

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

POTENCIAL DA RESISTÊNCIA GENÉTICA À FERRUGEM DA  
FOLHA EM AVEIA PARA O CONTROLE DA MOLÉSTIA NO SUL  
DO BRASIL

Franceli Rodrigues Kulcheski  
Bióloga/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos  
requisitos à obtenção do Grau de  
Mestre em Fitotecnia  
Área de Concentração Plantas de Lavoura

Porto Alegre (RS), Brasil  
Maio de 2007

## FOLHA DE HOMOLOGAÇÃO

*“Há homens que lutam um dia, e são bons;  
Há outros que lutam um ano, e são melhores;  
Há aqueles que lutam muitos anos, e são muito bons;  
Porém há os que lutam toda a vida  
Estes são os imprescindíveis.”*

*Bertold Brecht*

*A pessoas verdadeiramente imprescindíveis:  
Meus pais, Ivone e Silvío;  
Minha irmã, Patrícia;  
Pelo amor incondicional, incentivo e apoio em todos os momentos.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia por ter me possibilitado a realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Andréa Delatorre e ao Prof. Dr. José Antônio Martinelli, pela orientação, confiança e apoio durante toda a etapa de realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Pacheco que me auxiliou durante todo o mestrado, desde o campo até as análises dos dados. Com certeza sua ajuda foi imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Ivan Shuster da Codetec, pelo valioso apoio e infinita generosidade em colocar-se a disposição no ensino das análises do programa GQMOL.

A Dr<sup>a</sup>. Ana Locatelli, ao Msc. Felipe Graichen, Dr<sup>a</sup>. Marta Barbosa, Msc. Caroline Wesp, Msc. Luis Marcelo Tisian e a Eng<sup>a</sup> Agrônoma Loana Cardoso, por cederem dados que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca de defesa de dissertação: Prof. Dr. Luis Carlos Federizzi, Dr<sup>a</sup>. Sandra Milach e Dr<sup>a</sup>. Márcia Chaves, por aceitarem contribuir com este trabalho.

Aos professores que compõem o Programa de Pós-graduação em Fitotecnia pelos conhecimentos compartilhados.

Aos funcionários do Departamento de Plantas de Lavoura, principalmente à Alice, Fábio e Jonatan.

Aos colegas do curso de mestrado e colegas do laboratório de biotecnologia: Adrianinho, Adriano, Ana Paula, Anderson, Carlos, Carolina, Emerson, Everton, Fabiane, Itamar, Josana, Laize, Loana, Mércio, Naracelis, Noryan, Paula, Paulo, Raquel, Tanise, Tatiana Terra, Tatiana Boff, Thaís, Tonon.

Em especial a Carol, a Tati, ao Paulo e ao Emerson pelo valioso apoio na leitura dos géis e na análise dos dados.

Aos meus co-colegas e grandes amigos da fitopatologia: Luciane e Felipe.

As minhas grandes amigas Tanise e Loana, que suportaram os meus momentos de estresse durante todo o curso. Sei que nossa amizade é para sempre.

A minha irmã Patrícia por sempre estar ao meu lado, pelo amor e amizade infinitos. Eu te amo muito e obrigada por me apoiar em todos os momentos. Agradeço a ti a ao Zé pelos momentos de desopilação propiciados durante o final do curso. Obrigada pelos almoços, jantinhas, e tudo mais.

Aos meus pais, aos quais devo tudo o que tenho, obrigada pelo amor, carinho, confiança e dedicação durante todos estes anos, eu amo muito vocês.

A Deus por tudo!

# POTENCIAL DA RESISTÊNCIA GENÉTICA À FERRUGEM DA FOLHA EM AVEIA PARA O CONTROLE DA MOLÉSTIA NO SUL DO BRASIL<sup>1</sup>

Autor: Franceli Rodrigues Kulcheski  
Orientador: Carla Andréa Delatorre  
Co-orientador: José Antônio Martinelli

## RESUMO

A ferrugem da folha, causada por *Puccinia coronata* Corda. f. sp. *avenae* Eriksson, é a moléstia mais danosa para a cultura da aveia (*Avena sativa* L.). O uso de cultivares resistentes tem sido limitado devido à extrema diversidade genética presente nas populações de *P. coronata*. Geralmente a superação dos genes de resistência acaba ocorrendo em um curto intervalo de tempo. Desta forma a busca por uma resistência eficiente e durável é o objetivo dos programas de melhoramento deste cereal. Com o objetivo de compreender alguns aspectos da resistência genética a *Puccinia coronata* em aveia, este trabalho abordou dois aspectos distintos. No ano de 2005, o experimento avaliou o comportamento da resistência quantitativa em uma população F<sub>6:11</sub> resultante do cruzamento entre as cultivares UFRGS910906 e UFRGS7. Este ano caracterizou-se por ser extremamente favorável à doença, sendo que a maioria das linhagens apresentou uma ASCPD maior que o genitor suscetível. Uma análise avaliando os valores de ASCPD do período de 1998 a 2005 demonstrou que este tipo de resistência é altamente influenciado pelo ambiente, portanto em condições muito favoráveis ao fungo não é indicado selecionar genótipos com resistência parcial. Em 2006, as análises realizadas focaram na resistência do tipo qualitativa, buscando a identificação de marcadores do tipo AFLP para o gene de resistência *Pc68*, e ampliação do mapa genético da população de linhagens recombinantes em F<sub>6</sub> oriundas do cruzamento entre os genótipos *Pc68/5\*Starter* e UFRGS8, contrastantes quanto à presença deste gene. Um total de 78 marcadores polimórficos que segregaram na taxa esperada, formaram um mapa composto por 12 grupos de ligação, totalizando 409,4 cM do genoma de *Avena sativa*. Quanto às análises de ligação entre o gene *Pc68* e os marcadores AFLP, foram detectados dois marcadores em repulsão: U8PM22 e U8PM25, os quais encontram-se flanqueando o gene a uma distância de 18,60 e 18,83 cM respectivamente.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (68p.) Maio, 2007.

# POTENCIAL OF GENETIC RESISTANCE FOR OAT CROWN RUST CONTROL ON SOUTH OF BRAZIL<sup>1</sup>

Author: Franceli Rodrigues Kulcheski

Adviser: Carla Andréa Delatorre

Co-adviser: José Antônio Martinelli

## ABSTRACT

Crown rust, caused by *Puccinia coronata* Corda. f. sp. *avenae* Eriksson, is the most damaging disease of cultivated oat (*Avena sativa* L.). Use of resistant genotypes is limited by *P. coronata* extremely high genetic diversity. In general, the pathogen races overcome single resistance genes in a short period of time. Oat breeding programs are continuously in searching for an efficient and durable host resistance. This work involved two distinct studies on oat crown rust resistance. In the first study quantitative resistance was evaluated in a F<sub>6:11</sub> inbred line population derived from the cross UFRGS910906 X UFRGS7. Expression of host resistance was very dependent of environmental conditions as demonstrated by the comparison among AUDPC values from 1998 to 2005. The environment in 2005 was very favorable for disease development, and a large number of lines showed an AUDPC higher than the susceptible genitor one's. Under conditions that favor disease, genetic selection for partial host resistance is not recommended. The second study was related to qualitative host resistance aiming to identify AFLP markers linked to the resistance gene *Pc68*, and amplify the F6 genetic map from *Pc68/5\*Starter* X UFRGS8. Seventy-eight markers with normal segregation were discovered and distributed in 12 linkage groups. The map covered 409.4 cM of the *Avena sativa* genome. Two AFLP markers were linked in repulsion to *Pc68*: U8PM22 and U8PM25, which are flanking the gene at 18.60 and 18.83 cM respectively.

---

<sup>1</sup> Master of Science Dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (68p.) May, 2007.

## SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO II: COMPORTAMENTO DA RESISTÊNCIA QUANTITATIVA DA POPULAÇÃO DE AVEIA UFRGS 7 X UFRGS 910906 EM SETE ANOS DE AVALIAÇÃO .....	12
2.1 Introdução.....	12
2.2 Material e Métodos .....	15
2.2.1 Material Vegetal.....	15
2.2.2 Delineamento experimental .....	15
2.2.3 Avaliação da severidade da doença.....	16
2.2.4 Cálculo da área sob a curva do progresso da doença .....	16
2.2.5 Análise estatística.....	17
2.2.6 Distribuição de frequência.....	17
2.2.7 Comparação entre as ASCPDs do período de 1998 a 2005.....	18
2.3 Resultados e discussão .....	19
2.3.1 Avaliação da doença no ano de 2005 .....	19
2.3.2 Comparação da ASCPD no período de 1998 a 2005 .....	24
CAPÍTULO III: MAPEAMENTO MOLECULAR E ANÁLISE DE LIGAÇÃO ENTRE O GENE <i>Pc68</i> E MARCADORES DO TIPO AFLP EM <i>AVENA SATIVA</i> .....	38
3.1 Introdução.....	38
3.2 Material e Métodos .....	41
3.2.1 Material Vegetal e Análise Fenotípica .....	41
3.2.2 Extração e quantificação do DNA.....	42
3.2.3 Análises de AFLP.....	42
3.2.4 Análise de grupos segregantes ( <i>Bulk Segregation Analysis –BSA</i> ).....	43
3.2.5 Análise estatística.....	46
3.3 Resultados e Discussão.....	47
3.3.1 Análise de grupos segregantes ( <i>Bulk Segregation Analysis – BSA</i> ).....	47
3.3.2 Análise de Segregação dos marcadores.....	49
3.3.3 Análises de Ligação e Mapeamento Molecular .....	53
CAPÍTULO IV: CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
2.1 Comparação entre os genótipos de aveia branca, quanto à área sob a curva de progresso da doença (ASCPD) de <i>Puccinia coronata</i> em condições de campo (EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS) no ano de 2005.....	20
2.2 Lista dos genótipos de aveia branca com as dez menores áreas sob a curva do progresso da doença (ASCPD), com seus respectivos valores entre parênteses, para a ferrugem da folha entre 2002 e 2005, avaliados na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul (RS).....	34
3.1 Combinações de <i>primers</i> de AFLP testadas pelo método BSA na população Pc68/5*Starter x UFRGS8.....	45
3.2 Combinações de marcadores AFLP que detectaram polimorfismo entre os genótipos parentais e os distintos <i>bulks</i> com respectivos números de fragmentos polimórficos.....	52
3.3 Grupos de ligação, número de marcadores, distância acumulada dos grupos de ligação e QTLs associados à resistência a ferrugem da folha da aveia no mapa F6, do cruzamento Pc68/5*Starter. UFRGS. 2007 .....	55

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
2.1 Distribuição de freqüências da área sob a curva de progresso da doença (ASCPD) de ferrugem da folha, em 82 linhagens oriundas do cruzamento entre UFRGS7 e UFRGS910906, e a testemunha URS22. EEA, Eldorado do Sul, 2005.....	22
2.2 Curvas do progresso da severidade da ferrugem da folha nos genitores UFRGS 7 e UFRGS 910906, das linhagens recombinantes F <sub>6:11</sub> com pior desempenho e da testemunha URS 22. EEA/UFRGS, 2005.....	23
2.3 Curvas do progresso da severidade da ferrugem da folha nos genitores UFRGS 7 e UFRGS 910906, das linhagens recombinantes F <sub>6:11</sub> com melhor desempenho e da testemunha URS 22. EEA/UFRGS, 2005.....	23
2.4 Comparação entre as ASCPD de ferrugem da folha nas gerações: A) F <sub>2</sub> (1998), B) F <sub>3</sub> (1999), C) F <sub>4</sub> (1999), D) F <sub>5</sub> (2000), E) F <sub>6</sub> (2000), F) F <sub>6:8</sub> (2002), G) F <sub>6:9</sub> (2003), H)F <sub>6:10</sub> (2004) e I)F <sub>6:11</sub> (2005), originadas do cruzamento das cultivares UFRGS910906 x UFRGS7 de aveia. EEA, Eldorado do Sul, RS.....	28
2.5 Temperatura do ar (°C), variando das mínimas às máximas, com a média destacada, no período de agosto a outubro de 1998. As setas indicam a data de avaliação da doença. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.....	29
2.6 Temperatura do ar (°C), variando das mínimas às máximas, com a média destacada, no período de agosto a outubro de 1999. As setas indicam a data de avaliação da doença. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.....	29
2.7 Temperatura do ar (°C), variando das mínimas às máximas, com a média destacada, no período de agosto a outubro de 2000. As setas indicam a data de avaliação da doença. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.....	29

2.8	Temperatura do ar (°C), variando das mínimas às máximas, com a média destacada, no período de agosto a outubro de 2002. As setas indicam a data de avaliação da doença. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.....	30
2.9	Temperatura do ar (°C), variando das mínimas às máximas, com a média destacada, no período de agosto a outubro de 2003. As setas indicam a data de avaliação da doença. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.....	30
2.10	Temperatura do ar (°C), variando das mínimas às máximas, com a média destacada, no período de agosto a outubro de 2004. As setas indicam a data de avaliação da doença. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.....	30
2.11	Temperatura do ar (°C), variando das mínimas às máximas, com a média destacada, no período de agosto a outubro de 2005. As setas indicam a data de avaliação da doença. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.....	31
2.12	Umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm) do período de agosto a outubro de 1998. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.....	31
2.13	Umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm) do período de agosto a outubro de 1999. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.....	31
2.14	Umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm) do período de agosto a outubro de 2000. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.....	32
2.15	Umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm) do período de agosto a outubro de 2002. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.....	32
2.16	Umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm) do período agosto a outubro de 2003. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.....	32
2.17	Umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm) do período de agosto a outubro de 2004. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.....	33
2.18	Umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm) do período de agosto a outubro de 2005. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.....	33
3.1	Parte de um gel de poliacrilamida, composto por fragmentos dos	

dois genitores, Pc68/5*Starter (P1) e UFRGS 8 (P2), e 12 linhagens recombinantes. As setas pretas apontam fragmentos específicos de um ou outro genitor, que segregou na população. A seta vermelha demonstra a presença de marcas na população que não aparecem em nenhum dos progenitores. Porto Alegre, 2006.....	52
3.2 Mapa de ligação da população de aveia UFRGS 8 x Pc68/5*Starter. Valores à esquerda se referem à distância em centiMorgans (cM) entre os marcadores estruturados à direita. Porto Alegre, 2007.....	54
3.3 Representação gráfica do grupo de ligação GL10 da população UFRGS8 x Pc68/5*Starter de <i>A. sativa</i> , indicando o posicionamento do loco do gene Pc68 em relação aos marcadores AFLP identificados.....	57

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Avena* foi estabelecido primariamente por Tournefort em 1770, porém, a maioria das espécies conhecidas, já havia sido descrita anteriormente, em 1750, por Linnaeus (Matz, 1969). Popularmente conhecido por aveia, este gênero pertence à família Gramineae (Poaceae), tribo Aveneae (Clayton & Renvoize, 1986) e, compreende várias espécies silvestres, daninhas e cultivadas, distribuídas em seis continentes.

Segundo Harlan (1975), o gênero *Avena* tem seu centro de origem na Ásia Menor ou no Norte da África. As primeiras aveias a serem cultivadas datam de 1.000 a.C. e acredita-se que tenha sido na Europa Central. Entretanto, a aveia evoluiu como uma cultura secundária, sendo antes, considerada uma invasora das culturas de trigo e cevada.

As espécies do gênero *Avena* ocorrem em três níveis de ploidia: diplóides ( $2n=2x=14$ ), tetraplóides ( $2n=4x=28$ ) e hexaplóides ( $2n=6x=42$ ), sendo que nos três grupos são encontradas espécies cultivadas (Holden, 1979); e apresentam quatro diferentes genomas: A, B, C e D, cada um com um número básico de sete cromossomos (Zhou et al., 1999). Segundo Tavares et al. (1993) as espécies do gênero se dividem em: 15 espécies diplóides, sete tetraplóides e sete hexaplóides.

No início do século XVII, a aveia já estava extensivamente estabelecida na Europa Ocidental, sendo utilizada na produção de grãos e de forragens.

Atualmente, a inclusão da cultura de aveia no sistema de produção propicia a melhoria das propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, a redução de moléstias e pragas de outras espécies produtoras de grãos e o controle alelopático de algumas plantas daninhas. Possibilita, também, a produção de grãos usados na nutrição humana e animal, a formação de pastagens anuais de inverno, a elaboração de feno e silagem e a utilização como cobertura verde e morta do solo (Floss, 1988).

A produção mundial de grãos de aveia em 2005 foi de aproximadamente 24 milhões de toneladas. Os maiores produtores são Rússia, Canadá, Estados Unidos e Austrália, o Brasil ocupa a nona posição em produção de aveia (USDA – FAS, 2007).

A aveia branca (*Avena sativa* L.) é uma espécie hexaplóide, alopoliplóide, autógama, de cultivo anual e se destina basicamente à produção de grãos de alta qualidade industrial. Os grãos caracterizam-se pelo maior tamanho da cariopse, alto peso do hectolitro e alta percentagem de grãos descascados em relação ao grão inteiro (rendimento industrial). Entretanto, há cultivares de duplo propósito, isto é, além da produção de grãos, também são utilizadas na produção de forragem verde.

A aveia é uma gramínea anual cujo ciclo varia de 120 a mais de 200 dias, dependendo da cultivar e das condições edafoclimáticas da região de cultivo (Goellner, 2001). O hábito de crescimento é cespitoso, podendo atingir uma estatura de planta de 0,70 a 2 m. Apesar da grande diversidade quanto ao fotoperíodo, a aveia é considerada uma planta de dias longos (Shands & Cisar, 1988). Hoje, devido ao intenso melhoramento genético e a variabilidade existente, este cereal está adaptado a vários ambientes e é amplamente cultivado.

No Brasil, o cultivo da aveia branca, está concentrado no sul do país, especialmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. O Paraná é o

maior produtor de grãos, seguido do Rio Grande do Sul e em terceiro o estado de Santa Catarina (Comissão..., 2006).

Inicialmente, o uso da aveia foi restrito à alimentação animal. Atualmente sua utilização na dieta humana está bem estabelecida, principalmente pelo fato desta se destacar entre os cereais em função de seu alto teor de proteínas, lipídios e fibra alimentar. A qualidade nutricional, avaliada através de índices químicos e biológicos também é relativamente alta e muito superior a outros cereais. Estes indicadores, no entanto, variam com o local de cultivo, clima e genótipo (Gutkoski, 2000).

Devido o fato da aveia possuir altos níveis de fibra alimentar solúvel, ela é indicada no controle do colesterol sérico em indivíduos hipercolesterolêmicos e na diminuição da absorção de glicose em pacientes diabéticos, reduzindo com isto o risco de doenças cardiovasculares. O uso da aveia também é indicado como agente protetor ao desenvolvimento de tumores do cólon e como auxiliar nas dietas de emagrecimento (Anderson et al., 1994).

Apesar de todas estas propriedades acima referidas, o uso da aveia na alimentação humana ainda precisa ser mais difundido. Além disto, há muitos aspectos a serem pesquisados, principalmente focando para o potencial de vários compostos presentes no grão que muitas vezes são ignorados e desperdiçados. Isto se observa, por exemplo, no processo de descarte da casca da aveia durante o processamento do grão.

