sul do Brasil foram registradas em 1997, 1998, 2000 e 2002, anos de elevada precipitação pluvial (LIMA, 2004).

As condições requeridas para que a infecção aconteça segundo Reis e Casa (2005) são de 30 horas de molhamento contínuo com temperatura média de 20 ° C, e, segundo CBPTT (2013) temperaturas de 20-25°C e duração do molhamento foliar de, no mínimo, 48 horas consecutivas.

O fungo produz dois tipos de propágulos, os conídios e os ascospóros. A disseminação a curtas distâncias é feita por conídios transportados em respingo de chuva. Sob condições ideais os esporos liberados a partir de resíduos de culturas são depositados sobre ou no interior das espiguetas de trigo, onde germinam e iniciam a infecção. A infecção ocorre rapidamente espalhando-se pelas anteras extrusadas, e após o fungo se ramifica em toda a cariopse em desenvolvimento, brácteas florais, e ráquis (BAI e SHANER, 1994). O fungo pode também infectar por penetração direta de glumas, pálea ou ráquis.

A liberação dos ascospóros dos peritécios é regulada pela hidratação do peritécio pela água. Após a liberação, os ascospóros são disseminados pelo vento e terminando por serem depositados nas anteras, órgão da planta suscetível à infecção. Assim, o período de suscetibilidade do trigo ocorre entre o início da floração e o início da maturação. Porém, o principal inóculo é constituído pelos ascospóros provenientes de peritécios formados nos tecidos senescidos de trigo, de inúmeras gramíneas e de soja, são transportados pelo vento a longas distâncias, atingindo os sítios de infecção, constituídos pelas anteras do trigo (REIS e CASA, 2005).

Após a infecção, o fungo propaga-se através do ráquis, sendo os sintomas percebidos após alguns dias através da senescência prematura de espiguetas infectadas, e dependendo da cultivar se expandir por toda a espiga (Figura 1.1). Sob condições de umidade contínua e prolongada, observa-se uma massa rosada de esporos. Grãos infectados apresentam-se deformados e murchos (Figura 1.1), podendo conter micotoxinas produzidas pelo fungo (DEL PONTE et al., 2004).

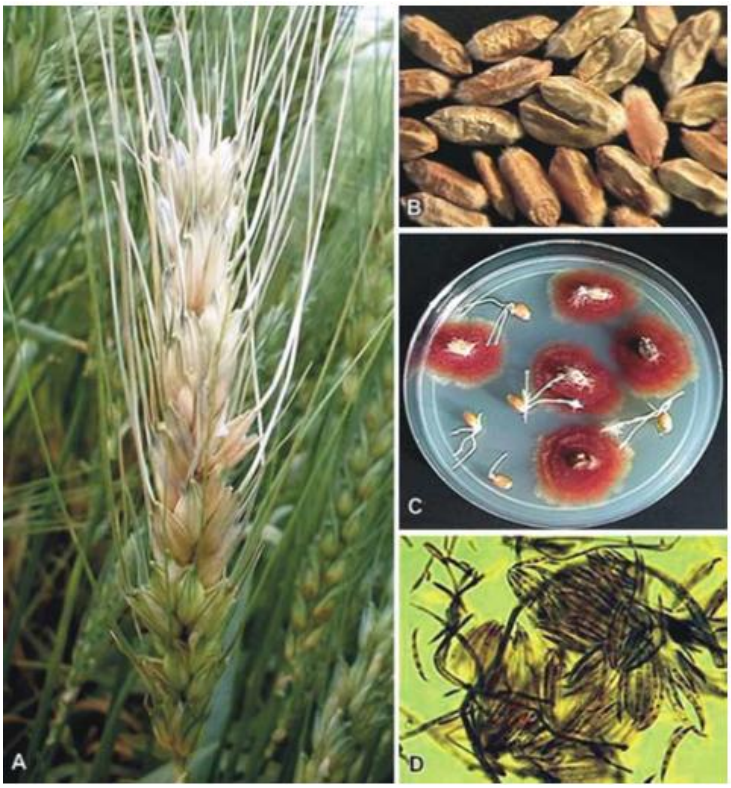


Figura 1. 1 Giberela ou fusariose da espiga do trigo. Espiga com sintomas típicos da doença (A), grãos giberelados (B*), Gibberella zeae* em meio seletivo (C), macroconídios *de Fusarium graminearum* (D).

Fonte: (Del Ponte et al., 2004).

Os prejuízos econômicos devido à ocorrência da doença frequentemente são subestimados, pois, quando o patógeno afeta as espigas no início da formação de grãos, estes são leves, sendo eliminados na colheita, no processo de trilha, juntamente com a palha (LIMA, 2004). Os danos diretos ocasionados por giberela resultam do abortamento de flores ou da formação de grãos murchos, enrugados, ásperos, de coloração rósea a esbranquiçada. Os danos indiretos são causados por grãos infectados e seus derivados, podendo ser tóxicos tanto para o ser humano como para animais, em razão da presença de micotoxinas, que são substâncias produzidas pelo patógeno.

Os sintomas característicos são espiguetas despigmentadas, de coloração esbranquiçada ou cor de palha, que contrastam com o verde normal de espiguetas sadias. Os sintomas iniciais em alguns genótipos, ocasionalmente, podem ser observados pela cor de marrom-escuro na gluma. Também é considerado sintoma típico de giberela a alteração do sentido das aristas de espiguetas afetadas, que se desviam do sentido das aristas de espiguetas não afetadas. Em genótipos de trigos múticos (espigas sem aristas) ou com aristas apicais, a giberela é caracterizada pela descoloração de espiguetas patógeno (BAI e SHANER, 2004).

Em condições favoráveis, estruturas (sinais) do patógeno são facilmente visualizadas a olho nu. Algumas espiguetas afetadas de espigas ainda verdes apresentam coloração salmão, em decorrência da produção de macroconídios de *F. graminearum*. Essa coloração geralmente permanece até o fim do ciclo da planta de trigo. Outros sinais do patógeno também podem ser observados nas espigas secas, pela formação de pontuações escuras, que são os peritécios de *G. zeae* (LIMA, 2004).

Grãos de trigo aparentemente sadios diferem daqueles produzidos em espiguetas atacadas por giberela, em que se formam grãos murchos, enrugados, de coloração branco-rosada a pardo-clara. O tamanho do grão afetado varia em função do estádio de desenvolvimento em que a espigueta foi infectada pelo patógeno (BAI e SHANER, 2004).

Quanto ao controle químico a giberela é uma doença de difícil controle e sua ocorrência é altamente influenciada pelo ambiente. Esta doença ataca a planta de trigo especialmente em regiões em que, principalmente a partir do inicio da floração, ocorrem chuvas freqüentes e contínuas. A aplicação de fungicidas deve ser realizada a partir do inicio da floração estendendo-se até o final do florescimento. O

tratamento com fungicidas apresenta menor eficiência de comparados a outras doenças foliares. Caso as condições climáticas impeçam a realização das aplicações de fungicidas no período indicado, não haverá possibilidade de controle, por outro lado, se não ocorrer clima favorável à infecção, não se justifica o tratamento (CBPTT, 2013).

Observa-se também que a giberela seja uma doença favorecida pelo sistema conservacionista de manejo de solo. Os grãos afetados precocemente são mais leves, permanecendo grande parte no campo junto com a palha, na superfície do solo, no processo de trilha. A manutenção de restos culturais na superfície do solo facilita a produção e a disseminação de unidades infectivas (ascospóros) de *G. zeae.* (LIMA, 2004).

## 1.4 Resistência de cultivares de trigo à giberela

Os mecanismos de resistência a giberela em trigo são classificados como ativos (fisiológico) ou passivos (morfológico) (MESTERHÁZY, 1995).

Mecanismos de resistência passiva estão associados a características fenotípicas, tais como altura da planta, presença de aristas, a densidade da espiga, ou seja, número de espiguetas por centímetro de espiga, e o período de florescimento. Por exemplo, os genótipos que florescem simultaneamente com condições ambientais favoráveis para a dispersão de esporos e infecção são mais propensos a desenvolverem sintomas de giberela. Glumas cerosas podem servir como uma barreira para a infecção fúngica e ajudar a excluir o patógeno, umidade e glumas adensadas podem limitar o acesso de inóculo no ar para os órgãos da flor do trigo.

Os mecanismos moleculares e bioquímicos da resistência do trigo à giberela ainda são desconhecidos. Diferentes padrões de expressão relacionados com proteínas e enzimas como a peroxidase, ácido ascórbico e catalase foram observadas entre linhagens de trigo resistentes e suscetíveis (BAI e SHANER, 2004).

Mesterházy (1995) classificou cinco tipos de resistência do trigo a infecção por giberela: (I) resistência à infecção inicial, (II) resistência à propagação da infecção dentro de uma espiga, (III) resistência à acumulação de micotoxinas em

grãos infectados, (IV) tolerância e (V) resistência à acumulação de toxina. No entanto, apenas três tipos são comuns entre as espiguetas de uma espiga (Tipo II) resistência acumulação de micotoxinas em grãos infectados (Tipo III)

É possível A presença de resistência Tipo I e Tipo II nos genótipos é independente, ou seja, apenas uma delas pode estar presente. Genótipos de trigo que possuem apenas a resistência do Tipo I ou do Tipo II podem parecer suscetíveis no campo. Quando apenas a resistência Tipo I está presente, a espiga tem um menor número de pontos iniciais de infecção, mas a infecção é rapidamente transmitida para todas as espiguetas, e a espiga apresenta-se com 100% das espiguetas infectadas. Quando apenas a resistência Tipo II está presente, um grande número de pontos iniciais de infecção é observado. Apenas as espiguetas que recebem inóculo externo apresentam sintomas da doença (BAI e SHANER, 2004).

Para garantir uma menor severidade de giberela será necessário reunir as resistências do Tipo I e do Tipo II, para aumentar, conseqüentemente, o nível de resistência de genótipos de trigo à giberela, em nível de campo (ALVES, 2010).

A resistência do Tipo III pode resultar de três possíveis causas: (1) um baixo nível de micotoxina produzida pelo fungo, (2) uma degradação da micotoxina por enzimas de plantas durante o desenvolvimento da espiga, ou (3) a estagnação da micotoxina nos grãos durante o seu desenvolvimento (BAI e SHANER, 2004).

Trabalhos realizados por Steiner et al. (2004) indicam que a cultivar Frontana produz enzimas que degradam desoxinivalenol (DON) (resistência Tipo III). O estudo da herança tem indicado que a resistência de Frontana é devida a dois ou três genes de efeito aditivo.

### 1.6 Os marcadores moleculares

Os marcadores moleculares são biomoléculas que podem ser relacionadas com uma característica genética fenotípica. As biomoléculas consideradas marcadores moleculares podem ser proteínas (antígenos ou isoenzimas) ou DNA. Em plantas, marcadores moleculares apresentam diversas aplicações, sendo principalmente utilizados em análises de diversidade genética, na caracterização de germoplasma, no mapeamento de genes e QTL de interesse e na implantação da

SAMM (Seleção Assistida por Marcadores Moleculares) (MALONE e ZIMMER, 2005).

Os microssatélites ou SSR (Seqüências simples repetidas- *Single Sequence Repeats*), caracterizados pela sua alta reprodutibilidade, natureza multi-alélica, característica co-dominante e abundância no genoma (VARSHNEY et al., 2005), constituem-se de seqüências de um a cinco nucleotídeos repetidos em *tandem* e se apresentam de forma abundante, principalmente nas plantas. Mediante a análise do polimorfismo dos microssatélites, é possível avaliar a dissimilaridade genética entre diferentes genótipos amplificando, via PCR, a região genômica que corresponde às seqüências repetitivas. A amplificação é feita utilizando *primers* específicos de 20 a 30 pares de bases, complementares as seqüências que flanqueiam uma determinada seqüência repetitiva. Os segmentos amplificados a partir destes sítios de anelamento dos *primers* apresentam um elevado polimorfismo, produto da presença de diferenças no número de elementos repetidos. Desta forma, cada seqüência repetitiva, independentemente do elemento repetitivo (CA, GC, TG, ATC, etc.), constitui-se num *loci* gênico altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo em relação a uma espécie. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo *locus* dentro da população (MALONE e ZIMMER, 2005).

Os SSR são principalmente co-dominantes e dispersos por todo o genoma de trigo (RÖDER et al., 1998). Mapas genéticos de trigo foram gerados usando populações de mapeamento e de diferentes sistemas de marcadores moleculares (RÖDER et al., 1998). Um mapa de consenso de alta densidade de trigo foi construído a partir de alguns destes mapas (SOMERS et al., 2004).

A disponibilidade de mapas de alta densidade de ligação de trigo baseados em PCR de e numerosos marcadores moleculares facilitou enormemente o progresso em estudos genéticos de trigo.

A característica de resistência à giberela é mostrada como de herança quantitativa, ou seja, resultado da ação de vários genes em um *loci* ou mais (QTL - *Quantitative traits loci*), os quais contribuem para a variância do caráter. Além destes fatores genéticos, a característica de resistência à esta doença tem alta influência do ambiente.

Vários tipos de marcadores têm sido utilizados para identificar QTL para resistência à giberela. Em variedades chinesas de trigo, sendo Sumai 3 a fonte de

resistência mais estudada, foi identificado um QTL no cromossomo 3B relacionado a caracteristica resistência do Tipo II. Este QTL principal foi também identificado em outras fontes chinesas resistentes, tais como Wuhan-1 (SOMERS et al., 2004). Outros QTL associados a caracteristica foram identificados, porém com menor efeito sobre a resistência.

QTL localizados nos cromossmos 3A e 5A na cultivar Frontana explicaram 26% da variação fenotípica da resistência do Tipo I. Sendo que o QTL de maior influência deste tipo de resistência foi mapeado no cromossmo 3A próximo ao centrômero explicando 16% da variação fenotípica. Esta região genômica identificada como estando ligada a reação de resistência Tipo I (resistência a infecção inicial), mostrando resposta positiva a incidência da doença mas não a severidade, indicando a contribuição desta região cromossômica a este tipo de resistência (STEINER et al., 2004).

A região genômica mais significativa associada com resistência à giberela em trigo está localizada no braço curto do cromossomo 3B (ANDERSON et al., 2001). Um QTL principal, denominado *Fhb*1 (*sin*. Qfhs.ndsu-3Bs), derivado de Sumai 3 foi identificado em uma população recombinante pura (WALDRON et al., 1999). O efeito deste QTL foi estudado em populações (BUERSTMAYR et al., 2002; ZHOU et al., 2002).

Após o mapeamento de todos os marcadores microssatélites publicados a partir do cromossomo 3B (RÖDER et al. 1998), *Qfhs.ndsu*-3Bs foi localizado entre Xgwm493 e Xgwm533, indicando o potencial da utilização destes marcadores na seleção assistida por marcadores moleculares (SAMM).

Na cultivar Frontana Steiner et al. (2004) detectaram QTL nos cromossomos 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 5A e 6B. O efeito principal associado com severidade mapeado para o cromossomo 3A, responsável por 16% da variação do QTL encontra-se no intervalo Xgwm720-Xdupw227. O intervalo Xgwm129-Xbarc197 no cromossomo 5A também mostrou uma associação com a severidade da giberela durante 3 anos no mesmo estudo, e mostrou-se responsável por 9% da variação fenotípica. QTL de menor efeito para a característica foram detectados nos cromossomos 1B, 2A, 2B, 3B, 5A e 6B (STEINER et al., 2004).

Utilizando marcadores moleclares grupos e ligação foram encontados em todos os cromosomos exceto em 6A e 7B Três regiões genômicas associadas com

resistência à giberela foram identificadas nos cromossomos 1B, 3A e 7A (MARDI et al., 2006).

O QTL relacionado a altura de planta, localizado no cromossomo 5A, relacionado ao marcador SSR Xbarc197, sobreposto a um QTL para severidade da doença. Gervais et al. (2003) identificou co-localização entre QTL para resistência à giberela e altura da planta no cromossomo 5A.

O QTL relacionado com baixo teor de DON foi mapeado para o mesmo local que o QTL com maior efeito para a resistência Tipo I. Resistência do trigo à giberela é uma característica quantitativa e, provavelmente, envolve uma complexa rede de interação e de vias de sinalização. Aplicação de novas tecnologias de grande escala de análise genética podem facilitar a descoberta de caminhos críticos e genes-chave nessas vias (BAI e SHANER, 2004).

Estudos evidenciam que *Qfhs.ndsu*-3Bs pode ser responsável por 15-60% da variação do caráter resistência à giberela. Avaliações fenotípicas em populações de mapeamento, têm sido consistentemente relatadas em Sumai 3 e Wangshuibai (WALDRON et al., 1999; ANDERSON et al., 2001; BUERSTMAYR et al., 2002, 2003; ZHOU et al., 2002).

## 1.7 Fontes de resistência

Entre os genótipos de trigo resistentes à giberela, a maioria das linhagens de trigo altamente resistentes possuem fontes de resistência chinesa, principalmente derivada de Sumai 3 e seus pedigrees. As fontes mais conhecidas de resistência são trigos de primavera da China como Sumai 3, do Japão, como Shinchunaga, e no Brasil como Frontana (SINGH et al.,1995), as quais podem vir a servir como fontes alternativas de resistência à giberela. Infelizmente, a resistência encontrada em culivares exóticas como Sumai 3, geralmente está associada com muitas caracteristicas agrícolas indesejáveis que são difíceis de remover das progênies (BAI e SHANER 2004).