A casca da aveia apresenta uma quantidade de hemicelulose (28,35%) superior à de *Eucalyptus globulus*, bagaço de cana-de-açúcar, *Eucalyptus grandis* e palha de arroz, os quais são resíduos amplamente utilizados na produção biotecnológica de xilitol (Tamanini et al., 2004). Esta característica da casca da aveia demonstra a possibilidade de sua utilização como matéria-prima no processo biotecnológico de obtenção desse poliálcool. O xilitol, álcool pentahidroxilado (pentitol) de xilose, tem sido

amplamente empregado na produção de vários produtos alimentícios e de higiene oral em função de suas peculiaridades como não participação de reações do tipo Maillard, anticariogenicidade (Emodi, 1978), além de ter metabolismo independente da insulina (Yilikahri, 1979). Foi relatado o emprego desse para a prevenção de osteoporose (Mattila et al., 1998) e tratamento de otite aguda (Taipainen et al., 2002).

Frente ao alto potencial da cultura da aveia, o aumento de seu cultivo implica atenção maior a esta, principalmente quanto aos fatores que abalam a expressão do potencial de rendimento dos genótipos disponíveis. Dentre estes fatores, o principal limitante da cultura da aveia é a ferrugem da folha, que chega a causar perdas de até 50% no peso de grãos em cultivares de aveia suscetíveis a este patógeno (Martinelli et al., 1994).

Além de ser a moléstia mais destrutiva na cultura da aveia, a ferrugem da folha é amplamente distribuída, sendo observada em todas as regiões do globo onde esta cultura é cultivada (Simons, 1985). Desde 1900, têm sido relatados os danos que a ferrugem da folha pode causar em aveia.

Esta moléstia é causada por *Puccinia coronata* Corda. f. sp. *avenae* Eriksson, um fungo basidiomiceto da ordem Uredinales. Este se caracteriza por ser um parasita obrigatório e apresentar uma alta especialização fisiológica.

É um fungo heteroécio (necessita de duas espécies hospedeiras para completar seu ciclo vital) e policíclico (vários ciclos secundários), completando cada ciclo entre sete e dez dias. A condição de heteroécio ocorre no hemisfério Norte, onde há ocorrência de arbustos do gênero *Rhamnus*, o hospedeiro alternativo.

O dano na folha ocorre devido às várias modificações estruturais, bioquímicas e fisiológicas que o fungo causa no hospedeiro. O crescimento da hifa intercelular causa compressão entre as células vegetais, ocasionando distorção da forma

destas. Os efeitos fisiológicos diretos começam a ocorrer com a invasão intracelular das células do mesófilo e a formação dos haustórios (Harder & Harber, 1992). Após a penetração, a colonização do tecido hospedeiro pode ser facilitada pela produção de fitotoxinas ou de compostos semelhantes a hormônios vegetais, que alteram a fisiologia das plantas em favor do patógeno (Heath, 1997). Poucos dias após a inoculação já se observa redução na taxa fotossintética. Com o passar dos dias, este declínio fotossintético causa o amarelecimento das folhas, as quais podem entrar em processo de senescência.

A colonização pelo fungo se caracteriza pela formação de pústulas, no estágio de urédia, a qual ocorre principalmente na lâmina foliar da planta, mas pode se estender por todas as partes verdes da planta. Este estágio apresenta uma coloração amarelo-brilhante, com formato redondo ou oblongo e ocorre em ambas as superfícies foliares da planta. Após algumas semanas as bordas das uredopústulas podem tornar-se negras, com a formação de teliosporos. Quando as plantas infectadas atingem a maturidade, a produção de uredosporos cessa, sendo produzidos então apenas os teliosporos (Simons, 1985; Martinelli, 2004).

No Brasil, *P. coronata* é autoécio, ou seja, envolve apenas um hospedeiro durante seu ciclo vital (neste caso a aveia), não necessitando de hospedeiro alternativo e não apresentando fase sexual (Martinelli, 2000). Na região sul do país, onde as condições ambientais são propícias, a ferrugem da folha também é a principal moléstia da aveia. O desenvolvimento desta, pode ocorrer em um período de até 100 dias na cultura da aveia, permitindo a ocorrência de muitos ciclos de infecção. Além disto, *Puccinia coronata* é caracterizado mundialmente por possuir uma alta variabilidade para a virulência, podendo rapidamente desenvolver novas raças virulentas que superem os genótipos resistentes em cultivo (Chong & Seaman, 1994). No sul do Brasil, em 53

amostras coletadas foram identificadas 53 raças diferentes de *P. coronata* f.sp. *avenae*. A média geral foi de 20 genes de virulência por raça, sendo que o menor número de genes de virulência por raça do patógeno foi de 10 e o maior foi de 27 (Martinelli et al., 1998).

A ferrugem da folha ocorre todos os anos no Brasil, sendo mais destrutiva quando o inverno é ameno e a primavera úmida (Forcelini, 2002). Pode-se dizer que a ferrugem da folha coexiste com essa cultura no sul do Brasil, frequentemente apresentando alta severidade (Martinelli et al., 1994). Esta severidade pode diminuir tanto a quantidade quanto à qualidade dos grãos de aveia (Martinelli & Federizzi, 1994).

Para o controle da ferrugem da folha em aveia, o uso da resistência genética é a melhor estratégia a ser utilizada. A natureza genética da resistência em plantas a patógenos vem sendo estudada desde o século XVIII, e muitos genes que condicionam resistência têm sido identificados e introduzidos em espécies cultivadas (Kover & Caicedo, 2001).

Segundo Parlevliet (1997), resistência pode ser definida como a habilidade do hospedeiro em impedir o crescimento e desenvolvimento do patógeno.

Para uma melhor compreensão da resistência podem se considerar vários aspectos, como: a expressão da resistência (completa ou parcial), a herança da resistência (monogênica ou poligênica), a especificidade da resistência às raças do patógeno, os mecanismos de resistência (hipersensibilidade, síntese de substâncias antimicrobianas, produção de enzimas hidrolíticas e outras proteínas de defesa) e a durabilidade ao longo dos anos de cultivo.

Contudo, o principal objetivo dos melhoristas é que a resistência seja eficiente e durável. Segundo Johnson (1984) a resistência durável é a que permanece efetiva em ampla área de cultivo, durante um longo período, em um ambiente favorável

ao desenvolvimento da doença. Entretanto, Zadoks (1997) define durabilidade como a continuidade da resistência no tempo, em algum espaço particular. Já, a continuidade da resistência no espaço é definida como estabilidade. Neste trabalho, será seguida a definição de durabilidade proposta por Zadoks (1997).

A durabilidade e a estabilidade podem ser modificadas por fatores extremos, como as condições climáticas (alterando a adaptação do patógeno, a resistência do hospedeiro ou a interação hospedeiro-patógeno) e por mudanças no genótipo do patógeno – aumento da frequência de raças virulentas na época do lançamento da cultivar e na taxa de multiplicação de raças virulentas (Kiyosawa, 1982).

Embora a resistência durável possa ser governada qualitativamente (através de um gene de efeito maior) ou quantitativamente (característica por ser poligênia), a maioria dos exemplos citados de resistência durável contra fungos é de natureza quantitativa (Leach et al., 2001).

A resistência quantitativa, também chamada de parcial, é o resultado da ação combinada de vários genes, geralmente não específicos à raça do patógeno. Este tipo de resistência resulta da interação de vários componentes que atrasam ou reduzem a magnitude dos estádios do ciclo reprodutivo do patógeno, tornando mais lento o progresso da moléstia no campo (Parlevliet, 1979). Neste caso, a população patogênica não é suprimida inteiramente, mas evita-se que atinja níveis prejudiciais à cultura hospedeira, exercendo menor pressão de seleção sobre o patógeno (Shaner, 1996; Thomé et al., 2001).

Entre os exemplos de resistência durável quantitativa pode se citar a cultivar de trigo Toropi, que mantém há mais de 30 anos resistência à ferrugem da folha (Da Silva, 2002). Outro exemplo é a resistência à ferrugem da folha (*Puccinia hordei*)

encontrada nas cultivares de cevada Minerva e Vada que permanece efetiva até hoje, desde o lançamento destas cultivares em 1955 (Parlevliet, 2002).

Contudo, há exemplos de resistência quantitativa com menor durabilidade, como é o caso de variedades de trigo, que ao serem lançadas no mercado, no final da década de 70, e inicialmente classificadas como parcialmente resistentes à ferrugem amarela, após dois anos de cultivo no campo demonstraram ser extremamente suscetíveis a *Puccinia striiformis* (Johnson & Taylor, 1972; Johnson & Bowyer, 1974; Johnson, 1978). Por isto, é necessário estudar o comportamento deste tipo de resistência e os mecanismos envolvidos para poder inferir quanto a sua durabilidade, principalmente quando comparada àquela proporcionada por um único gene.

A razão pela qual a resistência do tipo qualitativa tem sido caracterizada com menor durabilidade em relação à resistência quantitativa, é a grande variabilidade genética presente na maioria dos patógenos de plantas cultivadas.

De modo geral, genes que conferem resistência qualitativa agem de acordo com o modelo gene-a-gene proposto por Flor (1956), onde o fenótipo resistente é determinado pela interação entre o produto do gene de resistência no hospedeiro (o receptor) com o produto de um gene de avirulência no patógeno (o elicitor). Desta forma o efeito do gene de resistência do hospedeiro pode ser neutralizado pela perda da função de gene de avirulência do patógeno (Bohnert et al., 2000). Em consequência de fatos onde se observa esta perda de interação, a resistência qualitativa tornou-se conhecida como efêmera.

Entretanto, há vários casos demonstrando que resistência durável pode ser condicionada pelo efeito de um único gene. Um destes casos é o *Pc68*, que forneceu resistência à ferrugem da folha em genótipos de aveia durante 10 anos na América do Norte (Agri-Food, 2006). Outro exemplo é a resistência à ferrugem da folha em trigo,

causada por *Puccinia triticina*, condicionada pelo gene *Lr34*, que tem provido um controle efetivo da doença por mais de 30 anos na América do Norte, América do Sul e Austrália. Os genes de resistência *Xa3* e *Xa4* a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* também demonstraram alto potencial de controle do patógeno por 15 anos em variedades comerciais de arroz (Leach et al., 2001). O gene *mlo* de resistência a oídio em cevada é outro exemplo de resistência qualitativa durável. Este tem permanecido altamente eficiente ao controle do oídio desde 1979 (Lyngkjaer et al., 2000).

Contudo, o principal enfoque sobre genes de efeito maior, é o potencial de uso conjunto dos mesmos em um único cultivar através da estratégia de piramidização. A premissa para o sucesso da piramidização de genes consiste na baixa probabilidade de aparecimento de uma “super-raça” do patógeno contendo todos os genes de virulência necessários para atacar esta combinação de genes de resistência (Michereff, 2006). Além disto, os genes de resistência a moléstias têm ação aditiva quando a sua expressão pode ser incrementada pela presença de dois ou mais genes no hospedeiro, sendo que o mesmo nível de resistência pode ser oriundo de diversas combinações gênicas (Russel, 1981).

A estratégia de piramidização demorou a ser empregada devido à dificuldade em detectar quais genes estariam presentes em determinado genótipo através de métodos tradicionais, pois um gene poderia estar mascarando o efeito do outro. Com os avanços na área de biotecnologia, o desenvolvimento de marcadores moleculares de DNA propiciou o uso da técnica, auxiliando na identificação de genes na piramidização de plantas sem a necessidade de testes de inoculação e progênie (Hittalmani et al., 2000).

Trabalhos como o de Hittalmani et al. (2000), onde se observou aumento da resistência a brusone com a piramidização de três genes de resistência em arroz,

comparado ao uso destes isoladamente, demonstram o potencial que a piramidização de genes pode ter em reforçar a resistência genética de plantas frente a seus patógenos. Para que esta técnica possa ser aplicada, esforços na obtenção de marcadores moleculares devem ser empregados, a fim de que estes possam auxiliar na seleção dos genótipos através da SAM (Seleção Assistida por Marcadores Moleculares).

Frente às condições brasileiras, vários são os fatores que contribuem para a baixa durabilidade da resistência. Entre eles estão: o cultivo de aveia em todos os meses do ano na região do Cone Sul e a presença de outras espécies de gramíneas na área de seu cultivo, o que aumenta o inóculo; e as condições de ambiente brasileiro, as quais proporcionam um longo período de infecção e esporulação, aumentando a produção de esporos do patógeno (Federizzi & Stuthman, 1998). Além disto, segundo Martinelli et al. (1998), a alta variabilidade das raças presentes e a diversidade da sua virulência fazem da população de *Puccinia coronata*, encontrada no Sul do Brasil, uma das mais complexas do mundo.

Devido ao problema que a ferrugem da folha oferece ao cultivo da aveia no ambiente sul brasileiro, faz-se necessária a busca por novas e eficientes estratégias do uso da resistência genética à *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. Compreender como se comporta a resistência, os mecanismos utilizados pela planta para prover barreiras ao patógeno, ou até como se comportam genótipos que venham a ter diferentes tipos de resistência associados, são alguns dos pontos a serem desvendados no patossistema aveia-ferrugem da folha a fim de que os programas de melhoramento possam avançar rumo à obtenção de uma resistência efetiva e durável.

Focando a resistência genética à ferrugem da folha em aveia, o presente trabalho teve como objetivo estudar os dois tipos distintos de resistência, ou seja, a

resistência quantitativa e qualitativa, presente em populações desenvolvidas pelo programa de melhoramento da aveia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O primeiro experimento, apresentado no capítulo II, foi desenvolvido no ano de 2005, na Estação Experimental Agronômica em Eldorado do Sul. Neste trabalho o objetivo principal foi observar o comportamento da resistência quantitativa na população de linhagens recombinantes oriunda do cruzamento dos genótipos contrastantes UFRGS7 e UFRGS910906 em relação à resistência parcial à ferrugem da folha ao longo de sete anos.

No ano de 2006 e início de 2007, o segundo experimento foi realizado no laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Agronomia da UFRGS. Neste trabalho, a abordagem é sobre o potencial da biotecnologia, através do uso de marcadores moleculares, em identificar e auxiliar na introdução de genes de resistência em cultivares de interesse para o programa de melhoramento. Os principais objetivos deste experimento foram a expansão do mapa molecular da população F<sub>6</sub>, oriunda do cruzamento entre 'Pc68/5\*Starter x UFRGS8', e identificar marcadores do tipo AFLP associados ao gene *Pc68* de resistência à ferrugem da folha em aveia.

## **CAPÍTULO II**

### **COMPORTAMENTO DA RESISTÊNCIA QUANTITATIVA DA POPULAÇÃO DE AVEIA UFRGS 7 X UFRGS 910906 EM SETE ANOS DE AVALIAÇÃO**

#### **2.1 Introdução**

A ferrugem da folha, causada pelo fungo *Puccinia coronata* Corda f. sp. *avenae* Eriksson, é a doença de maior importância econômica da cultura da aveia (*Avena sativa* L.) e de distribuição mundial (Zhu & Kaeppler, 2003). As condições ideais para a ocorrência e disseminação da moléstia são temperaturas entre 16°C e 18°C e alta umidade do ar. No sul do Brasil, onde a ocorrência desta condição é comum, tem sido observado dano de até 50% no peso de grãos em cultivares elite de aveia suscetíveis à ferrugem da folha (Martinelli et al., 1994). Forcelini (2002) relata que mesmo intensidades pequenas de ferrugem causam dano significativo ao rendimento, podendo chegar a 50 kg/ha para cada 1% de severidade.

Desde a descoberta da resistência genética por Biffen (1905), a utilização de genótipos resistentes tem sido a forma preferida de controle de inúmeras moléstias, entre elas, a ferrugem da folha, por se tratar de um modo mais econômico e ambientalmente desejável. Inicialmente, a resistência à ferrugem da folha foi quase que exclusivamente obtida através do uso de resistência do tipo monogênica. Entretanto, o emprego de genes de grande efeito não se mostrou muito eficiente por longos períodos de tempo, pois estes exercem uma pressão de seleção muito forte sobre a população do patógeno, impondo constantes mudanças em suas frequências gênicas (Chaves &

Martinelli, 2005). Por esta razão, tem se buscado alternativas que não apresentem rápida quebra da resistência qualitativa. Entre estas alternativas aparece a resistência quantitativa ou também chamada de resistência parcial.

A resistência quantitativa é definida como um tipo de resistência incompleta, em que, embora o hospedeiro apresente reação de suscetibilidade, verifica-se uma baixa taxa de desenvolvimento da moléstia (Parlevliet, 1979; Chaves & Martinelli, 2005). Ela resulta da combinação de componentes de resistência como baixa frequência de infecção, período latente longo, pústulas pequenas, baixa produção de esporos por pústula e período infeccioso curto (Ohm & Shaner, 1992). O nível de resistência parcial economicamente aceitável é aquele que torna a doença manejável sem, contudo, erradicar o patógeno (Zadoks, 1997).

Na literatura, inúmeros relatos tratam a resistência quantitativa como sinônimo de resistência durável. Entretanto, deve-se ter muito cuidado, pois embora existam vários exemplos de culturas que possuam resistência condicionada por vários genes de pequeno efeito, por um longo período de tempo, há outros que não chegaram a durar tempo suficiente para serem lançados no mercado. A variedade de trigo ‘Joss Cambier’ quando lançada em 1968 era classificada como parcialmente resistente à ferrugem amarela, entretanto, após dois anos de cultivo no campo demonstrou ser extremamente suscetível a *Puccinia striiformis* (Johnson & Taylor, 1972; Johnson & Bowyer, 1974; Johnson, 1978). Caso semelhante foi observado com a variedade ‘Maris Bilbo’, a qual, durante os testes iniciais apresentou resistência parcial a *P. striiformis*, mas em 1972 reverteu-se em um quadro de extrema suscetibilidade ao mesmo patógeno (Johnson & Taylor, 1974; Johnson, 1978). Estes relatos sugerem que, sem adequados testes sobre a durabilidade da resistência parcial, corre-se o risco desta mostrar-se

efêmera quando o genótipo é cultivado em maior escala, similar ao que ocorre com a resistência qualitativa.

Segundo Zadoks (1997) a estabilidade da resistência se refere à reprodutibilidade da resposta do genótipo do hospedeiro ao genótipo do patógeno, em condições de campo. De outro modo, durabilidade se refere à continuidade da resistência no tempo, em algum espaço particular, e a estabilidade é definida como a continuidade da resistência no espaço.

A durabilidade e a estabilidade podem ser modificadas por fatores extremos, como as condições climáticas (alterando a adaptação do patógeno, a resistência do hospedeiro ou a interação hospedeiro-patógeno) e por mudanças no genótipo do patógeno – aumento da frequência de raças virulentas na época do lançamento da cultivar e na taxa de multiplicação de raças virulentas (Kiyosawa, 1982).

O ranqueamento constante dos cultivares para a resistência é visto como indicação de resistência quantitativa (Van der Plank, 1963; Robinson, 1976) e de durabilidade e estabilidade (Van der Vossen, 1997; Zadoks, 1997).

A avaliação da resistência quantitativa deve ser realizada no campo, e pode ser feita através da quantificação da proporção do tecido do hospedeiro afetado várias vezes durante o desenvolvimento da epidemia (Chaves et al., 2004). Esta forma de avaliação possibilita o cálculo da área sob a curva de progresso da doença (ASCPD) (Parlevliet, 1988; Chaves et al., 2004).

A área sob a curva de progresso da doença é um dos componentes da resistência parcial útil para revelar pequenas diferenças de severidade e níveis de resistência, auxiliando na identificação e caracterização de genótipos hospedeiros que apresentam progresso lento da moléstia, permitindo acompanhar o aumento da moléstia no tempo (Barbosa, 2002).

Devido ao fato da ASCPD ser considerada um bom indicador da resistência quantitativa (Parvevliet, 1979) e amplamente utilizada como uma ferramenta na seleção de genótipos resistentes em programas de melhoramento, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento da resistência quantitativa na população de aveia branca UFRGS 7 x UFRGS 910906 ao longo de sete anos, baseando-se na análise da área sob a curva de progresso da doença.

## **2.2 Material e Métodos**

### **2.2.1 Material Vegetal**

Neste estudo foram avaliadas 82 linhagens recombinantes na geração  $F_{6:11}$  obtidas do cruzamento entre UFRGS 7 e UFRGS 910906, e respectivos genitores, sendo incluída como testemunha a cultivar suscetível URS 22, a qual é atualmente cultivada e altamente suscetível à ferrugem da folha. Estes genitores foram cruzados, em 1995, e a população segregante conduzida até a geração  $F_6$ . A variedade UFRGS 7, proveniente do cruzamento X1205 x FLA1093, caracteriza-se por apresentar ciclo precoce, baixa estatura, bom rendimento de grãos e suscetibilidade à ferrugem da folha, conforme registro de Martinelli et al. (1994). Já o genótipo UFRGS 910906, oriundo do cruzamento UFRGS15 x UFRGS881920, apresenta resistência parcial à ferrugem da folha, segundo relato de Thomé (1999).

### **2.2.2 Delineamento experimental**

O experimento foi semeado em 21 de junho de 2005, na Estação Experimental Agronômica da UFRGS, em Eldorado do Sul, RS. O ensaio foi conduzido em blocos completamente casualizados com três repetições, sendo que cada parcela foi constituída de duas linhas com dois metros de comprimento, espaçadas 20 cm entre si. O espaçamento entre parcelas foi de 40 cm. O genótipo genitor UFRGS 7 foi semeado

na borda de todo o experimento. A inoculação do patógeno foi natural. Nenhuma aplicação de fungicida foi realizada sobre o experimento.

### 2.2.3 Avaliação da severidade da doença

As avaliações da severidade da ferrugem da folha se iniciaram quando as primeiras pústulas de *P. coronata* foram observadas nos genótipos mais suscetíveis entre o material experimental estudado. Cada estimativa da severidade da ferrugem da folha resultou da média das avaliações da área foliar afetada do conjunto de plantas da parcela. As avaliações foram baseadas na escala diagramática modificada de Cobb (Peterson et al., 1948), que possibilita classificar a severidade da ferrugem da folha de 0% a 100%. Antes de iniciar as avaliações, uma calibração visual foi realizada e consistiu em fazer a leitura individualizada de plantas inteiras, até haver coincidência entre as leituras da severidade, feitas pelo avaliador, e a escala diagramática modificada de Cobb. Todas as leituras foram realizadas pelo mesmo avaliador.

O progresso da doença foi acompanhado através de nove leituras seqüenciais da severidade, em intervalos de 3 a 11 dias. As datas de leitura foram: 11/08, 18/08, 26/08, 05/09, 16/09, 22/09, 26/09 e 29/09.

### 2.2.4 Cálculo da área sob a curva do progresso da doença

A área sob a curva do progresso da doença (ASCPD) foi calculada para cada um dos 85 genótipos analisados através da fórmula proposta por Das et al. (1992):

$$ASCPD = \sum \{ [1/2(x_i + x_{i+1})](t_{i+1} - t_i) \},$$

onde

$x_i$  = severidade da ferrugem na data  $t_i$ ,

$x_{i-1}$  = severidade da ferrugem na data  $t_{i+1}$ ,

$t_i$  = data da avaliação

$t_{i+1}$  = data de avaliação seguinte a  $t_i$ .

A ASCPD foi normalizada (modificada a partir de Fry, 1978) através da divisão da mesma pelo número de dias entre a primeira e a última leitura de cada parcela. O resultado foi então multiplicado pelo número de dias até a última leitura de todo o experimento.

### **2.2.5 Análise estatística**

A análise estatística dos dados foi feita através do programa SAS versão 8.0 (1999). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e a comparação das médias entre os genótipos, foi feita pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

### **2.2.6 Distribuição de freqüência**

As distribuições de freqüência para as linhagens foram obtidas pelo agrupamento dos dados em classes determinadas a partir do método empírico descrito abaixo:

$$C = \sqrt{n}$$

Onde:

C = número de classes e

n = número de linhagens,

O intervalo de classe foi determinado por:

$$I = A / C,$$

Onde:

I = intervalo de classe,

A = amplitude, que corresponde a diferença da ASCPD máxima – ASCPD mínima,

C = número de classe.

### **2.2.7 Comparação entre as ASCPDs do período de 1998 a 2005**

As ASCPDs das gerações  $F_2$ ,  $F_3$ ,  $F_4$ ,  $F_5$ ,  $F_6$ ,  $F_{6:8}$ ,  $F_{6:9}$ ,  $F_{6:10}$  e  $F_{6:11}$  foram avaliadas nos anos de 1998 a 2005. Juntamente foram avaliados ambos genitores UFRGS 7 e UFRGS 910906. Todos os experimentos foram conduzidos na Estação Experimental Agrônômica da UFRGS, em Eldorado do Sul.

Nos anos de 1998, 1999 e 2000, as avaliações foram realizadas por Barbosa (2002). Para os três anos foram semeadas duas linhas de cada genitor, em três repetições, e uma linha de cada genótipo da população segregante. Plantas dos genitores e das populações segregantes foram marcadas individualmente com um barbante e avaliadas visualmente para a severidade da infecção. Em 1998, a geração  $F_2$  foi avaliada, sendo marcadas 30 plantas da cultivar UFRGS 7, 20 plantas da UFRGS 910906 e 200 plantas da população  $F_2$ . Em 1999 foram plantadas duas populações segregantes, a  $F_3$  (103 linhas) e  $F_4$  (95 linhas). Posteriormente foram marcadas 30 plantas de cada genitor e 10 plantas de cada linha  $F_3$  e  $F_4$ . No ano de 2000 foram semeados os genitores e 92 linhas da população  $F_5$  e 91 linhas da população  $F_6$ , foram marcadas e avaliadas sete plantas de cada linha. Não houve aplicação de fungicida em nenhum dos anos.

Em 2002 e 2003 as avaliações foram realizadas por Tisian. O delineamento foi de blocos ao acaso com parcelas sub-divididas, sendo a parcela principal com ou sem aplicação de fungicida e as sub-parcelas os genótipos, avaliados em quatro repetições por fator principal. Dentro de cada parcela principal as quatro repetições dos dois genitores e das 83 linhagens foram aleatorizadas. Em 2002 foram semeadas as linhagens em  $F_{6:9}$  em 680 parcelas com quatro linhas cada; e em 2003 foram semeadas as linhagens em  $F_{6:10}$  em 680 parcelas com cinco linhas. Cabe salientar que para este estudo só foram consideradas as parcelas sem aplicação de fungicida.

No ano de 2004 a população  $F_{6:10}$  foi avaliada por Wesp. As 83 linhagens recombinantes e os genitores foram semeados a campo em parcelas com duas linhas. O delineamento experimental foi de blocos completamente casualizados, com quatro repetições. As avaliações da severidade foram realizadas por parcelas semanalmente. Não houve aplicação de fungicida.

O ensaio de 2005 foi detalhado anteriormente.

As ASCPDs destes sete anos foram comparadas entre si, a fim de observar o comportamento da resistência quantitativa das linhagens em gerações e anos diferentes.

## **2.3 Resultados e discussão**

### **2.3.1 Avaliação da doença no ano de 2005**

O ano de 2005 caracterizou-se por um ambiente extremamente favorável a ferrugem da folha. No início do mês de agosto, já havia sinais da doença no campo.

A testemunha URS22, caracterizada como altamente suscetível, foi o genótipo com maior ASCPD, já entre as linhagens recombinantes, o genótipo 254 foi o que apresentou maior severidade, enquanto que a linhagem 238 apresentou menor ASCPD (TABELA 2.1). Observando a distribuição das frequências da ASCPD da população  $F_{6:11}$ , na FIGURA 2.1, pode-se destacar que cerca de 63% das linhagens estão concentradas no intervalo de 1245 a 1455 de ASCPD, consideradas suscetíveis.

TABELA 2.1 Comparação entre os genótipos de aveia branca, quanto à área sob a curva de progresso da doença (ASCPD) de *Puccinia coronata* em condições de campo (EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS) no ano de 2005.

<b>Genótipo</b>	<b>ASCPD*</b>	
URS22	1754.59	a
254	1749.43	ab
283	1715.90	abc
233	1695.95	abcd
234	1687.92	abcd
227	1667.12	abcde
286	1648.51	abcdef
267	1630.70	abcdefg
256	1620.38	abcdefgh
218	1616.94	abcdefghi
282	1593.47	abcdefghij
290	1579.64	abcdefghijk
287	1572.53	abcdefghijkl
250	1561.13	abcdefghijklm
265	1557.93	abcdefghijklm
252	1553.07	bcdefghijklm
235	1542.70	cdefghijklmn
259	1542.27	cdefghijklmn
214	1537.97	cdefghijklmn
261	1531.80	cdefghijklmno
229	1529.25	cdefghijklmnop
230	1522.57	cdefghijklmnopq
271	1514.23	cdefghijklmnopqr
276	1503.07	defghijklmnopqrs
202	1501.43	defghijklmnopqrs
273	1500.40	defghijklmnopqrs
225	1497.95	defghijklmnopqrst
209	1497.33	defghijklmnopqrst
248	1480.73	efghijklmnopqrst
210	1469.08	efghijklmnopqrstu
274	1452.78	fghijklmnopqrstuv
268	1445.83	fghijklmnopqrstuvw
275	1444.28	fghijklmnopqrstuvw
220	1433.73	ghijklmnopqrstuvwxy
258	1424.22	ghijklmnopqrstuvwxy
281	1420.40	hijklmnopqrstuvwxy
262	1419.55	hijklmnopqrstuvwxy
242	1417.92	hijklmnopqrstuvwxy
212	1413.98	hijklmnopqrstuvwxy
204	1413.15	hijklmnopqrstuvwxy
266	1409.48	ijklmnopqrstuvwxyz
264	1392.18	jklmnopqrstuvwxyz
284	1384.35	jklmnopqrstuvwxyz
216	1382.77	klmnopqrstuvwxyz
277	1375.67	klmnopqrstuvwxyz
251	1367.65	a lmn pqrstuvwxyz

TABELA 2.1 Continuação...

219	1365.50	a	lmn pqrstuvwxyz
255	1360.07	a	lmn pqrstuvwxyz
237	1359.87	a	lmn pqrstuvwxyz
292	1356.48	a	lmn pqrstuvwxyz
211	1356.40	a	lmn pqrstuvwxyz
269	1353.47	a	lmn pqrstuvwxyz
UFRGS7	1352.52	a	lmn pqrstuvwxyz
244	1341.07	a	nopqrstuvwxyz
228	1326.98	ab	opqrstuvwxyz
295	1326.88	ab	opqrstuvwxyz
263	1319.20	abc	pqrstuvwxyz
246	1316.00	abc	qrstuvwxyz
205	1309.25	abc	rstuvwxyz
222	1307.62	abc	rstuvwxyz
221	1297.27	abc	stuvwxyz
289	1294.47	abc	stuvwxyz
243	1288.37	abc	tuvwxyz
240	1268.62	abcd	uvwxyz
208	1265.95	abcd	uvwxyz
270	1261.45	abcd	uvwxyz
232	1247.98	abcd	vxyz
272	1241.50	abcd	wxyz
207	1240.20	abcd	wxyz
236	1232.00	abcd	xyz
278	1230.08	abcd	xyz
206	1223.68	abcd	xyz
291	1221.70	abcd	yz
257	1216.53	abcd	yz
UFRGS910906	1215.27	abcd	yz
224	1202.40	abcd	z
288	1199.60	abcd	z
239	1165.05	abcde	
249	1158.70	abcde	
245	1131.30	bcde	
241	1131.13	bcde	
280	1114.73	cde	
247	1065.30	de	
285	1005.98	e	
238	772.82	f	

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Por limitação de letras do alfabeto, a partir da linhagem 251, a comparação entre as médias é continuada com um novo ciclo do alfabeto.

A distribuição da ASCPD normalizada demonstrou um comportamento próximo a distribuição normal, porém com deslocamento da curva para altos níveis de quantidade de doença, indicando que a população está formada em sua maioria por genótipos suscetíveis. Esta característica da população é salientada principalmente pelo

fato ASCPD média das linhagens ter ultrapassado o valor da ASCPD do genitor suscetível a UFRGS7 (FIGURA 2.1).

Os resultados demonstraram que a obtenção de uma população altamente variada pelo cruzamento de um genótipo suscetível com outro parcialmente resistente poderá originar genótipos mais resistentes que o pai resistente, como foi observado para as linhagens 238 e 285 (FIGURA 2.2), e genótipos mais suscetíveis que o genitor suscetível (FIGURA 2.3).

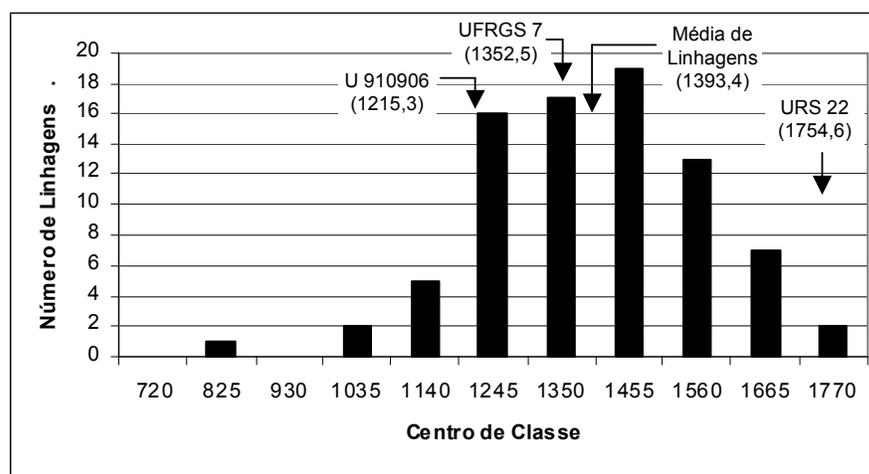


FIGURA 2.1 Distribuição de freqüências da área sob a curva de progresso da doença (ASCPD) de ferrugem da folha, em 82 linhagens oriundas do cruzamento entre UFRGS7 e UFRGS910906, e a testemunha URS22. EEA, Eldorado do Sul, 2005.

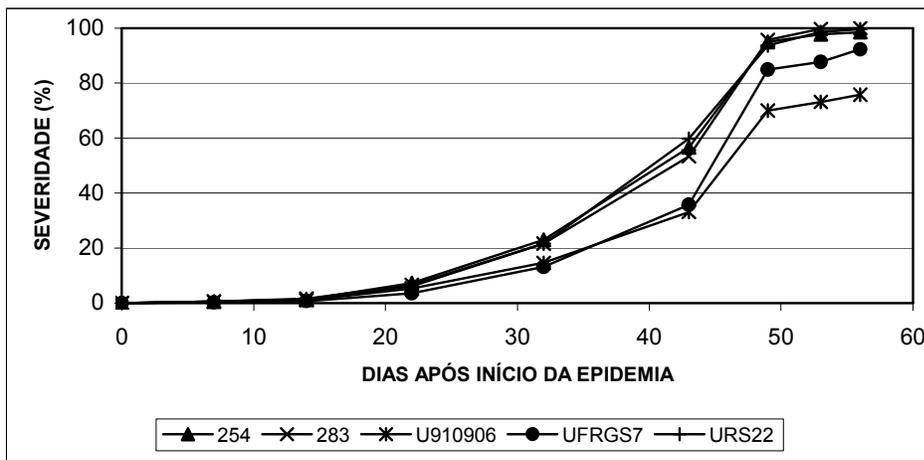


FIGURA 2.2 Curvas do progresso da severidade da ferrugem da folha nos genitores UFRGS 7 e UFRGS 910906, das linhagens recombinantes  $F_{6:11}$  com pior desempenho e da testemunha URS 22. EEA/UFRGS, 2005.

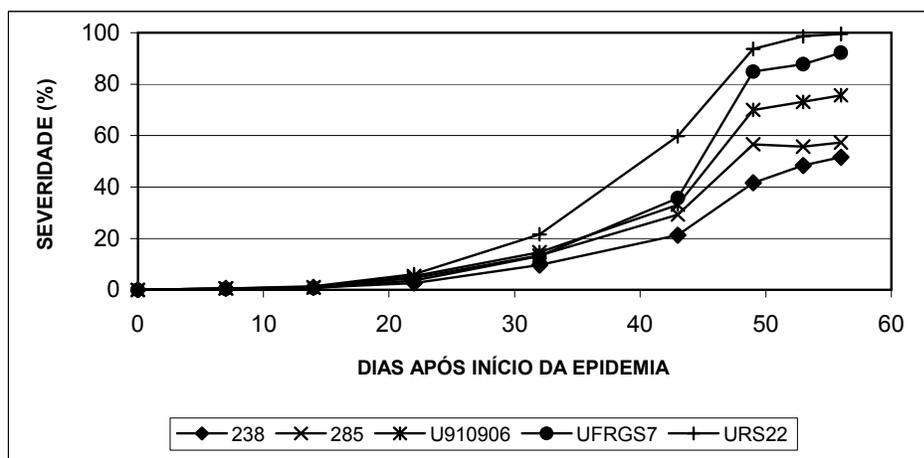


FIGURA 2.3 Curvas do progresso da severidade da ferrugem da folha nos genitores UFRGS 7 e UFRGS 910906, das linhagens recombinantes  $F_{6:11}$  com melhor desempenho e da testemunha URS 22. EEA/UFRGS, 2005.

No primeiro caso, onde as linhagens superam a resistência do genitor parcialmente resistente, os dados podem estar apontando para duas vias: ou o pai suscetível está colaborando com algum tipo de resistência; ou está ocorrendo uma variação *de novo* em alelos novos (Rasmusson & Phillips, 1997) ocasionada por anos de recombinação (devido à SSD); ou ainda, por ambos os motivos.

No segundo caso, a maior suscetibilidade à moléstia que algumas linhagens apresentaram em relação ao genitor suscetível pode ser devido a: uma redução de raças do fungo virulentas à cultivar UFRGS7, o que resultaria numa diminuição da severidade da doença observada sobre este genótipo; ou não houve a transferência de alguns genes de resistência para as linhagens recombinantes, as quais se esperavam uma taxa menor de doença do que no pai suscetível. Sobretudo, é arriscado fazer inferências, uma vez, que para entender o comportamento da resistência quantitativa, é imprescindível avaliar a quantidade de doença sobre cada genótipo em um intervalo de tempo maior. Por esta razão, foi realizada a etapa seguinte, a qual comparou a ASCPD a partir da geração F<sub>2</sub> no período de 1998 a 2005.