A cultivar brasileira de trigo Frontana, utilizada como controle resistente em estudos realizados no CYMMYT, vem sendo relatada como fonte de resistência à giberela (GILCHRIST et al., 1996). Sua resistência foi analisada através de estudos genéticos clássicos, que indicaram um mínimo de dois a três genes de herança

aditiva (SINGH et al., 1995; STEINER et al., 2004; MARDI et al., 2006; SHI et al., 2008).

Os resultados indicam que a resistência à giberela de Frontana baseia-se essencialmente sobre a resistência à infecção inicial, enquanto que a resistência à propagação de fungos no interior da espiga parece ser de menor importância. Os tipos de resistência são controlados, em parte, por *loci* independentes. QTL num cromossomo 3A e 5A parecem ser essenciais para a expressão da resistência a doença na cultivar (STEINER et al., 2004; MARDI et al., 2006).

O principal gene de resistência na cultivar  foi localizado no cromossomo 3A e não revelou nenhuma correlação com a altura da planta, precocidade e compactação de espiga. Marcadores microssatélites em torno dos QTL nos cromossomos 3A e 5A foram identificados e podem ser usados em seleção assistida por marcadores,  por exemplo para combinar os QTL de resistência de Frontana e trigos asiáticos (STEINER et al., 2004).

Resultados sugerem que Frontana não apresenta alelos relacionados a QTL com efeitos principais para a resistência à propagação de fungos (Tipo II). Em contraste, em genótipos de origem asiática, a resistência à propagação de fungos parece ser de grande importância (ANDERSON et al., 2001;. BUERSTMAYR et al., 2002; ZHOU et al., 2002).

Até o momento existe um número significativo de trabalhos que adotam a análise de QTL na identificação e mapeamento de caracteres quantitativos relacionados à resistência a giberela em germoplasma de várias regiões produtoras de trigo no mundo, dentre estes QTL estão o *Fhb1* cujas fontes de resistência são Sumai 3 e HC374 (Wuhan1/Nyubai) (CUTHBERT et al., 2006), *Fhb2 Fhb1* cuja fonte de resistência é Sumai 3 (CUTHBERT et al., 2007), e *Fhb4* (XUE et al., 2010) *e Fhb5* (XUE et al., 2011) cuja fonte de resistência á o genótipo Wangshuibai.

## Referências bibliográficas

ALVES, R. H. **Reação de resistência à giberela em cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.), avaliada m condições de campo e casa de vegetação.** 2010. 57f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Estadual do Paraná Marechal Cândico Rondon.

ANDERSON, J.A.; STACK, R.W. ; LIU, S.; WALDRON, B.L; FJELD, A.D.; COYNE, C.; MORENO-SEVILLA, B.; MITCHELL FETCH, J.; SONG, Q.J.; CREGAN, P.B.; FROHBERG, R.C. DNA markers for Fusarium head blight resistance QTL in two wheat populations. **Theor appl genet**, v.102, p**.** 1164-1168; 2001.

ANGELOTTI, F.; TESSMANN, D.J.; ALVES, T.C.A.; VIDA, J.B.; JACCOUD FILHO, D.S.; HARAKAVA, R.; Caracterização morfológica e identificação molecular de isolados de *Fusarium graminearum* associados à giberela do trigo e triticale no sul do Brasil. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 177-179, 2006.

BAI, G e SHANER, G. Scab of wheat: prospects of control. **Plant disease,** Lafayette, v.78, n.8, p. 760-766, 1994.

BAI, G. e SHANER G., Variation in *Fusarium graminearum* and cultivar resistance to wheat scab. **Plant disease,** Lafayette, v.80, p. 975-979, 1996.

BAI G., e SHANER G. Management and resistance in wheat and barley to Fusarium head blight. **Annual Review of Phytopathology,** v. 42, p. 135-161, 2004.

BUERSTMAYR, H., LEMMENS, M., HARTL, L., DOLDI, L., STEINER, B., STIERSCHNEIDER, M., RUCKENBAUER, P. Molecular mapping of QTL for Fusarium head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (Type II resistance) **Theor appl genet,** v. 104, p. 84-91, 2002.

BUERSTMAYR, H.; BAN, T.; ANDERSON, J. A. QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. **Plant Breeding,** v. 128, p. 1-26, 2009.

CONAB – Companhia Nacional de abastecimento - Acompanhamento da safra Brasileira de grãos 2011/2012 oitavo levantamento, maio 2012 disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_05_10_08_49_52_boletim_maio_2012.pdf.

CONAB – Companhia Nacional de abastecimento – Conjuntura semanal Período de 30/09 a 04/10/2013

CBPTT- Comissão brasileira de Pesquisa de Trigo e triticale. **Indicações técnicas para trigo e triticale safra 2013**. Londrina, 2012, 225p.

CUTHBERT, P.A.; SOMERS,D. J.; THOMAS, J.; CLOUTIER, S.; BRULÉ-BABEL A. Fine mapping *Fhb1*, a major gene controlling fusarium head blight resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) **Theor Appl Genet,** v.112, p.1465–1472, 2006.

CUTHBERT, P.A.; SOMERS, D.J. BRULÉ-BABEL, A**.** Mapping of *Fhb2* on chromosome 6BS: a gene controlling Fusarium head blight field resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) **Theor Appl Genet,** v. 114, p. 429–437 2007.

DEL PONTE, E.M., MAURÍCIO, M., FERNANDES, C., PIEROBOM, C.R., BERGSTROM, G.C., Giberela do Trigo – Aspectos Epidemiológicos e Modelos de Previsão. **Fitopatol bras,** v. 29, n. 6, p. 587- 605, 2004.

GERVAIS, L., DEDRYVER, F., MORLAIS, J.Y., BODUSSEAU, V., NEGRE, S., BILOUS, M., GROOS, C., TROTTET, M., Mapping of quantitative trait loci for field resistance to Fusarium head blight in an European winter wheat **Theor Appl Genet, v.** 106, p. 961–970, 2003.

GILCHRIST, L.; RAJARAM, S.; MUJEEB-KAZI, A., VAN GINKEL, M.; VIVAR, H.; PFEIFFER, W. Fusarium scab screening program at CIMMYT In: DUBIN, H.J.; GILCHRIST, l.; REEVES, J.; MCNAB, A. **Fusrium head scab: Global status and future prospects.** El Batan, Mexico, Content 2, p. 7-12, 1996.

LIMA, M.I.P.M. Giberela ou Brusone ? Orientações para a identificação correta dessas enfermidades em trigo e em cevada. Passo Fundo: Embrapa trigo, 42p (**Embrapa Trigo. Documentos, 51**), 2004.

MALONE, G., ZIMMER, P.D. Marcadores Moleculares. In: ZIMMER, OLIVEIRA e MALONE **Ferramentas da biotecnologia no melhoramento genético vegetal***.* Pelotas Editora: UFPel, Cap. 4, p.7 8-114, 2005.

MARDI, M., PAZOUKI, L., DELAVAR, H., KAZEMI, M.B., GHAREYAZIE, B., STEINER, B., NOLZ, R. QTL analysis of resistance to Fusarium head blight in wheat using a Frontana-derived population. **Plant Breeding,** v. 125, p. 313-317, 2006.

MESTERHÁZY, Á. Types and components of resistance to *Fusarium head blight of wheat.* **Plant Breeding,** v. 114, p. 337-386, 1995.

PIANA C F B, CARVALHO F I F Trigo a cultura que deu suporte à civilização In:

**Origem e evolução de plantas cultivadas**, Brasília- DF, Embrapa Informação

Tecnológica, p. 819-854, 2008.

REIS, E. M. e CASA, R.T. Doenças do trigo manual de Fitopatologia volume 2 In: **Doenças das plantas cultivadas** 4ª Ed., editora agronomia Ceres lrda. São Paulo, SP, p. 631- 638, 2005.

RÖDER, M.S.; KORZUN, V.; WENDEHAKE, K.; PLASCHKE, J.; TIXIER, M. A microsatellite map of wheat. **Genetics,** v. 149, p. 2007-2023, 1998.

SCHEEREN, P. L.; CAIERÃO, E.; SÓ E SILVA, M.e BONOW, S**. Melhoramento de trigo no Brasil**
In: Trigo no Brasil bases para uma produção competitiva e sustentável. Capítulo 17 Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, p. 427-452, 2011.

SHANER, G.E. Epidemiology of Fusarium head blight of small grain cereals in North America. In: Leonard, K.L. e ushnell, W.R (Eds.) Fusarium head blight of wheat and Barley. **APS Press,** 84- 119, 2003.

SINGH, R.P.; HONG, M.A.; RAJARAM, S. Genetic analysis of resistance to scab in spring wheat cultivar frontana. **Plant disease, v. 79, n.** 3, p. 238-240, 1995.

SOMERS, D.J.; ISAAC, P.; EDWARDS, K. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) **Theor Appl Genet, v. 109, p.** 1105-1114; 2004.

SOUSA, C. N. A. de. Cultivares de trigo no Brasil.I - cultivares disponíveis antes de 1950. PassoFundo: EMBRAPA-CNPT, 1995.34 p. (**EMBRAPA- CNPT.Documentos, 24).**

STEINER, B.; LEMMENS, M.; GRIESSER, M.; SCHOLZ, U.; SCHONDELMAIER, J.; BUERSTMAYR, H. Molecular mapping of resistance to Fusarium head blight in the spring wheat cultivar Frontana. **Theor appl genet,** v. 109, p. 215-224, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology, v.** 23, p. 48-55, 2005.

SOMERS, D. J.; ISAAC, P.; EDWARDS, K. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) **Theor Appl Genet,** v. 109, p. 1105-1114, 2004.

ZHOU, W.; KOLB, F.L.; BAI, G., SHANER, G.; DOMIER, L.L. Genetic analysis of scab resistance QTL in wheat with microsatellite and AFLP markers. **Genome**, v. 45 p. 719–727, 2002.

WALDRON, B.L.; MORENO-SEVILLA, B.; ANDERSON, J.A.; STACK, R.W.; FROHBERG, R.C. RFLP mapping of QTL for Fusarium head blight resistance in wheat. **Crop Science,** v. 39, p. 805–811, 1999.

XUE, S.; LI, G.; JIA, H.; XU, F.; LIN, F.; TANG, M.; WANG, Y.; AN, X.; XU, H.; ZHANG, L.; KONG, Z.; MA, Z. **Fine** mapping *Fhb4,* a major QTL conditioning resistance to Fusarium infection in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) **Theor Appl Genet,** v. 121, p. 147-156, 2010.

XUE, S.; XU, F.; TANG, M.; ZHOU Y.; LI, G.; AN, X.; LIN, F.; XU, H.; JIA, H.; ZHANG, L.; KONG, Z.; MA, Z. Precise mapping *Fhb5,* a major QTL conditioning

resistance to Fusarium infection in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) **Theor Appl Genet,** v. 123, p. 1055-1063, 2011.

# Capítulo II: Experimento I: Avaliação de cultivares brasileiras de trigo quanto à presença de níveis de resistência à giberela

## 2.1. Introdução

O trigo (*Triticum aestivum* L.)é o terceiro cereal mais produzido no mundo, sendo que o Brasil apresenta uma área total cultivada de 1.895,4 mil hectares (ha) em 2012/ 2013 com uma produção de 4.379,5 mil toneladas e produtividade média de 2.311 Kg/ha (CONAB, 2013).

No Brasil o cultivo do trigo é marcado pelo elevado número de doenças, dentre as principais está a giberela ou fusariose da espiga, induzida por *Gibberella zeae* (Schw.) Petch*,* (anamorfo *Fusarium graminearum* Schwabe*)*, que além do trigo pode parasitar alfafa, arroz, aveia, centeio, cevada, milho, trevo, triticale e sorgo (REIS E CASA, 2005).

Os danos mais comuns em decorrência da infecção são a redução no rendimento de grãos, pois a infecção impede o enchimento dos grãos. Além disso, a presença do fungo em grãos ou derivados pode resultar no acúmulo de micotoxinas, as quais afetam negativamente a qualidade do produto. Dentre as micotoxinas está Desoxinivalenol (DON), conhecida como vomitoxina, que no caso de ingestão, tanto pelo homem, quanto por animais resulta em vômito. Aliado a isso a nova legislação limita a quantidade de micotoxinas que pode estar nos grãos de trigo e seus derivados (BRASIL, 2011). Em condições de campo, uma espiga infectada por metro quadrado pode ser suficiente para o lote de produção ser rejeitado pelo conteúdo de DON (BROWN et al., 2011).

A ocorrência da doença é freqüente em regiões onde a floração coincide com períodos prolongados de chuva (REIS E CASA, 2005). As condições ambientais para que a infecção ocorra caracterizam-se com temperaturas de 20-25°C e duração do molhamento foliar de, no mínimo, 48 horas consecutivas. O

controle químico é realizado via aplicação de fungicidas a partir do inicio da floração estendendo-se até o final do florescimento. Entretanto essa forma de controle mostra menor eficiência quando comparado com o controle de doenças foliares. Caso as condições climáticas impeçam a realização das aplicações de fungicidas no período indicado, não haverá possibilidade de controle, por outro lado, se não ocorrer clima favorável à infecção, não se justifica o tratamento de acordo com as recomendações da Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale (CBPTT, 2013).

O fungo *G. zeae* tem a capacidade de sobreviver em restos culturais de uma ampla gama de hospedeiros e apresenta a capacidade de sobreviver em hospedeiros vivos ou em seus tecidos mortos, na forma de micélio, ascospóros, macroconídios e clamidósporos (REIS E CASA, 2005).

A característica do patógeno sobreviver em tecidos mortos do hospedeiro torna-se um fator agravante no Brasil, devido ao fato de o Sistema de Plantio Direto ser o principal sistema de cultivo de trigo no país, o qual representa mais de 90% da área cultivada com trigo no país (CONAB, 2012). Sob estas condições os restos culturais utilizados na cobertura do solo podem funcionar como uma fonte de inóculo para a próxima safra.

Devido à baixa eficiência dos tratos culturais no controle da giberela, e a facilidade de propagação do inoculo, uma das alternativas para o seu controle é a utilização de cultivares geneticamente resistentes (BAI e SHANER, 2004). No Brasil, ainda não estão disponíveis cultivares tolerantes ou resistentes à doença (REIS E CASA, 2005). Resultado este que pode estar associado à escassez de trabalhos na área de desenvolvimento de metodologias que busquem avaliar os níveis de resistência das cultivares nacionais (ALVES, 2010).

Os mecanismos de resistência a giberela em trigo são classificados como ativos ou passivos (MESTERHÁZY, 1995) sendo que os mecanismos de resistência passiva estão associados a características fenotípicas, tais como altura da planta; presença de aristas; densidade de grãos na espiga, e tempo para o florescimento; presença de glumas cerosas; caracteristicas estas que podem servir como uma barreira para a infecção.

Mesterházy (1995) propôs uma classificação, onde são identificados cinco tipos de resistência do trigo a infecção por giberela. No entanto, apenas três tipos são comummente aceitas: i) Tipo 1 - resistência à infecção inicial, ii) Tipo 2 -

resistência a disperção do patógeno no tecido infectado, e iii) Tipo III - capacidade da planta em reduzir o acumulo de micotoxinas nos tecidos infectados.

A presença dos diferentes tipos de resistência é independente, sendo assim, maiores níveis de resistência à giberela são obtidos pela reunião de diferentes tipos de resistência, para aumentar o nível de resistência de genótipos de trigo à giberela (ALVES, 2010).

A resistência a giberela é uma característica quantitativa, ou seja, resultado da ação de vários genes em um *locus* ou mais (QTL - *Quantitative traits loci*), os quais contribuem para a variância do caráter. Além destes fatores genéticos, a característica de resistência a giberela tem alta influência do ambiente. Dentre os trabalhos que adotam a análise de QTL na identificação e mapeamento de caracteres quantitativos relacionados resistência a giberela em germoplasma de várias regiões produtoras de trigo no mundo estão: *Fhb1*(CUTHBERT et al., 2006), *Fhb2*(CUTHBERT et al., 2007), *Fhb4* (XUE et al., 2010) *e Fhb5* (XUE et al., 2011).

O melhoramento para resistência a giberela apresenta dificuldades por várias razões: i) o germoplasma que apresenta níveis de resistência é de origem exótica e apresenta poucas características agronômicas desejáveis; ii) a herança quantitativa da resistência; iii) *screening* para identificação da resistência sofre grande influência do ambiente, é laborioso e de custo elevado (BUERSTMAYR et al., 2002).

Frente ao exposto os objetivos deste estudo foram: i) verificar o desempenho das cultivares CD 105, CD 116, Fundacep 52, Frontana e Pampeano sob condições de cultivo na região de Pelotas quanto à infecção por giberela; ii) dimensionar o polimorfismo em cultivares brasileiras resistentes e suscetíveis, utilizando marcadores microssatélites (SSR- *Simple Sequence Repeat*) associados à QTL de resistência a giberela, e assim auxiliar no desenvolvimento de ferramentas que possam ser utilizadas em programas de melhoramento de trigo visando facilitar a identificação de fontes de resistência; iii) utilizar avaliações morfológicas e moleculares por meio de análise multivariada separar genótipos suscetíveis e que contenham diferentes níveis de resistência.