### **2.3.2 Comparação da ASCPD no período de 1998 a 2005**

A curva de progresso da doença, expressa pela plotagem da proporção de doença versus tempo, é a melhor representação de uma epidemia. Através dela, interações entre patógeno, hospedeiro e ambiente podem ser caracterizadas, estratégias de controle avaliadas, níveis futuros de doença previstos e simuladores verificados (Bergamin Filho, 1995).

Comparando os gráficos da ASCPD nos diferentes anos (FIGURA 2.4) pode se observar que esta medida é extremamente variável entre os genótipos estudados, demonstrando desde uma distribuição perfeitamente normal, como no ano de 1998 (FIGURA 2.4 A), até distribuições tendenciosas aos extremos de resistência (FIGURA 2.4 B) ou de suscetibilidade (FIGURA 2.4 I). É importante considerar as condições ambientais durante os sete anos de avaliação das linhagens no campo, as quais podem ter afetado o desenvolvimento da doença sobre as plantas.

Em 1998, a ferrugem da folha ocorreu por um período de 60 dias (início de agosto a final de outubro) tendo sido observados valores de ASCPD que variaram de

917 a 1860, a média das linhagens foi de 1333,23 (FIGURA 2.4 A), e ambos os pais também apresentaram altos valores de ASCPD. O início do mês de agosto foi quente, e não houve registro de temperaturas muito baixas (FIGURA 2.5). Em relação à umidade relativa do ar, o comportamento foi similar a média dos últimos trinta anos para a região (segundo dados da EEA/UFRGS por Bergamaschi et al., 2003), a taxa de precipitação pluviométrica também não foi alta (FIGURA 2.12).

No ano de 1999, foram avaliadas duas gerações no campo, a  $F_3$  (FIGURA 2.4 B) e a  $F_4$  (FIGURA 2.4 C). O que se observou neste ano, é que durante o período da doença no campo (dois de setembro a 22 de outubro) ocorreram mínimas de  $1^\circ\text{C}$  e máximas de  $35^\circ\text{C}$  de temperatura (FIGURA 2.6). Estes extremos não favoreceram a população do patógeno. Além disto, a umidade relativa do ar e a precipitação ficaram um pouco abaixo da normal para aquela região (FIGURA 2.13). Analisando a distribuição da ASCPD para as duas gerações observa-se que ambas tiveram distribuição semelhante. Ocorreu um pequeno aumento da média das linhagens de 52,11 na geração  $F_3$  para 94,15 na  $F_4$ . Por se tratar de um mesmo ambiente, pode-se inferir que esta variação é devida a fatores genéticos, como possíveis quebras de blocos gênicos gerados por novas recombinações gênicas durante a meiose e redução do efeito de dominância.

Em 2000, novamente foram testadas no campo duas gerações, a  $F_5$  e  $F_6$ . De modo geral observa-se um deslocamento das freqüências da ASCPD para valores mais altos. Semelhante ao ano de 1999 nota-se que a média das linhagens da  $F_5$  (FIGURA 2.4 D) é inferior a média das linhagens em  $F_6$  (FIGURA 2.4 E), confirmando a idéia de perda de combinações gênicas que atuam sobre a resistência durante a meiose no avanço de gerações. Neste ano a ferrugem apareceu em meados de agosto (mais cedo que no ano anterior) e em uma época de baixa temperatura (FIGURA 2.7), ocorrendo

até sete de outubro. A umidade relativa do ar (FIGURA 2.14) foi menor em relação a 1999, mas a precipitação foi alta (FIGURA 2.14).

No ano de 2001, esta população não foi testada no campo, havendo apenas multiplicação da mesma em telado.

Quando em 2002, a população em  $F_{6:8}$  foi cultivada e avaliada em condições de campo, destacou-se a redução da ASCPD média do pai suscetível, UFRGS7, em relação ao pai parcialmente resistente UFRGS910906, e este último foi inferior a média das linhagens (FIGURA 2.4 F). A principal causa desta modificação pode ter sido uma redução na população de raças virulentas à cultivar UFRGS7. No ano de 2002 o período de doença no campo foi de 27 dias (nove de setembro a seis de outubro), um período curto, com certo aumento da umidade relativa do ar e da precipitação quando comparado a normal (FIGURA 2.15). Entretanto no mês de agosto ocorreram temperaturas muito baixas (FIGURA 2.8), e não houve aumento da severidade da doença sobre as plantas.

Em 2003, ocorreu um aumento geral da ASCPD da população em  $F_{6:9}$ , e a quantidade de doença sobre o genitor suscetível UFRGS7 aumentou equiparando-se ao genitor UFRGS91006 (FIGURA 2.4 G), demonstrando que dois anos consecutivos no campo são suficientes para um aumento da população de raças virulentas a um genótipo suscetível. Neste ano a ferrugem apareceu no campo por volta de meados de agosto e permaneceu até metade de outubro. Durante este período ocorreram temperaturas negativas (FIGURA 2.9), umidade relativa próxima à normal, uma estiagem nos meses de agosto e setembro e um aumento significativo da precipitação em outubro (FIGURA 2.16). Talvez este último fato tenha influenciado para que no final do ciclo da doença, ainda houvesse aumento da população patogênica e conseqüente aumento de severidade capaz de superar a média da ASCPD das linhagens em relação ao ano anterior.

No ano seguinte, 2004, a doença ocorreu do final de agosto até meados de outubro. O período caracterizou-se por temperaturas mais baixas que as mínimas normais para a região (FIGURA 2.10), e extremamente seco no mês de agosto (FIGURA 2.17). Observou-se pouca doença no campo, e novamente a cultivar UFRGS7 apresentou menor ASCPD que o genitor parcialmente resistente (FIGURA 2.4 H). A média das linhagens foi de 308,22, inferior ao ano de 2003, indicando que a baixa severidade da doença pode ter sido ocasionada pelas condições ambientais desfavoráveis à multiplicação do patógeno.

No último ano de avaliação, 2005, a doença apareceu no início de agosto e permaneceu até final de setembro. As temperaturas foram mais altas neste ano (FIGURA 2.11). A umidade relativa do ar e a precipitação pluviométrica (FIGURA 2.18) foram extremamente altas, propiciando um ano muito favorável ao patógeno. A cultivar UFRGS7, novamente assumiu seu caráter de suscetibilidade em relação ao genótipo UFRGS910906, mas a média da ASCPD das linhagens foi superior a ambos os genitores (FIGURA 2.4 I).

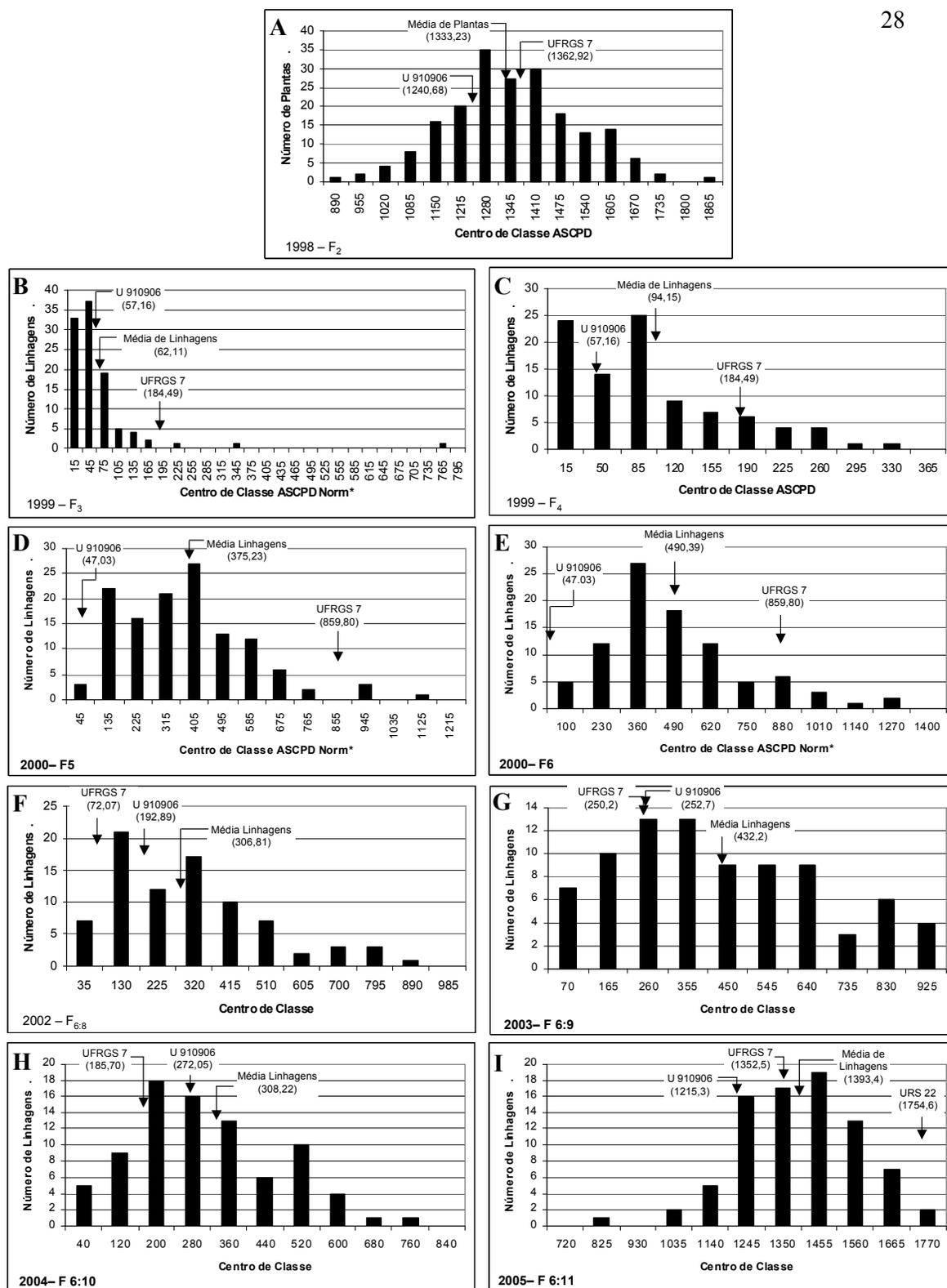


FIGURA 2.4. Comparação entre as ASCPD de ferrugem da folha nas gerações: A) F<sub>2</sub> (1998), B) F<sub>3</sub> (1999), C) F<sub>4</sub> (1999), D) F<sub>5</sub> (2000), E) F<sub>6</sub> (2000) (Barbosa, 2002), F) F<sub>6:8</sub> (2002), G) F<sub>6:9</sub> (2003) (Tisian, 2005), H) F<sub>6:10</sub> (2004) (Wesp, 2005) e I) F<sub>6:11</sub> (2005), originadas do cruzamento das cultivares UFRGS910906 x UFRGS7 de aveia. EAA, Eldorado do Sul, RS.

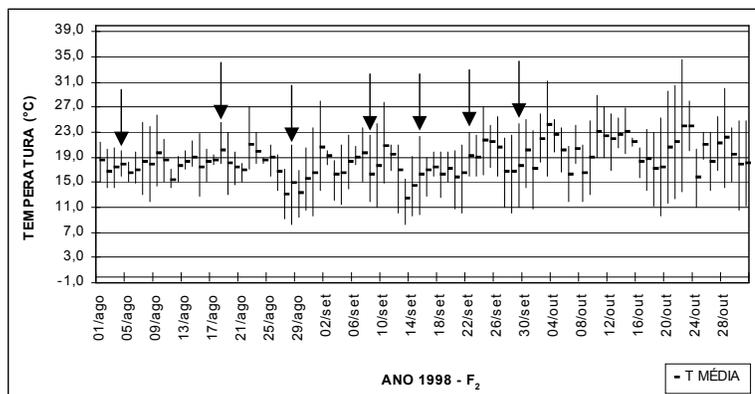


FIGURA 2.5 Temperatura do ar (°C), variando das mínimas às máximas, com a média destacada, no período de agosto a outubro de 1998. As setas indicam a data de avaliação da doença. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.

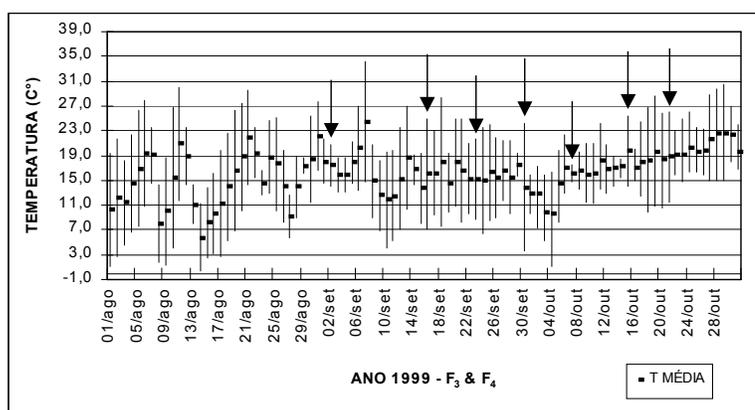


FIGURA 2.6 Temperatura do ar (°C), variando das mínimas às máximas, com a média destacada, no período de agosto a outubro de 1999. As setas indicam a data de avaliação da doença. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.

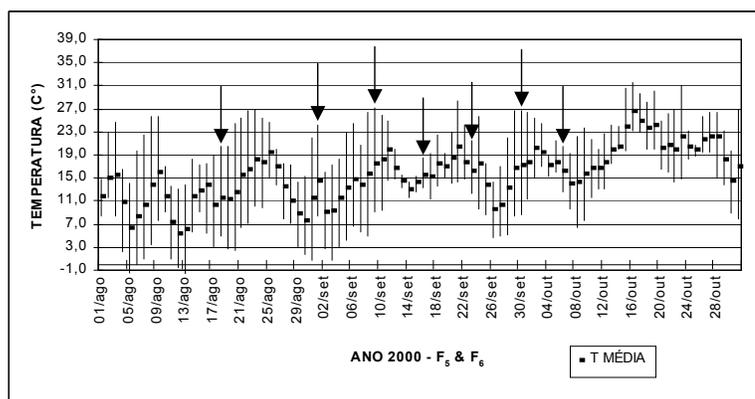


FIGURA 2.7 Temperatura do ar (°C), variando das mínimas às máximas, com a média destacada, no período de agosto a outubro de 2000. As setas indicam a data de avaliação da doença. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.

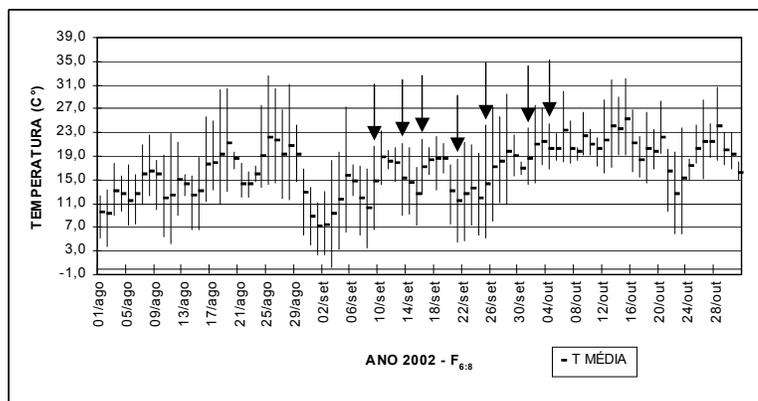


FIGURA 2.8 Temperatura do ar (°C), variando das mínimas às máximas, com a média destacada, no período de agosto a outubro de 2002. As setas indicam a data de avaliação da doença. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.

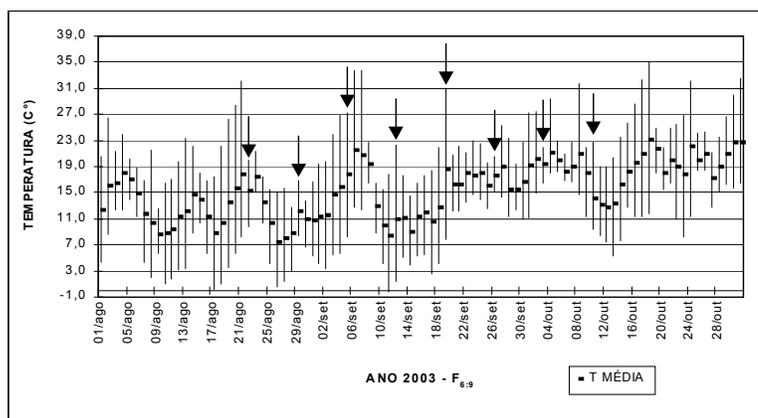


FIGURA 2.9 Temperatura do ar (°C), variando das mínimas às máximas, com a média destacada, no período de agosto a outubro de 2003. As setas indicam a data de avaliação da doença. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.

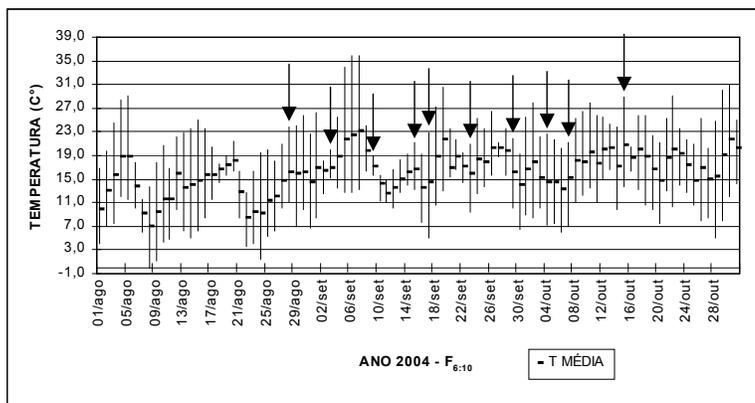


FIGURA 2.10 Temperatura do ar (°C), variando das mínimas às máximas, com a média destacada, no período de agosto a outubro de 2004. As setas indicam a data de avaliação da doença. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.

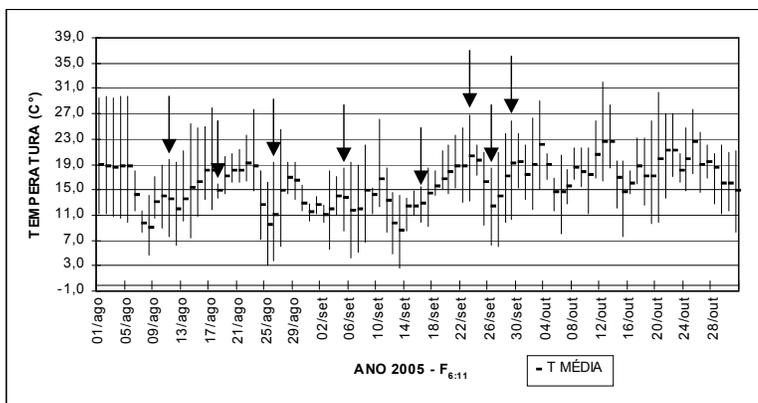


FIGURA 2.11 Temperatura do ar (°C), variando das mínimas às máximas, com a média destacada, no período de agosto a outubro de 2005. As setas indicam a data de avaliação da doença. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.

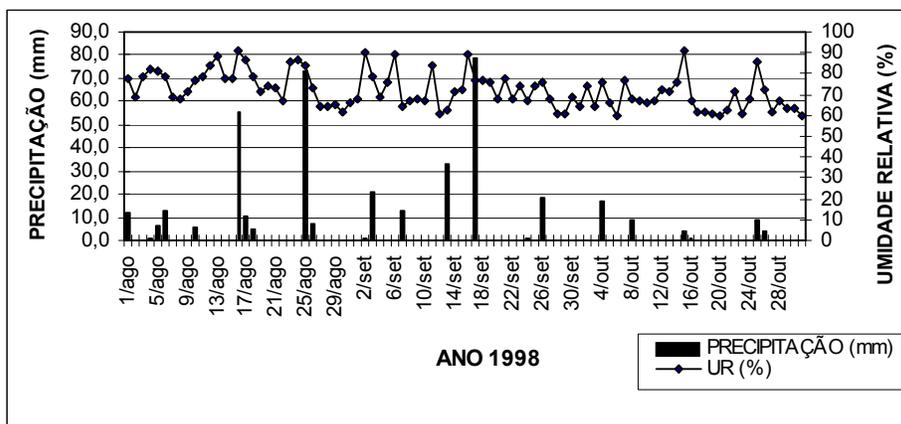


FIGURA 2.12 Umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm) do período de agosto a outubro de 1998. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.

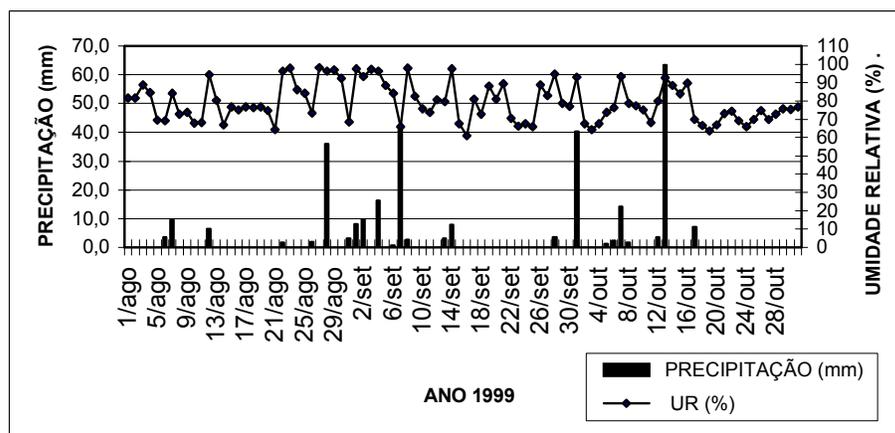


FIGURA 2.13 Umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm) do período de agosto a outubro de 1999. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.

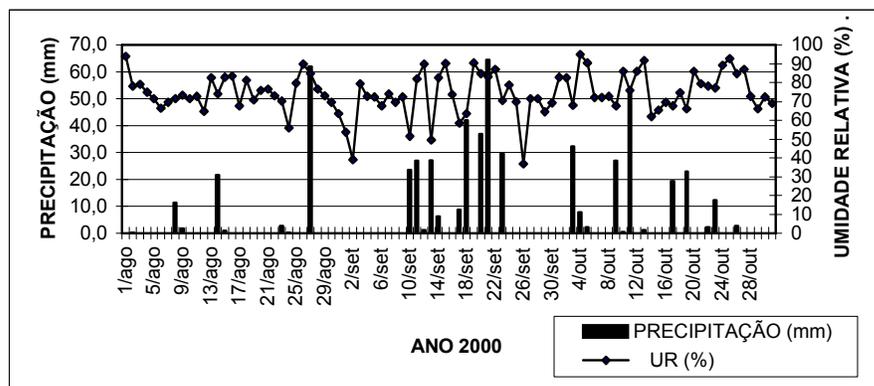


FIGURA 2.14 Umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm) do período de agosto a outubro de 2000. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.

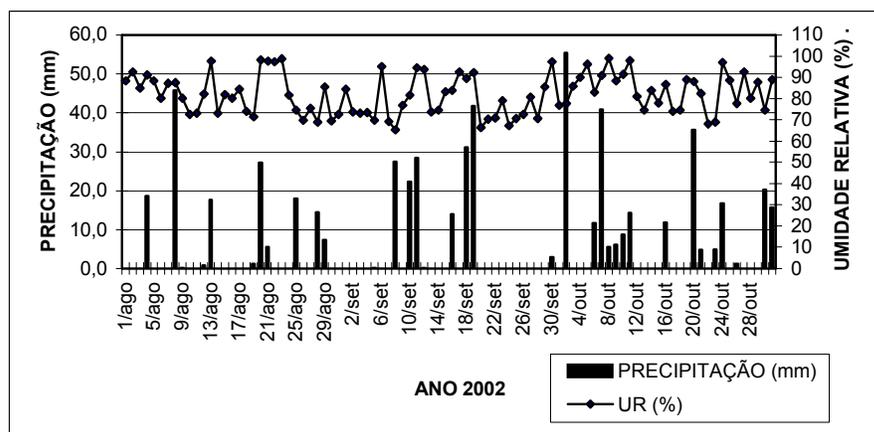


FIGURA 2.15 Umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm) do período de agosto a outubro de 2002. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.

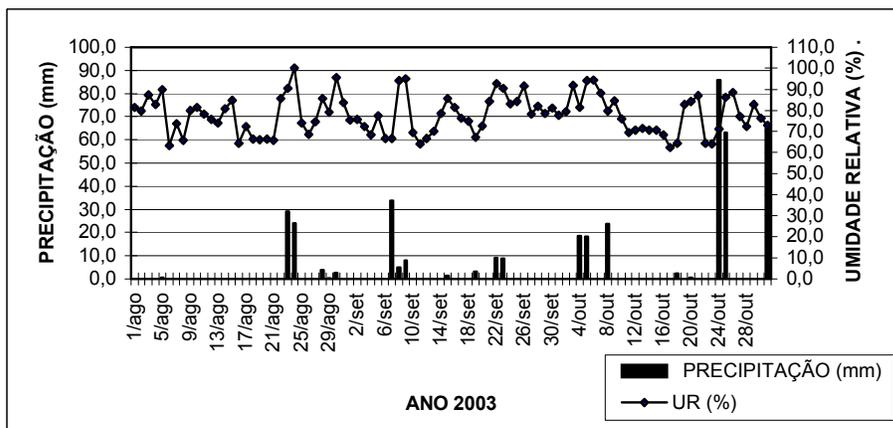


FIGURA 2.16 Umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm) do período de agosto a outubro de 2003. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.

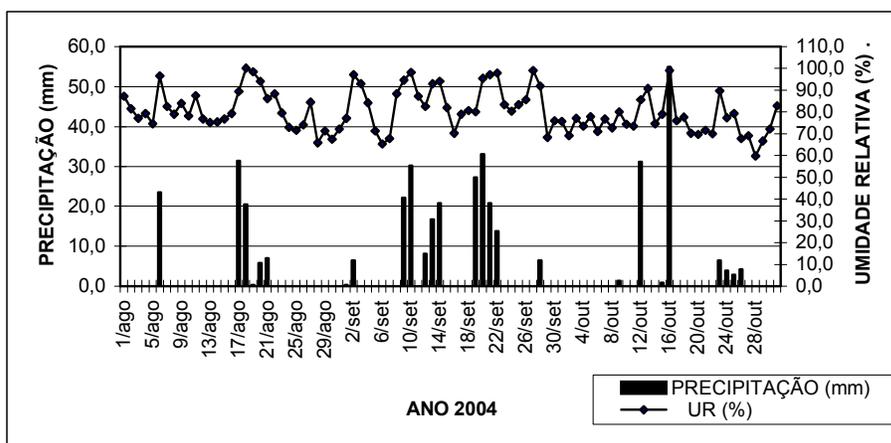


FIGURA 2.17 Umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm) do período de agosto a outubro de 2004. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.

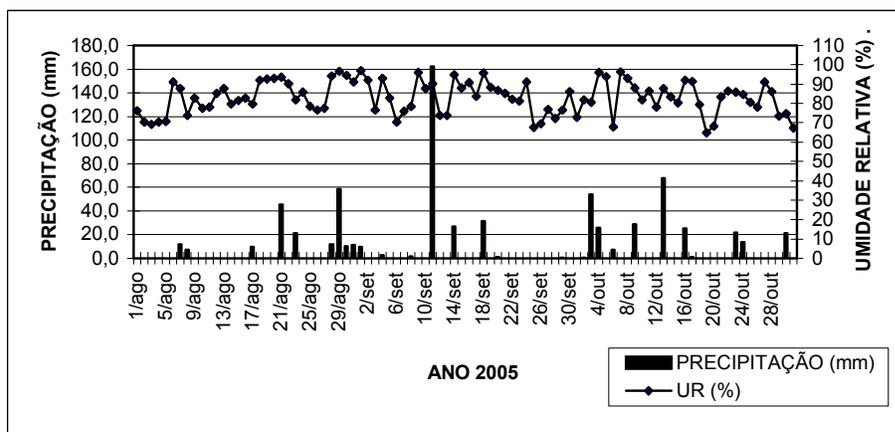


FIGURA 2.18 Umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm) do período de agosto a outubro de 2005. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul, RS.

Analisando os sete anos e as nove gerações, observa-se instabilidade da resistência na maioria dos genótipos. Para melhor demonstração desta variação, realizou-se um ranqueamento entre as linhagens recombinantes para cada ano e comparou-se entre os mesmos (TABELA 2.2). Somente o genótipo 238 manteve-se estável e com menor ASCPD durante todos os anos.

TABELA 2.2 Lista dos genótipos de aveia branca com as dez menores áreas sob a curva do progresso da doença (ASCPD), com seus respectivos valores entre parênteses, para a ferrugem da folha entre 2002 e 2005, avaliados na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul (RS).

GENÓTIPO	ORDEM DE CLASSIFICAÇÃO PELA ASCPD							
		2005		2004		2003		2002
238	<b>1°</b>	(772,82)	<b>1°</b>	(37,05)	<b>1°</b>	(34,12)	<b>4°</b>	(54,28)
285	<b>2°</b>	(1005,98)	<b>82°</b>	(619,24)	<b>30°</b>	(277,90)	<b>13°</b>	(96,33)
247	<b>3°</b>	(1065,30)	<b>38°</b>	(282,07)	<b>15°</b>	(209,30)	<b>56°</b>	(349,99)
280	<b>4°</b>	(1114,73)	<b>11°</b>	(122,24)	<b>24°</b>	(244,47)	<b>23°</b>	(144,01)
241	<b>5°</b>	(1131,13)	<b>41°</b>	(298,81)	<b>6°</b>	(92,22)	<b>1°</b>	(36,05)
245	<b>6°</b>	(1131,30)	<b>42°</b>	(300,47)	<b>3°</b>	(65,97)	<b>3°</b>	(51,45)
249	<b>7°</b>	(1158,70)	<b>35°</b>	(268,54)	<b>2°</b>	(35,17)	<b>11°</b>	(88,56)
239	<b>8°</b>	(1165,05)	<b>34°</b>	(268,39)	<b>14°</b>	(203,87)	<b>6°</b>	(69,77)
288	<b>9°</b>	(1199,60)	<b>5°</b>	(97,37)	<b>20°</b>	(219,10)	<b>27°</b>	(163,33)
224	<b>10°</b>	(1202,40)	<b>84°</b>	(680,95)	<b>5°</b>	(77,17)	<b>36°</b>	(211,41)
244	<b>32°</b>	(1341,07)	<b>2°</b>	(51,45)	<b>16°</b>	(211,75)	<b>10°</b>	(87,12)
278	<b>15°</b>	(1230,08)	<b>3°</b>	(62,19)	<b>19°</b>	(218,4)	<b>30°</b>	(186,20)
243	<b>23°</b>	(1288,37)	<b>4°</b>	(83,53)	<b>4°</b>	(66,15)	<b>2°</b>	(43,72)
207	<b>17°</b>	(1240,20)	<b>6°</b>	(99,09)	<b>25°</b>	(246,57)	<b>25°</b>	(154,44)
221	<b>25°</b>	(1297,27)	<b>7°</b>	(107,49)	<b>13°</b>	(203,17)	<b>26°</b>	(156,92)
206	<b>14°</b>	(1223,68)	<b>8°</b>	(108,60)	<b>18°</b>	(213,32)	<b>12°</b>	(90,82)
270	<b>20°</b>	(1261,45)	<b>9°</b>	(109,29)	<b>12°</b>	(198,45)	<b>15°</b>	(107,66)
292	<b>36°</b>	(1356,48)	<b>10°</b>	(120,01)	<b>37°</b>	(351,05)	<b>17°</b>	(116,38)
240	<b>22°</b>	(1268,62)	<b>15°</b>	(177,92)	<b>7°</b>	(114,10)	<b>41°</b>	(260,82)
277	<b>41°</b>	(1375,67)	<b>16°</b>	(180,80)	<b>8°</b>	(145,07)	<b>54°</b>	(347,32)
264	<b>45°</b>	(1392,18)	<b>40°</b>	(291,03)	<b>9°</b>	(158,20)	<b>18°</b>	(120,57)
211	<b>35°</b>	(1356,40)	<b>62°</b>	(399,99)	<b>10°</b>	(167,47)	<b>5°</b>	(66,41)
UFRGS 7	<b>33°</b>	(1352,52)	<b>17°</b>	(185,70)	<b>26°</b>	(250,20)	<b>7°</b>	(72,07)
291	<b>13°</b>	(1221,70)	<b>13°</b>	(167,78)	<b>41°</b>	(366,45)	<b>8°</b>	(80,17)
273	<b>61°</b>	(1500,40)	<b>29°</b>	(232,00)	<b>47°</b>	(439,07)	<b>9°</b>	(87,05)
UFRGS 910906	<b>11°</b>	(1215,27)	<b>66°</b>	(272,05)	<b>27°</b>	(252,70)	<b>31°</b>	(192,89)

Nas análises dos três fatores ambientais aqui avaliados, temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica, não há como inferir qual deles interfere mais na severidade da doença. Relatos indicam que as condições que fornecem maior quantidade de água no ambiente são fundamentais para o fungo, uma vez que há a necessidade que um filme de água cubra o esporo para que a germinação ocorra. O ideal seria calcular o ponto de formação de orvalho para uma informação mais precisa desta relação.

As diferenças observadas entre os anos estão também relacionadas à época de início da infecção no campo e ao período da epidemia. Em anos muito favoráveis ao desenvolvimento da moléstia e com aparecimento precoce da ferrugem no campo, a resistência de planta adulta não se manifesta, e a expressão da resistência parcial é mascarada pelo ambiente, dificultando a diferenciação dos níveis de resistência. Isto indica que nestas circunstâncias de alta severidade da moléstia, não é aconselhável fazer seleção para este tipo de resistência.

Segundo Camargo (1995), quanto maior a distribuição da variação entre genótipos, maior o número de genes envolvidos, pois à medida que aumenta o número de genes, aumenta também o número de diferentes combinações entre eles, o que aumenta por sua vez, a distribuição fenotípica. O presente trabalho, que analisou o comportamento da distribuição da ASCPD sobre uma população de aveia branca em vários anos, demonstrou que este é um caso onde a resistência parcial é conferida por mais de um gene. Este relato já havia sido feito por Thomé (1999), quando afirmou que vários genes de pequeno efeito estavam envolvidos na herança genética dos componentes de resistência avaliados na geração  $F_2$  do cruzamento UFRGS 7 x UFRGS 910906, com grande contribuição de efeitos de dominância (interação de alelos do mesmo gene, onde o gene com efeito dominante pode mascarar o alelo com efeito recessivo) e efeito epistático. Além disto, no trabalho de mapeamento molecular realizado nesta mesma população (Barbosa, 2002) foram identificados cinco QTLs (*quantitative trait loci*) associados à resistência parcial à ferrugem da folha na geração  $F_2$  e três QTLs na  $F_6$ , comprovando a fonte quantitativa da resistência para este caso.

Outro aspecto interessante foi a inconstância observada em certos genótipos que em alguns anos se comportam como resistentes, já em outros se mostram extremamente suscetíveis (TABELA 2.2). Entretanto, um aumento na ASCPD de

muitas linhagens quando comparada a outros anos pode ser considerada como uma quebra de resistência. Pois, considerando o fato de que resistência quantitativa é sensível às condições ambientais, e que houve anos extremamente favoráveis para o fungo causador da ferrugem (altas taxas de precipitação combinadas a ondas de calor), deve se levar em consideração que o patógeno evoluiu superando a resistência quantitativa no agroecossistema. Todavia, devido esta evolução diferir da evolução sobre genes de efeito maior, ela é mais difícil de ser detectada e é melhor caracterizada como um processo de erosão da resistência do que um processo de quebra da resistência de alguns genes (McDonald, 2002).

Trabalhos como este que, analisam uma mesma população em várias gerações, são escassos na literatura. No entanto, análises como estas são imprescindíveis para avaliar a durabilidade da resistência e para determinar as condições mais adequadas para seleção de genótipos com resistência parcial durável. Cabe ressaltar que a avaliação de severidade realizada por diferentes avaliadores ao longo dos anos pode gerar variações e erros. No entanto, considerando-se não os valores *per se*, mas a distribuição da população, o efeito do avaliador pode ser minimizado. A efetividade da resistência parcial da população UFRGS 7 x UFRGS 910906 demonstra ser dependente das condições ambientais. Em condições onde o período de ocorrência da moléstia é curto ou a incidência é pequena, a utilização da resistência parcial pode ser uma estratégia eficiente no controle da ferrugem, porém em ambientes favoráveis a moléstia, sua efetividade é limitada, pelo menos nos níveis encontrados na população testada.

Embora o nível de resistência quantitativa encontrado na população estudada pareça ser baixo, limitando seu uso como fonte principal de resistência em genótipos do programa de melhoramento de aveia, ele apresenta um grande potencial

para ser associado a outras fontes de resistência, além de ser uma grande fonte para o estudo da resistência quantitativa.

## CAPÍTULO III

### MAPEAMENTO MOLECULAR E ANÁLISE DE LIGAÇÃO ENTRE O GENE DE RESISTÊNCIA *PC68* E MARCADORES DO TIPO AFLP EM *AVENA SATIVA*

#### 3.1 Introdução

A produção mundial de aveia (*Avena sativa* L.) tem como principal limitante à ferrugem da folha. Esta moléstia, causada pelo fungo *Puccinia coronata* Corda f. sp. *avenae* Eriksson, tem limitado a expressão do potencial de rendimento dos genótipos de aveia branca. Este patógeno tem potencial para causar severas epidemias em cultivares suscetíveis quando as condições ambientais são favoráveis (Cruz et al., 1999). No Rio Grande do Sul foram observadas perdas de até 50% no peso de grãos em cultivares de aveia suscetíveis à ferrugem da folha (Martinelli et al., 1994).