## 2.2. Material e métodos

No presente estudo foram utilizadas cultivares brasileiras suscetíveis e com níveis de resistência à giberela. Como suscetíveis foram escolhidas CD 105, CD 116, Fundacep 52 e como resistentes foram escolhidas a cultivar Frontana (ALVES, 2010; CBPTT, 2011, 2013) e a cultivar Pampeano (CBPTT, 2011), pois esta apresenta a cultivar Sumai 3 em sua genealogia (OR sementes, 2013) (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 Genealogia das cultivares utilizadas.

| Cultivar | Cruzamento | Ciclo | EST | NR | Classe comercial | Ano de lançamento | Instituição |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CD 105 | PFAU “S”/2*OCEPAR 14//IAPAR 41 | P | B | S | Brando | 1999 | Coodetec |
| CD 116 | MILAN/MUNIA | P | B | S | Melhorador | 2006 | Coodetec |
| Fundacep 52 | CEP 88132/PG 876//BR 34/CRDN | P | B | S | Brando | 2005 | Fundacep |
| Pampeano | ORL91274/ORL93807//ORL95711’S’ (ORL 95711′s’=BR35//BR14*2/Sumai#3/OR-1) | M | M/A | MR | Brando | 2004 | OR/Biotrigo |
| Frontana | Fronteira/Mentana | - | - | R | | 1940 | EEF BAGÉ |

Fonte: Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale (CBPTT, 2011,2013).
Ciclo: P= precoce, M= médio; EST= estatura de planta: B= baixa, M= média, A= alta. NR= nível de resistência à giberela, S=suscetível, MR= moderadamente resistente, R=resistente.

### Fenotipagem dos genótipos em condições de inoculação natural

No ano de 2012 na área experimental do Centro Agropecuário da Palma Capão do Leão/RS, foram semeadas cinco cultivares de trigo descritas na tabela 2.1 O preparo do solo da área experimental seguiu as recomendações da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale (CBPTT, 2012), realizadas correções da acidez e adubação com macronutrientes (NPK), e não sendo realizadas aplicações de fungicidas. Brasil. O delineamento empregado foi de blocos ao acaso, com três repetições, adotando a densidade de sementes viáveis por metro quadrado adequada para cada cultivar de acordo com as recomendações da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale (CBPTT, 2013). Cada repetição foi formada por parcelas com cinco linhas de 5,0 m de comprimento espaçadas em 0,20 m, com as mensurações efetuadas a partir do produto obtido nas três linhas centrais.

Durante o período de cultivo foram avaliados os caracteres número de dias da emergência ao florescimento (DEF, em dias), número de dias da emergência à maturidade fisiológica (DEM, em dias), estatura de planta (EST, em cm).

Sendo a dispersão de esporos uniforme em toda a lavoura (PICININI e FERNANDES, 1995), no estádio de espiga verde foram realizadas análises de diagnose por meio da contagem de número de espigas que apresentavam sintomas de giberela em um metro linear de cada uma das três linhas centrais, obtendo-se valores de incidência (I, em forma de porcentagem), e nestas espigas foi avaliada a severidade (S, em forma de porcentagem) baseada na escala de Stack e Mckullen (2011).

Após a colheita e trilha manual dos três metros lineares centrais foram realizadas mensurações de comprimento da espiga (CE, em cm), massa de espiga (ME, em g), número de grãos por espiga (NGE, em unidades), massa dos grãos por espiga (MGE, em g), densidade da espiga (DE, obtida por NG/CE), rendimento de grãos (RG, em g. m linear -1), massa de 100 grãos (M100, em g) e porcentagem de grãos giberelados (GG, em %).

**Genotipagem**

**Extração de DNA**

Sementes das cultivares de trigo foram semeadas em caixas *gerbox*® contendo papel *germitest*, os quais foram umidecidos quando necessário. O material vegetal utilizado para extração de DNA foi coletado no sétimo dia. A metodologia de extração de DNA foi a descrita por Doyle e Doyle (1987) mediante as modificações, conforme descrito a seguir: 150 mg de folhas jovens foram maceradas em nitrogênio líquido, condicionadas em tubos estéreis de 2,0 ml e adicionando 700 µL de tampão de extração CTAB (100 mM de Tris-HCl, 1,4 M de NaCl, 20 mM de EDTA, 2% de CTAB, 1% de PVP, 0,5% de β-Mercaptoetanol). Após, as amostras foram mantidas em agitação por inversão (50-60 vezes), a seguir incubadas a 65°C por 50-60 minutos, posteriormente adicionou-se igual volume de CIA 24:1 (Clorofórmio: Alcool Isoamílico) mantendo-as sob agitação por inversão (50-60 vezes a cada 10 minutos), e logo após centrifugadas a 12.000 g por um período de 10 minutos. A fase sobrenadante foi recuperada em tubos de 1,5 ml e cuidadosamente misturada

com igual volume de etanol a −20°C. Na sequencia realizou-se lavagens do pellet: 700 µL de etanol 70%, mantido por 20 minutos; após a retirada adicionou-se 300 µL de etanol 100% por alguns segundos, posteriormente ao pellet estar desidratado realizou-se a ressuspenção do mesmo em 50 µL de TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8.0) contendo 0,5 µg $mL^{-1}$ de RNase, e incubado a 37°C por 60minutos.

A quantificação do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%, com marcador de peso molecular Low mass DNA ladder (Invitrogen ®). O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado em equipamento fotodocumentador sob raios UV (ultravioleta). Após as amostras foram padronizadas para a concentração 50-100 ng $\mu L^{-1}$ e armazenadas a temperatura de −20◦C para o subsequente uso em amplificações por PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

**Amplificação de DNA**

O DNA genômico isolado foi amplificado via PCR utilizando 19 pares de oligonucleotideos iniciadores (*primers*) alvos de *loci* SSR da série Xgwm, Xbarc entre outros, os quais são descritos na literatura como significativamente associados à QTL de resistência à giberela, cujas sequência estão descritas no apêndice I.

A reação de PCR foi realizada com o volume final de 13,5 µL, contento 2,5 µL de primer (Foward+ Reverse na concentração de 10 mM); 50-100 ng de DNA genômico; água ultrapura (Invitrogem®). A PCR foi realizada em termociclador marca (Peltier Thermal Cycler) modelo PTC–100™ de acordo com o programa proposto por Röder et al. (1998).

Os produtos de PCR foram desnaturados com 32% de SD [solução desnaturante (99% de formamida; 0,5% de EDTA 0,5M; 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% dexileno cianol)] a temperatura de 94°C por 5 minutos e imediatamente condicionados em gelo. Destas amostras desnaturadas retirou-se 4,5 µL para aplicação em gel de poliacrilamida 5% com tampão TBE 1X (89 mM de Tris; 0,89 M de ácido bórico e 8 mM de EDTA pH 8,0). Para o controle do tamanho dos alelos foi aplicado 3 µL de marcadores de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder da marca Invitrogen®. A eletroforese foi conduzida em voltagem de 9 V $cm^{-1}$ por 2 horas e 30 minutos. A revelação do gel foi realizada com nitrato de prata conforme o protocolo descrito por Bassam et al. (1991).

Dos produtos de PCR também foi realizada um eletroforese em gel de agarose 2,5%. O gel foi corado com blue green e visualizado em equipamento fotodocumentador sob raios UV (ultravioleta).

**Análise dos dados**

**Avaliações morfológicas**

Os dados morfológicos foram submetidos a uma análise de variância, após foram submetidos a uma análise de comparação de médias utilizando o programa SAS (SAS Institute, 2013). Utilizando o mesmo software foi realizada análise de correlação de Pearson, objetivando verificar o efeito da variação de uma variável sobre as demais. Após, utilizando o software GENES (CRUZ, 2001) foi realizada uma análise de trilha (*Path analysis)* para verificar os efeitos indiretos da variação de uma variável nas demais, sendo que os dados de incidência, severidade e grãos giberelados foram transformados utilizando a fórmula:

$$arco\ seno\ \sqrt{X/100}$$

Posteriormente, foi estimada a distância generalizada de Mahalanobis ($D^2$) entre todos genótipos utilizando programa computacional GENES. Com base da matriz de distância genética, foi construído o dendrograma, utilizando o método de agrupamento da distância média (UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)*. A variação entre a matriz de distância e o dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação de Mantel (1967) utilizando 1000 permutações, sendo estas análises realizadas por meio do programa computacional NTSYS pc2.1 (ROHLF, 2000).

**Análise de géis e conversão de dados**

Os perfis eletroforéticos dos géis de poliacrilamida e agarose foram fotografados e analisados de forma manual. A presença e a ausência de bandas de

cada genótipo foram registradas na forma de binários, ou seja, 1 para presença e 0 para ausência.

A relação genética entre os genótipos foi analisada pelo coeficiente de similaridade de Dice (1945), realizando-se a análise de agrupamento com o método UPGMA (Sneath e Sokal, 1973) e posteriormente os dados representados de forma gráfica por um dendrograma O coeficiente de correlação (r) foi calculado com o teste de Mantel (1967) utilizando 1000 permutações para avaliar o grau de confiabilidade entre a matriz de similaridade e os dados de agrupamento. As análises descritas acima foram conduzidas no software NTSYS-PC Ver. 2.1 (ROHLF, 2000).

A variância da similaridade genética (PCoA) em coordenadas otimizadas foi verificada pela análise de Eigen, obtendo-se o porcentagem de variação de cada dimensão e a variação acumulada. Esta análise, bem como a obtenção do gráfico foram conduzidas no software NTSYS-PC 2.1 (ROHLF, 2000).

## 2.3. Resultados e Discussão

Os resultados apresentados pela análise de variância (Tabela 2.2) permitem evidenciar diferenças significativas a 1 e 5 % de probabilidade de erro pelo teste F, entre as cultivares para todos os caracteres avaliados.

A análise prosseguiu por meio do teste de comparação de médias, pelo teste de Tukey a 1 e 5% de probabilidade de erro. A tabela 2.3 demonstra os resultados obtidos pela análise de médias. Foi possível observar a formação de um grande número de classes, para todas as variáveis avaliadas.

A cultivar CD 105, suscetível, apresentou valores superiores de I (0,46) e GG (0,34), não diferindo significativamente para estes caracteres, CD 116 (I 0,34, GG 0,30), também suscetível, apresentou resultados (Tabela 2.3) semelhantes foram encontrados por Alves (2010).

Características como densidade de espiga e estatura são citadas como características morfológicas relacionadas com resistência passiva à giberela (MESTERHÁZY 1995). No entanto, no presente trabalho para os caráteres DE e EST resultados contrários aos citados acima foram obtidos, pois a DE da cultivar CD 105 (0,29), não diferiu estatisticamente de Frontana (0,31) e Pampeano (0,31), e, para o caráter EST as médias das cultivares com níveis de resistência, Frontana

(88,34) e Pampeano (88,90) não diferiram significativamente de CD 116 (84,68) (Tabela 2.3).

A variação de incidência de giberela em porcentagem nas cultivares apretestaram valores máximo e mínimo respectivamente de 9,25 e 43,90 para a cultivar CD 105; 12,5 e 30 para a cultivar CD 116; 3,71 e 10,71 para a cultivar Fundacep 52; 4,76 e 10,81 para a cultivar Frontana; e 1,58 e 5,76 para a cultivar Pampeano (Figura 2.1).

Tabela 2.2 Resumo da análise de variância em cultivares de trigo no município de Capão do Leão. UFPel, Pelotas-RS, 2013.

| Caracteres | Quadrado médio | | | Média | CV (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| | Bloco | Cultivares | Resíduo | | |
| CE | 17,61** | 53,28** | 1,18 | 8,60 | 12,64 |
| ME | 0,22 | 1,97** | 0,11 | 1,18 | 28,53 |
| NGE | 561,01** | 1315,52** | 62,10 | 33,14 | 23,78 |
| MGE | 0,27* | 1,68* | 0,06 | 0,82 | 31,07 |
| DE | 0,02 | 0,17** | 0,00 | 0,28 | 24,89 |
| EST | 1881,83** | 731,19** | 61,16 | 84,98 | 9,20 |
| RG | 327,93* | 662,75** | 91,62 | 28,92 | 33,10 |
| M100 | 0,97* | 1,92** | 0,19 | 2,51 | 17,35 |
| I | 0,08* | 0,26** | 0,02 | 0,23 | 65,1 |
| S | 0,57* | 10,24** | 0,13 | 0,26 | 141,54 |
| GG | 0,03* | 0,29** | 0,01 | 0,2 | 44,32 |
| DEF | 47,4* | 88,3** | 5,92 | 54,8 | 4,44 |
| DFM | 12,60 | 66,2* | 1,41 | 96,60 | 1,23 |

** e * = Significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; CV% = Coeficiente de Variação Percentual; . CE= comprimento da espiga, em centímetros; ME= massa da espiga, em gramas; MGE= massa de grãos por espiga, em gramas; NGE = número de grãos por espiga, em unidades; DE= densidade da espiga; EST = estatura da planta, em centímetros; RG = rendimento de grãos, em $g.m^{-1}$; M100 = massa de cem grãos, em gramas; I= incidência de giberela (dados transformados); S=severidade de giberela (dados transformados); GG= grãos giberelados (dados transformados); DEF= dias da emergência a floração; e DEM= dias da emergência a maturação.

Cabe salientar que a resistência à *G. zeae* no trigo é uma característica quantitativa, sendo influenciada por fatores genéticos e de ambiente e, embora existam modelos de previsão para a ocorrência da doença, o controle preventivo é sempre necessário.

Na cultivar Frontana (I 0,06; S 0,05) portadora da resistência do Tipo I (STEINER et al., 2004; ALVES 2010; ALVES et al., 2013) esperava-se menores médias de incidência, entretanto não apresentou médias significativamente distintas

de Pampeano (I 0,09; S 0,04) (Tabela 2.3) cujas médias para severidade foram menores, exaltando o esperado, que a cultivar tenha herdado QTL relacionados à resistência Tipo II, provenientes de Sumai 3, presente na genealogia da cultivar (OR sementes).

Em função a ocorrência de a doença ser altamente ambiente dependente, a Tabela 2.4 apresenta dados agroclimatológicos dos dias próximos à data do florescimento das cultivares.

Tabela 2.3 Resumo do desempenho médio dos caracteres adaptativos e agronômicos de rendimento em cultivares de trigo no município de Capão do Leão. UFPel, Pelotas-RS, 2013.

| Cultivar | Variáveis | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | I | S | CE | PE | NGE | PGE | DE | RG | DEF | DEM | EST | GG | M100 |
| CD105 | 36,33a | 4,89a | 8,34c | 1,03c | 29,23c | 0,69c | 0,29a | 28,93b | 52,33b | 94c | 81,85bc | 0,34a | 2,53a |
| CD116 | 17ab | 3,50b | 7,61d | 1,35a | 37,21a | 0,9a | 0,22b | 39,04a | 50,67b | 98b | 84,68ab | 0,30a | 2,67a |
| Fundacep 52 | 7,67bc | 3,33c | 8,43c | 1,02c | 36,83a | 0,6c | 0,23b | 22,93b | 58a | 93,67c | 79,18c | 0,20b | 1,75b |
| Frontana | 1,67c | 2,50c | 8,95b | 1,28ab | 29,54c | 0,87b | 0,31a | 26,51b | 56,67a | 100a | 88,34a | 0,09c | 2,73a |
| Pampeano | 3c | 1,86c | 9,68a | 1,20b | 32,89b | 0,8b | 0,31a | 27,17b | 56,33a | 97,33b | 88,90a | 0,04c | 2,54a |

Números seguidos de mesma letra não diferenciam entre si na coluna pelo teste Tukey a 5% de significância. Dados referentes ao cultivo no município de Capão do Leão,2012. CE= comprimento da espiga, em centímetros; ME= massa da espiga, em gramas; MGE= massa de grãos por espiga, em unidades ; NGE = número de grãos por espiga, em unidades; DE= densidade da espiga; EST = estatura da planta, em centímetros; RG = rendimento de grãos, em $g.m^{-1}$; M100 = massa de cem grãos, em gramas; I= incidência de giberela em %; S=severidade de giberela (dados transformados); GG= grãos giberelados (dados transformados); DEF= dias da emergência a floração; e DEM= dias da emergência a maturação.

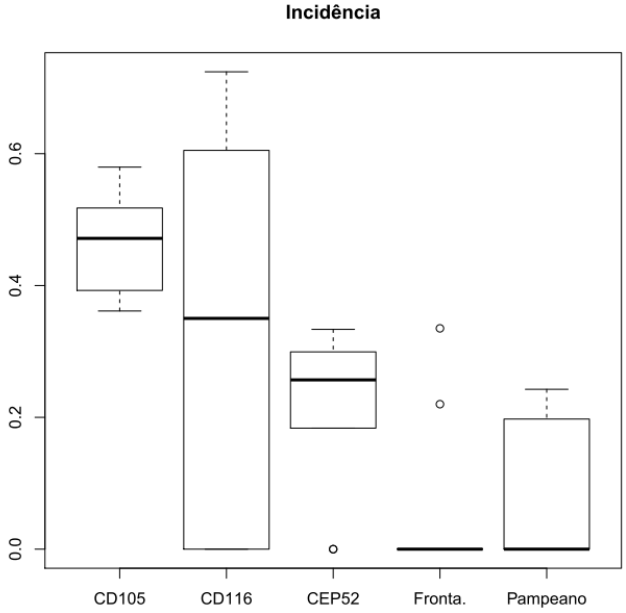


Figura 2. 1 Resumo das estatísticas descritivas através do gráfico de “box-plot” para a variável incidência de giberela (I).