A melhor estratégia de controle da ferrugem da folha é o uso de cultivares resistentes, sendo que, o conhecimento dos genes de resistência é fundamental para a manutenção desta. Em aveia já foram identificados mais de 100 genes de resistência à ferrugem da folha, dos quais 96 são designados de Pc, e são, na sua maioria, genes dominantes (Zhu & Kaeppler, 2003). Entretanto, devido à extrema diversidade genética presente nas populações de *Puccinia coronata*, geralmente a superação destes genes acaba ocorrendo em um curto intervalo de tempo (Cruz et al., 1999).

Entre os métodos propostos para aumentar a durabilidade da resistência à ferrugem da folha, pode-se destacar a piramidização de genes (Hittalmani et al., 2000). Esta estratégia consiste no princípio de incorporar dois ou mais genes de resistência do

tipo vertical (ou também chamados de “genes maiores”) em uma única cultivar. Desta forma, o sucesso da piramidização depende da premissa de que a probabilidade do aparecimento de uma “super-raça” do patógeno, contendo todos os genes de virulência necessários para atacar esta combinação de genes de resistência, é muito baixa, principalmente se existirem poucas raças virulentas aos genes escolhidos. Por este motivo, a escolha dos genes a serem piramidizados deve ser bastante criteriosa, procurando agrupar genes que possuam nenhuma ou poucas raças virulentas a eles. Neste contexto, o gene *Pc68* demonstra ser um forte candidato para ser utilizado em programas que visem o melhoramento para a resistência à ferrugem da folha através da piramidização. Este gene foi introduzido em 1992 em *Avena sativa* a partir de *Avena sterilis*, sendo amplamente utilizado nas aveias cultivadas no Canadá e no norte dos Estados Unidos, onde permaneceu efetivo até o ano de 2005 (Agri-Food, 2006).

Na América do Sul, o *Pc68* continua sendo de especial interesse. Em 2005, Leonard & Martinelli, realizaram um levantamento sobre a virulência de raças de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e encontraram apenas duas raças, oriundas do Brasil, virulentas ao *Pc68* e, duas raças também virulentas, oriundas do Uruguai (Graichen, 2006). Desta forma, o *Pc68*, demonstra potencial para ser introduzido em material elite, num processo de piramidização em programas de melhoramento do sul do Brasil.

Não existem muitos relatos de piramidização para a resistência na literatura. Uma possível explicação para este fato é a dificuldade encontrada no processo de combinação de genes diferentes de resistência via métodos tradicionais de melhoramento (Milach & Cruz, 1997). O uso de marcadores moleculares que sejam capazes de identificar diferentes genes de resistência é uma ferramenta útil para os programas de melhoramento. Entre as diversas aplicações que os marcadores moleculares podem ter no melhoramento de plantas, pode citar-se, a seleção assistida

(SAM- Seleção Assistida por Marcadores) a qual é fundamentada no mapeamento e associação de marcadores a genes que controlam características de interesse (Milach, 1998).

Desde 1990, consideráveis esforços têm sido despendidos para o desenvolvimento de marcadores baseados em DNA para genes de resistência à ferrugem da folha em aveia (Chen et al., 2006). Penner et al. (1993) foi o primeiro a identificar um marcador molecular para um gene de resistência à ferrugem da folha em aveia. Um marcador do tipo RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) foi obtido para o gene *Pc68* em uma população em F3 resultante do cruzamento entre as linhagens ‘Makuru’\*2//CAV4904/2\*’SunII’ (com presença do *Pc68*) e ‘Rodney O’ (sem *Pc68*). Entretanto, o marcador identificado estava em repulsão, podendo desta forma, existir a possibilidade dele não ser validado em outra população.

Trabalhos posteriores identificaram marcadores do tipo SCAR- *Sequence characterized amplified region* (Orr et al., 1999) e SNP- *Single nucleotide polymorphisms* (Chen et al., 2006) para o gene *Pc68*, partindo da hipótese de que este gene encontra-se em um cluster com o gene de resistência à ferrugem do colmo *Pg9* (Chong et al., 1994). Ambos os marcadores citados anteriormente foram desenvolvidos a partir de marcadores RAPD (Orr et al. 1998) e RFLP- *Restriction-fragment length polymorphism* (O’Donoghue et al. 1996) respectivamente, obtidos inicialmente para o gene *Pg9*. Entretanto, deve-se ter muita cautela ao extrapolar marcadores do gene *Pg9* ao *Pc68*, pois ainda faltam esclarecer questões como a distância que separa estes genes, bem como, se o cluster permanece em outras populações de aveia branca. Além disto, o marcador do tipo SNP detectado por Chen et al. (2006) também encontra-se em repulsão ao gene *Pc68*, e foi desenvolvido de forma que se faz necessário o uso de

seqüenciamento para a identificação do marcador para cada genótipo, o que ainda é inviável para a maioria dos programas de melhoramento de aveia.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos detectar marcadores do tipo AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) associados ao gene *Pc68*, presente na população de linhagens recombinantes na geração F6 derivada do cruzamento entre as cultivares *Pc68/5\*Starter* e UFRGS 8, desenvolvidas pelo programa de melhoramento da aveia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e ampliar o mapa genético desta população.

## **3.2 Material e Métodos**

### **3.2.1 Material Vegetal e Análise Fenotípica**

Foi utilizada uma população F6 composta por 92 linhagens recombinantes provenientes do cruzamento entre as cultivares *Pc68/5\*Starter* e UFRGS 8 contrastantes quanto à presença do gene *Pc68*. A cultivar *Pc68/5\*Starter* é resistente à ferrugem da folha devido à presença do gene *Pc68*, enquanto que a cultivar UFRGS 8 (oriunda do cruzamento entre as cultivares OA338 x X2682-1), desprovida deste gene, caracteriza-se por apresentar suscetibilidade à moléstia. Ambas cultivares pertencem ao Programa de Melhoramento Genético de Aveia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O processo de avanço de gerações da progênie do cruzamento destas duas cultivares foi descrito por Locatelli (2003). A caracterização fenotípica foi realizada em plântulas por Graichen (2006), que inoculou a população F6 com a raça SQPT de *Puccinia coronata* f. sp. avenae, devido esta apresentar avirulência ao gene *Pc68* e virulência à cultivar UFRGS 8, e obteve uma taxa de segregação de 1R:1S (um resistente para um suscetível).

### 3.2.2 Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico dos genitores, juntamente com o das 92 linhagens recombinantes da população F6 foi extraído de folhas verdes, com o uso de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), segundo o protocolo descrito por Roy et al. (1992) com algumas modificações. A quantificação do DNA foi determinada em espectrofotômetro (Spectronic® Genesys™). A qualidade do DNA foi avaliada pela relação A260/ A280nm. A concentração final de todos DNAs foi ajustada para 250ng/μl para as reações de AFLP.

### 3.2.3 Análises de AFLP

As análises de AFLP foram realizadas conforme descrito por Vos et al. (1995) com algumas modificações. Um total de 250ng de DNA genômico foi digerido com as enzimas *MseI* (Promega) e *PstI* (Gibco BRL). Ao DNA digerido foram adicionados adaptadores específicos aos sítios de restrição. A pré-amplificação foi realizada no termociclador PTC-100 (MJ Research) por 20 ciclos, nas condições de 94°C por 30", 56°C por 1' e 72°C por 1'. Nesta etapa a reação foi composta de 10ng de DNA ligado, 37,5ng da cada seqüência inicializadora adicionada de um nucleotídeo (*MseI*+C e *PstI*+A), 0,8mM de dNTP, tampão 1X e uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase. A amplificação seletiva foi realizada com o uso de PCR *touch down* com ciclos de 94°C por 60", 65°C por 60" e 72°C por 90". A temperatura de pareamento começou a 65°C e foi reduzida em 1°C sucessivamente até alcançar a temperatura de 56°C a qual foi mantida por 23 ciclos. A reação de PCR para a amplificação seletiva continha 20ng de DNA pré-amplificado, 30ng de ambas as seqüências inicializadoras *PstI* e *MseI* acrescidas de três nucleotídeos, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,8mM de dNTP, tampão 1X e uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 5% (19 bis-acrilamida : 1 acrilamida), a 80W por aproximadamente 2 horas e 30 minutos, acompanhado com o marcador DNA Ladder de 123 pb (Invitrogen). Os géis foram corados com nitrato de prata de acordo com o protocolo Silver sequence TM da Promega Corporation (1996). A análise visual dos fragmentos foi realizada em mesa de luz fluorescente por dois leitores.

O tamanho dos fragmentos foi estimado através da comparação com a migração dos fragmentos do marcador de peso molecular (DNA Ladder), determinada a partir do ponto de aplicação em cada gel.

As análises de AFLP realizadas por Locatelli (2003) diferenciaram-se quanto à enzima de restrição de corte raro, a qual foi utilizada a *EcoRI*, e quanto às reações de pré-amplificação. Nas reações de pré-amplificação foi utilizado o primer *EcoRI* marcado com P<sup>33</sup>ATP e a seguir sofreu amplificação seletiva com o primer *MseI* adicionado de quatro nucleotídeos, sendo os três nucleotídeos terminais constantes, variando o quarto nucleotídeo (Locatelli, 2003).

#### **3.2.4 Análise de grupos segregantes (*Bulk Segregation Analysis –BSA*)**

O método BSA proposto por Michelmore et al. (1991) foi utilizado a fim de detectar o polimorfismo existente entre o DNA dos genitores e de dois grupos (*bulks*) obtidos com a mistura de DNA de plantas de distintas classes fenotípicas da população F6. Para a realização do BSA, quantidade equivalente de DNA genômico de 10 genótipos resistentes e 10 suscetíveis da população F6, derivada do cruzamento entre UFRGS 8 e Pc68/5\*Starter, foram misturados formando um grupo (*bulk*) suscetível e outro resistente. Ambos os *bulks*, juntamente com os genitores foram submetidos a 60 combinações de *primers* de AFLP (TABELA 3.1). Somente as combinações

polimórficas foram utilizadas para a análise individual das 92 plantas F6 a fim de determinar associações entre marcadores AFLP e o gene de resistência *Pc68*.

TABELA 3.1. Combinações de *primers* de AFLP testadas pelo método BSA na população Pc68/5\*Starter x UFRGS8.

<b>Combinações dos primers de AFLP</b>			
<i>Pst</i> I		<i>Mst</i> I	
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAG</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CCG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAG</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAA*</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CGC*</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAG</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CGG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAA</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTT</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ACC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTT</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ATT</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CAG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ACG</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTC</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CGG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ACC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CGG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ATC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CCG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ATC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTT</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ACG</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CGG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAG</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTC</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ACC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CAG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ATT</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTC</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAG</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTT</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAG</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CAG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAA</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CCG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAA</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAA*</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CAG*</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAA</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTC</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ACC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ACC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTC</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ATT</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CCG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ATT</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ATT</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CGG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ATT</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTT</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ACG</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CCG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ACG</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ACG</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTT</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ATC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CGG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ATC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTC</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ATC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CCG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTT</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTC</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CAG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ACG</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CAG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ACG</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CCG</b>

TABELA 3.1 Continuação...

GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ACG</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAG</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AAA</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CGG</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AGA</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CGA</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AGA</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CAC</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ACC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CGA</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ACC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CAC</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ACC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTA</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ATC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CGA</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ATC</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CAC</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ATC*</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTA*</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AGA*</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CGA*</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AGA</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CAC</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AGA</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTA</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AGA*</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CCG*</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AGA</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTT</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ACG</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CGA</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ACG*</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CAC*</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>ACG*</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTA*</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AGA*</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CTC*</b>
GACTGCGTAGGTGCAG	<b>AGA*</b>	GATGAGTCCTGAGTAA	<b>CAG*</b>

\* combinações que demonstraram polimorfismo tanto nos genitores, quanto nos *bulks* resistentes e suscetíveis.

### 3.2.5 Análise estatística

Após a leitura dos locos polimórficos, foram acrescentados 34 marcadores previamente identificados por Locatelli (2003) na mesma população. Todos os marcadores foram verificados quanto ao padrão de segregação de cada loco. Para a verificação da ocorrência de distorção de segregação, os locos foram submetidos ao teste de aderência de “qui-quadrado” ( $\chi^2$ ), utilizando-se a proteção de Bonferroni. A correção de Bonferroni é dada por:

$$\alpha = -\exp(\ln(1 - \alpha^*)/t) + 1$$

que é aproximadamente:

$$\alpha = \alpha^*/t$$

onde  $\alpha$  corresponde ao nível de significância individual (determinado pelo pesquisador),  $t$  o número total de marcas analisadas, e  $\alpha^*$  o nível de significância para o experimento.

As marcas que apresentaram distorções das proporções mendelianas no teste de aderência não foram utilizadas na construção do mapa de ligação.

A obtenção dos grupos de ligação foi realizada a partir dos programas GQMOL (Cruz, 2007) e MAPMAKER/EXP versão 3.0 (Lander et al., 1987).

Como critérios para determinar a ligação foi utilizado  $LOD\ score > 3,0$  e frequência de recombinação inferior a 0,30. Para converter as frequências de recombinação em distâncias de mapa, expressa em centiMorgans (cM), foi utilizada a função de mapeamento de Kosambi (Kosambi, 1944). Para a construção do mapa utilizou-se o programa GQMOL (Cruz, 2007).

### **3.3 Resultados e Discussão**

#### **3.3.1 Análise de grupos segregantes (*Bulk Segregation Analysis* – BSA)**

A maioria dos *loci* analisados pelo método de BSA mostrou-se monomórfica e não informativa para diferenciar os dois *bulks*. Das 60 combinações as quais os *bulks* e ambos os genitores foram submetidos, apenas nove (15%) demonstraram polimorfismo. A partir destas nove combinações, foram identificados 80 marcadores, uma média de nove bandas polimórficas por combinação de iniciadores (TABELA 3.1). Apesar da grande diversidade fenotípica observada entre os pais, o pequeno número de fragmentos polimórficos está de acordo com a literatura de genomas hexaplóides.

Dados como estes também foram encontrados por Yu & Herrmann (2006) em um estudo de mapeamento de um gene de resistência introgridido de *Avena macrostachya* em *Avena sativa*. Através do método BSA, de um total de 256

combinações de *primers* de AFLP utilizadas para identificar polimorfismo entre os genitores e respectivos *bulks* resistentes e suscetíveis, apenas 21 combinações (cerca de 8%) demonstraram segregação entre os genótipos contrastantes para a resistência.

Este baixo nível de polimorfismo parece ser comum em espécies com grandes genomas. Li et al. (2000), analisando 20 cultivares de aveia com marcadores SSRs, obtiveram somente 36% polimórficos.

Esta observação de baixo grau de polimorfismo também é estendida para o genoma hexaplóide do trigo. Bryan et al. (1999), com o intuito de estudar a variação em nível de seqüência de DNA entre genótipos adaptados de trigo, seqüenciaram vários produtos amplificados de PCR em diversos genótipos. Como resultado, encontraram um baixo nível de variação nestas seqüências. Estes autores sugerem que o baixo polimorfismo e a baixa variação nucleotídica em espécies com tamanho grande de genoma, como aveia e trigo, são devidos ao modo de evolução destas espécies. Provavelmente, muitos eventos de duplicação de regiões repetitivas contribuíram para o aumento do genoma. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram os dados da literatura, os quais relatam a dificuldade de trabalhar com mapeamento em espécies hexaplóides.

Em casos como este, o método BSA, demonstra ser bastante eficiente em detectar polimorfismos entre linhagens segregantes para uma característica, além de prevenir o desperdício de tempo e material em analisar géis de eletroforese contendo populações inteiras para as combinações de seqüências inicializadoras que não possuam considerável polimorfismo.

Além disto, a escolha do marcador AFLP em associação com o método BSA foi um ponto muito importante, visto que, AFLP tem um alto potencial de detecção de polimorfismo. Em termos de eficiência relativa na detecção de

polimorfismos, AFLP demonstra ser superior a RFLP e RAPD (Gupta et al., 1999). Caso houvesse sido escolhido outro tipo de marcador, os resultados poderiam ter sido inferiores quanto ao grau de polimorfismo.

### **3.3.2 Análise de Segregação dos marcadores**

Aos 80 marcadores polimórficos detectados, foram acrescentados 34 marcadores do tipo AFLP previamente obtidos por Locatelli (2003), totalizando 114 marcadores moleculares. A análise de segregação mendeliana revelou que 77 (67,54%) marcadores segregaram na taxa de 1:1 ( $\alpha^* = 0,05$ ) conforme esperado para taxa de segregação de uma população de linhagens recombinantes em  $F_6$ . Salienta-se que o alfa utilizado tem correção de Bonferroni, indicado para análise de dados conjuntos, como no presente trabalho, um conjunto de marcadores. Neste caso, utiliza-se um nível de significância conjunto do teste, ou também chamado nível de significância genômico ( $\alpha^*$ ). Desta forma, o  $\alpha^*$  é a probabilidade de rejeitar pelo menos uma hipótese nula verdadeira, ou seja,  $\alpha^* = 1 -$  probabilidade de não rejeitar nenhuma hipótese nula verdadeira (Silva & Vencovsky, 2002). Para isto, deve-se estimar o nível de significância  $\alpha$  para cada teste, que proporcione o nível de significância  $\alpha^*$  para o experimento.

Se no presente trabalho, fosse utilizado apenas o nível de significância individual ( $\alpha = 0,05$ ), teriam sido considerados com desvio de segregação 10 locos a mais. Portanto, todos esses locos não seriam incluídos nas análises se este fosse o critério para detectar distorções da segregação mendeliana. Critérios que controlam o nível de significância global são recomendados para evitar que seja cometido o erro tipo I quando são realizados testes múltiplos (Bearzoti, 2000; Silva & Vencovsky, 2002). No caso, isto corresponde a rejeitar erroneamente um loco que apresenta o padrão de segregação testado em  $H_0$ , ou seja, 1:1.

Das combinações que não distorceram quanto à segregação esperada, as combinações P-AAA/MCAG e P-AGA/M-CCG foram as que renderam mais marcadores polimórficos (TABELA 3.2). Pode-se também observar que combinações como a P-ACG/M-CTA e a P-AGA/M-CAG embora não tenham demonstrado um grande número de marcadores, praticamente nenhum destes distorceu quanto à segregação de 1:1 (TABELA 3.2).

No trabalho aqui realizado, observou-se 32,46% de distorção na taxa de segregação dos marcadores. Sobretudo, distorções da segregação esperada de locos AFLP têm sido observadas em inúmeras espécies. Esta proporção é inerente à espécie e aos genótipos usados para gerar a população segregante. Por exemplo, em melão foi observada uma distorção de 14% (Wang et al, 1997), em kiwi variou de 4 a 10% (Testolin et al., 2001), já em *Cryptomeria japonica*, foram observadas taxas superiores a 40% (Nikaido et al., 1999).

Distorção na segregação de marcadores pode resultar de inúmeros fatores, como, fertilização preferencial, quebra das fitas de DNA durante a extração deste, amplificação de outras regiões do genoma, erro de genotipagem ou de análise do gel, ou pode ser um fenômeno biológico real (Tan et al., 2001). Possíveis razões biológicas para distorção na segregação podem ser causadas pela proximidade física dos locos marcadores com regiões ou genes que afetam a formação de gametas antes da fertilização ou a viabilidade dos genótipos após a fertilização (Vogl & Xu, 2000).