Tabela 2.4 Dados agroclimatológidos da Estação agroclimatológica de Pelotas, do mês de outubro de 2012.

| Dia | Data de florescimento das cultivares | | | | | Dados agroclimatológicos | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | CD105 | CD116 | Fundacep 52 | Frontana | Pampeano | UR | PR | TA | TM | Tm | A |
| 1 | | | | | | 87 | 29 | 19,9 | 25,2 | 17,4 | 7,8 |
| 2 | | | | | | 94,5 | 0 | 17,5 | 20,6 | 14,2 | 6,4 |
| 3 | | | | | | 88.3 | 0 | 20,0 | 25,9 | 15,8 | 10,1 |
| 4 | | | | | | 89,8 | 0 | 07,9 | 21,9 | 16,6 | 5,3 |
| 5 | | X | | | | 91,8 | 0 | 19,6 | 22,2 | 19,4 | 5,6 |
| 6 | | X | | | | 76,5 | 0,7 | 23, | 26,6 | 17,7 | 7,2 |
| 7 | X | X | | | | 90,0 | 0,0 | 20,2 | 24,8 | 18,8 | 7,1 |
| 8 | X | X | | | X | 95,8 | 0,0 | 19,5 | 21,4 | 14,8 | 4,3 |
| 9 | X | X | | | X | 97 | 5,4 | 19,5 | 20,7 | 10,9 | 1,9 |
| 10 | X | X | | X | X | 84,5 | 14,6 | 15,9 | 19,1 | 21,0 | 4,3 |
| 11 | X | X | | X | X | 72,8 | 0 | 15, | 19,8 | 12,6 | 8,9 |
| 12 | X | X | | X | X | 71,5 | 0 | 17 | 21,0 | 15,1 | 9,0 |
| 13 | X | X | | X | X | 69 | 0 | 18 | 22,2 | 16,0 | 9,6 |
| 14 | X | X | | X | X | 70,8 | 0 | 18,8 | 22,8 | 15,1 | 7,7 |
| 15 | | X | X | X | X | 75,3 | 0 | 19,3 | 22,4 | 16,0 | 6, |
| 16 | | X | X | X | X | 61 | 0 | 21,9 | 29,5 | 17,6 | 11,9 |
| 17 | | | | | | 71,5 | 0,8 | 18,2 | 21,8 | 16,4 | 5,4 |
| 18 | | | | | | 82,8 | 0 | 15,5 | 21,6 | 12,7 | 8,9 |
| 19 | | | | | | 73,3 | 0 | 18,1 | 23,9 | 11,6 | 12,3 |
| 20 | | | | | | 86,5 | 0 | 20,8 | 27,8 | 17,3 | 10,5 |

UR= umidade relativa do ar (%); PR= precipitação pluviométrica (mm) ; TA= temperatura média diária (°C); TM= temperatura máxima (°C); Tm= temperatura mínima (°C); A= Amplitude térmica (°C).
Fonte: Boletim agroclimatológico, Estação agroclimatológica de Pelotas.

A seleção direta pode ser de grande utilidade para se obter ganhos para um único caráter, o contrário desta, a seleção indireta busca melhorar o caráter principal através da seleção em outros caracteres (Carvalho et al., 2004), sendo assim o conhecimento sobre associações entre os caracteres é de fundamental importância para um programa de melhoramento, pois permite aumentar a eficiência na seleção de indivíduos superiores através do emprego da seleção indireta.

Falconer e Mackay (1996) definem três situações onde a seleção indireta pode ser aplicada com vantagens sobre a seleção direta: i) quando o caráter desejado é difícil de ser mensurado com precisão; ii) quando o caráter a ser mensurado é de difícil manipulação genética; e iii) quando o caráter desejado tem condições de ser mensurado em somente um sexo, mas o caráter indireto pode ser encontrado em ambos.

Desta forma, devido à dificuldade de mensuração, e a sua interação com o ambiente, para que ocorra um incremento no ganho de seleção quanto à resistência a giberela em trigo, faz-se necessário conhecer a contribuição relativa das principais características da cultura, com o objetivo de ser adotada com maior eficiência a seleção indireta.

O coeficiente de correlação de Pearson (r) é uma medida do grau de relacionamento linear entre duas variáveis aleatórias e possui grande utilidade na pesquisa agronômica (Carvalho et al., 2004). Uma análise de correlação foi realizada entre incidência (I) e severidade (S) de giberela em trigo e de alguns caracteres citados na literatura como indicadores de resistência, mostrou associação com caracteres relacionados ao rendimento. Foram obtidas as estimativas dos coeficientes de correlação fenotípica, utilizando a correlação de Pearson. Os resultados obtidos na análise de correlação estão apresentados na Tabela 2.5.

Pelos resultados obtidos observou-se que existem diferenças tanto na magnitude como na significância dos coeficientes de correlação. Observando a correlação entre I e S e os demais caracteres avaliados, foi possível verificar correlações significativas para ambas as variáveis, quando comparadas com características relacionadas à resistência à giberela.

Para o carácter S foi possível identificar correlações significativas entre o caracter e, CE (-0,34), ME (-0,13), NGE (-0,19), MGE (-0,14), EST (-0,15), DEF (-0,22), DEM (-0,25), porém todos os valores observados são de baixa magnitude,

exceto para a associação entre S e CE que foi de média magnitude, sendo os coeficientes classificados conforme critério proposto por Carvalho et al. (2004).

A análise das correlações indica que plantas de estatura elevada e de ciclo tardio tendem a reduzido número de espiguetas infectadas por espiga. Características contrárias aos objetivos dos melhoristas e dos programas de melhoramento, visto que são desejáveis plantas com menor estatura e mais precoces.

Embora severidade não tenha apresentado correlação significativa com rendimento de grãos, os caracteres de espiga relacionados ao rendimento NGE (0,26) e MGE (0,23), que apresentaram correlação significativa positiva com rendimento, mostraram correlações negativas com a S, indicando que o aumento de severidade da doença reflete em perda no rendimento de grãos, principalmente via seus componentes (Tabela 2.5).

Observou-se também uma correlação positiva entre I e GG (0,67), indicando que a avaliação é capaz de representar o número de espigas infectadas, podendo ser utilizada para seleção indireta para esta característica (Tabela 2.5).

A aplicabilidade da análise de trilha consiste no estudo do efeito direto de uma variável independente sobre uma variável dependente (y) após a remoção da influencia de todas as outras variáveis independentes (xi) incluídas na análise. Permite, ainda, desdobrar coeficientes de correlação simples e seus efeitos diretos e indiretos sobre a característica em estudo (Carvalho et al., 2004).

De forma a obter um maior detalhamento dos efeitos direto e indiretos associados aos caracteres secundários sobre a incidência e a severidade da infecção causada pelo fungo *G. zeae*, e, em função das baixas magnitudes obtidas na análise de correlação, foi realizada a análise de trilha, cujos resultados são apresentados na tabela 2.6.

A correlação fenotípica (Pearson) foi utilizada para obter os coeficientes de trilha. O diagnóstico de multicolinearidade baseado no número de condição apresentou valores menores que 100, indicando multicolinearidade classificada como fraca em ambos os casos. Dessa forma, a análise de trilha foi realizada sem necessidade de técnicas estatísticas mais complexas.

Na análise de correlação de Pearson as variáveis que foram significativas quando comparadas com S foram CE (-0,34), ME (-0,13), NGE (-0,19), EST (-0,15), DEF (-0,22), DEM (-0,25) (Tabela 2.5). O efeito direto entre os caracteres CE e S,

onde a magnitude do efeito direto (-0,596) de CE sobre a S foi semelhante à correlação fenotípica (-0,34). Uma situação semelhante à descrita anteriormente é observada para a associação entre os caracteres DEF e S, onde a magnitude do efeito direto (-0,537) de DEF sobre a S foi semelhante à correlação fenotípica (-0,22). Esta situação também é observada para a associação entre os caracteres DEM e S, onde a magnitude do efeito direto (-0,206) de DEM sobre a S foi semelhante à correlação fenotípica (-0,25). Nestas circunstâncias, a seleção direta sobre os caracteres CE, DEF e DEM são estratégias importantes para a obtenção de estimativas da capacidade do genótipo em impedir a dispersão ou desenvolvimento do fungo entre as espiguetas, ou seja, o espalhamento do fungo pela espiga (Tabela 2.6).

Porém a ocorrência da doença tem alta influência do ambiente, ou seja, existem exigências para que a infecção ocorra como ocorrência de temperaturas de 20-25°C e duração do molhamento foliar de, no mínimo, 48 horas consecutivas.

O efeito direto de ME sobre S foi negativo (-0,014), sendo que estes caracteres são negativamente correlacionados (-0,13). Neste caso o efeito indireto de MGE (0,237) deve ser considerado simultaneamente na seleção. Isto vem confirmar a considerável correlação obtida entre os caracteres.

A correlação entre NGE e S foi de baixa magnitude (-0,19), enquanto o efeito direto de NGE sobre S foi elevado (-0,519), indicando que os efeitos indiretos é que são responsáveis os pela falta de correlação (Tabela 2.6). Desta forma os fatores causais indiretos deverão merecer atenção nesta seleção.

Uma situação semelhante à descrita anteriormente é observada para a correlação entre os caracteres EST e S, que foi de baixa magnitude (-0,15), enquanto o efeito direto de EST sobre S foi elevado (-0,709), neste caso somente RG teve efeito indireto significativo (0,49), o que indica que os efeitos indiretos do RG é que são responsáveis pela falta de correlação. Desta forma os fatores causais indiretos deverão merecer atenção nesta seleção. Pois de fato, cultivares com estatura elevada tendem a apresentar maiores níveis de resistência, pelo fator escape, como já explicado anteriormente, que reflete no rendimento de grãos, pois o genótipo mais alto apresenta menor severidade da doença e a sua produtividade é menos afetada (Tabela 2.6). No entanto, genótipos com estatura mais elevada podem apresentar outro problema na cultura, o de acamamento.

Tabela 2.5 Coeficientes de correlação de fenotípica de caracteres de interesse agronômico e associados à infecção por giberela conduzidos no município de Capão do Leão no ano de 2012. FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2013.

| Variável | Coeficiente de correlação de Pearson | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | S | RG | CE | ME | NGE | MGE | DE | I | EST | M100 | GG | DEF | DEM |
| S | -- | -0,12 | -0,34** | -0,13** | -0,19** | -0,14* | 0,005 | 0,14 | -0,15* | 0,19 | 0,17 | -0,22** | -0,25** |
| RG | | -- | 0,038 | -0,07 | 0,26* | 0,23* | -0,20* | 0,16 | 0,76* | 0,93 | 0,15 | -0,07 | 0,21* |
| CE | | | -- | -0,13* | 0,37** | 0,33** | 0,14* | -0,31 | 0,19* | -0,02 | -0,57** | 0,14* | 0,25** |
| ME | | | | -- | -0,025 | 0,98* | -0,32** | 0,13 | -0,01 | 0,20 | 0,57** | 0,38** | 0,38* |
| NG | | | | | -- | 0,62** | -0,78* | 0,004 | -0,12 | -0,069 | -0,20 | -0,06 | 0,04 |
| MG | | | | | | -- | -0,42** | -0,02 | 0,0003 | 0,12 | -0,18 | -0,23** | 0,40** |
| D | | | | | | | -- | -0,18 | 0,24** | 0,11 | 0,23* | 0,11* | 0,16** |
| I | | | | | | | | -- | 0,06 | 0,38* | 0,67** | -0,44** | -0,24 |
| M100 | | | | | | | | | -- | 0,02 | 0,00 | 0,26** | 0,38** |
| EST | | | | | | | | | | -- | 0,0 | -0,2 | 0,3 |
| GG | | | | | | | | | | | -- | 0,81** | -0,3 |
| DEM | | | | | | | | | | | | -- | 0,06 |
| DEM | | | | | | | | | | | | | -- |

* e ** = Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente; CE= comprimento da espiga, em centímetros; ME= massa da espiga, em gramas; NGE = número de grãos por espiga, em unidades; MGE= massa de grãos por espiga, em unidades; DE= densidade da espiga; EST = Estatura da planta, em centímetros; RG = rendimento de grãos, em $g.m^{-1}$; M100 = massa de cem grãos, em gramas; I= incidência de giberela (dados transformados); S=severidade de giberela (dados transformados); GG= grãos giberelados (dados transformados); DEF= dias da emergência a floração; e DEM= dias da emergência a maturação.

Tabela 2.6 Estimativa dos efeitos diretos e indiretos dos coeficientes de trilha através de correlações fenotípicas severidade de giberela como variável dependente principal e os caracteres comprimento da espiga (CE); massa da espiga (ME); número de grãos por espiga (NGE); massa de grãos por espiga (MGE); densidade da espiga (DE); estatura da planta (EST); rendimento de grãos (RG); massa de cem grãos (M100); incidência de giberela (I); severidade de giberela (S); grãos giberelados (GG); dias da emergência a floração (DEF); e dias da emergência a maturação (DEM) como variáveis independentes explicativas, em cinco cultivares de trigo, Capão do Leão 2012. CGF-FAEM/UFPel, 2012.

| Caractere | ED | Efeito indireto | | | | | | | | | | | | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | S | RG | CE | ME | NGE | MGE | D | I | EST | M100 | GG | DEF | DEM | |
| RG | 0,645 | -- | -0,023 | 0,001 | -0,135 | 0,003 | -0,058 | -0,049 | -0,539 | 0,027 | 0,038 | -0,043 | -0,430 | -0,12 |
| CE | -0,596 | 0,025 | -- | 0,004 | 0,073 | 0,092 | 0,087 | 0,095 | -0,135 | -0,007 | 0,150 | -0,075 | -0,052 | -0,34** |
| ME | -0,014 | -0,045 | 0,149 | -- | 0,013 | 0,237 | -0,084 | -0,040 | 0,007 | 0,080 | -0,150 | -0,204 | -0,078 | -0,13* |
| NGE | -0,519 | 0,168 | 0,083 | 0,013 | -- | 0,150 | -0,084 | -0,040 | 0,007 | 0,080 | -0,150 | -0,204 | -0,078 | -0,19 |
| MGE | 0,242 | 0,148 | -0,227 | -0,014 | -0,322 | -- | -0,111 | 0,006 | 0,000 | 0,049 | 0,047 | 0,124 | -0,082 | -0,14* |
| D | 0,263 | -0,142 | -0,197 | 0,005 | 0,405 | -0,102 | -- | 0,055 | -0,170 | 0,044 | -0,060 | -0,059 | -0,033 | 0,01 |
| I | -0,308 | 0,103 | 0,185 | -0,005 | -0,002 | -0,005 | -0,047 | -- | -0,043 | 0,149 | -0,176 | 0,236 | 0,049 | 0,14 |
| EST | -0,709 | 0,490 | -0,113 | 0,000 | 0,062 | 0,00 | 0,063 | -0,018 | -- | 0,008 | 0,013 | 0,124 | -0,070 | -0,15* |
| M100 | 0,391 | 0,045 | 0,011 | -0,003 | 0,036 | 0,030 | 0,030 | -0,117 | -0,015 | -- | -0,001 | -0,140 | -0,078 | 0,19 |
| GG | -0,263 | 0,097 | 0,340 | -0,008 | 0,104 | -0,044 | 0,061 | -0,206 | 0,035 | 0,001 | -- | 0,124 | -0,070 | 0,17 |
| DEF | -0,537 | -0,045 | -0,083 | -0,005 | 0,031 | -0,056 | 0,029 | 0,135 | 0,163 | 0,102 | 0,060 | -- | -0,013 | -0,22** |
| DEM | -0,206 | 0,135 | -0,149 | -0,005 | -0,021 | 0,097 | 0,042 | 0,074 | -0,241 | 0,149 | -0,089 | -0,035 | -- | -0,25** |
| Coeficiente de determinação 0,41 | | | | | | | | | | | | | | |
| Efeito da variável residual 0,77 | | | | | | | | | | | | | | |

** e * = Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente.

ED=efeito direto.

Em trigo, a quantificação da variabilidade genética tem sido estimada por meio da distância genética, onde se destaca a utilização de caracteres morfológicos, dados moleculares, coeficiente de parentesco e a análise conjunta destas técnicas (BERTAN, 2007).

O estudo da distância genética revelou a presença de variabilidade entre as cinco cultivares utilizadas no estudo, tanto em relação aos caracteres morfológicos e quanto na avaliação por meio de marcadores SSR.

Em relação à distância morfológica, o ajuste da matriz de distância e o dendrograma (Figura 2.2) foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenético que foi de 0,78. Este coeficiente evidencia que a distância de Mahalanobis foi eficiente para representar distância genética, pelo truncamento estabelecido pela dissimilaridade média entre todos os pares de genótipos, é possível observar a formação de dois grupos bem definidos, estando presente no grupo I as cultivares CD 105, CD 116, Frontana e Pampeano, e no grupo II apenas a cultivar Fundacep 52.