Além dos fatores acima citados, como possíveis causas para a alteração na taxa de segregação, outro fator pode ser a alteração da excisão devido à falha no reconhecimento do sítio de restrição. Entre os fenômenos que podem levar à digestão parcial está o não reconhecimento de sítios de restrição pela enzima *PstI* devido à metilação de bases nucleotídicas. A metilação, ou adição de um grupo metil a uma

citossina, pode alterar o reconhecimento de alguns sítios de restrição e está associada a diversos processos biológicos, incluindo regulação transcricional e silenciamento gênico (Cervera et al., 2002). Mudanças no padrão de metilação podem ocorrer devido a metilação “de novo” ou por demetilação passiva devido às falhas na manutenção da metilação durante a replicação do DNA (Matsuo et al., 1998). Algumas enzimas, dentre elas a *PstI*, são sensíveis à metilação, o que pode explicar o aparecimento de fragmentos inespecíficos.

Particularmente neste trabalho, uma provável fonte da desproporção na segregação dos marcadores parece ser a sensibilidade da enzima *PstI* à metilação. Esta conclusão baseia-se em dois pontos: um, ao aparecimento de fragmentos inespecíficos nas linhagens recombinantes, os quais não eram detectados nem no pai resistente, nem no suscetível (FIGURA 3.1); o segundo aspecto é observado ao se analisar separadamente a taxa de segregação dos marcadores obtidos com digestão da enzima *PstI* e da *EcoRI*. Analisando separadamente os 80 marcadores obtidos em 2007, com uso da enzima de restrição *PstI*, em relação aos 34 marcadores obtidos por Locatelli em 2003, pode-se observar uma diferença em relação a quantidade de distorções na segregação. Os marcadores que foram obtidos com a enzima *EcoRI*, caracterizada por não ser sensível à metilação, tiveram 26% de índice de distorção de segregação, enquanto que, as marcas geradas pela enzima *PstI* demonstraram um índice de 35% .

Vale salientar que distorções de segregação têm sido observadas em vários trabalhos. Segundo Bearzoti (2000), é recomendável que estes locos sejam excluídos da construção de mapas de ligação por afetarem os testes estatísticos usados para detectar a ligação gerando, assim, falsos positivos.

TABELA 3.2 Combinações de marcadores AFLP que detectaram polimorfismo entre os genótipos parentais e os distintos *bulks* com respectivos números de fragmentos polimórficos.

Combinações de <i>primers</i>		Nº Total de Bandas Polimórficas	Nº de Bandas polimórficas que segregaram 1:1 <sup>§</sup>
<i>Pst</i> I	<i>Mse</i> I		
GACTGCGTAGGTGCAG-AAA	GATGAGTCCTGAGTAA-CAG	11	09
GACTGCGTAGGTGCAG-AAA	GATGAGTCCTGAGTAA-CGC	06	05
GACTGCGTAGGTGCAG-ATC	GATGAGTCCTGAGTAA-CTA	09	03
GACTGCGTAGGTGCAG-AGA	GATGAGTCCTGAGTAA-CGA	07	04
GACTGCGTAGGTGCAG-AGA	GATGAGTCCTGAGTAA-CCG	15	09
GACTGCGTAGGTGCAG-ACG	GATGAGTCCTGAGTAA-CAC	08	06
GACTGCGTAGGTGCAG-ACG	GATGAGTCCTGAGTAA-CTA	06	05
GACTGCGTAGGTGCAG-AGA	GATGAGTCCTGAGTAA-CTC	13	06
GACTGCGTAGGTGCAG-AGA	GATGAGTCCTGAGTAA-CAG	05	05

<sup>§</sup>  $\chi^2$  para  $\alpha^*$  de 0,05

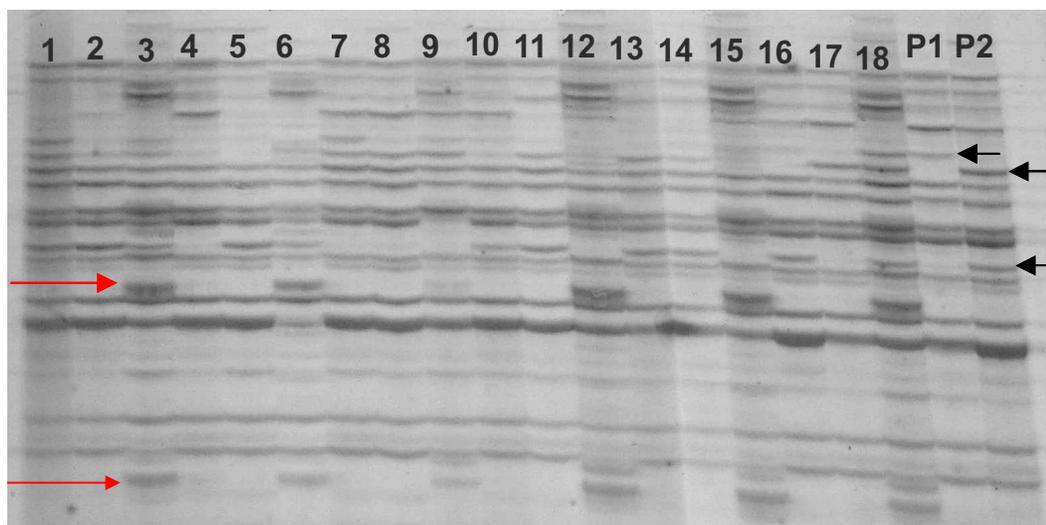


FIGURA 3.1 Parte de um gel de poliacrilamida, composto por fragmentos dos dois genitores, Pc68/5\*Starter (P1) e UFRGS 8 (P2), e 12 linhagens recombinantes. As setas pretas apontam fragmentos específicos de um ou outro genitor, que segregou na população. A seta vermelha demonstra a presença de marcas na população que não aparecem em nenhum dos progenitores. Porto Alegre, 2006.

### 3.3.3 Análises de Ligação e Mapeamento Molecular

A construção dos mapas de ligação foi baseada na análise de uma amostra de 92 indivíduos oriundos do cruzamento Pc68/5\*Starter e UFRGS 8. Para a análise de ligação e mapeamento gênico foram utilizados os 77 marcadores que segregaram na taxa esperada.

Os mapas obtidos nos programas QMOL e MAPMAKER foram similares. Ambos os mapas tiveram o mesmo número de grupos de ligação, mesmos marcadores em cada grupo e semelhantes distâncias entre os marcadores. Estes resultados não surpreendem, uma vez que foram utilizados os mesmos parâmetros em ambos os programas.

Das 77 marcas utilizadas, 56 foram agrupadas em 12 grupos de ligação (FIGURA 3.2). Dentre os 12 grupos, apenas um grupo, concentrou 30 marcadores. Entre os grupos restantes, oito destes, foram compostos por apenas dois marcadores. O comprimento dos grupos de ligação variou de 2,5 a 196,80 cM (TABELA 3.2). A menor distância detectada entre dois marcadores foi 1,69 cM, e a maior foi de 27,46 cM, salientando que ambos os segmentos são encontrados no primeiro grupo de ligação. No trabalho de Locatelli (2003), que construiu o primeiro mapa desta população, foram obtidos sete grupos de ligação, sendo que, semelhante ao observado aqui, o grupo de ligação número um, concentrou o maior número de marcas.

Os 18 marcadores que não foram agrupados em nenhum grupo de ligação são os seguintes: AAGC264, AAGC232, AAGC228, AAAG483, AAAG477, AAAG225, GAGA293, GACG531, GACG199, CGAC432, CGAC335, CGTA207, GATC559, GATC442, U8PM3, U8PM23, U8PM24, U8PM28, U8PM32, U8PM33 e U8PM34.

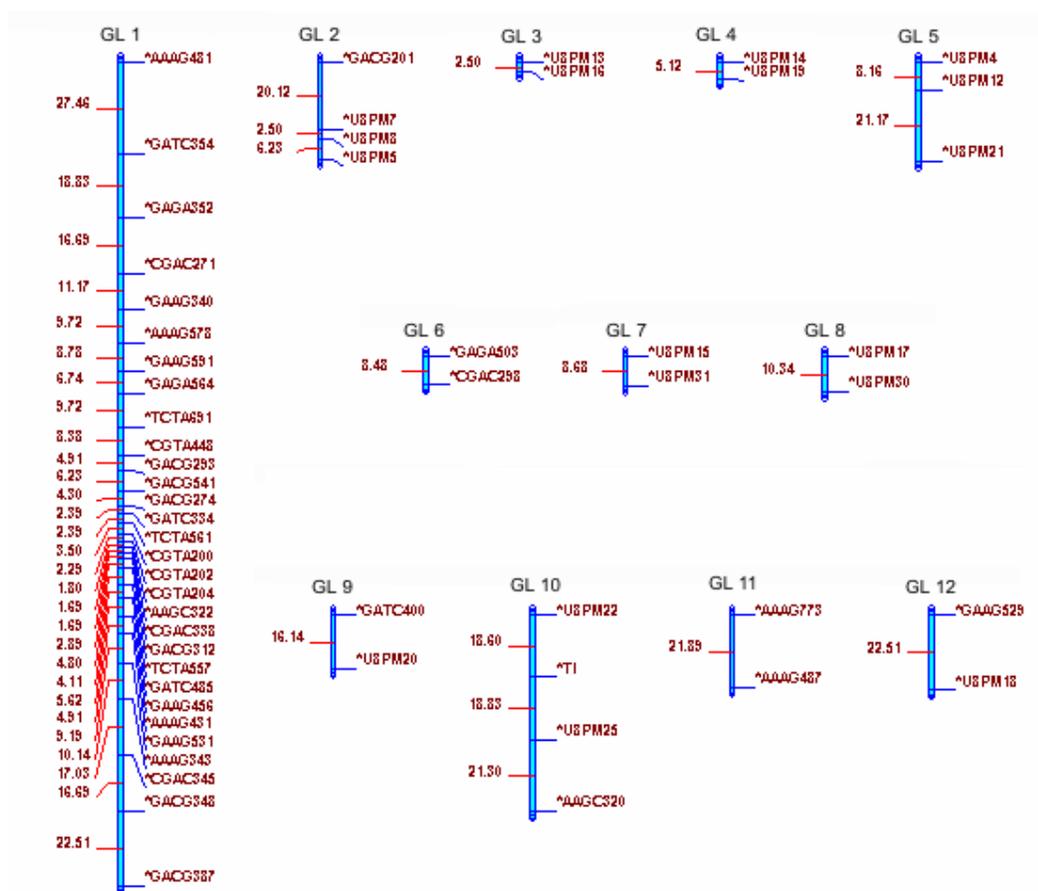


FIGURA 3.2. Mapa de ligação da população de aveia UFRGS 8 x Pc68/5\*Starter. Valores à esquerda se referem à distância em centimorgans (cM) entre os marcadores estruturados à direita. Porto Alegre, 2007.

TABELA 3.3 Grupos de ligação, número de marcadores, distância acumulada dos grupos de ligação e QTLs associados à resistência a ferrugem da folha da aveia no mapa F<sub>6</sub>, do cruzamento Pc68/5\*Starter. UFRGS. 2007.

Grupo de Ligação	Nº de Marcadores	Distância (cM)
1	30	196,80
2	04	28,85
3	02	2,5
4	02	5,12
5	03	29,33
6	02	8,48
7	02	8,68
8	02	10,34
9	02	16,14
10	02	58,73
11	02	21,89
12	02	22,51

O baixo número médio de polimorfismos detectados foi limitante para a obtenção de maior número de marcadores. O mapa gerado cobre cerca de 409,4 cM (14%) do tamanho total do genoma de *Avena sativa* que está estimado em aproximadamente 2900cM (O'Donoghue et al., 1995). Entretanto houve uma boa expansão em relação ao primeiro mapa desta população, gerado por Locatelli (2003), onde o mesmo cobria apenas 4% do genoma total da espécie.

O mapa obtido é pouco representativo, sendo que são esperados 21 grupos de ligação em *Avena sativa*. Pode-se também observar que a distribuição dos marcadores nos grupos não ocorreu de forma uniforme. Aproximadamente 39% das marcas concentram-se em apenas um grupo de ligação. Esta concentração de marcadores é comumente observada quando se utiliza apenas um tipo de marcador molecular, e quando o número de marcadores não é muito grande. O ideal é saturar mais

o mapa. Uma alternativa seria procurar outros tipos de marcadores, como RAPD ou SSR. Infelizmente durante o desenvolvimento deste trabalho, os marcadores do tipo SSR que foram testados nesta população, não apresentaram nenhum polimorfismo (dados não apresentados).

Quanto às análises de ligação entre o gene *Pc68* e os marcadores AFLP, dois marcadores, o U8PM22 e U8PM25, demonstraram estar associados em repulsão, a uma distância de 18,60 e 18,83 cM respectivamente, no grupo de ligação GL10 (FIGURA 3.3). Na realidade estes dois marcadores estão flanqueando o loco do gene na cultivar suscetível. Embora estas distâncias sejam consideradas muito amplas para auxiliar na seleção assistida por marcadores, Brogin em 2005, obteve alta eficiência de seleção (91,43%) para um gene de resistência à ferrugem asiática da soja, utilizando um marcador do tipo SSR que estava a 24,4 cM do gene. Contudo, é preciso ter muita cautela quanto ao emprego de marcadores com ampla distância em processos de seleção. Muitas vezes, o que ocorre é um ordenamento incorreto dos marcadores, levando a estas circunstâncias.

Contudo, a questão destes marcadores estarem flanquendo o loco, é vantajosa em relação a marcadores unilaterais, os quais são mais fáceis de serem perdidos com a ocorrência de “*cossing-over*” simples, enquanto que para os marcadores flanqueadores, seria necessária a ocorrência de uma permuta dupla.

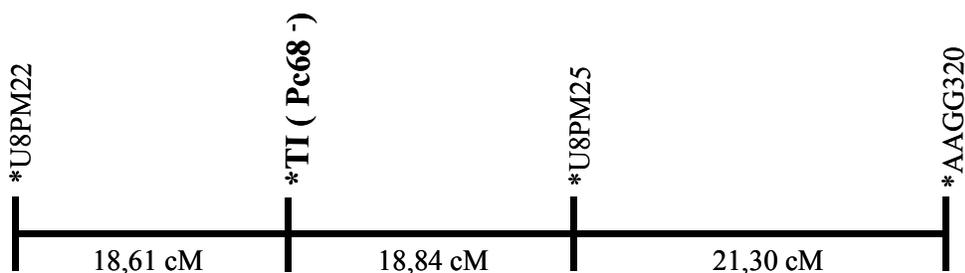


FIGURA 3.3. Representação gráfica do grupo de ligação GL10 da população UFRGS8 x Pc68/5\*Starter de *A. sativa*, indicando o posicionamento do loco do gene *Pc68* em relação aos marcadores AFLP identificados.

Para o processo de seleção assistida existe a necessidade de identificação de marcadores mais próximos ao gene para uma utilização segura. Principalmente pelo fato de existir uma predição de que a distância entre o marcador e o caráter qualitativo, não deve ultrapassar a distância de 10 cM, para ser utilizado como uma ferramenta em seleção assistida por marcadores (Staub et al., 1996). Além disto, o marcador deve estar preferencialmente associado à presença do gene de resistência. Pois com a obtenção de marcadores em repulsão, estes marcadores apenas serão válidos para seleção negativa do gene, e para a população oriunda de cruzamentos que possuam o mesmo pai suscetível.

É imprescindível relatar, que desde os primeiros estudos na busca de marcadores moleculares para o gene *Pc68* (Penner et al, 1993), até o presente momento, todos os marcadores identificados encontram-se em fase de repulsão. Explicar a possível causa desta situação é algo inviável, visto que, na literatura não há nada descrito que possa relacionar prováveis causas que contribuam para esta realidade. O que se pode inferir a respeito, é a dificuldade de trabalhar com o genoma de aveia.

A natureza do genoma hexaplóide, constituída por extensivas duplicações gênicas, e caracterizada por numerosos eventos de translocação, são algumas das causas

da dificuldade do estudo deste genoma. Faz-se necessária a busca e identificação de outros marcadores mais próximos ao gene *Pc68*, para a utilização segura no processo de seleção assistida. Marcadores mais próximos também possibilitariam a exploração de bibliotecas genômicas de aveia, podendo com isto propiciar a construção de clones YAC (*Yeast Artificial Chromosome*) ou BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) contendo o gene de resistência à ferrugem. Uma alternativa na pesquisa de marcadores para o gene *Pc68* seria iniciar uma investigação na espécie doadora do gene *Avena sterilis*. Visto que, que as recombinações ocorridas durante a introdução do gene em *Avena sativa*, possam ser um dos motivos que dificultem tanto o mapeamento do mesmo.

Uma vez que a seqüência do *Pc68* seja conhecida, o desenvolvimento de marcadores específicos se viabilizará, e conseqüentemente, o gene poderá ser melhor estudado, abordando seus mecanismos, compreendendo sua expressão e comparado-o aos demais genes específicos de resistência.

## **CAPÍTULO IV**

### **CONCLUSÕES**

Este trabalho contribui para elucidar o comportamento de genótipos empregados nos programas de melhoramento em relação ao caráter resistência à ferrugem da folha, bem como de um gene de resistência de efeito maior, gerando informações sobre materiais que podem auxiliar no desenvolvimento de novas cultivares brasileiras de aveia.

A respeito dos dois enfoques abordados neste trabalho pode se concluir os seguintes aspectos:

Houve uma erosão da resistência da população UFRGS 7 x UFRGS 910906 durante os anos de avaliação no ambiente sul brasileiro:

A resistência presente na população UFRGS 7 x UFRGS 910906 não demonstrou nível de resistência adequado em anos com condições favoráveis à ocorrência do patógeno. O nível de resistência dos indivíduos mais resistentes não é suficiente para que essa seja utilizada no desenvolvimento de genótipos superiores em programas de melhoramento.

O genótipo 238 possui potencial para ser utilizado no estudo dos mecanismos de resistência parcial;

Os marcadores do tipo AFLP U8PM22 e U8PM25 podem ser utilizados em seleção negativa para o gene *Pc68*, desde que validados para a população em questão.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRI-FOOD. **Oat Research at the Agriculture and Agri-Food Canada Cereal Research Centre.** Winnipeg. Disponível em: <[http://www.poga.ca/images/Articles/2\\_research\\_crc.pdf](http://www.poga.ca/images/Articles/2_research_crc.pdf)>. Acesso em 15 dez 2006.

AMARAL, A.L. **Etiologia e genética da resistência à mancha branca do milho.** 2005. 83f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ANDERSON, J.W.; SMITH, B.M.; GUSTAFSON, N.J. Health benefits and practical aspects of high-fiber diets. **American Journal Clinical Nutrition**, Davis, v.59, p.1242–1247, 1994.

BARBOSA, M.M. **Genética e mapeamento molecular da resistência parcial à ferrugem da folha da aveia (*Avena sativa* L.).** 2002. 113 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

BEARZOTI, E. **Simulação de seleção recorrente assistida por marcadores moleculares em espécies autógamas.** 1997. 230 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

BERGAMASCHI, H.; GUADAGNIN, M.R.; CARDOSO, L.S.; SILVA, M.I.G. **Clima da estação experimental da UFRGS** (e região de abrangência). Porto Alegre : Editora UFRGS, 2003. 78p.

BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. 919p.

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

BOHNERT, H.U.; FUDAL, I.; DIOH, W.; THARREAU, D.; NOTTEGHEM, J.L.; LEBRUN, M.H. Identification of the avirulence gene *AVR-IRAT7* of rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. In: INTERNATIONAL RICE GENETIC SYMPOSIUM, 4., 2000, Los Baños. **Proceedings...** Los Baños: International Rice Research Institute, 2000. p. 22 - 27.

BRIÉRE, S.C.; KUSHALAPPA, A.C. Evaluation of components of resistance in oat breeding lines and cultivars to crown rust (*Puccinia coronata* f. sp. *avenae*) under

controlled conditions. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.17, n.4, p.319-324, 1995.

BROGIN, R.L. **Mapeamento de genes de resistência à ferrugem e de QTLs envolvidos à Septoriose em soja**. 2005. 93 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior De Agricultura Luiz De Queiroz, Universidade De São Paulo, Piracicaba, 2005.

BRYAN, G.J.; STEPHENSON, P.; COLLINS, A.; KIRBY, J.; SMITH, J.B.; GALE, M.D. Low levels of DNA sequence variation among adapted genotypes of hexaploid wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, p.192-198, 1999.

CAMARGO, L.E.A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIN-FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.470-492.

CERVERA, M.T.; RUIZ-GARCIA,L.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.268, p.543-552, 2002.

CHAVES, M.S.; MARTINELLI, J.A. Ferrugem da folha da aveia: aspectos epidemiológicos e perspectivas de controle através da resistência genética na região sul do Brasil. **Ciência Agrônômica**, Pelotas, v.11, n.4, p.397-403, 2005.

CHAVES, M.S.; MARTINELLI, J.A.; FEDERIZZI, L.C. Resistência Quantitativa à Ferrugem da Folha em Genótipos de Aveia Branca: III – Correlação de componentes de resistência entre si e com a intensidade de doença no campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.197-199, 2004.

CHEN, G.; CHONG, J.; GRAY, M.; PRASHAR, S.; PROCUNIER, J.D. Identification of single-nucleotide polymorphisms linked to resistance gene *Pc68* to crown rust in cultivated oat. **Canadian Journal Plant Pathology**, Ottawa, v.28, p. 214-222, 2006.

CHONG, J.; HOWES, N.K.; BROWN, P.D.; HARDER, D.E. Identification of the stem rust resistance gene *Pg9* and its association with crown rust resistance and endosperm proteins in ‘Dumont’ oat. **Genome**, Ottawa, v.37, p.440-447, 1994.

CHONG, J.; SEAMAN, W.L. Incidence and virulence of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* in Canada in 1993. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.6, n.4, p.335-340, 1994.

CLAYTON, W.P.; RENVOIZE, S.A. **Genera graminum grasses of the world**. London: Royal Botanic Gardens, 1986. 389p.

COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA. **Indicações técnicas para a cultura da aveia**. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2006. 83p.

CRUZ, C.D. **Programa GQMOL**. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>>. Acesso em: 10 fev 2007.

CRUZ, R.P.; FEDERIZZI, L.C.; MILACH, S.C.K. Severidade da ferrugem da folha e seus efeitos sobre caracteres da panícula de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.4, p.543-551, 1999.

DA SILVA, P.R. **Identificação e conversão de marcadores moleculares associados à resistência à ferrugem da folha em trigo**. 2002. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

DAS, M.K. et al. Inheritance of slow-rusting resistance to leaf rust in wheat. **Crop Science**, Madison, v.32, n.6, p.1452-1456, 1992.

EMODI, A. Xylitol its properties and food applications. **Food Technology**, Chicago, v. 32, p. 28-32, 1978.

FLOR, H.H. The complementary gene systems in flax rust. **Advances in Genetics**, New York, v.8, p.29-54, 1956.

FLOSS, E.L. Manejo forrageiro de aveia e azevém. In: SIMPÓSIO DE MANEJO DE PASTAGEM, Piracicaba, 1988. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 1988. p.219-268.

FORCELINI, C.A. Moléstias da aveia e seu controle. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 2002, Passo Fundo. **Resultados Experimentais**. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2002. 742p.

FRY, W.E. Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide effect for integrated control of potato late blight. **Phytopathology**, Saint Paul, v.68, p.1650-1655, 1978.

GOELLNER, C.I. **Insetos-pragas da cultura da aveia : biologia, manejo e controle**. Passo Fundo: UPF, 2001. 98 p.

GRAICHEN, F.A.S. **Herança e caracterização da resistência à ferrugem da folha conferida pelo gene *Pc68* em linhagens recombinantes de aveia**. 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

GUPTA, P.K.; VARSHNEY, R.K.; SHARMA, P.C.; RAMESH, B. Molecular markers and their applications in wheat breeding. **Plant Breeding**, Berlin, v.118, p.369-390, 1999.

GUTKOSKI, L.C.; PEDÓ, I. **Aveia: composição química, valor nutricional e processamento**. São Paulo: Varela, 2000. 191p.

HARDER, D.E.; HABER, S. Oat diseases and pathologic techniques. In: MARSHALL, H.G.; SORRELS, M.E. **Oat Science and Technology**. Madison: Crop Science Society of America, 1992. p. 307-402.

- HARLAN, J.R. **Crops and Man**. Madison: American Society of Agronomy, 1975. 295p.
- HEATH, M.C. Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. **Annals of Botany**, London, v.80, n.6, p.713-20, 1997.
- HITTALMANI, S.; PARCO, A.; MEW, T.V.; ZEIGLER, R.S.; HUANG, N. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.100, p.1121-1128, 2000.
- HOLDEN, J.H.W. Oats. *Avena* spp. (Gramineae-Aveneae). In: SIMMONDS, N.W. (Ed.). **Evolution of crop plants**. New York: Longman, 1979. 339p.
- JOHNSON, R. Practical breeding for durable resistance to rust diseases in self-pollinating cereals. **Euphytica**, Wageningen, v.27, p.529-540, 1978.
- JOHNSON, R. The concept of durable resistance. **Phytopathology**, Saint Paul, v.69, n.3, p.198-199, 1979.
- JOHNSON, R.; BOWYER, D.E. A rapid method for measuring production of yellow rust spores on single seedlings to assess differential interactions of wheat cultivars with *Puccinia striiformis*. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v.77, p.251 – 258, 1974.
- JOHNSON, R.; TAYLOR, A.J. Isolates of *Puccinia striiformis* collected in England from the wheat varieties Maris Beacon and Joss Cambier. **Nature**, Londres, v.238, p.105-106, 1972.
- JOHNSON, R.; TAYLOR, A.J. **Pathology and entomology department report: yellow rust of wheat**. Cambridge: Plant Breeding Institute, 1974. 152 p.
- JOHNSON, R.A. Critical analysis of durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.22, p.309-330, 1984.
- KIYOSAWA, S. Genetics and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.20, p.93-117, 1982.
- KOLMER, J.A. Genetics of resistance to wheat leaf rust. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.34, p.435-455, 1996.
- KOSAMBI, D.D. The estimation of map distance from recombination values. **Annuaire of Eugenetics**, Washington, v.12, p.172-175, 1944.
- KOVER, P.X.; CAICEDO, A.L. The genetic architecture of disease resistance in plants and the maintenance of recombination by parasites. **Molecular Ecology**, Oxford, v.10, p.1-16, 2001.
- LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M.J.; LINCOLN, S.E.; NEWBURGH, L. MAPMAKER: An interactive computer package for

constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, San Diego, v.1, p.174-181, 1987.

LEACH, J.E.; CRUZ, C.M.V.; BAI, J.; LEUNG, H. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.39, p.187-224, 2001.

LEONARD, K.J.; MARTINELLI, J.A. Virulence of oat crown rust in Brazil and Uruguay. **Plant Disease**, Saint Paul, v.89, p.802-808, 2005.

LI, C.D.; ROSSNAGEL, B.G.; SCOLES, G.J. The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars. **Theoretical Applied in Genetics**, Berlin, v.101, p.1259-1268, 2000.

LOCATELLI, A.B. **Florescimento em aveia**: identificação de genes e análise genética. 2003. 82 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

LYNGKJAER, M.F.; NEWTON, A.C.; ATZEMA, J.L.; BAKER, S.J. The barley *mlo*-gene: an important powdery mildew resistance source. **Agronomie**, Paris, v.20, p.745-756, 2000.

MARTINELLI, J. A. et al. Análise de virulência de alguns isolados de *Puccinia coronata avenae* no Sul do Brasil. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 18., 1998, Londrina. **Resultados Experimentais**. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, p.17-19, 1998.

MARTINELLI, J.A. Major diseases on oats in South America. In: INTERNATIONAL OATS CONFERENCE, 6., 2000, Lincoln. **Proceedings**...Christchurch: New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited, 2000. p.276-282.

MARTINELLI, J.A. Oat diseases and their control. In: SUTTIE, J.M.; REYNOLDS, S.G. (Eds.). **Fodder Oats**: a worl overview. Roma: FAO, 2004. Cap. 12. p. 97-214.

MARTINELLI, J.A.; FEDERIZZI, L. C. Redução da quantidade e qualidade de grãos de aveia pela doença da ferrugem da folha. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 14., 1994, Porto Alegre. **Resultados Experimentais**. Porto Alegre, 1994. p. 22-25.

MARTINELLI, J.A.; FEDERIZZI, L. C.; BENNEDETI, A. C. Redução do rendimento de grãos de aveia em função da severidade da ferrugem da folha. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.20, n.2, p.116-118, 1994.

MATSUO, K.; SILKE, J.; GEORGIEV, O.; MARTI, P.; GIOVANNINI, N.; RUNGGER, D. An embryonic demethylation mechanism involving binding of transcription factors to replicating DNA. **EMBO Journal**, Oxford, v.17, p.1446-1453, 1998.

MATTILA, P.T. et al. Dietary xylitol supplementation prevents osteoporotic changes in streptozotocin-diabetic rats. **Metabolism**, Finland, v.47, n.19, p.578-583, 1998.

MATZ, S.A. Oats. **Cereal Science**, Minneapolis, v.8, p.78-96, 1969.

McDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen Population Genetics, Evolutionary Potential, and Durable Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.40, p.349-379, 2002.

McINTOSH, R.A.; BROWN, G.N. Anticipatory breeding for resistance to rust diseases in wheat. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.35, p.311-326, 1997.

MICHELMORE, R.; PARAN, I.; KESELLI, V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings National Academy of Science**, USA, v.88, p.9828-9832, 1991.

MICHEREFF, S.J. **Controle genético de doenças de plantas**. Disponível em: <<http://www.ufrpe.br/fitopatologia/teoricas/T15.pdf>>. Acesso em: 5 nov 2006.

MILACH, S.C.K. Mapeamento molecular de características de importância agrônômica. In: MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre : UFRGS, 1998. p.67-73.

MILACH, S.C.K.; CRUZ, R.P. Piramidização de genes de resistência às ferrugens em cereais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.4, p.685-689, 1997.

NELSON, R.R. The meaning of disease resistance in plants. In: NELSON, R.R. (Ed.). **Breeding Plants for Disease Resistance**. Pennsylvania: The Pennsylvania State University Press, 1973. p.13-25.

NIKAIDO, A.M.; YOSHIMARU, H.; TSUMURA, Y.; SUYAMA, Y.; MURAI, M.; NAGASAKA, K. Segregation distortion for AFLP markers in *Cryptomeria japonica*. **Genes and Genetics Systems**, Suita, v.74, p.55-59, 1999.

O'DONOUGHUE, L.S. A molecular linkage map of cultivated oat. **Genome**, Ottawa, v.38, p.368-380, 1995.

O'DONOUGHUE, L.S. et al. Localization of stem rust resistance genes and associated molecular markers in cultivated oat. **Phytopathology**, Saint Paul, v.86, p. 719-727, 1996.

OHM, H.W.; SHANER, G.E. Breeding oats for resistance to diseases. In: MARSHALL, H.G.; SORRELS, M.E. (co-eds.) **Oat Science and Technology**. Madison: [s.n.], 1992. p.657-690.

ORR, W.; De KOYER, D.; WIGHT, C.P.; TINKER, N.; MOLNAR, S.J. Scar markers for rust resistance genes *Pc68*, *Pg3* and *Pg9* designed for marker assisted selection in

oats. **Oat Newsletter**, (s.l.), v.44, 1998. Disponível em: <<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/oatnewsletter/>> Acesso em: 06 mar 2007.

ORR, W.; De KOYER, D.; WIGHT, C.P.; TINKER, N.; MOLNAR, S.J. Scar markers for rust resistance genes *Pc68*, *Pg3* and *Pg9* designed for marker assisted selection in oats. PLANT & ANIMAL GENOMA CONFERENCE, 7., 1999, San Diego. **Proceeding...** Disponível em: <<http://www.intlpag.org/7/abstracts/pag7471.html>> Acesso em: 6 mar 2007.

PARLEVLIET, J.E. Components of resistance reduce the rate of epidemic development. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.17, p.203-222, 1979.

PARLEVLIET, J.E. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. **Euphytica**, Wageningen, v.124, n.2, p. 147-156, 2002.

PARLEVLIET, J.E. Present concepts in breeding for disease resistance private. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 30., 1997, Poços de Caldas. **Palestras**. Poços de Caldas: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1997. p. 7 - 15.

PARLEVLIET, J.E. Strategies for the utilization of partial resistance for the control of cereal rusts. In: SIMMONDS, N.W.; RAJARAM, S. (Eds.) **Breeding Strategies for Resistance to the rusts of Wheat**. Mexico, D.F. : CIMMYT, 1988. p.48-62.

PENNER, G. et al. Identification of an RAPD marker for the crown rust resistance gene *Pc68* in oats. **Genome**, Ottawa, v.36, p.818-820, 1993.

PETERSON, R.F.; CAMPBELL, A.B.; HANNAH, A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity of leaves and stem of cereals. **Canadian Journal of Research Section**, Ottawa, v.26, p.496-500, 1948.

RASMUSSEN, D.C.; PHILLIPS, R.L. Plant breeding progress and genetic diversity from de nova variation and elevated epistasis. **Crop Science**, Madison, v. 37, p.303-310, 1997.

ROBINSON, R.A. **Plant pathosystems**. Berlin: Springer-Verlag, 1976.184p.

ROY, A.; FRASCARIA, N.; MACKAY, J.; BOUSQUET, J. Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.85, p.173-180, 1992.

RUSSEL, G.E. **Plant Breeding for Pest and Disease Resistance**. London: Butterworths, 1981. 485p.

SAS Software, versão 8.0. Cary, NC : SAS Institute Inc., 1999.

SHANDS, H.L.; CISAR, G.L. Avena. In: HEVELY, A.H. **CRC handbook of flowering**. Boca Raton : CRC Press, 1988. p.523-535.

SHANER, G. Breeding for partial resistance in oat to rusts. In: INTERNATIONAL OAT CONFERENCE, 5., 1996, Saskatoon. **Proceedings...** Saskatoon: University of Saskatchewan, 1996. v.2, p.752-754.

SILVA, H.D.; VENCOVSKY, R. Testes múltiplos e associação de marcas associadas a QTL's. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.99, n.4, p.755-762, 2002.

SIMONS, M.D. **Crown rust**. In: ROELFS, A.P.; BUSHEL, W.R.(Ed.). New York: Academic Press, 1985. p.132-172.

SINGH, H.; RAO, M.V. Area under the disease progress curve: its reliability as a measure of slow-rusting resistance. **Plant Breeding**, Berlin, v.103, n.4, p.319-323, 1989.

STAUB, J.E.; SERQUEN, F.C.; GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience**, Alexandria, v.31, n.5, p.729-740, 1996.

TAIPAINEN, T. et al. Xylitol administered only during respiratory infections failed to prevent acute otitis media. **Pediatrics**, Springfield, v.109, n.2, p.17-19, 2002.

TAMANINI, C.; OLIVEIRA, A.S.; ALMEIDA-FELIPE, M.G.; CANETTIERI, E.V.; CANDIDO, E.J.; OLIVEIRA, M.C. Avaliação da casca de aveia para produção biotecnológica de xilitol. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v.26, n.2, p.117-125, 2004.

TAN, Y.D.; WAN, C.; ZHU, Y.; LU, C.; XIANG, Z.; DENG, H.W. An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm. **Genetics**, Berlin, v.157, p.1277-1284, 2001.

TAVARES, M.J.C.M.S.; ZANETTINI, M.H.B.; CARVALHO, F.I.F. de. Origem e evolução do gênero *Avena*: suas implicações no melhoramento genético. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.28, n.4, p.499-507, 1993.

TESTOLIN, R.; HUANG, W.G.; CIPRIANI, G.; RETAMALES, J. Towards a linkage map in kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planch.) based on microsatellites and saturated with AFLP markers. **Acta Horticultural**, [Netherlands], v.498, p.79-84, 2001.

THOMÉ, G.C.H. **Genética e análise molecular da resistência parcial à ferrugem da folha em aveia**. 1999. 127 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

THOMÉ, G.C.H.; MILACH, S.C.K; FEDERIZZI, L.C. Resistência parcial à ferrugem da folha em genótipos de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.2, p.393-398, 2001.

TISIAN, L.M. **Variabilidade, herdabilidade e regiões genômicas associadas à expressão da resistência parcial à ferrugem da folha em aveia (*Avena sativa* L.)**

**avaliada em parcelas.** 2005. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

USDA-FAZ. [Informações] 2007. Disponível em: <<http://www.pecad.faz.usda.gov/cropexplorer/cropview/CommodityView.cfm>>. Acesso em: 20 de março de 2007.

VAN DER PLANK, J.E. **Plant diseases: epidemics and control.** New York: Academic Press, 1963.

VAN DER VOSSSEN, H. **Strategies of variety improvement in Cocoa with emphasis on durable disease resistance.** Reading, UK: International Group for Genetic Improvement of Cocoa, 1997.

VOGL, C.; XU, S. Multipoint mapping of viability and segregation distorting loci using molecular markers. **Genetics**, Berlin, v.115, p.1439-1447, 2000.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v.3, n.21, p.4407-4414, 1995.

WANG, Y.H.; THOMAS, C.E.; DEAN, R.A. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.95, p.791-798, 1997.

WESP, C. L. **Componentes da resistência quantitativa à ferrugem da folha em linhagens recombinantes de aveia.** 2005. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

YILIKAHRI, R. Metabolic and nutritional aspects of xylitol. **Advances Food Research**, San Diego, v.25, p.159-180, 1979.

YU, J.; HERRMANN, M. Inheritance and mapping of a powdery mildew resistance gene introgressed from *Avena macrostachya* in cultivated oat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.113, p.429-437, 2006.

ZADOKS, J.C. Disease resistance testing in cocoa. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON THE CONTRIBUTION OF DISEASE RESISTANCE TO COCOA VARIETY IMPROVEMENT, 1997, Salvador-Bahia, Brazil. **Proceedings...** Salvador, 1997. v.1, p.17-22.

ZHOU, X.; JELLEN, E. N.; MURPHY, J.P. Progenitor germoplasm of domesticated hexaploid oat. **Crop Science**, Madison, v.39, p.1208-1214, 1999.

ZHU, S.; KAEPLER, H.F. Identification of quantitative trait loci for resistance to crown rust in oat line MAM17-5. **Crop Science**, Madison, v.43, p.358-366, 2003.