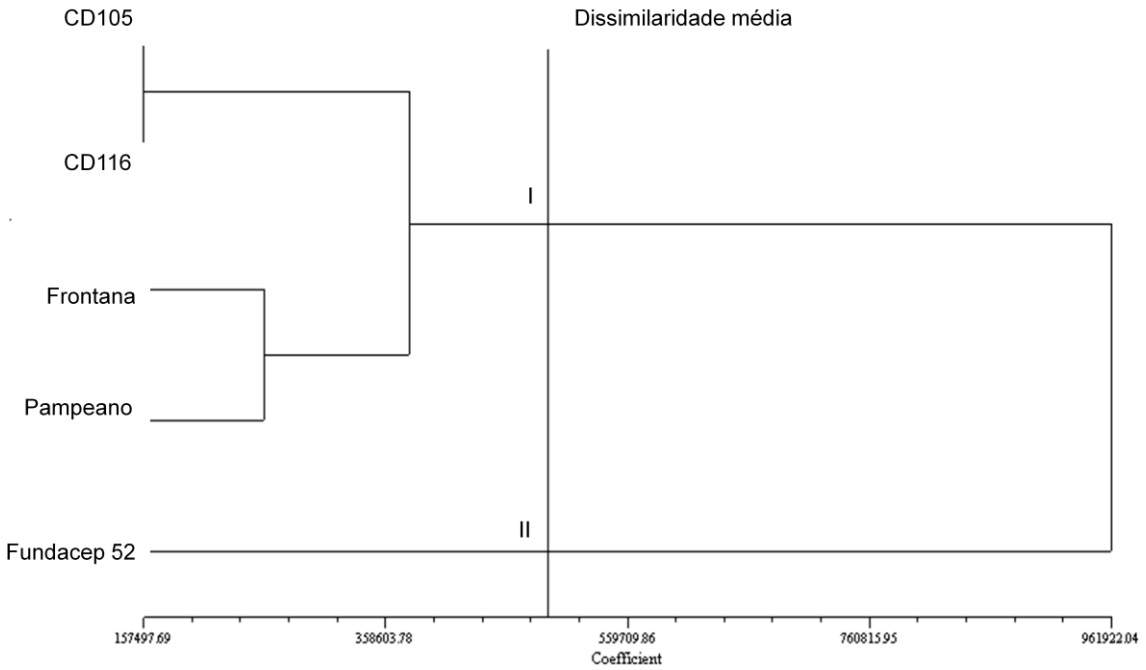


Figura 2. 2 Dendrograma da análise de agrupamento de 5 cultivares de trigo utilizando a distância de Mahalanobis com base em 13 caracteres morfológicos no ano de 2012. Coeficiente de correlação cofenético r= 0,78. CGF-FAEM/UFPel – Pelotas-RS,2013.

Neste estudo foram empregados 19 *primers* alvos de *loci* SSR (Apêndice I). Destes, três (Xbarc 102, Xgwm 133 e Xgwm 644) apresentaram amplificação nula, dois foram monomórficos (Xgwm 533 e Xgwm194), e 14 foram polimórficos.

A elucidação da relação genética entre os genótipos de trigo com base na combinação do polimorfismo de 14 *loci* polimorficos associados à resistência a giberela pode ser visualizada na figura 2.3. O teste de Mantel (*r*) foi empregado para verificar o grau de confiabilidade entre a matriz de similaridade genética e os resultados de agrupamento apresentados no dendrograma, o resultado obtido foi de 0,90, indicando uma ótima correlação. Na análise utilizando os 14 *primers* polimórficos foi possível identificar 29 alelos, a elucidação da relação genética entre as cultivares demonstrada na forma de um dendrograma (Figura 2.3), o qual foi obtido pelo algoritmo UPGMA, a partir da matriz de similaridade genética de Dice (1945), baseada no polimorfismo dos *loci* SSR avaliados. A partir da análise de agrupamento UPGMA foi possível constatar a existência de diversidade genética entre as cultivares, com similaridade variando desde 0,46 a 1,00.

Com base nos resultados da análise de *loci* SSR realizadas neste estudo foi possível verificar a diversidade e a relação genética das cultivares, de maneira que os *loci* avaliados possibilitaram a discriminação dos cinco genótipos de trigo avaliados. A similaridade genética média entre os genótipos foi de 0,70, separando os genótipos em quatro grupos, nos quais Frontana ficou em um grupo isolado das demais formando o grupo I, no grupo II estavam presentes as cultivares CD 116 e Fundacep 52, no grupo III estava a cultivar Pampeano, e o grupo IV foi composto pela cultivar CD 105. Com relação genética variando entre 0,46 a 0,75 (CD 116 e Fundacep 52), Os genótipos caracterizados como putativos portadores de níveis de resistência à giberela (Frontana e Pampeano) apresentaram-se em lados opostos pelos resultados obtidos neste estudo, possivelmente pelo fato de estas apresentarem QTL diferentes para a resistência a giberela, pois foram polimórficos para todos os *primers* utilizados (ANDERSON et al., 2001; STEINER et al., 2004; CUTHBERT et al., 2006; CUTHBERT et al., 2007; SHI et al., 2008; XUE et al., 2010; ALVES 2010; ALVES et al., 2013;).

Os resultados obtidos corroboram com a classificação dos genótipos quanto à reação a infecção por giberela. Sendo os suscetíveis CD 105, CD116 e Fundacep 52, enquanto que Frontana se manteve distante de Pampeano (ALVES, 2010; CBPTT, 2011, 2013). Sendo assim a utilização dos marcadores SSR teve maior

eficiência na separação dos genótipos, talvez pelo fato de terem maior número de bandas polimórficas (29) em relação ao número de caracteres morfológicos (13).

Além disto, decorre o fato de que nem sempre dois fenótipos idênticos são determinados pelos mesmos genes, ou seja, genes distintos em muitos casos levam à manifestação similar do fenótipo. Desta forma, fica evidente que tais estimativas vão ser tão mais próximas quanto maior for à associação entre os *loci* que controlam os caracteres morfológicos estudados e as bandas avaliadas, e também quanto maior for o número mensurado de caracteres morfológicos (ROY et al., 2004; VIEIRA et al., 2007)

A análise de coordenadas principais (PCoA) possibilitou verificar o grau da variância otimizada da variabilidade genética de forma bidimensional. Os resultados obtidos pela análise de coordenadas principais apresentou valor ótimo com as duas primeiras coordenadas principais com o valor acumulado de variância de 80,75%. A contribuição da PCoA1 foi de 62,34%e da PCoA2 foi de 16,41%, e PCoA3 foi de 8,39%, sendo PCoA1 a coordenada que mais representa a variabilidade genética dos genótipos de trigo, conforme pode ser verificado na representação gráfica da figura 2.4. Os resultados de agrupamento obtidos com esta análise corroboram com os resultados obtidos pelo dendrograma.

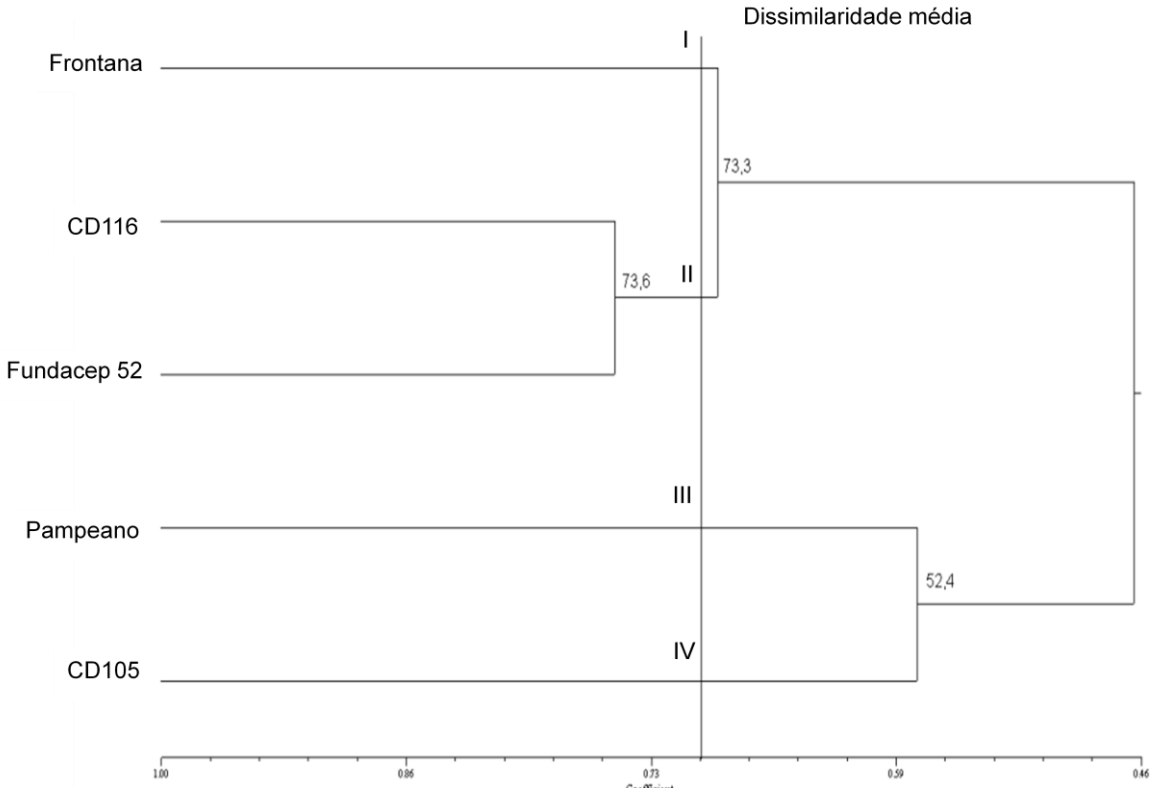


Figura 2. 3 Dendrograma da análise de agrupamento de 5 cultivares de trigo utilizando a UPGMA e o coeficiente de Dice, com base em 19 marcadores SSR. Coeficiente de correlação cofenético r =0,90. CGF-FAEM/UFPel – Pelotas-RS,2013.

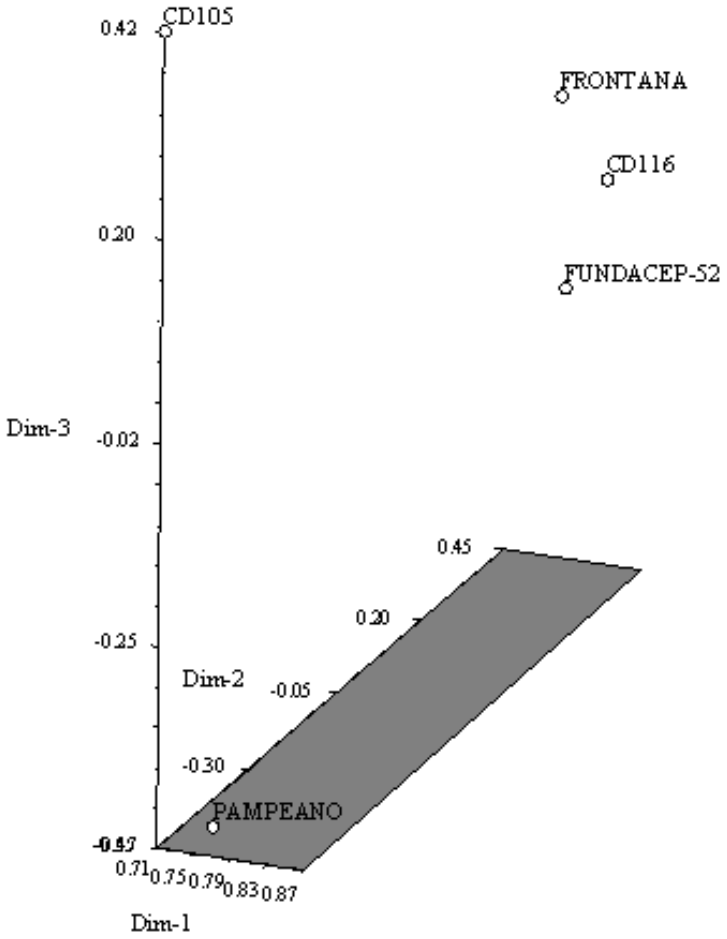


Figura 2. 4 Dispersão bidimensional das cultivares, baseada na análise de Coordenadas Principais (PCoA). Os Eigenvalues obtidos através da PCoA foram: PCoA1 62,34%, da PCoA2 foi de 16,41% e PCoA3 foi de 8,39%, obtidos pela análise Eigen a partir da matriz de similaridade genética Dice (1945).

## 2. 4 Conclusões

As cultivares Frontana e Pampeano apresentam resistência Tipo I e Tipo II respectivamente, pois apesar de apresentarem características de resistência passiva, também apresentam regiões gênicas relacionadas com resistência à giberela. Portanto podem ser utilizadas como fontes de resistência à giberela em programas de melhoramento de trigo.

As cultivares CD 105 e CD 116 podem ser utilizadas em estudos de mapeamento para a característica de resistência à giberela, e como controle suscetível.

Um total de 73,7% (14/19) dos microssatélites associados à QTL de resistência a giberela foram polimórficos entre os genótipos elite estudados, indicando variabilidade genética para resistência a giberela.

## Referências bibliográficas


ALVES, R. H. **Reação de resistência à giberela em cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.), avaliada m condições de campo e casa de vegetação.** 2010. 57f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Estadual do Paraná Marechal Cândido Rondon.

ALVES, R. H.; NORA, T. D.; FRANCO, F. A.; COSTA, A. C. T.; STANGARLIN, J. R Reação de resistência tipo I à Giberela em cultivares de trigo **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 39, n. 2, p. 97-101, 2013.

ANDERSON, J.A.; STACK, R.W. ; LIU, S.; WALDRON, B.L; FJELD, A.D.; COYNE, C.; MORENO-SEVILLA, B.; MITCHELL FETCH, J.; SONG, Q.J.; CREGAN, P.B.; FROHBERG, R.C. DNA markers for Fusarium head blight resistance QTL in two wheat populations. **Theor appl genet,** v. 102, p. 1164-1168, 2001.

BAI G. e SHANER G. Management and resistance in wheat and barley to Fusarium head blight. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 135-161, 2004.

BASSAM, BJ; CAETANO-ANOLL´ES, G; GRESSHOff, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Anal Biochemistry**, v.196, p.80-83, 1991.

BERTAN, I**. Implicações da capacidade combinatória e da distância genética entre genitores no desenvolvimento de populações superiores em trigo** (*Triticum aestivum* L.) 2007. 132P. Tese (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Pelotas.

BUERSTMAYR, H., LEMMENS, M., HARTL, L., DOLDI, L., STEINER, B., STIERSCHNEIDER, M., RUCKENBAUER, P. Molecular mapping of QTL for Fusarium head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (Type II resistance) **Theor appl genet,** v. 104, p. 84-91, 2002.

BRASIL. RESOLUÇÃO - RDC N° 7, DE 18 DE FEVEREIRO DE 2011.

BROWN, N. A.; BASS, C.; BALDWIN, T. K.; CHEN, H.; MASSOT, F.; CARION, P.W. C.; URBAN, M.; VAN DE MEENE, A. M. L.; HAMMOND-KOSACK, K. E. Characterisation of the *Fusarium graminearum* –Wheat Floral Interaction **,** v. 2011.

CARVALHO, F, I, F,; LORENCETTI, C,; BENIN, G, Estimativa de correlação por meio do coeficiente de Pearson. Capítulo 3. In: **Estimativas e implicações da correlação no melhoramento vegetal**, Pelotas: UFPel, 2004, 142p.

CBPTT- Comissão brasileira de Pesquisa de Trigo e triticale, **Indicações técnicas para trigo e triticale safra 2011**, Cascavel, 167p.

CBPTT- Comissão brasileira de Pesquisa de Trigo e triticale. **Indicações técnicas para trigo e triticale safra 2013**. Londrina, 225p.

CONAB – Companhia Nacional de abastecimento - Acompanhamento da safra Brasileira de grãos 2011/2012 oitavo levantamento, maio 2012 disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_05_10_08_49_52_boletim_maio_2012.pdf.

CONAB – Companhia Nacional de abastecimento – Conjuntura semanal Período de 30/09 a 04/10/2013

CUTHBERT, P.A.; SOMERS,D. J.; THOMAS, J.; CLOUTIER, S.; BRULÉ-BABEL A. Fine mapping *Fhb1*, a major gene controlling fusarium head blight resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) **Theor Appl Genet,** v.112, p.1465–1472, 2006.

CUTHBERT, P.A.; SOMERS, D.J. BRULÉ-BABEL, A**.** Mapping of *Fhb2* on chromosome 6BS: a gene controlling Fusarium head blight field resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) **Theor Appl Genet,** v. 114, p. 429–437 2007.

CRUZ, C.D. Programa genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2001. 648p.

DOYLE, J,J, e DOYLE, J,L, A rapid DNA isolation procedure for s mall quantities of fresh leaf tissue, **Phytochemistry Bulletin,** v. 19, p. 11-15, 1987.

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of The United Nations data. Disponível em: < http://faostat.fao.org/>. Acesso em julho. 2013.

FALCONER, D,S, e MACKAY, T,F,C, Introduction to quantitative genetics, 4 ed, Harlow: Longmans, 1996, 464p.

MANTEL, N.A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach, **Cancer Res,** v. 27, p. 209-220, 1967.

MARDI, M., PAZOUKI, L., DELAVAR, H., KAZEMI, M.B., GHAREYAZIE, B., STEINER, B., NOLZ, R. QTL analysis of resistance to Fusarium head blight in wheat using a Frontana-derived population. **Plant Breeding,** v. 125, p. 313-317, 2006.

MESTERHÁZY, Á. Types and components of resistance to Fusarium head blight of wheat. **Plant Breeding,** v. 114, p. 337-386,1995.

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de Fitopatologia.** Recife,133p. 2001.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-290, 1978.

OR Sementes disponível em: http://www,orsementes,com,br/?cultivares=pampeano. Acesso em julho de 2013

PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. **Doenças em cereais de inverno.** Passo Fundo RS. 1995.

REIS, E. M. E CASA, R.T. Doenças do trigo manual de Fitopatologia volume 2 In: **Doenças das plantas cultivadas** 4ª Ed., editora agronomia Ceres lrda. São Paulo, SP. 2005. P. 631- 638.

RIBEIRO DO VALE, F.X.; PARLEVLIET, J.E.; ZAMBOLIM, L. Concepts in plant disease resistance. **Fitopatol Bras,** v. 26, p. 577- 589, 2001.

RÖDER, M.S.; KORZUN, V.; WENDEHAKE, K.; PLASCHKE, J.; TIXIER, M., A microsatellite map of wheat. **Genetics,** v. 149, p. 2007-2023, 1998.

ROHLF, J, NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2,1, New York: Exeter, Software, 2001.

ROY, J.K.; LAKSHMIKUMARAN, M.S.; BALYAN, H.S.; GUPTA, P.K. AFLP-based genetic diversity and its comparison with diversity based on SSR, SAMPL, and phenotypic traits in bread wheat. **Biochemical Genetics,** v.42, n.1-2, p.43-59, 2004.

SAS Institute, The SAS system for Windows, Release 9,2, SAS Inst,, Cary, NC. 2013.

STACK, R,W,; MCMULLEN, M,P,; A Visual Scale to Estimate Severity of Fusarium Head Blight in Wheat Extension Plant Pathologist North Dakota State University Fargo, North Dakota Reviewed June 2011.

STEINER, B.; LEMMENS, M.; GRIESSER, M.; SCHOLZ, U.; SCHONDELMAIER, J.; BUERSTMAYR, H. Molecular mapping of resistance to Fusarium head blight in the spring wheat cultivar Frontana. **Theor appl genet,** v. 109, p. 215-224, 2004.

SNEATH, PHA; SOKAL, RR. Numeric Taxonomy: the principles and practice of numerical classification. SanFrancisco: W. H. Freeman, 573p. 1973.

SHI, J. R.; XU, D. H.; YANG, H. Y.; LU, Q. X.; BAN, T. DNA marker analysis for pyramided of Fusarium head blight (FHB) resistance QTL from different germplasm **Genetica**, v. 133, p. 77–84, 1973.

VIEIRA, E.A.; CARVALHO, F.I.F.; BERTAN, I.; KOOP, M.M.; ZIMMER, P.D.; BENIN, G.; SILVA, J.A.G.; HARTWIG, I.; MALONE, G.; OLIVEIRA, A.C. Association between genetic distances in wheat (*Triticum aestivum* L.) as estimated by AFLP and morphological markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.2, p.392-399, 2007.

XUE, S.; XU, F.; TANG, M.; ZHOU Y.; LI, G.; AN, X.; LIN, F.; XU, H.; JIA, H.; ZHANG, L.; KONG, Z.; MA, Z. Precise mapping *Fhb5,* a major QTL conditioning resistance to Fusarium infection in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) **Theor Appl Genet,** v. 123, p. 1055-1063, 2011.

XUE, S.; LI, G.; JIA, H.; XU, F.; LIN, F.; TANG, M.; WANG, Y.; AN, X.; XU, H.; ZHANG, L.; KONG, Z.; MA, Z. **Fine** mapping *Fhb4,* a major QTL conditioning

resistance to Fusarium infection in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) **Theor Appl Genet,** v. 121, p. 147-156, 2010.

# Capítulo III:Experimento II: Segregação de marcadores SSR (*Single Sequence Repeats)* para resistência à giberela (*Giberela zeae*) em população $F_2$ de trigo (*Triticum aestivum* L.)

## 3.1 Introdução

A giberela é uma das doenças que mais causa prejuízos à triticultura brasileira, e devido à ineficiência dos tratos culturais no controle da doença, a melhor estratégia para o controle é o uso da resistência genética (ALVES, 2010). Desta foram identificados QTL associados à resistência à giberela em trigo: *Fhb1*(CUTHBERT et al., 2006), *Fhb2*(CUTHBERT et al., 2007), *Fhb4* (XUE et al., 2010) *e Fhb5* (XUE et al., 2011).

Estudos indicam que cultivar de trigo brasileira Frontana tem sido a mais usada mundialmente como fonte de resistência à ferrugem-da-folha, e além de possuir os genes Lr15, Lr34, identificados como responsáveis, em conjunto, pela maior parte dessa resistência (SOUSA, 1995) apresenta potencial para ser utilizada em programas de melhoramento como fonte de resistência à giberela. Sua resistência foi analisada através de estudos genéticos clássicos, que indicaram um mínimo de dois a três genes de herança aditiva (SINGH et al., 1995; STEINER et al., 2004; MARDI et al., 2006).

Resultados indicam que à resistência a giberela de Frontana baseia-se essencialmente sobre a resistência à infecção inicial, enquanto que a resistência à propagação de fungos no interior da espiga parece ser de menor importância. Os tipos de resistência são controlados, em parte, por *loci* independentes, QTL num cromossomo 3A e 5A parecem ser essenciais para a expressão da resistência a doença na cultivar (STEINER et al., 2004; MARDI et al., 2006),

A combinação de genes de resistência por métodos clássicos de melhoramento tem sido limitada, devido à presença de um gene na planta mascarar o efeito de outro, o que torna difícil à avaliação fenotípica da presença individual de cada gene (MILACH e CRUZ, 1997). Sendo assim o uso de marcadores moleculares, associados a genes que confiram resistência à giberela em trigo, pode aumentar a eficiência da seleção, e possibilita a seleção de caracteres de interesse com base no genótipo.

QTL foram identificados em genótipos com níveis consideráveis de resistência, no entanto, esses marcadores foram desenvolvidos em genótipos exóticos, que não são os utilizados em programas de melhoramento de trigo no Brasil. Para possibilitar o uso deles na seleção assistida, é necessário fazer sua validação para genótipos a ser utilizados como fontes de resistência.

Frente ao exposto o objetivo deste trabalho foi verificar a herança genética da resistência à giberela utilizando a cultivar Frontana como fonte de resistência, assim como avaliar o potencial de 19 *primers* descritos na literatura como significativamente associados à QTL de resistência a giberela para serem utilizados como ferramenta auxiliar na seleção de genótipos que contenham resistência à giberela em programas de melhoramento de trigo no Brasil.

## 3.2 Material e métodos

### Material vegetal e extração de DNA

Foram utilizadas nove cultivares brasileiras (Tabela 3.1), e após uma população $F_2$, originadas de pais contrastantes para o caráter reação a infecção por giberela. A população foi obtida no ano de 2010, tendo sido originada do cruzamento entre as cultivares Frontana e Itaipú (88 indivíduos), resistente e suscetível à giberela, respectivamente.

### Extração de DNA

A obtenção de material vegetal das cultivares para a extração de DNA, sementes das mesmas foram semeadas em caixa *gerbox*® contendo papel *germitest*, que foi umedecido quando necessário; sendo que no sétimo dia procedeu-se a extração do DNA, utilizando a parte aérea destas plântulas.

A obtenção de material vegetal dos indivíduos $F_2$ para a extração de DNA foi a partir de plantas cultivadas em casa de vegetação em baldes contendo solo, obtidas de sementes provenientes de uma única planta $F_1$. Após 17 dias procederam-se as coletas envelopando em papel alumínio e imediata imersão em

nitrogênio líquido, após as amostras foram levadas ao laboratório do Centro de Genômica e Fitomalhoramento – CGF/ UFPel, no qual procederam-se as extrações.

Tabela 3.1 Genealogia das cultivares utilizadas.

| Cultivar | Cruzamento | Estatura | NR | Classe comercial | Ano de lançamento | Instituição |
|---|---|---|---|---|---|---|
| BRS 194 | CEP 14/BR 23//CEP 19 | Alta | S | Pão | 2000 | Embrapa |
| BRS 220 | EMBRAPA 16/TB 108 | Média | MS | Pão | 2003 | Embrapa |
| Marfim | ORL 94101/2*ORL 95688 | Baixa | MS/S | Pão | 2007 | OR/Biotrigo |
| Valente | BR 18/Alcover | Média | S | Pão | 2004 | OR/Biotrigo |
| Supera | PF-9099/OR-1 | Média | MS | Pão | 2004 | OR/Biotrigo |
| Quartzo | ÔNIX/AVANTE | Média | MS | Pão | 2007 | OR/Biotrigo |
| TBIO Itaipu | Quartzo/Safira | Média | MS | Doméstico | 2012 | Biotrigo |
| Pampeano | ORL91274/ORL93807//ORL95711'S'(ORL 95711's'=BR35//BR14*2/Sumai#3/OR-1) | Méd/alta | MR | Brando | 2004 | OR/Biotrigo |
| Frontana | Fronteira/Mentana | - | R | - | 1940 | EEF BAGÉ |

Fonte: Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale (CBPTT, 2011 e 2013; OR sementes (2013).
Ciclo: P= precoce, M= médio; EST= estatura de planta: B= baixa, M= média, A= alta. NR= nível de resistência à giberela, S=suscetível, MS= moderadamente suscetível, MR= moderadamente resistente, R=resistente.

A metodologia de extração de DNA foi a descrita por Doyle e Doyle (1987) mediante as modificações, conforme descrito a seguir: 150 mg de folhas jovens foram maceradas em nitrogênio líquido, condicionadas em tubos estéreis de 2,0 mL e adicionando 700 µL de tampão de extração CTAB (100 mM de Tris-HCl, 1,4 M de NaCl, 20 mM de EDTA, 2% de CTAB, 1% de PVP, 0,5% de β-Mercaptoetanol). Após, as amostras foram mantidas em agitação por inversão (50-60 vezes), a seguir incubadas a 65°C por 50-60 minutos, posteriormente adicionou-se igual volume de CIA 24:1 (Clorofórmio: Alcool Isoamílico) mantendo-as sob agitação por inversão (50-60 vezes a cada 10 minutos), e logo após centrifugadas a 12.000 g por um período de 10 minutos. A fase sobrenadante foi recuperada em tubos de 1,5 ml e cuidadosamente misturada com igual volume de etanol a −20°C. Seguido desta etapa realizou-se lavagens do pellet: 700 µL de etanol 70%, mantido por 20 minutos; após a retirada adicionou-se 300 µL de etanol 100% por alguns segundos, posteriormente ao pellet estar desidratado realizou-se a diluição do mesmo em 50 µL de TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8.0) contendo 0,5 µg $mL^{-1}$ de RNase, e incubado a 37°C por 60minutos.

A quantificação do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%, com marcador de peso molecular Low mass DNA ladder (Invitrogen ®). O gel foi

corado com blue green e visualizado em equipamento fotodocumentador sob raios UV (ultravioleta). Após as amostras foram padronizadas para a concentração 50-100 ng $\mu L^{-1}$ e armazenadas a temperatura de −20◦C para o subseqüente uso em amplificações por PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

**Amplificação de DNA**

O DNA genômico isolado foi amplificado via PCR utilizando 19 pares de oligonucleotideos iniciadores (*primers*) alvos *loci* SSR da série Xgwm, Xbarc entre outros, os quais são descritos na literatura como significativamente associados à QTL de resistência a giberela, cujas seqüências estão descritas no apêndice I.

A reação de PCR foi realizada com o volume final de 13,5 µL, contento 2,5 µLl de primer (Foward+ Reverse na concentração de 10 mM); 50-100 ng de DNA genômico; água ultrapura (Invitrogem®). A PCR foi realizada em termociclador marca (Peltier Thermal Cycler) modelo PTC–100™ de acordo com o programa proposto por Röder et al. (1998).

Os produtos de PCR foram desnaturados com 32% de SD [solução desnaturante (99% de formamida; 0,5% de EDTA 0,5M; 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% dexileno cianol)] a temperatura de 94°C por 5 minutos e imediatamente condicionados em gelo. Destas amostras desnaturadas retirou-se 4,5 µL para aplicação em gel de poliacrilamida 5% com tampão TBE 1X (89 mM de Tris; 0,89 M de ácido bórico e 8 mM de EDTA pH 8,0). Para o controle do tamanho dos alelos foi aplicado 3 µL de marcadores de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder da marca Invitrogen®. A eletroforese foi conduzida em voltagem de 9 V $cm^{-1}$ por 2 horas e 30 minutos. A revelação do gel foi realizada com nitrato de prata conforme o protocolo descrito por Bassam et al. (1991).

Dos produtos de PCR também foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 2,5%. O gel foi corado com blue green e visualizado em equipamento fotodocumentador sob raios UV (ultravioleta), destacando que os produtos da PCR dos indivíduos $F_2$ somente foi realizada eletroforese em gel de agarose 2,5%.

**Análise dos dados**

**Análise de géis e conversão de dados**

Os perfis eletroforéticos dos géis de poliacrilamida e agarose foram fotografados e analisados de forma manual. A presença e a ausência de bandas de cada genótipo foram registradas na forma de binários, ou seja, 1 para presença e 0 para ausência.

A relação genética entre os genótipos foi analisada pelo coeficiente de similaridade de Dice (1945), realizando-se a análise de agrupamento com o método UPGMA (Sneath e Sokal, 1973), e posteriormente os dados representados de forma gráfica por um dendrograma O coeficiente de correlação (r) foi calculado com o teste de Mantel (MANTEL, 1967) utilizando 1000 permutações para avaliar o grau de confiabilidade entre a matriz de similaridade e os dados de agrupamento. As análises descritas acima foram conduzidas no software NTSYS-PC Ver. 2.1 (ROHLF, 2000).

A variância da similaridade genética (PCoA) em coordenadas otimizadas foi verificada pela análise de Eigen, obtendo-se o porcentagem de variação de cada dimensão e a variação acumulada. Esta análise, bem como a obtenção do gráfico foram conduzidas no software NTSYS-PC 2.1 (ROHLF, 2000).

As análises dos parâmetros de diversidade genética para cada locus foram: número de alelos por locus (Na); número efetivo de alelos (Ne=1/1-He) (Hartl and Clark, 1989); frequência alélica; heterozigosidade esperada (He = 1 -ΣP $ij^2$, onde $p_i$ é a frequência alélica na população $i^{th}$ para cada locus); heterozigosidade observada (Ho) foi calculada a partir do número de acessos heterozigotos dividido pelo número total de acessos (Nei, 1973); índice de fixação ou coeficiente de endogamia (F = 1 – Ho/He) (Wright, 1978); e o índice de informação de Shannon (Lewontin, 1972). Tais parâmetros foram calculados utilizando o software POPGENE Ver. 1.32 (Yeh et al., 1997).

**3.3 Resultados e Discussão**

Entre os 19 *primers* alvos de *loci* SSR (apêndice I) utilizados no estudo, destes, três (Xbarc 102, Xgwm 133 e Xgwm 644) apresentaram amplificação nula, dois foram monomórficos (Xgwm 533 Xgwm194), dos 14 que foram polimórficos

quando comparou-se as cultivares suscetíveis com Frontana, quatro foram polimórficos entre Frontana e Itaipú (Xdupw 227, Xgwm 293, Xbarc 147 e Xgwm 493) sendo estes utilizados neste o estudo. A amplificação destes *loci* resultou na identificação de um ou dois alelos por cultivar, sendo desta maneira, considerados como marcadores unilocus.

Na análise utilizando os 14 *primers* polimórficos foi possível identificar 29 alelos, a elucidação da relação genética entre as cultivares demonstrada na forma de um dendrograma (Figura 3.1). Após a análise conjunta dos parâmetros de diversidade genética, as nove cultivares foram divididas em 4 grupos, visando fazer inferências sobre a variabilidade genética dentro de cada grupo e qual a contribuição para a diversidade genética total.

Na análise utilizando os 14 *primers* polimórficos foi possível identificar 29 alelos, a elucidação da relação genética entre as cultivares demonstrada na forma de um dendrograma (Figura 3.1), o qual foi obtido pelo método UPGMA, a partir da matriz de similaridade genética de Dice (1945), baseada no polimorfismo dos *loci* SSR avaliados. A partir da análise de agrupamento UPGMA foi possível constatar a existência de diversidade genética entre as cultivares, com similaridade variando desde 0,42 a 1,00.

Com base nos resultados da análise de *loci* SSR realizadas neste estudo foi possível verificar a diversidade e a relação genética das cultivares, de maneira que os *loci* avaliados possibilitaram a discriminação dos 9 genótipos de trigo avaliados. A similaridade genética média entre os genótipos foi de 0,73, separando os genótipos em 4 grupos, nos quais Frontana, Quartzo, BRS 220, Itaipú, Marfin e Supera formaram o grupo I; no grupo II isolou-se a cultivar Valente, no grupo III BRS 194 e no grupo IV Pampeano. Os genótipos caracterizados como possíveis portadores de níveis de resistência à giberela (Frontana e Pampeano) apresentaram-se em lados opostos pelos resultados obtidos neste estudo, talvez pelo fato de estas apresentarem QTL diferentes para a resistência a giberela, pois foram polimórficos para todos os *primers* utilizados (ANDERSON et al., 2001; STEINER et al., 2004; CUTHBERT et al., 2006; CUTHBERT et al., 2007; SHI et al., 2008; XUE et al., 2010; ALVES, 2010; ALVES et al., 2013).

Os resultados da análise de coordenadas principais (PCoA) corroboram com os resultados obtidos pelo método de agrupamento hierárquico demonstrando na forma de dendrograma. A análise de possibilitou verificar o grau variância otimizada

da variabilidade genética de forma triidimencional. Os resultados obtidos apresentaram valor ótimo com as duas primeiras coordenadas principais com o valor acumulado de variância de 80,83%. A contribuição da PCoA1 foi de 71,14% e da PCoA2 foi de 9,69%, e da PCoA3 foi de 6,82%, sendo PCoA1 a coordenada que mais representa a variabilidade genética dos genótipos de trigo, conforme pode ser verificado na representação gráfica da figura 3.2.

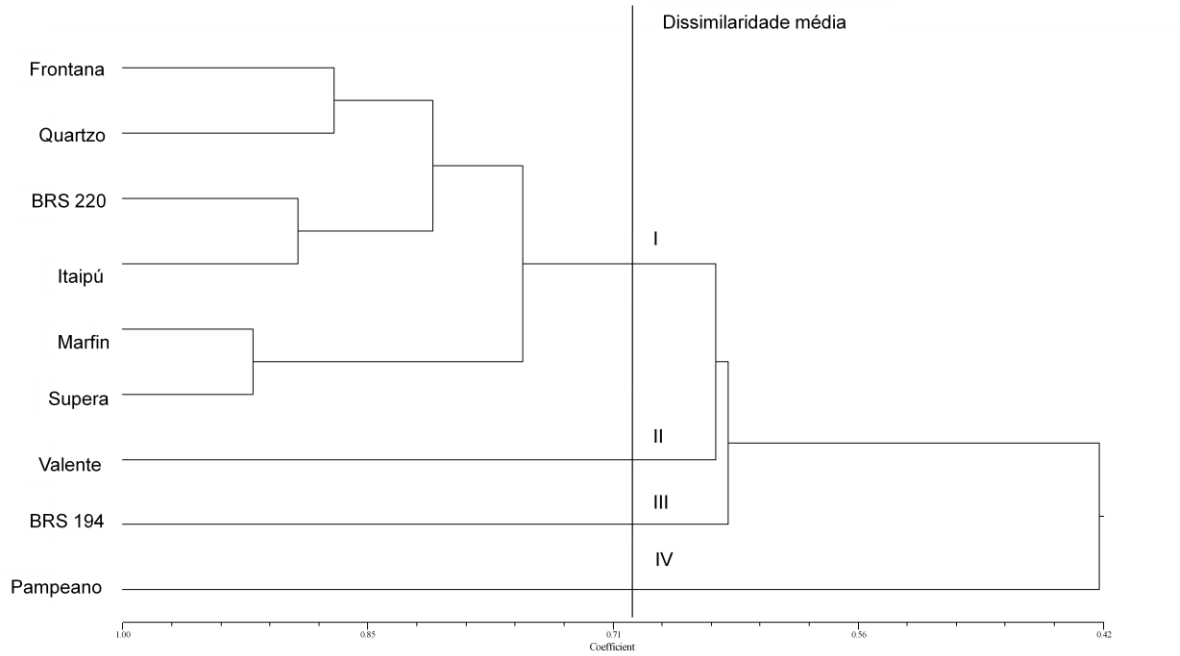


Figura 3. 1 Dendrograma da análise de agrupamento de 9 cultivares de trigo utilizando a UPGMA e o coeficiente de Dice, Coeficiente de correlação cofenético r = 0,70. CGF-FAEM/UFPel – Pelotas-RS,2013.

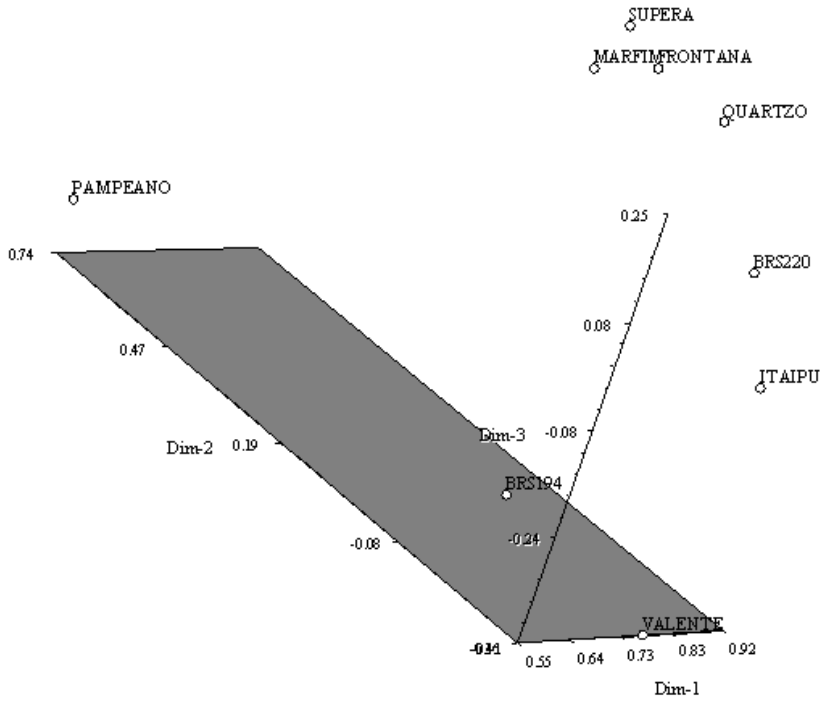


Figura 3. 2 Dispersão bidimensional das cultivares, baseada na análise de Coordenadas Principais (PCoA). Os Eigenvalues obtidos através da PCoA foram: PCoA1 71,14%, da PCoA2 foi de 9,69% e da PCoA3 foi de 6,82%, obtidos pela análise Eigen a partir da matriz de similaridade genética Dice (1945).

A partir dos dados da população obtida pelo cruzamento entre Frontana e Itaipú obtiveram-se parâmetros de diversidade genética. A avaliação dos 4 *loci* polimórficos revelou 8 alelos na população segregante. A heterozigosidade esperada apresentou média de 0,40 com valores variando de 0,26 (Xgwm 293) a 0,47 (Xgwm 493). Em todos os *loci* avaliados a heterozigosidade observada apresentou valores superiores aos da heterozigosidade esperada (Tabela 3.2). A freqüência alélica está apresentada na tabela 3.3 e na figura 3.4.

Mardi et al. (2006) em uma análise de QTL para resistência a giberela utilizando Frontana como doadora da resistência identificaram três regiões genômicas associadas com a resistência presentes nos cromossomos 1B, 3A e 7A.

Dentre os 4 primers que foram polimórficos, Xdupw 227 e Xgwm 293 são indicados como ligados a QTL para resistência Tipo I, sendo que o primeiro foi identificado em estudos com a própria cultivar Frontana (RÖDER et al., 1998; STEINER et al., 2004) e o segundo com a cultivar Wangshuibai (RÖDER et al., 1998; SHI et al., 2008); os primers Xbarc 147 e Xgwm 493 são indicados como

ligados a QTL para resistência Tipo II, identificados em estudos com a cultivar Sumai 3 (RÖDER et al., 1998; ANDERSON et al., 2001; SHI et al., 2008). Isso indica que a cultivar Frontana além de apresentar regiões gênicas relacionadas com a resistência Tipo I (SINGH et al., 1995; STEINER et al., 2004; MARDI et al., 2006; SHI et al., 2008, ALVES et al., 2013), pode apresentar regiões gênicas relacionadas com a resistência Tipo II.

O marcador Xdupw 227, foi descrito por Steiner et al. (2004) como significativamente associado à resistência à giberela em um estudo utilizado Frontana como doadora da resistência.

Dos marcadores utilizados para o cromossomo 5A: Xbarc117, Xgwm293, Xgwm304, Xgwm129 e Xgwm415 (RÖDER et al., 1998; SHI et al., 2008; XUE et al., 2011), apenas Xgwm 293 foi polimórfico entre Itaipú e Frontana.

A elucidação da relação genética entre os indivíduos e as cultivares é demonstrada na forma de um dendrograma (Figura 3.4), o qual foi obtido pelo algoritmo UPGMA, a partir da matriz de similaridade genética de Dice (1945), baseada no polimorfismo dos *loci* SSR avaliados.

Com base nos resultados da análise de *loci* SSR realizadas neste estudo foi possível verificar a diversidade e a relação genética das cultivares, de maneira que os *loci* avaliados possibilitaram a discriminação dos 88 segregantes e das 2 cultivares. A similaridade genética média entre os genótipos foi de 0,80, separando os genótipos de acordo com a associação a repulsão de acordo com a associação com os genitores.

Os resultados da análise de coordenadas principais (PCoA) corroboram com os resultados obtidos pelo método de agrupamento hierárquico demonstrado na forma de dendrograma. A análise de possibilitou verificar o grau variância otimizada da variabilidade genética de forma bidimensional. Os resultados obtidos apresentaram valor ótimo com as duas primeiras coordenadas principais com o valor acumulado de variância de 87,42%. A contribuição da PCoA1 foi de 72,74%, da PCoA2 foi de 5,93% e da PCoa3 de 4,40%, sendo PCoA1 a coordenada que mais representa a variabilidade genética dos genótipos de trigo, conforme pode ser verificado na representação gráfica da Figura 3.5.

Tabela 3.2 Parâmetros de variabilidade genética.

| *Loci* | Na | Ne | He | Ho |
|---|---|---|---|---|
| Xgwm 493 | 2,0 | 1,91 | 0,47 | 0,45 |
| Xbarc 147 | 2,0 | 1,88 | 0,46 | 0,65 |
| Xgwm 293 | 2,0 | 1,36 | 0,26 | 0,29 |
| Xdupw 227 | 2,0 | 1,72 | 0,41 | 0,51 |
| Media | 2,0 | 1,72 | 0,40 | 0,48 |
| Total | 8,0 | - | - | - |

Na=numero de alelos observados; Ne= numero de alelos efetivos; He= heterozigosidade esperada, Ho-= heterozigosidade observada.

Tabela 3.3 Freqüência alélica dos *primers*: *Xdupw 227; Xgwm 293; Xbarc 147; Xgwm 493.*

| Alelo*Loci* | Xdupw 227 | Xgwm 293 | Xbarc 147 | Xgwm 493 |
|---|---|---|---|---|
| Alelo A | 0,7013 | 0,1591 | 0,6037 | 0,6250 |
| Alelo a | 0,2987 | 0,8409 | 0,3963 | 0,3750 |

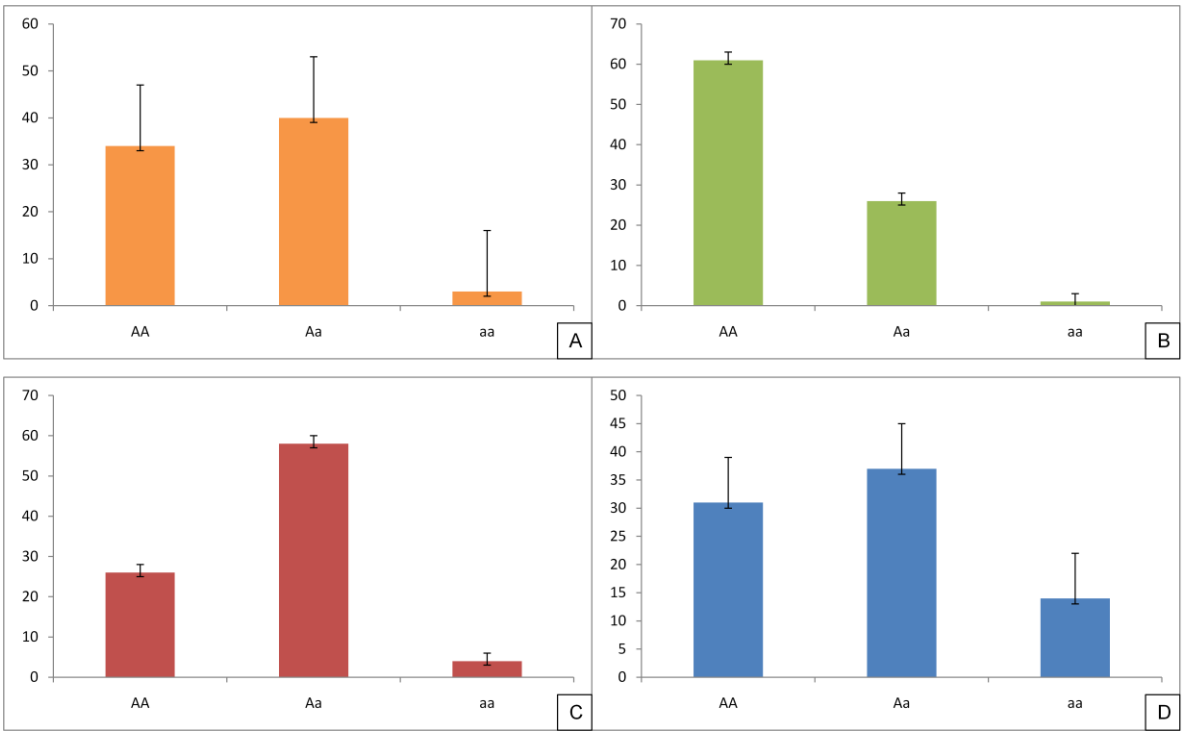


Figura 3.3 Segregação encontrada na população $F_2$. Alelo proveniente de Frontana representado como A, e alelo proveniente de Itaipú representado como a, exceto para a figura B, na qual AA representa Frontana e Aa representa Itaipu. A) *Primer* Xdupw 227 B) *Primer* Xgwm 293; C) *Primer* Xbarc 147; e D) *Primer* Xgwm 493.

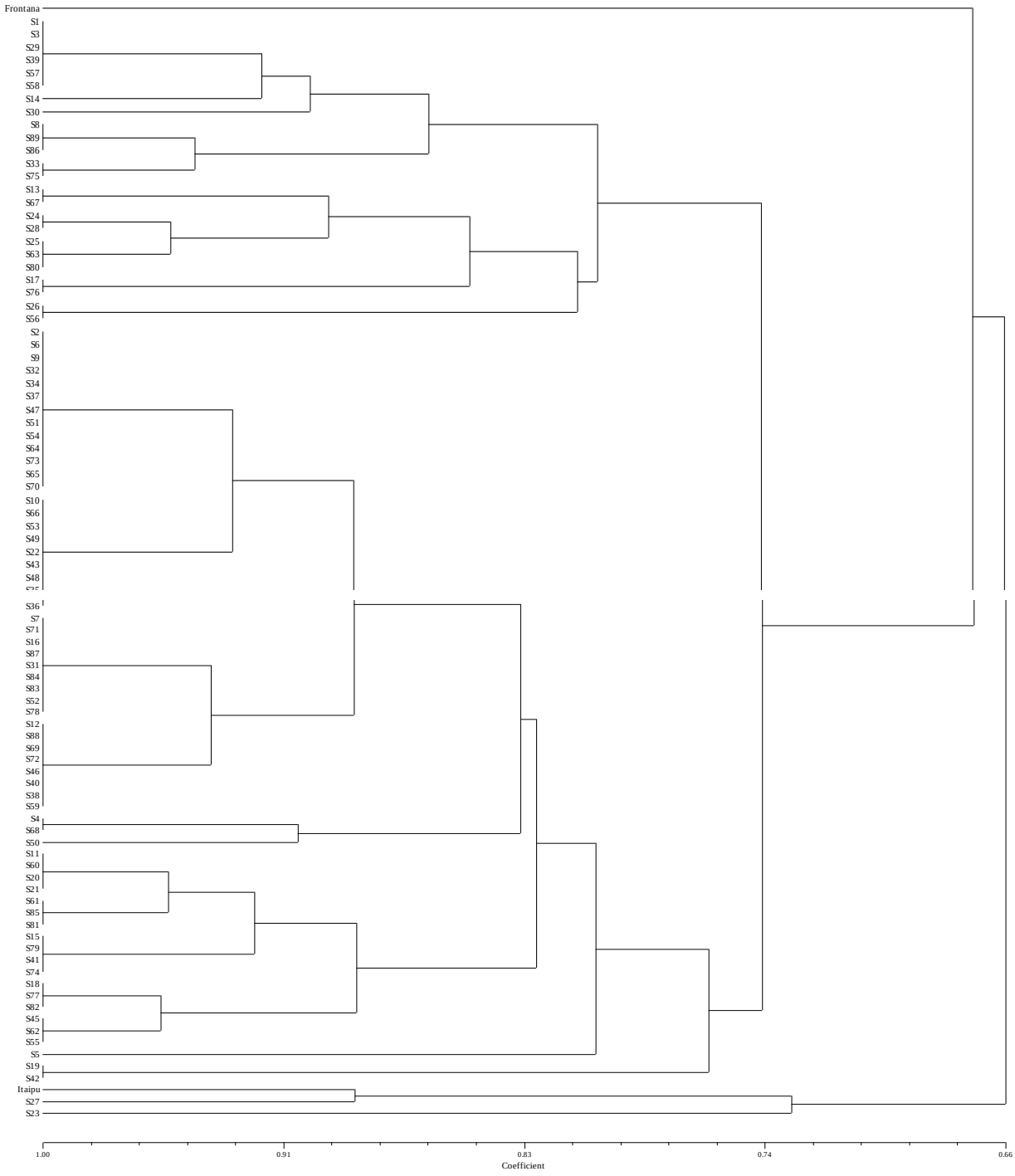


Figura 3. 4 Dendrograma da análise de agrupamento de duas cultivares de trigo Frontana e Itaipú e 88 indivíduos obtidos a partir do cruzamento destas cultivares, utilizando a UPGMA e o coeficiente de Dice, Coeficiente de correlação cofenético r = 0,70. CGF-FAEM/UFPel – Pelotas-RS,2013.

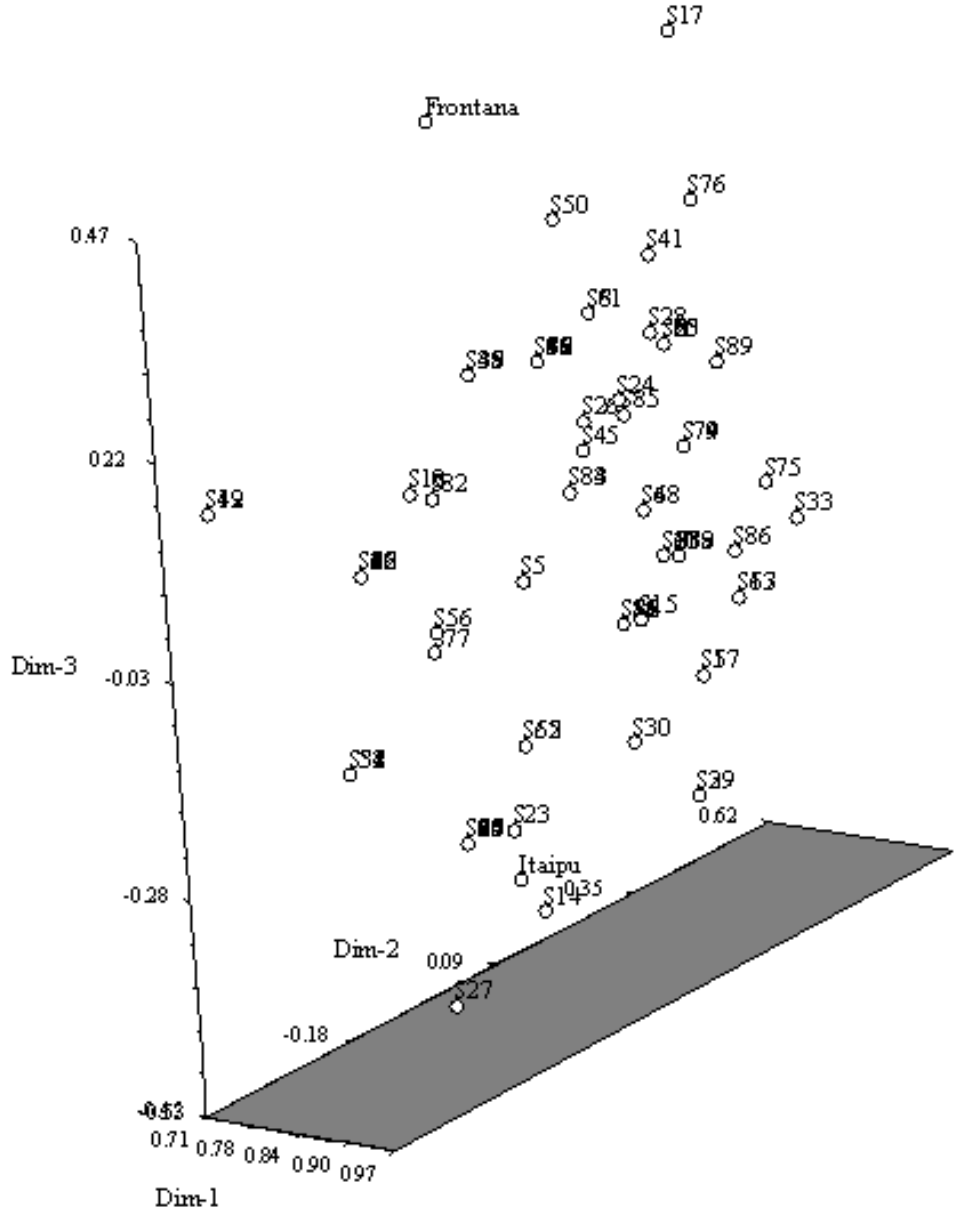


Figura 3. 5 Dispersão bidimensional das cultivares, baseada na análise de Coordenadas Principais (PCoA). Os Eigenvalues obtidos através da PCoA foram: PCoA1 72,74% e da PCoA2 foi de 5,93% e PCoA3 foi de 4,40%, obtidos pela análise Eigen a partir da matriz de similaridade genética Dice (1945).

## 3.4 Conclusões

A cultivar Frontana que apresenta resistência à giberela, além de apresentar alelos relacionadas com a resistência Tipo I apresenta polimorfismo no marcador associado à resistência Tipo II, o que pode conferir uma resistência adicional.

Os 14 *primers* SSR citados neste estudo apresentam potencial para serem utilizados em programas de melhoramento de trigo no Brasil para resistência à giberela.

## Referências bibliográficas


ALVES, R. H. **Reação de resistência à giberela em cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.), avaliada m condições de campo e casa de vegetação.** 2010. 57f . Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Estadual do Paraná Marechal Cândido Rondon.

ALVES, R. H.; NORA, T. D.; FRANCO, F. A.; COSTA, A. C. T.; STANGARLIN, J. R Reação de resistência tipo I à Giberela em cultivares de trigo **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 39, n. 2, p. 97-101, 2013.

ANDERSON, J.A.; STACK, R.W. ; LIU, S.; WALDRON, B.L; FJELD, A.D.; COYNE, C.; MORENO-SEVILLA, B.; MITCHELL FETCH, J.; SONG, Q.J.; CREGAN, P.B.; FROHBERG, R.C. DNA markers for Fusarium head blight resistance QTL in two wheat populations. **Theor appl genet,** v. 102, p. 1164-1168, 2001.

BASSAM, BJ; CAETANO-ANOLL´ES, G; GRESSHOff, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Anal Biochemistry**, v.196, p.80-83, 1991.

CBPTT- Comissão brasileira de Pesquisa de Trigo e triticale, **Indicações técnicas para trigo e triticale safra 2011**, Cascavel, 2006, 167p.

CBPTT- Comissão brasileira de Pesquisa de Trigo e triticale, **Indicações técnicas para trigo e triticale safra 2011**, Cascavel, 2006, 167p,

CBPTT- Comissão brasileira de Pesquisa de Trigo e triticale. **Indicações técnicas para trigo e triticale safra 2013**. Londrina, 2012, 225p.

CUTHBERT, P.A.; SOMERS,D. J.; THOMAS, J.; CLOUTIER, S.; BRULÉ-BABEL A. Fine mapping CUTHBERT, P.A.; SOMERS,D. J.; THOMAS, J.; CLOUTIER, S.; BRULÉ-BABEL A. Fine mapping *Fhb1*, a major gene controlling fusarium head blight resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) **Theor Appl Genet,** v.112, p.1465–1472, 2006.

CUTHBERT, P.A.; SOMERS, D.J. BRULÉ-BABEL, A**.** Mapping of *Fhb2* on chromosome 6BS: a gene controlling Fusarium head blight field resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) **Theor Appl Genet,** v. 114, p. 429–437 2007.

DOYLE, J,J, e DOYLE, J,L, A rapid DNA isolation procedure for s mall quantities of fresh leaf tissue, **Phytochemistry Bulletin,** v. 19, p. 11-15, 1987.

MANTEL, N.A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach, **Cancer Res,** v. 27, p. 209-220, 1967.

MARDI, M.; PAZOUKI, L.; DELAVAR, H.; KAZEMI, M.B.; GHAREYAZIE, B.; STEINER, B.; NOLZ, R. QTL analysis of resistance to Fusarium head blight in wheat using a Frontana-derived population. **Plant Breeding, v. 125, p.** 313-317, 2006.

MILACH, S. C. K. e CRUZ, R. P. **Piramidização de genes de resistência às ferrugens em cereais.** *Cienc. Rural* [online]. 1997, vol.27, n.4, pp. 685-689. ISSN 0103-8478.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, v. 89, p. 583-290, 1978.

OR Sementes disponível em: http://www,orsementes,com,br/?cultivares=pampeano. Acesso em julho de 2013

RÖDER, M.S.; KORZUN, V.; WENDEHAKE, K.; PLASCHKE, J.; TIXIER, M., A microsatellite map of wheat. **Genetics,** v. 149, p. 2007-2023, 1998.

ROHLF, J, NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2,1, New York: Exeter, Software, 2001.

STEINER, B.; LEMMENS, M.; GRIESSER, M.; SCHOLZ, U.; SCHONDELMAIER, J.; BUERSTMAYR, H. Molecular mapping of resistance to Fusarium head blight in the spring wheat cultivar Frontana. **Theor appl genet,** v. 109, p. 215-224, 2004.

SNEATH, PHA; SOKAL, RR. Numeric Taxonomy: the principles and practice of numerical classification. SanFrancisco: W. H. Freeman, 573p. 1973.

SHI, J. R.; XU, D. H.; YANG, H. Y.; LU, Q. X.; BAN, T. DNA marker analysis for pyramided of Fusarium head blight (FHB) resistance QTL from different germplasm **Genetica**, v. 133, p. 77–84, 1973.

SINGH, R.P.; HONG, M.A.; RAJARAM, S. Genetic analysis of resistance to scab in spring wheat cultivar frontana. **Plant disease,** v. 79, n. 3, 1995.

VIEIRA, E.A.; CARVALHO, F.I.F.; BERTAN, I.; KOOP, M.M.; ZIMMER, P.D.; BENIN, G.; SILVA, J.A.G.; HARTWIG, I.; MALONE, G.; OLIVEIRA, A.C. Association between genetic distances in wheat (*Triticum aestivum* L.) as estimated by AFLP and morphological markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.2, p.392-399, 2007.

XUE, S.; XU, F.; TANG, M.; ZHOU Y.; LI, G.; AN, X.; LIN, F.; XU, H.; JIA, H.; ZHANG, L.; KONG, Z.; MA, Z. Precise mapping *Fhb5,* a major QTL conditioning resistance to Fusarium infection in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) **Theor Appl Genet,** v. 123, p. 1055-1063, 2011.

XUE, S.; LI, G.; JIA, H.; XU, F.; LIN, F.; TANG, M.; WANG, Y.; AN, X.; XU, H.; ZHANG, L.; KONG, Z.; MA, Z. **Fine** mapping *Fhb4,* a major QTL conditioning resistance to Fusarium infection in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) **Theor Appl Genet,** v. 121, p. 147-156, 2010.

## Considerações finais

As cultivares Frontana e Pampeano apresentaram variabilidade genética para o caráter resistência a giberela. Sendo assim a utilização das mesmas é indicada como fonte de níveis de resistência à giberela em programas de melhoramento de trigo, podendo ser utilizadas em estudos com piramidação de genes para resistência à giberela, e, com auxílio dos marcadores utilizados neste estudo realizada a identificação dos segregantes que contenham alelos de resistência.

# APÊNDICE

Apêndice I Informações dos *primers* utilizados no estudo.

| Fonte de resistência | Cr | QTL | TR | Marcador | Motivo do SSR | Seqüência do primer | Referências |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Wangshuibai/DH181 | 3A | QFhs,ndsu-3AS | | *Xgwm2* | (CA)18 | F- CTGCAAGCCTGTGATCAACT<br>R - CATTCTCAAATGATCGAACA | Röder et al., 1998 |
| Frontana | 3A | Qfhs,ndsu-3AS | I | *Xdupw227* | | F – CATGTTGGGAATTTCTGTCG<br>R - CCACGAGCCATGTATCACC | Röder et al 1998; Steiner et al., 2004 |
| Frontana | 5A | Qfhs,ndsu-3AS | II | *Xgwm129* | (GT)8(N)28(GT)16 | F – TCAGTGGGCAAGCTACACAG<br>R - AAAACTTAGTAGCCGCGT | Steiner et al., 2004; Shi et al., 2008 |
| Frontana | 5A | Qfhs,ifa-5A | II | *Xbarc197* | | F – CGCATGGTCAGTTTTCTTTTAATCCT<br>R - CGCTCTCCTTCATTTATGGTTTGTTG | Steiner et al., 2004 |
| Frontana/ Wangshuibai | 5A | Qfhs,ifa-5A | III | *Xgwm293* | (CA)24 | F – TACTGGTTCACATTGGTGCG<br>R - TCGCCATCACTCGTTCAAG | Röder et al., 1998; Shi et al., 2008; Xue et al., 2011 |
| Sumai 3 | 5A | Qfhs,ifa-5A | | *Xgwm156* | (GT)14 | F – CCAACCGTGCTATTAGTCATTC<br>R - CAATGCAGGCCCTCCTAAC | Röder et al., 1998; Buerstmayr et al., 2002 |
| Wangshuibai | 5A | Qfhi,nau-5A | | Xbarc117 | | F – TCATGCGTGCTAAGTGCTAA<br>R - TCGCCATCACTCGTTCAAG | Shi et al., 2008; Xue et al,, 2011 |
| Wangshuibai | 5A | Qfhi,nau-5A | | Xbarc358 | | F – TGCTAATTGCCGACTCACTCCAG<br>R - AGGACTGTGGGGAATGAATG | Xue et al., 2011 |
| Wangshuibai | 5A | Qfhi,nau-5A | | Xgwm304 | (CT)22 | F – AGGAAACAGAAATATCGCGG<br>R - GAGGGCAGGAAAAAGTGACT | Röder et al., 1998; Shi et al., 2008; Xue et al., 2011 |
| Wangshuibai | 5A | Qfhi,nau-5A | | Xgwm415 | (GA)25imp | F – GATCTCCCATGTCCGCC<br>R - TGCATACCGCCTCGCTTCAT | Röder et al., 1998; Shi et al., 2008; Xue et al., 2011 |
| Sumai 3/ND2603 | 3B | Fhb1 | II | *Xgwm533* | (CT)18(CA)20 | F – AAGGCGAATCAAACGGAATA<br>R - GTTGCTTTAGGGGAAAAGCC | Röder et al.,1998; Anderson et al., 2001; Shi et al., 2008 |
| Sumai 3/ND2603 | 3B | Fhb1 | II | *Xgwm493* | (CA)43imp | F – TTCCCATAACTAAAACCGCG<br>R - GGAACATCATTTCTGGACTTT | Röder et al., 1998; Anderson et al., 2001 |
| Sumai 3 | 3B | Fhb1 | | Xbarc147 | | F – GCGCCATTTATTCATGTTCCTCAT<br>R - CCGCTTCACATGCAATCCGTTGAT | Shi et al., 2008 |
| Sumai 3 | 3B | ? | | Xbarc133 | | F – AGCGCTCGAAAAGTCAG<br>R - GGCAGGTCCAACTCCAG | Shi et al., 2008 |
| Sumai 3 | 3B | ? | | *Xbarc102* | | F - GGAGAGGACCTGCTAAAATCGAAGACA<br>R - GCGTTTACGGATCAGTGTTGGAGA | Röder et al., 1998; Anderson et a.,, 2001; Shi et al., 2008 |

Cr= cromossomo, TR= tipo de resistência

Continuação do apêndice I Informações dos *primers*

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Wangshuibai | 4B | Fhb4 | Xgwm149 | (GA)23imp | F - CATTGTTTTCTGCCTCTAGCC<br>R - CTAGCATCGAACCTGAACAAG | Röder et al., 1998; Xue et al., 2010 |
| Wangshuibai | 4B | Fhb4 | Xgwm192 | (CT)46 | F - GGTTTTCTTTCAGATTGCGC<br>R - CGTTGTCTAATCTTGCCTTGC | Röder et al., 1998; Xue et al., 2010 |
| Sumai 3 | 6B | Fhb2 | Xgwm133 | (CT)39imp | F - ATCTAAACAAGACGGCGGTG<br>R - ATCTGTGACAACCGGTGAGA | Röder et al., 1998; Cuthbert et al., 2007 |
| Sumai 3 | 6B | Fhb2 | Xgwm644 | (GA)20 | F – GTGGGTCAAGGCCAAGG<br>R - AGGAGTAGCGTGAGGGGC | Röder et al., 1998; Cuthbert et al., 2007 |

Cr= cromossomo, TR= tipo de resistência

## Vitae

Taiane Peres Viana, nascida em 18 de outubro de 1988, em Pelotas - RS. Cursou o ensino fundamental e médio no Colégio Sinodal Alfredo Simon. Em outubro de 2006 ingressou no curso de Agronomia na Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, FAEM/UFPel Obtendo o título de Engenheira Agrônoma em setembro de 2011. No decorrer do curso de Agronomia realizou estágio no Laboratório de Grãos – UFPel, na Revista Brasileira de Agrociência, e no Laboratório de Sementes no qual permaneceu por quase 3 anos, sendo bolsista de iniciação científica na Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS de agosto de 2009 à agosto de 2011, sob orientação do Pof. Dr. Paulo Dejalma Zimmer. Durante este período desenvolveu trabalhos científicos na área sementes e biotecnologia. Em janeiro de 2011 iniciou estágio de conclusão de curso na EMBRAPA Clima temperado na área de melhoramento e recursos genéticos de cebola, sob orientação da Pesquisadora PhD. Daniela Lopes Leite, com término das atividades em junho de 2009. Em agosto de 2011 ingressou no mestrado do curso de Pós Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitomelhoramento.