

**JOSÉ RENATO EIDES**

**ANÁLISE METABOLÔMICA EM CULTIVARES DE TRIGO COM INFECÇÃO  
FOLIAR POR BRUSONE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Frederico Garcia Pinto

**RIO PARANAÍBA - MINAS GERAIS  
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba**

T

E34a  
2023 Eides, José Renato, 1981-  
Análise metabolômica em cultivares de trigo com infecção foliar  
por Brusone / José Renato Eides. - Rio Paranaíba, MG, 2023.  
52 f.: il.

Orientador: Frederico Garcia Pinto.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Instituto  
de Ciências Agrárias (IAP), 2023.  
Referências bibliográficas: f.51-52.

1. Triticum aestivum L.. 2. Pyricularia oryzae. 3. Translocação  
2NS. I. Pinto, Frederico Garcia, 1980-. II. Universidade Federal de  
Viçosa. Instituto de Ciências Agrárias (IAP). Mestrado em Agronomia  
(Produção Vegetal). III. Título.

633.11


**JOSÉ RENATO EIDES**

**ANÁLISE METABOLÔMICA EM CULTIVARES DE TRIGO COM INFECÇÃO FOLIAR POR BRUSONE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 17 de março de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 JOSE RENATO EIDES  
Data: 03/06/2023 09:07:08-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

José Renato Eides  
Autor

Documento assinado digitalmente  
 FREDERICO GARCIA PINTO  
Data: 24/05/2023 15:58:03-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Frederico Garcia Pinto  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida que sempre me guiam para os melhores caminhos.

Aos meus pais Sebastião Eides (in memoriam) e minha mãe Silvia Elena Ferreira Eides que formaram a base para a pessoa que me tornei.

A meu irmão Antônio Marcos Eides que sempre torce muito por mim e vibra com minhas conquistas.

A minha esposa Junia Daniela de Oliveira e a minha filha Sofia de Oliveira Eides que me incentivam diariamente e me apoiam sempre nas horas difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A OR Melhoramento de Sementes pelo fornecimento das sementes e apoio financeiro.

A Cooperativa Agropecuária do Alto Paranaíba pelo cessão da área para desenvolvimento da pesquisa.

## RESUMO

EIDES, José Renato, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2023. **Análise Metabolômica em Cultivares de Trigo com Infecção Foliar por Brusone.** Orientador: Frederico Garcia Pinto.

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma das culturas que mais tem expandido seu cultivo no cerrado, o principal fator limitante da expansão é a ocorrência da doença de brusone causada pelo fungo *Pyricularia oryzae*, que leva a perdas elevadas de produtividade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência de cultivares de trigo que possuem a translocação 2NS a infecção foliar de *P. oryzae*, associando rendimento de grãos, peso hectolitro (PH), severidade e compostos metabólicos para assim identificar cultivares com maior resistência a *P. oryzae*. Neste estudo, sete cultivares comerciais de trigo da OR Melhoramento de Sementes, consideradas resistentes à brusone por possuir a translocação 2NS foram selecionadas. Os experimentos foram conduzidos em São Gotardo, MG, Brasil. As cultivares foram semeadas em 2022 em diferentes épocas e sistemas de plantio, com quatro repetições, em delineamento experimental de blocos ao acaso, em um dos experimentos foram feitas inoculações de *P. oryzae*. O rendimento de grãos, peso hectolitro (PH), severidade e metabólicos foram avaliados. As variáveis rendimento de grãos, peso hectolitro (PH) e severidade foram submetidas a análise de variância pelo teste Scott-Knott a 5%. As análises estatísticas dos dados obtidos para a Metabolômica foram realizadas pelo *software* MetaboAnalyst 5.0. No experimento sem inoculação não houve diferença significativa para o rendimento de grãos, PH. No experimento com a infecção por *P. oryzae* foram identificados dois grupos significativos para o rendimento de grãos, PH e severidade. Os menores danos foram na cultivar ORS 1403 e os maiores na cultivar ORS Premium. As quais devidos ao desempenho agrônomo foram analisadas metabolicamente, apresentando diferentes compostos após infecção de *P. oryzae*, evidenciando diferença quanto a resistência destas cultivares com a translocação 2NS a *P. oryzae*.

Palavras-chave: *Triticum aestivum* L.. *Pyricularia oryzae*. Translocação 2NS.

## ABSTRACT

EIDES, José Renato, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2023. **Metabolomic analysis in wheat cultivars with leaf blast infection.** Adviser: Frederico Garcia Pinto.

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the crops that has expanded its cultivation in the cerrado, however in this region the crop has had as its main limiting factor the occurrence of blast disease caused by the fungus *Pyricularia oryzae*, leading to high losses of productivity. The objective of this work was to evaluate the reaction of different cultivars to *P. oryzae* infection, associating grain yield, hectoliter weight (PH), severity and metabolic compounds in order to identify cultivars with greater resistance to *P. oryzae*. In this study, 7 commercial wheat cultivars belonging to OR Improvement of Seeds, considered resistant to blast because they have the 2NS translocation, were selected. The experiments were conducted in São Gotardo, MG, Brazil. The cultivars were sown in 2022 at different times and planting systems, with 4 replications, in a randomized block design, in one of the experiments *P. oryzae* was inoculated. Grain yield, hectoliter weight (PH), severity and metabolites were evaluated. Grain yield, hectoliter weight (PH) and severity variables were submitted to analysis of variance by Scott-Knott test at 5%. Statistical analyzes of the data obtained for Metabolomics were performed using the MetaboAnalyst 4.0 software. In the experiment without inoculation, there was no significant difference for the variables grain yield, hectoliter weight (PH) analyzed. After infection by *P. oryzae*, two groups were identified with a significant difference in grain yield, hectoliter weight (PH) and severity. The smallest damages were in the ORS 1403 cultivar and the biggest in the ORS Premium cultivar. Which due to the agronomic performance were analyzed metabolically, showing different compounds after *P. oryzae* infection, showing difference in the resistance of these cultivars with the 2NS translocation to *P. oryzae*.

Keywords: *Triticum aestivum* L.. *Pyricularia oryzae*. 2NS Translocation.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	7
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	9
<b>2.1 A cultura do Trigo</b>	9
<b>2.2 Agente causal da brusone do Trigo</b>	11
<b>2.3 Reprodução do patógeno</b>	12
<b>2.4 Principais sintomas da brusone do trigo</b>	14
<b>2.5 Medidas de controle da brusone do trigo</b>	15
2.5.1 Controle químico	16
2.5.2 Controle cultural	16
2.5.3 Controle biológico	17
2.5.4 Controle genético	17
<b>2.6 Análise metabólica</b>	19
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	21
<b>3.1 Local de condução dos ensaios</b>	21
<b>3.2 Material vegetal</b>	21
<b>3.3 Procedimentos experimentais</b>	21
<b>3.4 Análise Metabólica</b>	23
<b>3.5 Análise de dados</b>	24
<b>4. RESULTADOS</b>	25
<b>4.1 Caracterização morfofisiológica e produtiva das plantas de trigo</b>	25
4.1.1 Rendimento e peso hectolitro (PH) de grãos de trigo	25
4.1.2. Redução de produtividade de grãos em trigo	27
4.1.3. Severidade, Produtividade, peso hectolitro e ciclo de cultivares de trigo	28
<b>4.2 Caracterização metabólica das plantas de trigo</b>	29
4.2.1 Análise metabólica não-alvo das cultivares ORS 1403 e ORS Premium sem inoculação de patógeno	29
4.2.2 Análise metabólica não-alvo das cultivares ORS 1403 e ORS Premium com inoculação de patógeno	33
4.2.3 Análise metabólica não-alvo da cultivar ORS 1403 com inoculação e sem inoculação do patógeno	37
4.2.4 Análise metabólica não-alvo da cultivar ORS Premium com inoculação e sem inoculação do patógeno	40
<b>5. DISCUSSÕES</b>	44
<b>6. CONCLUSÕES</b>	49
<b>REFERÊNCIAS</b>	51

## 1. INTRODUÇÃO

O trigo atualmente é uma das espécies mais estudadas no mundo, tanto dos pontos de vista científico e tecnológico, quanto econômico. Desde a sua domesticação, na região do Sudoeste Asiático, entre os anos de 7000 a 9000 a.C., até a realização do presente estudo, este cereal apresentou grande expansão (Bell, 1987). De modo que ao decorrer da evolução agrícola surgiram cultivares com grande variabilidade genética, selecionadas para as mais distintas características regionais, o que possibilita seu cultivo em praticamente todo o mundo (Mota, 1982, citado por Angra, 1995), e desde o início do século XX, vários pesquisadores de diversos países e, mais recentemente, do Brasil, dedicam-se ao estudo das peculiaridades do sistema genético dessa espécie (Mackey, 1963, 1975; Feldman, 1977; Moraes-Fernandes, 1982; Braun et al., 1997).

No cerrado brasileiro este cereal tem ganhado cada vez mais espaço, até o ano de 2023 estima-se um aumento na área cultivada de 100 mil hectares, o que pode reduzir as importações em R\$ 450 milhões, é um projeto ambicioso que conta com apoio de vários seguimentos da cultura deste cereal no país, tornando o trigo protagonista na próxima revolução do cerrado (Embrapa 2021), mas para que isso seja possível vários avanços ainda são necessários, destacando-se neste cenário cultivares que tenham melhor resistência a doenças e pragas, além de práticas agrícolas mais adequadas à realidade do Bioma Cerrado.

Dentre os fatores que podem afetar a produtividade do trigo e, conseqüentemente, levar a perdas econômicas, destaca-se a brusone do trigo, doença causada pelo fungo *Pyricularia oryzae* / *Magnaporthe oryzae*. Sendo atualmente a doença que mais preocupa a produção global de trigo (Couch e Kohn 2022). Sua ocorrência se dá quando existe combinação de períodos com intensas chuvas, temperaturas favoráveis entre 20 a 25°C, dias nublados e alta umidade relativa superior a 93%, tendem a favorecer a ocorrência de epidemias de brusone (Goulart *et al.*, 2007; Kohli et al. 2011). No trigo os órgãos mais afetados são as espigas e as folhas, nas folhas os sintomas apresentam lesões verde-acinzentadas e encharcadas de água com bordas verde-escuras, nas espigas e espiguetas os sintomas se apresentam com lesões marrom-acinzentadas e manchas pretas brilhantes na raquis (Goulart *et al.*, 2007).

A nível de importância econômica, a brusone no trigo reduz o rendimento e a qualidade dos grãos, devido a infecção os grãos tornam-se enrugados, pequenos, com deformações e baixo peso hectolitro (PH) (Goulart e Paiva, 2000) gerando altos prejuízos, dependendo do nível e da época de infecção as perdas podem chegar a níveis de 100% (Goulart *et al.*, 2007). As principais alternativas de manejo para esta doença no cerrado brasileiro, são época de semeadura adequada, uso de cultivares resistentes e o uso do controle químico, no entanto o controle químico com fungicidas não tem se mostrado muito eficiente (Panisson *et al.*, 2004), o que tem tornado esta doença a mais preocupante para o cultivo de trigo nesta região. Desta forma, o uso de cultivares resistentes aliadas à época correta de semeadura tem se mostrado a principal alternativa de manejo para a brusone do trigo no cerrado brasileiro.

No Brasil, os programas de melhoramento genético do trigo destinados a desenvolver cultivares para o cerrado brasileiro, têm colocado como prioridade dentro de seus programas a seleção de cultivares que apresentem a resistência à brusone do trigo. O que permitiu a estas empresas a aquisição de dados consistentes e induziu o melhoramento de cultivares a partir da translocação de um segmento cromossômico selvagem (2NS de *Aegilops ventricosa*) para o cromossomo 2A do trigo, sendo este responsável por conferir maior resistência a doença (Cruz *et al.*, 2016).

No entanto o que se tem observado a campo é que cultivares resistentes que possuem o segmento da translocação 2NS / 2AS, oriundas de um mesmo programa de melhoramento apresentam variabilidade de resistência, o que dá a entender que outros fatores estariam associados a resistência a brusone do trigo, desta forma é imprescindível um estudo dos mecanismos de defesas usados pelas plantas de trigo, para melhor entender o que confere maior resistência a determinada cultivar em relação a outra quando submetidas ao ataque do patógeno *Pyricularia oryzae*, para assim serem propostas ações para a seleção das melhores cultivares no controle desta doença.

Após o ataque do fungo, a planta passa a sintetizar vários metabólitos secundários de defesa, como fitoalexinas, antioxidantes, ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno, ou ativação da via fenilpropanóide para apoiar a biossíntese de lignina, (Shulaev, V.; Cortes, D.; Miller, G.; Mittler, 2008) envolvendo a produção de ácido abscísico, brassinosteroides e auxinas (Koorneef, A.; Pieterse, 2008). Além disso, pode-se esperar que o fungo altere a biossíntese de nutrientes essenciais para sua própria dieta, e assim, novas vias metabólicas podem ser induzidas dentro das

plantas hospedeiras. Foi afirmado por Leite e Pacholati 1995, que o tecido vegetal responde de maneira quase que simultânea a um ataque de microrganismos, onde um simples contato entre eles desencadeia vários processos em ambos. Segundo Leegood e Scholes 1991, os fungos são patógenos especializados em retirar suprimentos de nutrientes de um hospedeiro para se desenvolver e reproduzir, onde ele coexiste com o hospedeiro causando mudanças na sua fisiologia e metabolismo.

Mudanças nos perfis metabólicos de um organismo vivo como uma resposta a uma modificação genética, estímulo externo e/ou estressor pode ser estudado pela abordagem metabolômica (Alcantara *et al.*, 2015). Medir o nível de metabólitos polares pode dar uma imagem precisa do estado fisiológico de uma célula/tecido ou biofluido. Dentre as técnicas utilizadas para a análise de metabólitos, a Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS) é uma técnica analítica hifenizada amplamente usada em metabolômica de plantas. (Hill *et al.*, 2013).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 A cultura do Trigo**

O trigo é um cereal originário do continente asiático que atualmente já é cultivado em mais de 70 países e 5 continentes (Dixon, 2007), trata-se de uma gramínea pertencente à família das Poaceae, gênero *Triticum* e tendo como espécie mais cultivada o *Triticum aestivum* L. Em 1534 o trigo chega ao Brasil trazido por colonizadores europeus, precisamente por Martim Afonso de Souza, sendo primeiramente cultivado nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul (Neves, 2005), atualmente este cereal é considerado um dos mais nutritivos, junto ao milho e arroz (Gill, 2010), constituindo aproximadamente 20% da dieta humana, seu uso se dá na forma de farinhas para a produção de pães, biscoitos, bolos, massas, sopas, pudins, molhos e ainda para composição de rações para alimentação animal (Mori, 2015).

A produção mundial é estimada em 733 milhões de toneladas, cultivadas em aproximadamente 216,5 milhões de hectares (CONAB, 2019). O Brasil produz em média 5,47 milhões de toneladas e tem um consumo em torno de 11 milhões de toneladas, ou seja, para suprir a demanda interna seria necessário dobrar a produtividade (CONAB, 2019), a região sul se destaca no cultivo de trigo, sendo esta

região responsável por 87% da produtividade nacional, com destaque aos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, estados como Bahia, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina também possuem áreas de produção de Trigo (CONAB, 2018).

Novas fronteiras agrícolas têm surgido no cenário tritícola nacional, destacando-se a região Centro-oeste que teve ampliação de sua área de cultivo superior a 43% e incremento de produtividade de 47% na Safra 2019 (CONAB, 2020). Quando bem manejado nos aspectos técnicos (adubação, controle de pragas e doenças) e condições climáticas favoráveis, o trigo produzido no Cerrado brasileiro tem atingido altos tetos produtivos, aliados a excelente qualidade industrial dos grãos, destacando se como trigo pão ou melhorador tipo 1 na indústria de produção de farinhas (Reunião Técnica Trigo e Triticale, 2022). Comparada as demais culturas de grãos, condições climáticas diferentes são exigidas pela cultura do trigo para produzir bem e com qualidade, na sua fase inicial de desenvolvimento a cultura necessita de temperaturas baixas, já para a fase de floração e formação de grãos as exigências são baixa umidade e temperaturas mais elevadas (ABITRIGO, 2011).

O trigo é uma cultura que durante seu desenvolvimento passa pelas fases de sensibilidade a fotoperíodo (comprimento do dia), vernalização (exposição a baixa temperatura) e comprimento de sua fase basal (“intrinsic earliness”), essa sensibilidade é dependente do local e época de semeadura (Alberto 2008), com isso ela pode variar amplamente (Rodrigues *et al.*, 2013). Os fatores abióticos como temperatura e a precipitação são os principais efeitos climáticos que interferem no rendimento e na qualidade dos grãos produzidos, tornando-se necessário ajustar época de semeio, cultivares e manejo nas novas áreas tritícolas visando reduzir a interferência destes (Luiz *et al.*, 2005). Variações climáticas nesses fatores têm acarretado impactos negativos, chuvas em excesso no período de maturação fisiológica e ou doenças como a brusone podem reduzir o rendimento e o peso específico, conhecido também como peso do hectolitro dos grãos, este quando é inferior a 78, interfere na qualidade industrial da farinha, sendo causa de prejuízo ao produtor devido a precificação mais baixa (Abrecht, 2009).

## 2.2 Agente causal da brusone do Trigo

Em 2011 pesquisadores chegaram a um consenso sobre a nomenclatura para o fungo agente causador da brusone do trigo, foram necessários anos de estudos taxonômicos, com exames de patogenicidade, compatibilidade, especificidade e morfologia, até definir que o agente seria o *Magnaporthe oryzae* Catt., com estágio teleomórfico de *Pyricularia oryzae* (Couch e Kohn 2002; Zhang et al., 2016).

Atualmente, entre todas as doenças fúngicas que acometem a cultura do trigo, a brusone (*Magnaporthe oryzae*) é considerada a mais importante (Dean et al., 2012). Identificada no Brasil pela primeira vez no ano de 1985, no estado Paraná (Igarashi et al., 1986), logo se espalhou por várias regiões tritícolas abrangendo uma área que vai do Rio Grande do Sul até o Cerrado brasileiro (Goulart et al., 1990; Ceresine et al., 2019). Países vizinhos como Argentina, Paraguai e Bolívia relataram incidência da brusone do trigo em suas regiões uma década após o relato de sua identificação no Brasil, mostrando como esta doença se expandiu rapidamente na América do Sul (Kohli et al., 2011; Maciel et al., 2014).

No ano de 2016 pesquisadores relataram a identificação de ocorrência de brusone no trigo no continente asiático, mais precisamente em Bangladesh, tornando essa moléstia de amplo espectro de atuação, deixando de ser restrita à América do Sul, e com grande possibilidade de se espalhar para cultivos de campos vizinhos, pois já foi também relatada casos de aparecimento na Índia (Tosa et al., 2016) o que levou este país a desenvolver estratégias para reduzir a disseminação, visto que a Índia é o segundo maior produtor de trigo do mundo (Islan et al., 2016; Malaker et al., 2016). Em Bangladesh a suspeita que grãos contaminados entraram no país oriundos das importações de grãos que ocorrem em diversos países de 2006 a 2017, os quais foram colhidos em áreas infectadas, chegando a Índia pela fronteira entre os países (Islam et al., 2016).

As perdas de produtividade relacionadas a brusone do trigo variam em média entre 10% a 13 %, mas dependendo das condições pode chegar a 100% de perdas na qualidade dos grãos (Goulart et al., 2007). Na espiga é visível o sintoma mais comum da doença, onde após a fase do espigamento a infecção da espiga promove o esbranquiçamento deste órgão e com presença de uma pontuação negra no local de infecção, o que causa má formação dos grãos, murchamento, mas é importante

destacar que quando o ataque é nas folhas, principalmente no estágio inicial de desenvolvimento, durante a fase de plântula, ocorre o desenvolvimento epidemiológico da doença, que pode se espalhar para demais partes da planta (Cruz *et al.*, 2015).

Devido ao grande poder de destruição da doença e o volume de perdas ocasionado, vários estudos foram realizados buscando encontrar fontes de resistência a doença, algumas cultivares foram desenvolvidas, no entanto nenhum genótipo expressou resistência completa ou durável (Cruz, Valente, 2019). Dependendo do ambiente e da severidade da doença, estes genótipos apresentaram suscetibilidade (Urashima *et al.*, 2001; Urashima *et al.*, 2005). Há um elevado número de cepas, o que torna a resistência complexa, os programas de melhoramento estão engajados na busca de desenvolvimento de novas cultivares resistentes, porém devido a variabilidade das cepas, não é possível determinar o quão essa resistência será efetiva e duradoura com as informações encontradas até o presente momento.

### **2.3 Reprodução do patógeno**

Existe duas formas de reprodução do fungo causador da brusone, a sexual e a assexual, onde na forma sexual *Magnaporthe oryzae* Catt., age com a formação de ascomas do tipo peritécio, ostiolados, sem estroma, rostrados e periáfises, com anel refrativo e não amiloide. Onde cada asca da origem a oito ascósporos possuindo três septos cada, fusiformes, curvados e hialinos (Purchio; Muchovej, 1994; Massola Jr.; Krugner, 2011). No entanto, até o momento não foram encontrados peritécios na forma comum na natureza nas condições de campo. Um ascomiceto hemibiotrófico é o fungo causador da brusone na fase teleomórfica, pertencente à família Magnaporthaceae, composta por mais de 100 espécies em 12 gêneros de telemorfos e 7 de anamorfos (Huhndorf *et al.*, 2008; Kirk *et al.*, 2008; Zhang; Zhao; Shen, 2011. Baseado em estudos filogenéticos, Magnoporthaceae classe Sordariomycetidae, faz parte da ordem unifamiliar Magnaporthales, ordem Diaporthales e Ophiostomatales (Zhang *et al.*, 2006; Thongkantha *et al.*, 2009), gênero *Magnaporthe* e espécie *M. oryzae*, essa fase somente é encontrada em laboratório não estando presente na natureza.

Em condições ambientais ótimas como molhamento superior a 10h e temperatura próxima a 25°C na fase inicial de emborrachamento até o final do

enchimento de grãos, favorecem a ocorrência e intensidade da doença. Sendo uma doença necrotrófica e também policíclica onde sítios doentes podem gerar novos ciclos da doença, pode sobreviver em diversos ambientes, plantas nativas e hospedeiros secundários, que atualmente são os principais e mais importantes fontes de sobrevivência do fungo na entressafra (Cruz, Valente, 2019). Não sendo possível utilizar hospedeiros secundários para sua sobrevivência, o fungo também por ter hábito necrotrófico consegue sobreviver em restos culturais, o que lhe dá a capacidade de posterior infecção das plantas de trigos e também arroz, cevada, centeio da família Poaceae (Choi *et al.*, 2013). Outra fonte de inóculo primário são as sementes, pois o fungo pode ainda estar na forma de micélio dormente internamente nas sementes ou superficial das mesmas, permitindo sua disseminação em outras áreas (Reis *et al.*, 1998).

Quando ocorre a deposição e adesão do esporo na superfície do tecido hospedeiro, dá-se início ao ciclo de *Pyricularia oryzae*, o esporo germina nas condições de alta umidade, e após duas horas está formado o tubo germinativo (Talbot, 2003), em seguida, forma-se o apressório, estrutura responsável pela penetração do fungo no tecido vegetal do hospedeiro, isso só é possível graças a uma pressão de turgor próxima a 80 atm, o que equivale a 8,08Mpa (Ribot *et al.*, 2008). A “peg” produzida pelo apressório penetra e rompe a superfície da folha, dando-se a formação da hifa primária, a qual ao se encontra com os plasmodesmas na parede celular permitindo sua movimentação pelas células vizinhas, produzindo hifas secundárias (Kankanala; Czymmek; Valent, 2007).

A propagação da doença ocorre através das lesões necróticas esporulantes, entre 4 a 5 dias após a penetração, quando o fungo coloniza o tecido (Ribot *et al.*, 2008). São repetidos vários ciclos da doença, em média após 6 dias da infecção produz uma lesão, que é capaz de produzir de 2.000 a 6.000 conídios por dia por aproximadamente 14 dias em condições controladas (Ou, 1985). A temperatura é o fator que determinará a duração do processo de penetração, podendo variar de 6, 8 e 12 horas, sob temperaturas de 24°C, 28°C e 32°C respectivamente. Para que ocorra a germinação e penetração dos conídios na folha do trigo é necessário moderado molhamento foliar, onde a doença é favorecida por períodos de longa presença de orvalho 2 ou 3 dias consecutivos (Picinini; Fernandes, 1995).

A temperatura ao redor de 28°C e umidade relativa entre 95 a 100% é a ideal para favorecer a conidiogênese (Alves; Fernandes, 2006). Fatores tais com precipitação pluvial, dias nublados, temperaturas entre 24 e 28°C, umidade relativa acima de 90% influenciam o desenvolvimento da doença e são favoráveis a mesma. A patogenicidade do fungo é muito virulenta, causando lesões em todos os órgãos aéreos da planta, incluindo folhas, colmos, bainhas, nós, pedúnculo e glumas e também sementes (Igarashi, 1988). O vento é o principal meio de disseminação do patógeno (Lima, 2004), no entanto o meio de propagação mais importante de sobrevivência, transmissão e disseminação de um patógeno é a semente, principalmente devido seu amplo uso pelo homem nas diferentes culturas (Telles Neto, 2004).

Quando o inóculo está presente em uma semente infectada, a doença é transmitida para a plântulas emergidas (Maude, 1996). A disseminação via sementes não engloba somente a semente do próprio trigo como inóculo de *Pyricularia oryzae*, destacando-se também gramíneas invasoras e nativas (Gomes, 2012). Epidemias podem ser geradas em novas áreas principalmente campos de sementes, devido a inóculos oriundos de sementes que visualmente podem não apresentar a doença, ocasionando graves consequências (Gomes *et al.*, 2019).

## **2.4 Principais sintomas da brusone do trigo**

Nas folhas a doença da brusone do trigo tem uma sintomatologia bem característica, com pequenas lesões elípticas de coloração castanha, as quais evoluem para lesões maiores rapidamente, sempre em direção a nervura da folha, local com concentração de maior umidade (Lima, 2004). A evolução da doença resulta em uma lesão esbranquiçada com margens castanho-avermelhada e centro acinzentado, correspondente à esporulação do patógeno que pode ocorrer em condições climáticas favoráveis (Toledo; Escobar, 2002). Com isso, plantas com suas folhas severamente atacadas entram em senescência precocemente devido à redução da sua área fotossintética ativa (Picinini; Fernandes, 1995).

Em condições de clima favorável a doença se apresenta nas glumas, existe a possibilidade de visualização da esporulação de cor acinzentada do patógeno, o que

pode confundir com outras doenças causadas por fungo principalmente a giberela, no entanto nas glumas as lesões são caracterizadas por ter forma elíptica ovalada de coloração castanha nas bordas e região do centro esbranquiçada (Serfling *et al*, 2017). Lesões nessa região da planta ocasiona má qualidade das sementes que estão se desenvolvendo o que tem ocasionado favorecimento a transmissão do patógeno, pois quando ocorre a formação dos grãos, as sementes tem aparência sadia, no entanto estão murchas e possui contaminação do fungo em seu endosperma (Toledo; Escobar, 2002).

A região da planta de trigo em que a doença se expressa de forma mais destrutiva é na espiga, uma lesão com pontuações de coloração preta é visível na ráquis, após a infecção pelo patógeno e está resulta em uma necrose a partir do ponto de infecção, bloqueando o acesso da espiga a água e nutrientes essenciais para seu desenvolvimento, ocorre a morte prematura da espigas, seus grãos tornam cochos e mal formados e o sintoma característico é o branqueamento da espiga a partir do ponto de infecção (Goulart *et. al.*, 2007). Em todas as fases de desenvolvimento da cultura do trigo pode ocorrer a manifestação da brusone, dependendo da fase em que ela ocorre e as condições favoráveis é que irá determinar o potencial de danos, em espigas quando a infecção ocorre mais tarde o potencial de dano é menor, já infecções na fase de pleno espigamento, o rendimento e a qualidade dos grãos é severamente afetada, acarretando grandes danos econômicos devido aos grãos se tornarem inutilizados para comercialização e utilização humana (Igarashi; Balan, 2004; Cruz *et al.*, 2009).

## **2.5 Medidas de controle da brusone do trigo**

Considerada uma doença de difícil controle, principalmente nas regiões do cerrado brasileiro, a brusone do trigo é atualmente um dos principais problemas para o cultivo deste cereal (Urashima *et al.*, 2004). Manejar o patógeno para que esse cause o menor dano econômico possível tem sido um desafio para todos os envolvidos na cadeia produtiva do trigo, através de estudos tem se buscado desenvolver técnicas e medidas que aplicadas integradamente com práticas agrônomicas atinjam esse objetivo (Prabhu & Fillippi 2006).

Aliar um conjunto de práticas tais como medidas culturais, químicas, genéticas tem possibilidade de reduzir danos causados pela brusone no trigo. Essas medidas englobam incorporação dos restos culturais, eliminação de plantas hospedeiras principalmente gramíneas invasoras, utilizar sementes tratadas com fungicidas e com boa sanidade, fazer rotação de culturas utilizando plantas não hospedeiras, plantio respeitando a época recomendada para a região de adaptação, utilizar cultivares resistentes e diversificação das mesma para evitar a seleção por genótipos, adotar as práticas agronômicas de adubação, controle de pragas e doenças (Pagini, 2011).

### *2.5.1 Controle químico*

O controle químico é uma das opções de manejo a ser adotada, sendo recomendado sua utilização de maneira preventiva, quando as condições climáticas estiverem favorecendo o patógeno, sendo uma aplicação realizada logo após o florescimento e uma segunda 10 a 12 dias após a primeira aplicação direcionadas para atingir a parte aérea das plantas (folha bandeira e espigas). Devido não conseguir atingir o alvo a ser protegido, a ráquis, o controle químico não tem se mostrado muito eficiente, não passando de 50% independente do princípio ativo utilizado (Goulart, 2004). Dentre os fungicidas recomendados para o controle da brusone no trigo, destacam-se como os principais: tebuconazol, metconazol e piroclostrobin + epoxiconazol (Pizoloto, 2019) e de acordo com dados fornecidos pela Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale (2019) os fungicidas que contém mancozebe em sua formulação se mostraram mais eficientes.

### *2.5.2 Controle cultural*

Como manejo cultural, adota-se época de semeadura de acordo com recomendação para cada região, planejando para que o espigamento, momento mais crítico da doença não coincida com condições favoráveis a ela, molhamento superior a 10 horas e umidade relativa acima de 90% aliadas a temperaturas entre 24 e 28°C (Coelho *et al.*, 2016). Sendo que essa estratégia de manejo tem sido muito eficiente para diminuir a pressão do inóculo na cultura. Países como Bolívia, Argentina, Paraguai e regiões do cerrado brasileiro o atraso no plantio tem reduzido perdas de produtividade ocasionadas por brusone (Coelho *et al.*, 2016). Fator importante a observar é o ciclo das cultivares, onde aquelas de ciclo mais longo, tendem a ter

menor incidência de espigas com brusone, pois seu espigamento coincide com condições de umidade e temperatura desfavoráveis ao patógeno (Goulart; Sousa; Urashima, 2007). Rotação cultural com leguminosas como soja e feijão tem reduzido o inóculo para o próximo cultivo.

### 2.5.3 Controle biológico

Controle biológico tem sido muito pouco utilizado no manejo de brusone no trigo, no entanto vários trabalhos com biológicos tem mostrado potencial para controle de fitopatógenos e o caso das populações bacterianas associadas à rizosfera das culturas agrícolas, as quais já mostraram esse potencial (Weller, 1988; Dantas *et al.*, 2011). Foram coletadas amostras de solos de duas regiões de cultivo de trigo, visando obter estirpes da rizosfera com potencial para controle de brusone, nas amostra coletadas obteve-se 606 estirpes de bactérias e actinobactérias das quais 16 apresentaram *in vitro* diferentes porcentagens de inibição de *Pyricularia oryzae* (Casteliani, 2016).

### 2.5.4 Controle genético

O controle genético da brusone no trigo tem sido uma busca constante das empresas de pesquisa e melhoramento genético da cultura, até os anos 2000 poucas cultivares apresentavam em seu genoma fontes de resistência a brusone, maioria sendo altamente suscetível, e com alta variabilidade de resistência entre os genótipos de trigo quanto a reação a brusone (Coelho *et al.*, 2016; Maciel *et al.*, 2014). Esta variabilidade pode estar relacionada a própria defesa qualitativa que a planta de trigo possui ou até mesmo as múltiplas raças entre isolados e também ainda a interação entre isolado e planta (Urashima *et al.*, 2004). Outro fator a considerar é com relação ao comportamento das cultivares a campo em diferentes regiões, onde um genótipo por apresentar resistência em determinada região e ser suscetível em outra, principalmente devido a variabilidade do patógeno (Urashima, *et al.*, 2004).

Cruz *et al.*, (2012) salientam que os mecanismos de defesas utilizados pela planta de trigo para a resistência a brusone na folha e na espiga, não apresentam diferença, o que beneficia o patógeno quanto a infecção do hospedeiro. Já foram identificados 8 genes de resistência a brusone do trigo sendo eles: gene Rmg2

(cromossomo 7A), gene Rmg3 (cromossomo 6B), gene Rmg7 (cromossomo 2A), gene Rmg8 (cromossomo 2B), gene Rmg1 e gene Rmg6 (cromossomo 1D) e os genes Rmg4 e Rmg5 (Zhan *et al.*, 2008; Tagle *et al.*, 2015; Anh *et al.*, 2015; Takabayashi *et al.*, 2002; Nga *et al.*, 2009). Sob condições naturais de infecção estes genes conferem resistência a brusone, já com isolados mais agressivos da doença tem ocorrido a quebra da resistência, já apresentada em estudos para os genes Rmg2, Rmg3 e Rmg7 (Islam *et al.*, 2019).

Além dos genes já descobertos relacionados a resistência do trigo a brusone, foi identificado um segmento de cromossomo, a translocação 2NS o qual foi introduzido de *Aegilops ventricosa* no cromossomo da região distal 2AS para ser utilizado para a resistência a ferrugem (Helguera *et al.*, 2003). Posteriormente descobriu que outros genes de resistência estavam presentes no segmento 2NS, sendo o Cre5 para resistência de nematoide do cisto em cereais (Jahier *et al.*, 2001) e Rkn3 para resistência a nematoides de nó da raiz (meloidogyne), (Williamson *et al.*, 2013). Com a inserção do segmento 2NS em algumas cultivares, derivadas da linhagem “Milan” do CIMMYT, estas apresentaram altos níveis de resistência para a brusone, mas vale salientar em contrapartida que muitos genótipos que apresentam o segmento não possuem baixo nível de resistência, devendo uma análise precisa dos melhoristas durante a seleção (Tellez *et al.*, 2018).

Diante disso sugere que a resistência promovida pelos genes já descoberto e pela translocação 2NS estejam associada com a base genética da planta e/ou condições ambientais, números de genes envolvidos, tipo de dominância da resistência, nível de resistência para cada nível de observação (campo ou casa de vegetação), sendo uma gama gigantesca de informações a serem utilizadas dentro de um programa de melhoramento, o que determina a necessidade de mais estudos sobre como funciona o complexo de resistência do trigo a brusone (Vales *et al.*, 2018). Fazer uso das altas tecnologias disponíveis atualmente é o caminho a ser explorado para tentar minimizar os danos causados por essa moléstia através da descoberta de novas fontes de resistência (Cruz *et al.*, 2017).

## 2.6 Análise metabolômica

A análise metabolômica é uma tecnologia moderna com a qual é possível mapear um grande número de metabólitos em organismos sob determinadas condições. O mapeamento pode ser de cunho qualitativo como também quantitativo. A metabolômica permite relacionar o fenótipo do organismo de interesse através dos compostos que podem ser monitorados pelas análises (Saia et al., 2019).

Essa técnica de análise metabolômica já é um conceito bastante explorado e avançado no estudo de fungos e às plantas, no entanto ainda pouco se sabe quanto a interação entre fungos e plantas principalmente quando essa interação é entre fitopatógenos e seu hospedeiro (Chen; Ma; Chen, 2019). Sendo essa uma interação bastante complexa, pois envolve várias reações fisiológicas e metabólicas, gerando um monte de dados de difícil compreensão, assim associar análise metabolômica com demais tecnologias, como métodos de análises não supervisionados (PCA), pode ajudar a agrupar grandes amostras de dados e tirar conclusões mais precisas sobre determinada interação (Chen; Ma; Chen, 2019).

Várias técnicas instrumentais são empregadas para análises metabolômicas, entre elas, a cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC-MS) e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) que por sua alta sensibilidade e reprodutibilidade têm sido amplamente utilizadas (Leite et al., 2021).

Fisiologicamente ocorrem mudanças na planta quando ela sofre ataque de fitopatógenos, pela manifestação de mecanismos de defesa, que podem ser a fortificação da parede celular (aumentando o teor de lignina), a biossíntese de metabólitos primários e secundários agindo como atividade antimicrobiana, ou até mesmo ação antifúngica (Mhlongo et al., 2018). Atualmente, já é possível através de uma análise metabolômica investigar as modificações fisiológicas que ocorrem quando há interação entre patógeno e hospedeiro. Ainda é uma área de estudo que está se desenvolvendo, no entanto mostra-se muito promissora para contribuir com a produção agrícola na melhoria da produção de alimentos (Allwood et al., 2011; Chen; Ma; Chen, 2019).

Levantamos então a hipótese de que a variação de resistência das cultivares a brusone esteja associada a alterações no perfil metabólico de cada cultivar, onde após a infecção o metabolismo reage com defesas metabólicas diferentes, conferindo menor ou maior resistência a determinada cultivar. O presente trabalho teve como objetivo avaliar quais cultivares de trigo da Empresa OR Melhoramento de Sementes indicadas para o cultivo do cerrado brasileiro, são mais resistentes a brusone e pela análise metabolômica por GC-MS determinar o maior número possível de metabólitos presentes nesses cultivares que estão expressando maior e menor resistência, o que poderá ser usado para entender as interações planta-patógenos e permitir melhor seleção de cultivares pelas empresas de melhoramento genético.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de condução dos ensaios**

Quatro experimentos foram conduzidos no ano de 2022 na Cooperativa Agrícola do Alto Paranaíba (COOPADAP), localizada em latitude 19°18'40" S e longitude 46°02'56" W, altitude de aproximadamente 1132 m, município de São Gotardo, Minas Gerais, Brasil. O clima da região é classificado como Aw, de acordo com classificação de Köppen, com temperatura média de 20°C e pluviosidade média anual de 1540 mm, (Climate org, 2017), o cultivo se deu em local com histórico de brusone, sendo dois experimentos conduzidos em sistema de plantio direto sequeiro área de média fertilidade e dois em sistema de plantio convencional irrigado área de alta fertilidade. Em um dos experimentos de sistema irrigado de alta fertilidade foram feitas inoculações a campo de *Pyricularia oryzae*.

Nos ensaios de sistema de plantio direto sequeiro de média fertilidade, as condições não foram favoráveis a doença da brusone no trigo na safra 2022 na região e desta forma seus dados não foram avaliados.

#### **3.2 Material vegetal**

Sete cultivares de trigo pertencentes a empresa OR Melhoramento de Sementes (ORS Feroz, ORS Senna, ORS Guardiã, ORS Absoluto, ORS 1403, ORS Premium, ORS Soberano) que apresentam o segmento da translocação 2NS no seu genoma, sendo consideradas resistentes a brusone, foram utilizadas no trabalho, as diferentes cultivares foram semeadas utilizando-se uma semeadora mecanizada de grãos. A população de plantas de cada cultivar foi a recomendada pela obtentora das cultivares.

#### **3.3 Procedimentos experimentais**

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, 7 tratamentos (cultivares) e quatro repetições, as parcelas eram 5 linhas de 5 metros, com espaçamento 0,2 metros entre linhas, a população final de plantas de foi de 65 a 70 sementes por metro linear. Para proporcionar um bom estabelecimento da cultura evitando redução inicial de estande de plantas causadas por fungos, insetos e bactérias, as sementes de trigo foram tratadas com inseticidas e fungicidas.

Para a inoculação das plantas de trigo com o *P. oryzae* na área de um dos experimentos irrigados alta fertilidade, utilizou-se plantas de trigo da cultivar BRS 264 infectadas que foram coletas na região de São Gotardo, no ano de 2020 e armazenadas em câmara fria. Essas plantas foram trituradas em solução de água utilizando-se um liquidificador, a solução foi filtrada em malha de sombrite de densidade de 70% para retiradas da impurezas maiores, após filtragem, um volume de 2 litros da solução contendo o fungo de *Pyricularia oryzae* foi colocado em uma bomba costal de 20 litros e foi pulverizada sobre as plantas de trigo quando as mesmas atingiram a fase de emborrachamento (escala fenológica 45, ZADOKS), foram feitas duas pulverizações, sendo a segunda aplicação feita 7 dias após a primeira, as aplicações foram realizadas no final do dia e a irrigação via pivô foi mantida para proporcionar horas de molhamento entre 10 a 14 horas, condições mais favoráveis a infecção do patógeno.

A adubação de plantio 80 kg/ha do formulado NPK 10-35-06 e cobertura de 200 kg/ha de KCL mais 150 kg/ha de ureia.

**Tabela 1 – Fertilidade do solo**

ANÁLISE DE FERTILIDADE DO SOLO										
PROPRIETÁRIO	E.E.R.		Pivô: 01				Lote: 78		Data: 11/09/2020	
Identificação da amostra	pH	Mat Org	P	K	Ca	Mg	Al	H + Al	SB	
	Água	dag/kg	mg/dm <sup>3</sup>							cmol/dm <sup>3</sup>
Média	6,43	2,95	22,86	83,3	3,89	1,05	0	3,19	5,15	
CV (%)	2,44	4,38	29,12	23,11	5,25	10,32		15,4	5,32	
Micro nutrientes	B	Cu	Fe	Mn	Zn	S	CTC (T)	V	m	
	mg/dm <sup>3</sup>							(T)	%	
Média	0,27	2,17	59	2,65	11,1	8,98	8,35	61,89	0	
CV (%)	19,12	13,21	4,79	26,59	21,91	18,18	5,83	6,95		

P,K: Mehlich  
 B: Extrator água quente  
 Ca, Mg, Al: Extrator KCL 1mol/l  
 H + Al: Extrator SMP

CTC (T): Capacidade de Troca Catiônica pH 7.0  
 V: Saturação por Bases  
 Cu, Fe, Mn e Zn (DTPA 0,005 mol L + 1) + TEA 0,1 mol -1 + CaCl2 0,01 mol L -1 a pH 7.3

S: Extrator Fosfato Monocálcio  
 Mat. Org. Oxidação  
 Na2Cr2O7+H2SO4  
 m: Saturação por Alumínio

Vale ressaltar que as cultivares do presente trabalho possuem ciclos precoce, médios e tardios, no entanto no momento da inoculação foi observado que todas as cultivares estavam na fase de emborrachamento entrando em florescimento e chegaram na maturação fisiológica com ciclos simultâneos, todos com

comportamento tardio, isso por ter ocorrido devido as condições favoráveis de fertilidade e irrigação do local dos experimentos irrigados.

Durante a condução dos ensaios as aplicações de fungicidas foram feitas somente até o momento do emborrachamento (escala fenológica 45, ZADOKS), para que as cultivares pudessem expressar sua resistência a doença de brusone, as demais recomendações de manejo aplicação de inseticidas, herbicidas foram realizadas, sendo todas feitas com produtos registrados para a cultura.

Nos experimentos de sistema de plantio convencional irrigado alta fertilidade foram feitas avaliações de severidade da brusone na folha bandeira (experimento inoculado) usando escala diagramática de acordo com Torres et.al., 2015 (Figura 3), colheita das parcelas no estágio de maturação fisiologia para avaliação do rendimento de grãos em kg/ha e peso hectolitro (PH) Kg/hct para qualidade, os danos à produtividade foram estimados pela diferença entre o rendimento de grãos da área sem inoculação de brusone, e o rendimento de grãos da área inoculada com brusone, para cada genótipo de trigo. Foram analisadas por GC-MS amostras da folha bandeira das cultivares de plantas de trigo para cada genótipo (n=40).

### **3.4 Análise Metabolômica**

As amostras, provenientes de folhas bandeira, das cultivares de plantas de trigo para cada genótipo (n=40) foram coletadas e armazenadas em refrigeração para posterior maceração com nitrogênio líquido, utilizando almofariz e pilão, resultando em pó fino. Foram pesados 100 mg de amostra macerada em microtubos tipo eppendorf e posteriormente extraídas com 2 mL de solução extratora de metanol (MeOH), clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) e água ultra-pura (3:1:1), com 25 µL/mL de Adonitol Purex como padrão interno. As amostras foram agitadas em vórtex por 5 s e mantidas em repouso por 1 min e 1 mL do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionado de 300 µL de Hexano (P.A.). As amostras foram mantidas em repouso por 3 min e posteriormente foram retirados 500 µL de suas porções médias e colocados em microtubos para secagem no liofilizador por 48 h.

As amostras secas foram metoximadas em 50 µL de hidrocloreto de metoxiamina diluído em piridina (20 mg/mL) a 37 °C por 2 h e trimetilsililadas pela adição de 50 µL de BSFTA [Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide] a 37 °C por 30 min.

As alíquotas derivatizadas foram transferidas para vials de 2 mL com inserts redutores de volume de 200 µL para realização da análise cromatográfica.

A análise foi realizada por cromatografia gasosa com espectrômetro de massas acoplado (GCMS-QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japão), utilizando a coluna capilar DB-5MS (30 m × 250 µm diâmetro interno). A temperatura de injeção de amostras utilizada foi 300 °C. A separação cromatográfica foi realizada com a temperatura inicial da coluna de 80 °C, que foi mantida por 2 minutos, aumentada em taxa de 5 °C/min até atingir 315 °C, temperatura final que foi mantida por 5 minutos, com fluxo constante de gás hélio de 1,0 mL/min durante toda a corrida. O volume de injeção foi de 1 µL com split de 10:1. Foi feita a varredura do espectro de massas no intervalo de 50 a 650 m/z em modo de scan completo, com 5 scans por segundo. Utilizou-se 5 min de corte de solvente, considerando o tempo de retenção da piridina utilizada na etapa de derivatização. As temperaturas de interface e da fonte de íons utilizadas foi de 250 °C. A voltagem do detector foi de 1,2 kV e o modelo de impacto de elétrons (EI) foi selecionado para ionização dos metabólitos em 70 eV. Um padrão de alcanos (C9-C25) foi utilizado como controle de qualidade e cálculo dos índices de retenção.

### 3.5 Análise de dados

Os dados de severidade (%), rendimento de grão kg/ha, peso hectolitro (PH) kg/hct foram submetidos a análises de variância pelo teste F e a comparação de médias pelo Scott & Knott com auxílio do programa SPEED Stat (Carvalho *et al.*, 2020).

O software MS-DIAL foi utilizado para alinhar, preencher lacunas e identificar metabólitos no conjunto de dados de cada amostra. Os metabólitos foram identificados por correspondência com uma biblioteca NIST usando tempo de retenção e razão massa/carga das moléculas/fragmentos. As análises estatísticas dos dados obtidos para a Metabolômica foram realizadas pelo *software* MetaboAnalyst 5.0.

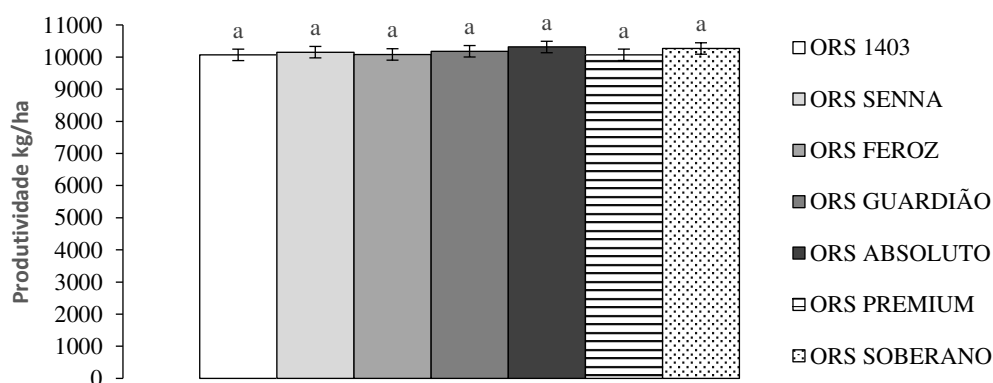
## 4. RESULTADOS

No presente trabalho, sete cultivares de trigo previamente identificadas como resistentes foram avaliadas sem inoculação e com inoculação de *Pyricularia oryzae*. Nas cultivares inoculadas, o principal sintoma visual da brusone que é nas espigas não se manifestou em uma das cultivares, não permitindo avaliar as cultivares quanto a resistência das mesmas na espiga, no entanto nas folhas foram observados sintomas em todas as cultivares estudadas, onde algumas manifestaram maior suscetibilidade ao patógeno, dando nos possibilidade de avaliar a resistência de cada cultivar.

### 4.1 Caracterização morfofisiológica e produtiva das plantas de trigo

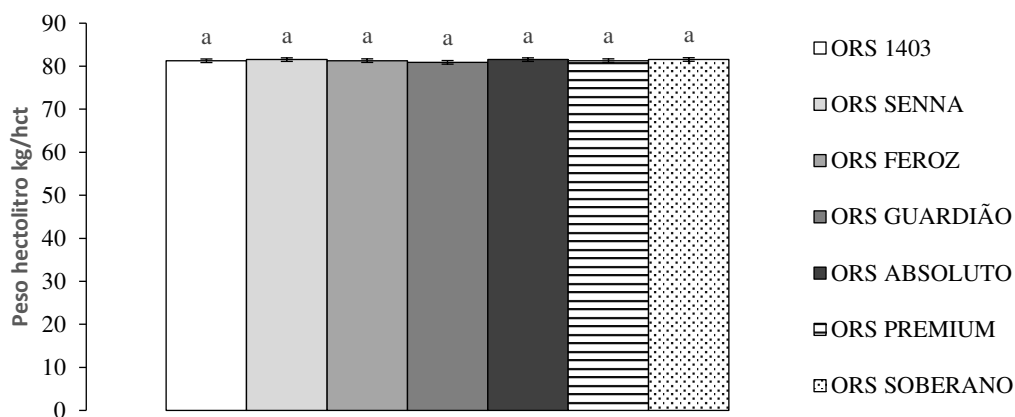
#### 4.1.1 Rendimento e peso hectolitro (PH) de grãos de trigo

**Figura 1.** Rendimento de grãos de cultivares de trigo sem infecção por brusone.



Médias seguidas da mesma letra nas barras não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

**Figura 2.** Peso hectolitro (PH) de grãos de cultivares de trigo sem infecção por brusone.



Médias seguidas da mesma letra nas barras não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

Com relação a avaliação das variáveis produtividade e o peso hectolitro de cultivares de trigo para estimar resistência a doenças, entende-se que essas podem ser maiores ou menores dependendo das cultivares, visto que fatores genéticos estão atrelados a estas variáveis e são dependentes do potencial produtivo de cada material e também do seu ciclo de desenvolvimento, onde materiais precoce tendem a produzir menos se comparado a tardios e podem diferir em qualidade industrial, porém no presente estudo conforme verifica-se na tabela 2 as cultivares tiveram ciclos bem próximos.

E ainda quando observamos as figura 1 e 2, as cultivares presentes neste estudo no experimento irrigado sem a infecção por brusone, não apresentaram diferença significativa no rendimento e no peso hectolitro (PH) dos grãos, conseguindo as mesmas expressar seu alto potencial produtivo e produzir grãos de excelente qualidade, com PH acima de 78 kg/hct, dando a entender que essas cultivares no sistema irrigado e de alta fertilidade apresentam potencial produtivo e qualidade de grãos semelhantes, outra lógica para essa afirmativa seria que todas as cultivares são oriundas do mesmo banco de germoplasma da OR Melhoramento de Sementes e características genéticas bem próximas.

#### 4.1.2. Redução de produtividade de grãos em trigo

**Tabela 2** – Perda de produtividades de cultivares de trigo submetidas a infecção por brusone.

Cultivar	Produtividade				
	S/brusone Kg/ha	C/brusone Kg/ha	Perda Kg/ha	Perda Sc/ha	Perda (%)
ORS ABSOLUTO	10314,6 a	10080,0 a	234,6	3,91	2,27
ORS SOBERANO	10207,2 a	9779,4 a	427,8	7,13	4,19
ORS GUARDIÃO	10181,4 a	9787,2 a	394,2	6,57	3,87
ORS SENNA	10093,8 a	9327,1 b	766,8	12,78	7,59
ORS FERROZ	10022,4 a	9641,4 a	381	6,35	3,82
ORS PREMIUM	10070,4 a	9067,8 b	1002,6	16,71	9,95
ORS 1403	10009,2 a	9822,6 a	186,6	3,11	1,86

S/brusone. Sem infecção de brusone; C/brusone. Com infecção de brusone; Kg/ha. Quilos por hectare; Sc/ha. Sacas por hectare; (%) porcentagem de perda.

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

Analisando os dois experimentos irrigados sem e com infecção por brusone da tabela 2, verifica-se que as cultivares expressarem elevado potencial produtivo, apresentando altas produtividades. Porém observar-se que após a infecção por brusone todas as cultivares apresentaram redução de produtividade resultando em perda. Neste estudo, as perdas de produtividade foram estimadas em termos de percentual de redução da produtividade em quilos por hectare (kg/ha), sacas por hectare (Sc/ha) e em porcentagem (%), pela diferença entre a produtividade das cultivares com e sem infecção por brusone. Comparar perdas de rendimento de grãos entre cultivares sem e com infecção por brusone pode ser um indicativo importante para identificar maior ou menor resistência entre determinado grupo de cultivares.

**Figura 3.** Sintomas de brusone em folhas de trigo

Fonte: adaptado de Torres et al., 2015

#### 4.1.3. Severidade, Produtividade, peso hectolitro e ciclo de cultivares de trigo

**Tabela 3** – Média de severidade na folha bandeira, produtividade, peso hectolitro (PH) e ciclo de cultivares de trigo submetidas a infecção por brusone.

Cultivar	Severidade (%)	Produtividade kg/ha	Peso hectolitro (kg/hct)	Ciclo (dias)
ORS ABSOLUTO	3,7 e	10080,0 a	81,75 a	142
ORS SOBERANO	5,2 d	9779,4 a	81,13 a	145
ORS GUARDIÃO	4,2 e	9787,2 a	80,00 a	138
ORS SENNA	22,3 c	9327,1 b	76,83 b	142
ORS FERROZ	4,3 e	9641,4 a	81,18 a	142
ORS PREMIUM	30,3 b	9067,8 b	76,55 b	145
ORS 1403	4,1 e	9822,6 a	81,05 a	146
CV (%)	12,6	4,02	1,27	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

Na tabela 3, verifica-se que houve diferença significativa para as variáveis analisadas severidade, produtividade e peso hectolitro (PH) das cultivares estudadas após a infecção por brusone, e as cultivares que apresentaram maior severidade de brusone na folha bandeira, apresentaram menor produtividade e peso hectolitro (PH) sendo elas as cultivares ORS Premium 30,3% severidade 9067,8 kg/ha produtividade e 76,55 kg/hct de peso hectolitro (PH) e ORS Senna 22,3% de severidade 9327,1 kg/ha e 76,88 kg/hct de peso hectolitro (PH).

## 4.2 Caracterização metabolômica das plantas de trigo

A partir de observações da perda de produtividade e qualidade industrial das cultivares de trigo estudadas após inoculação do patógeno, perfis metabólicos por GC-MS foram obtidos da folha bandeira das plantas sobre os tratamentos que apresentaram comportamentos extremos dessa variável, representados pelas cultivares ORS 1403 e Premium, com valores de 3,11 sc/ha, PH 81,05 e 16,71 sc/ha, PH 76,55 respectivamente. Outro fato que reforçou essa escolha foi a análise fenotípica das folhas, exemplificada pela figura 4, onde é possível observar os sintomas apresentados por cada cultivar que sofreu inoculação do fungo.

**Figura 4.** Folhas bandeira das diferentes cultivares que sofreram inoculação com *P. oryzae*.



Fonte: o autor.

### 4.2.1 Análise metabolômica não-alvo das cultivares ORS 1403 e ORS Premium sem inoculação de patógeno

O estudo metabolômico que comparou ORS 1403 e ORS Premium sem inoculação de *P. oryzae* detectou 33 metabólitos com diferença estatística significativa de suas intensidades entre os dois tratamentos ( $p < 0,05$  obtido a partir do Teste T de *Student*), de um total de 284 metabólitos encontrados. Entre os compostos que estatisticamente apresentaram diferença significativa, 18 são conhecidos e foram categorizados por classe (Tabela 4). O *heatmap* construído com base no agrupamento hierárquico dos 33 metabólitos que apresentam diferença estatística significativa

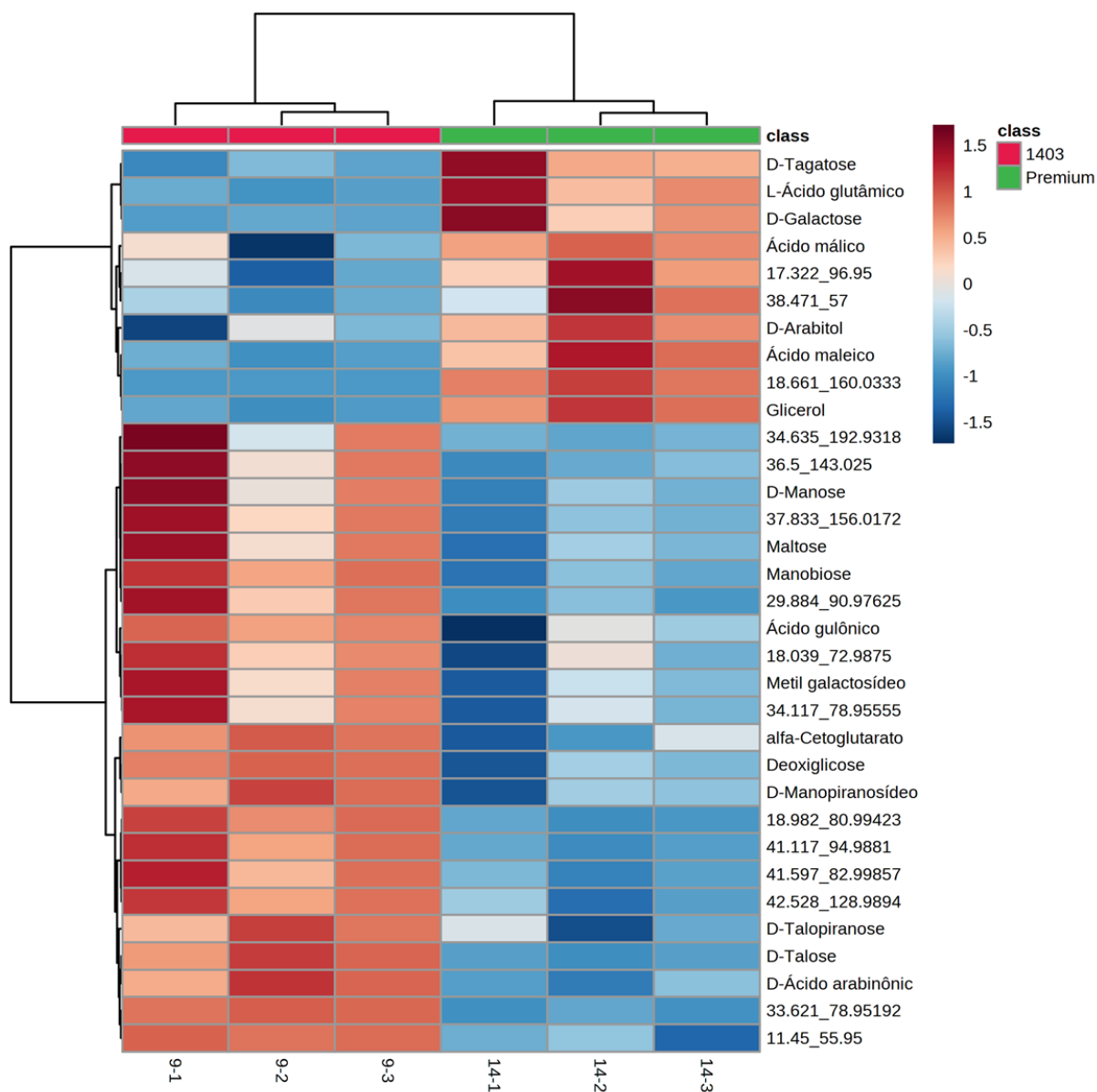
indicou agrupamento dos dois tratamentos, sendo que 10 desses metabólitos apresentaram maior abundância em ORS Premium e 23 deles uma maior abundância no trigo ORS 1403 (Figura 5).

A figura 7A apresenta a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para as amostras das cultivares ORS 1403 e ORS Premium. A PLS-DA mostrou uma clara separação entre os tratamentos, os componentes descrevem 76,9% da variância total dos dados.

Para discriminação dos grupos pela PLS-DA os dados foram centrados pela soma e auto escalados. A PLS-DA das amostras das duas cultivares foi testada por validação cruzada obtendo gráfico mostrando o desempenho da acurácia,  $R^2$  e  $Q^2$  dos componentes. Os metabólitos que mais contribuíram para a separação dos grupos estão listados de acordo com seu *VIP score* (Figura 7B) que é calculado pela soma ponderada das correlações quadradas dos componentes da PLS-DA da variável original. A D-talose com maior abundância na amostra ORS 1403 e o Glicerol com maior abundância na ORS Premium foram os metabólitos conhecidos que mais contribuíram para a separação dos grupos pela PLS-DA.

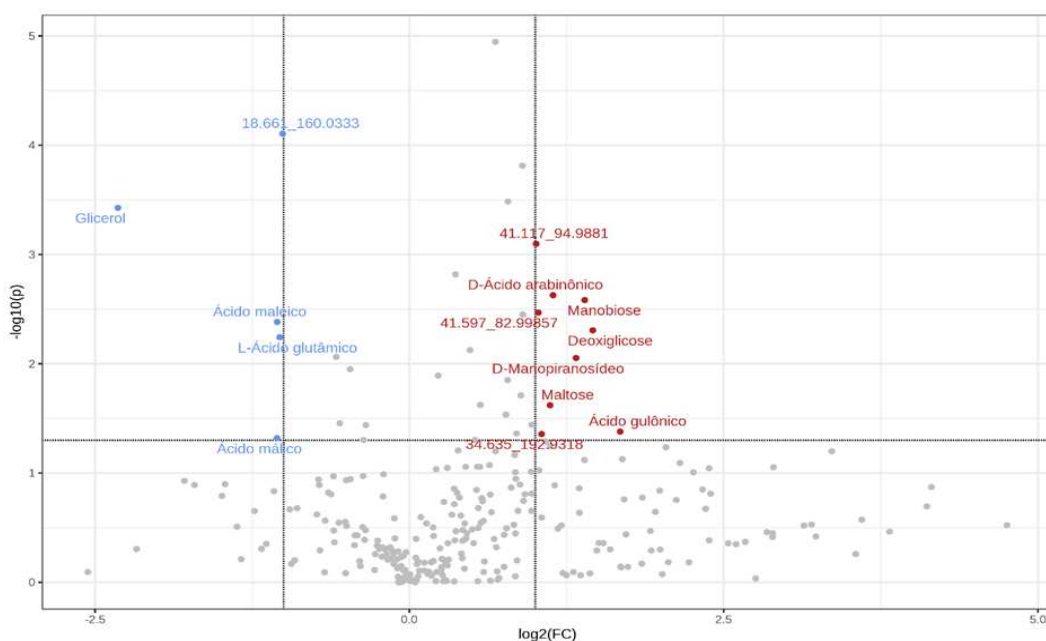
Por meio do *volcano plot*, que combina a medida *Fold Change* (FC) e teste *T*, foi possível também visualizar os metabólitos com diferença estatística significativa entre os grupos estudados e suas abundâncias relativas por amostra em cada tratamento. A figura 6 traz um gráfico *volcano plot* que evidencia os metabólitos diferenciais encontrados em ORS 1403 quando comparados ao ORS Premium, ambos sem a inoculação de *P. oryzae*. Cada ponto representa um metabólito encontrado pela análise CG-MS e os pontos vermelhos ou azuis indicam os metabólitos com diferença estatística significativa e suas abundâncias em cada tratamento, considerando FC 1,0 e teste *T* de *Student* com 0,05 de significância. Neste caso, foram encontrados 10 metabólitos com maior intensidade nas amostras do grupo ORS Premium em relação ao grupo ORS 1403 e 23 em maior intensidade nas amostras de ORS 1403 em relação a ORS Premium.

**Figura 5.** Heatmap da análise de ORS 1403 e ORS Premium sem inoculação *P. oryzae*.



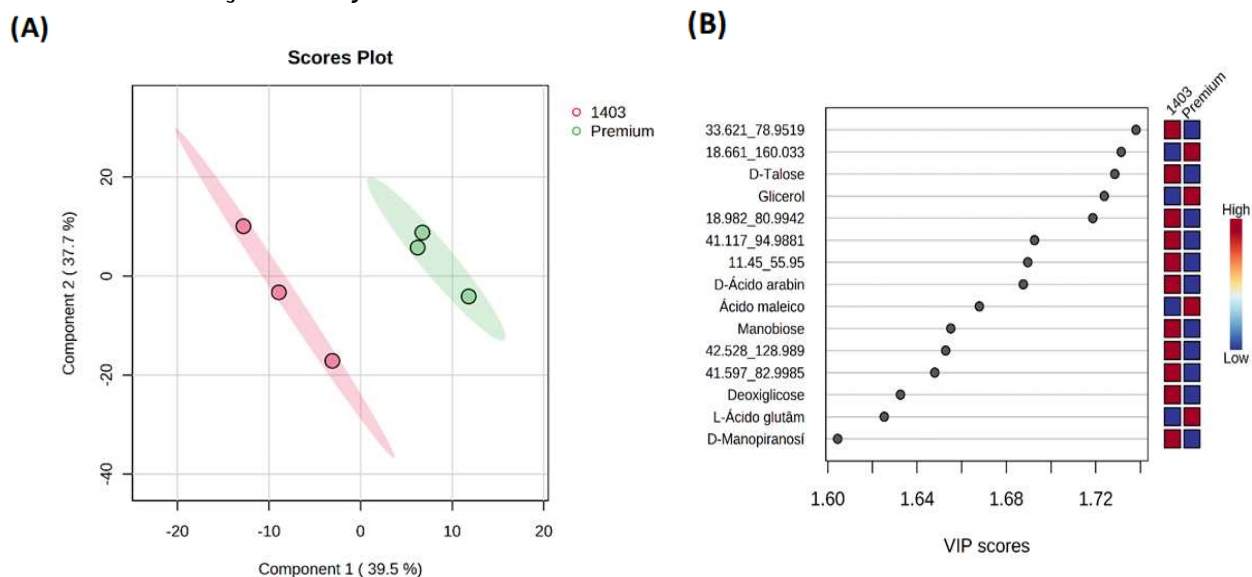
Heatmap dos 33 metabólitos significativos diferentes entre ORS 1403 e ORS Premium sem inoculação do patógeno. A barra colorida indica a abundância relativa de metabólitos, em vermelho é indicado a maior abundância do metabólito e em azul é indicada uma menor abundância do metabólito. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

**Figura 6.** *Volcano plot* da análise de ORS 1403 e ORS Premium sem inoculação *P. oryzae*.



*Volcano plot* da identificação diferencial dos metabólitos das amostras ORS 1403 e ORS Premium sem inoculação do patógeno. Os pontos vermelhos indicam metabólitos em maior intensidade e os pontos em azul indicam metabólitos em menor intensidade. Os pontos em cinza representam metabólitos sem significância estatística ( $p < 0,05$ ).

**Figura 7.** PLS-DA e VIP score da análise de ORS 1403 e ORS Premium sem inoculação *P. oryzae*.



**(A)** Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais (PLS-DA) dos dados das amostras ORS 1403 e ORS Premium sem inoculação do patógeno. Os componentes apresentaram  $R^2 = 0,99993$  e  $Q^2 = 0,86277$  pelo método de validação cruzada. **(B)** VIP (variable influence on projection) scores. São indicados metabólitos contributivos para a separação dos grupos.

**Tabela 4.** Metabólitos conhecidos significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre ORS 1403 e ORS Premium sem inoculação de *P. oryzae*.

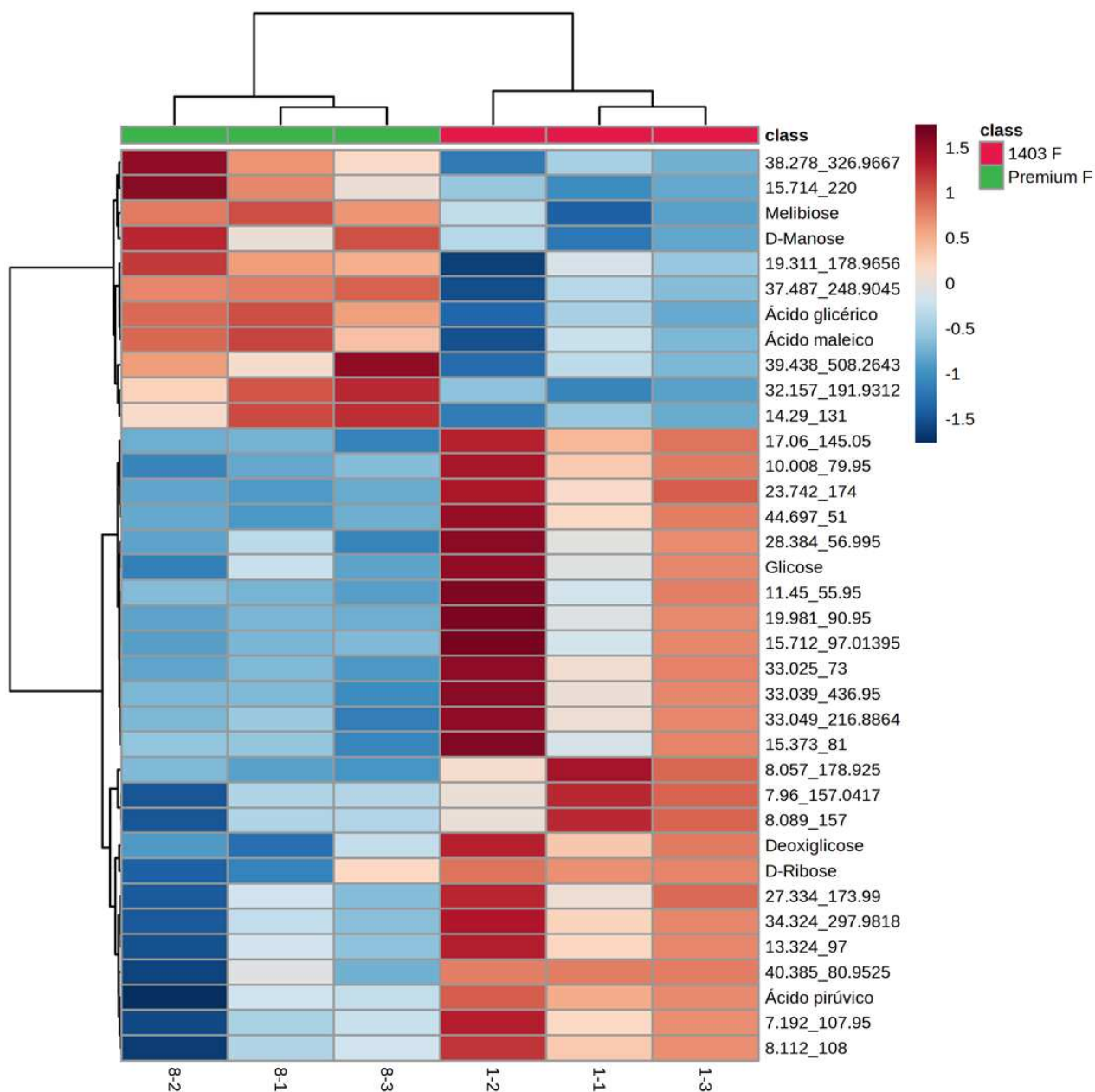
Metabólito	FC	p-valor
<b>Carboidratos</b>		
alfa-Cetoglutarato	1,1722	0,01284
Deoxiglicose	2,7484	0,00494
D-Galactose	0,7212	0,01121
D-Manopiranosídeo	2,5063	0,00885
D-Manose	1,7023	0,02922
D-Tagatose	0,6679	0,00865
D-Talopirranose	1,4787	0,02379
D-Talose	1,7218	0,00033
Maltose	2,1716	0,02396
Manobiose	2,6294	0,00261
Metil galactosídeo	1,9622	0,03621
<b>Ácidos Orgânicos</b>		
Ácido arabinônico	2,2082	0,00236
Ácido gulônico	3,1971	0,04174
Ácido maleico	0,4825	0,00414
Ácido málico	0,482	0,04792
<b>Álcoois</b>		
D-Arabitól	0,6814	0,03504
Glicerol	0,2004	0,00037
<b>Aminoácidos</b>		
L-Ácido glutâmico	0,48924	0,0057156

#### 4.2.2 Análise metabolômica não-alvo das cultivares ORS 1403 e ORS Premium com inoculação de patógeno

Já quando comparadas as cultivares ORS 1403 e a ORS Premium ambas inoculadas com o patógeno, 36 metabólitos apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) por teste t de *Student*, de um total de 284. Entre os compostos significativamente diferentes, 8 são conhecidos e foram categorizados por classe (Tabela 5). No *heatmap* é possível observar 11 metabólitos com maior abundância e 25 com menor abundância em ORS 1403 em relação a ORS Premium (Figura 8). A diferenciação dos grupos é evidenciada pelos resultados da PLS-DA, onde os componentes descrevem 72,7% da variância dos dados (Figura 10A). O *VIP score* é mostrado na Figura 10B. Seguindo o mesmo resultado apresentado pelo *Heatmap*, o

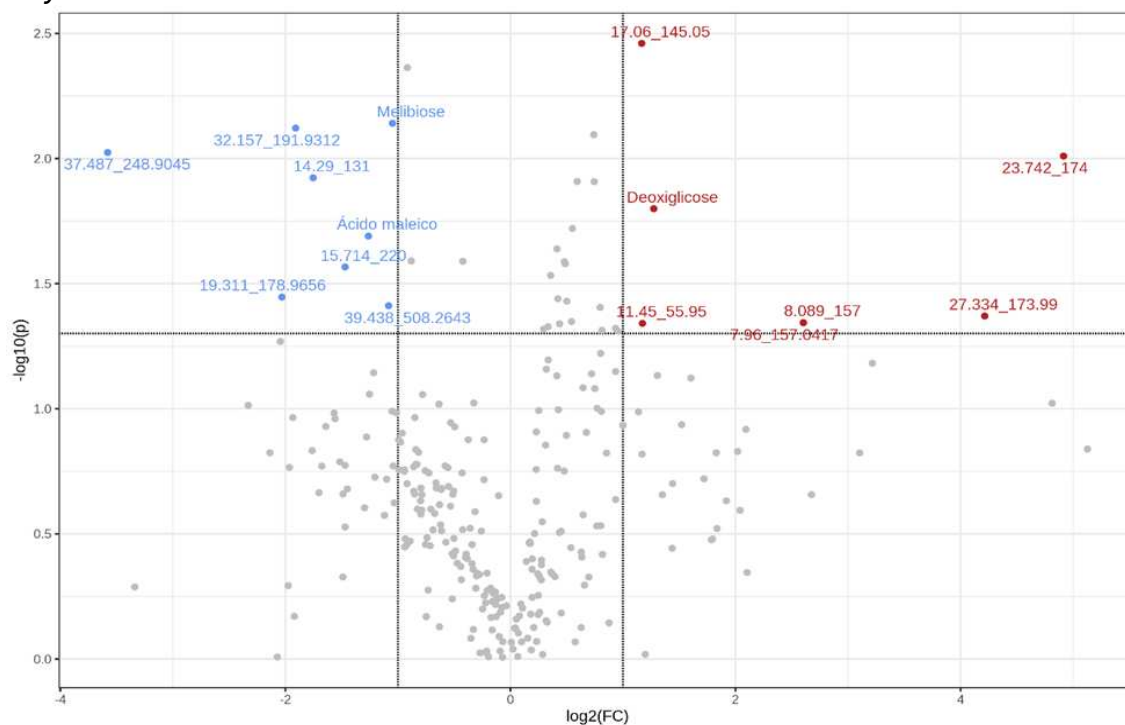
*volcano plot* (Figura 9) mostra que 11 metabólitos foram menos abundantes na ORS 1403 inoculado com *P. oryzae* e 25 mais abundantes, quando comparados com ORS Premium também inoculado com o fungo.

**Figura 8.** Heatmap da análise de ORS 1403 e a ORS Premium inoculadas com *P. oryzae*.



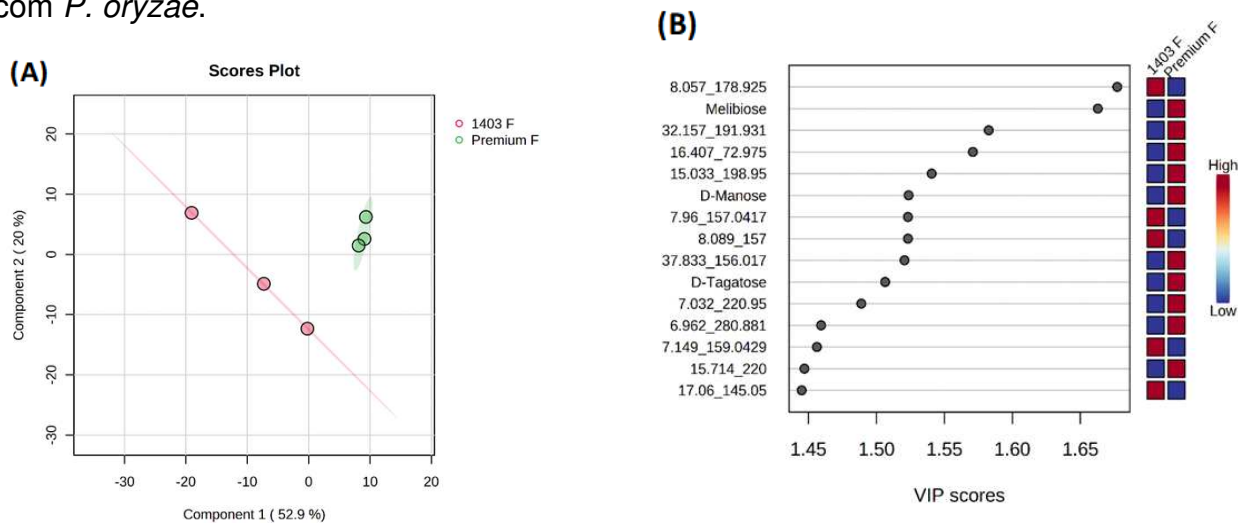
Heatmap dos 36 metabólitos significativos diferentes entre ORS 1403 e a ORS Premium inoculadas com o patógeno. A barra colorida indica a abundância relativa de metabólitos, em vermelho é indicado a maior abundância do metabólito e em azul é indicada uma menor abundância do metabólito. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

**Figura 9.** *Volcano plot* da análise de ORS 1403 e a ORS Premium inoculadas com *P. oryzae*.



*Volcano plot* da identificação diferencial dos metabólitos das amostras ORS 1403 e ORS Premium com inoculação do patógeno. Os pontos vermelhos indicam metabólitos em maior intensidade e os pontos em azul indicam metabólitos em menor intensidade. Os pontos em cinza representam metabólitos sem significância estatística ( $p < 0,05$ ).

**Figura 10.** PLS-DA e VIP score da análise de ORS 1403 e a ORS Premium inoculadas com *P. oryzae*.



**(A)** Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais (PLS-DA) dos dados das amostras ORS 1403 e ORS Premium com inoculação do patógeno. Os componentes apresentaram  $R^2 = 0,99954$  e  $Q^2 = 0,61277$  pelo método de validação cruzada. **(B)** VIP (variable influence on projection) scores. São indicados metabólitos contributivos para a separação dos grupos.

**Tabela 5.** Metabólitos conhecidos significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre ORS 1403 e ORS Premium com inoculação de *P. oryzae*.

<b>Metabólito</b>	<b>FC</b>	<b>p-valor</b>
<b>Carboidratos</b>		
Melibiose	0,4835	0,00723
Deoxiglicose	2,4176	0,01587
D-Manose	0,7457	0,02575
D-Ribose	1,3385	0,03631
Glicose	1,9381	0,04897
<b>Ácidos Orgânicos</b>		
Ácido glicérico	0,5299	0,00433
Ácido maleico	0,4169	0,02042
Ácido pirúvico	1,3535	0,045747

Apesar de ambas as análises apresentadas anteriormente indicarem números próximos de metabólitos significativos, a Tabela 6 mostra aqueles que foram encontrados em ambas as comparações, antes e depois da inoculação do patógeno. É importante ressaltar que houve mudança no parâmetro de *Fold Change* (FC), que denuncia mudanças em suas intensidades, indicando quantas vezes um composto está presente em uma amostra quando comparada a outra, quando maior que 1,0 em maior intensidade e menor, em menor intensidade pela quantidade de vezes proporcional ao parâmetro. Um exemplo disso é a D-Manose, que apresentou diferença estatística significativa em ambas as comparações, com e sem infecção fúngica, entretanto em maior quantidade na cultivar ORS 1403 sem inoculação com *P. oryzae* (aproximadamente 70%) e maior quantidade na ORS Premium após inoculação (aproximadamente 25%).

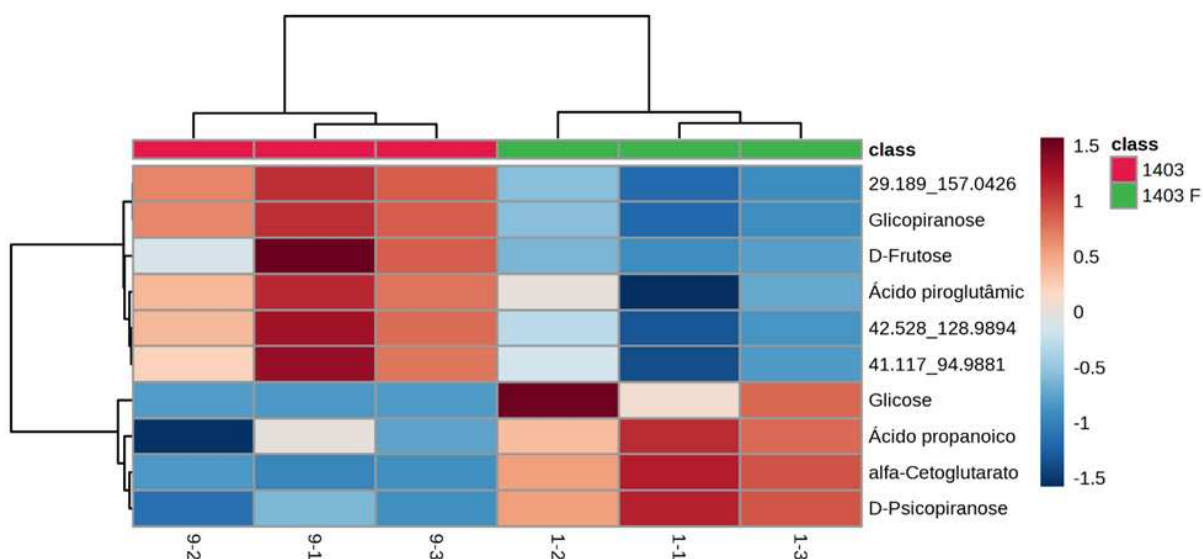
**Tabela 6-** Metabólitos conhecidos significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre ORS 1403 ORS Premium com e sem inoculação de *P. oryzae*.

Metabólito	ORS 1403/ORS Premium		ORS 1403 F/ORS Premium F	
	FC	P-valor	FC	P-valor
Ácido maleico	2,7484	0,00494	2,4176	0,01587
D-Manose	1,7023	0,02922	0,7457	0,02575
Deoxiglicose	0,4825	0,00414	0,4169	0,02042

#### 4.2.3 Análise metabolômica não-alvo da cultivar ORS 1403 com inoculação e sem inoculação do patógeno

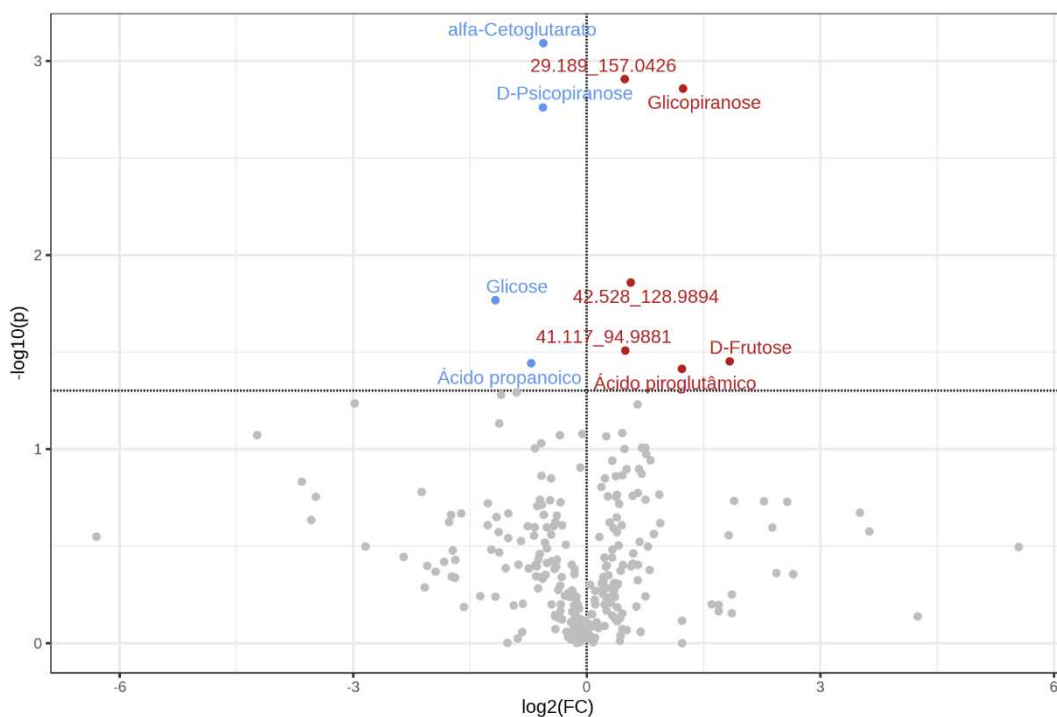
Foram comparados também os cromatogramas das amostras da cultivar ORS 1403 com e sem inoculação de patógeno *P. oryzae*, a fim de observar o comportamento metabólico do trigo que apresentou menor perda de produtividade. De 284 metabólitos presentes nas amostras, 10 apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) por teste T de *Student*. Entre os compostos significativamente diferentes, 7 são conhecidos e foram categorizados (Tabela 7). A figura 11 apresenta o *heatmap*, onde é possível observar 6 metabólitos com abundância reduzida e 4 metabólitos com abundância aumentada em ORS 1403 contaminada em relação a cultivar não inoculada. A diferenciação dos grupos é evidenciada pelos resultados da PLS-DA, onde os componentes descrevem 74,2% da variância dos dados (Figura 13A). O *VIP score* também é mostrado na figura 13 B. O *volcano plot* (Figura 12) mostra que 4 metabólitos foram encontrados em menores intensidades em ORS 1403 inoculado com *P. oryzae*, e 6 em maiores intensidades, quando comparado com ORS sem inoculação de patógeno.

Figura 11. Heatmap da análise de ORS 1403 com e sem inoculação de *P. oryzae*.



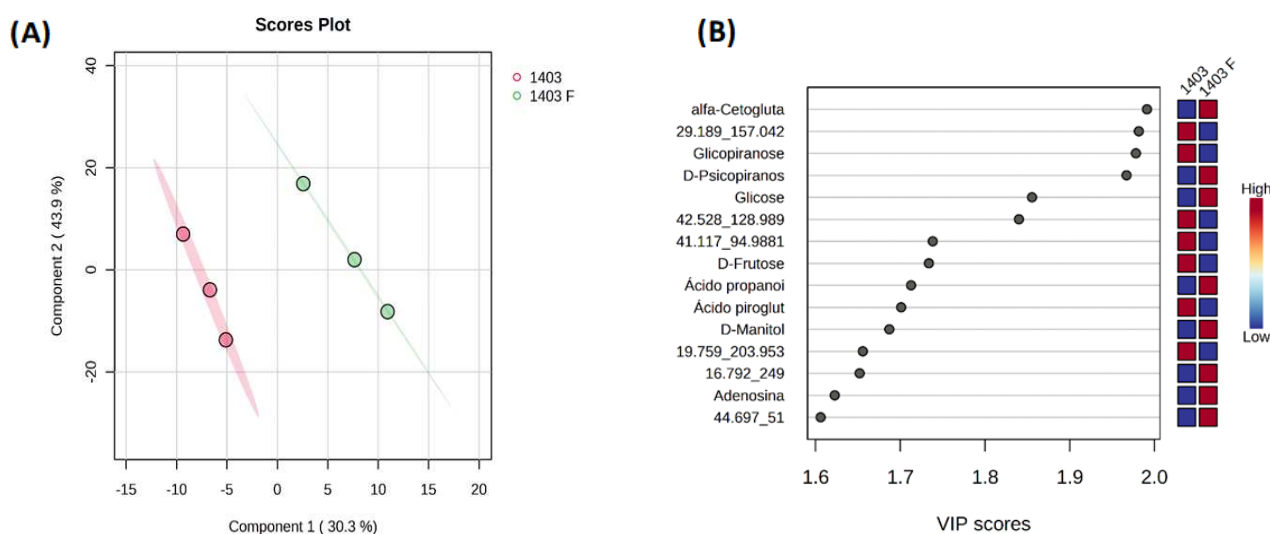
Heatmap dos 11 metabólitos significativos diferentes entre ORS 1403 com e sem inoculação do patógeno. A barra colorida indica a abundância relativa de metabólitos, em vermelho é indicado a maior abundância do metabólito e em azul é indicada uma menor abundância do metabólito. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

Figura 12. Volcano plot da análise de ORS 1403 com e sem inoculação de *P. oryzae*.



Volcano plot da identificação diferencial dos metabólitos das amostras de ORS 1403 com e sem inoculação do patógeno. Os pontos vermelhos indicam metabólitos em maior intensidade e os pontos em azul indicam metabólitos em menor intensidade. Os pontos em cinza representam metabólitos sem significância estatística ( $p < 0,05$ ).

**Figura 13.** PLS-DA e VIP score da análise de ORS 1403 com e sem inoculação de *P. oryzae*.



**(A)** Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais (PLS-DA) dos dados das amostras ORS 1403 com e sem inoculação do patógeno. Os componentes apresentaram  $R^2 = 0,99975$  e  $Q^2 = 0,87164$  pelo método de validação cruzada. **(B)** VIP (variable influence on projection) scores. São indicados metabólitos contributivos para a separação dos grupos.

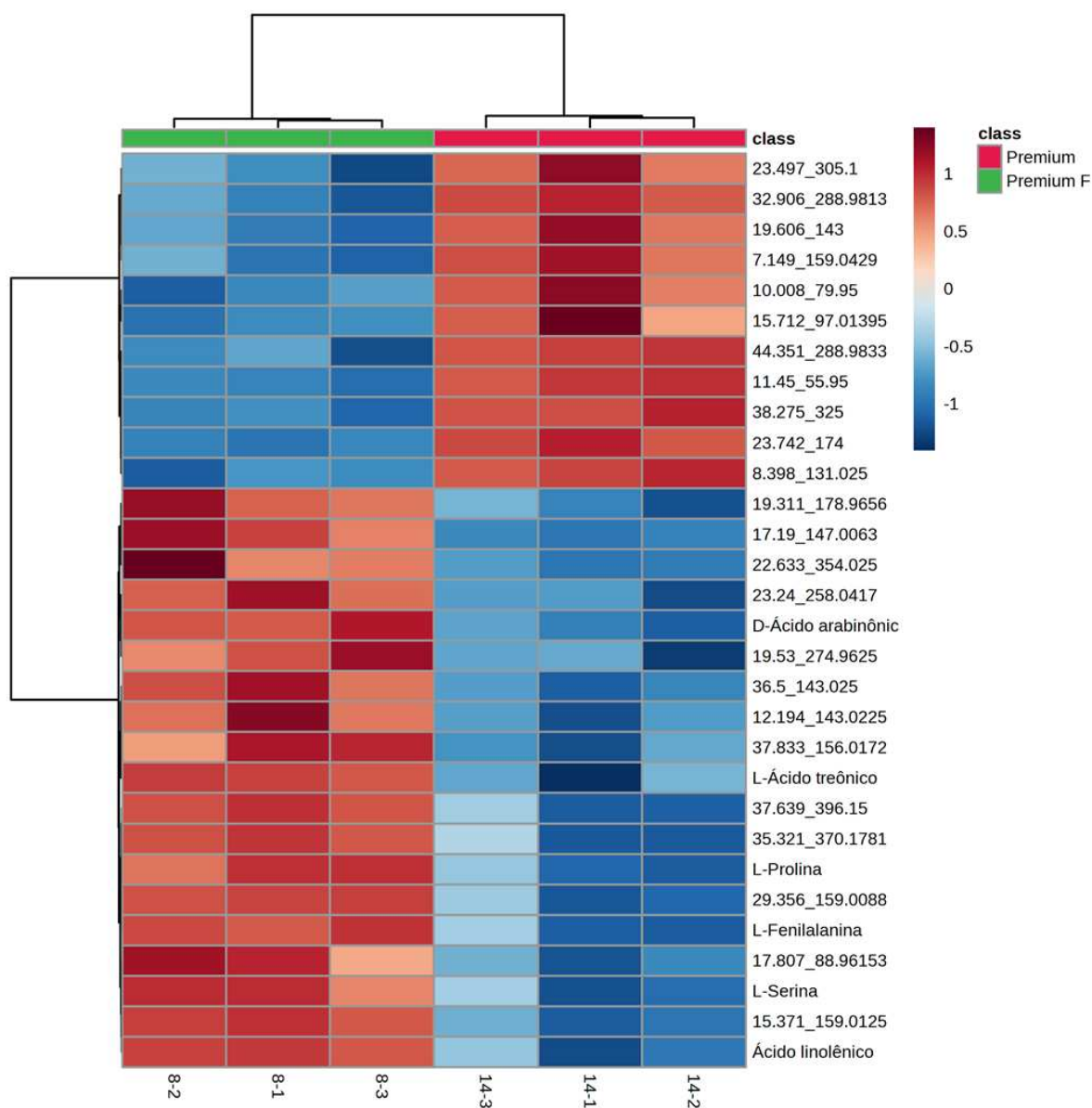
**Tabela 7.** Metabólitos conhecidos significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre ORS 1403 com e sem inoculação de *P. oryzae*.

Metabólito	FC	<i>p</i> -valor
<b>Carboidratos</b>		
α-Cetogluturato	1,4733	0,00081
D-Frutose	0,2803	0,03531
D-Psicopirranose	1,4779	0,00174
Glicopirranose	0,4246	0,00139
Glicose	2,2572	0,01708
<b>Ácidos Orgânicos</b>		
Ácido propanoico	1,6412	0,03609
Ácido piroglutâmico	0,4288	0,03859

#### 4.2.4 Análise metabolômica não-alvo da cultivar ORS Premium com inoculação e sem inoculação do patógeno

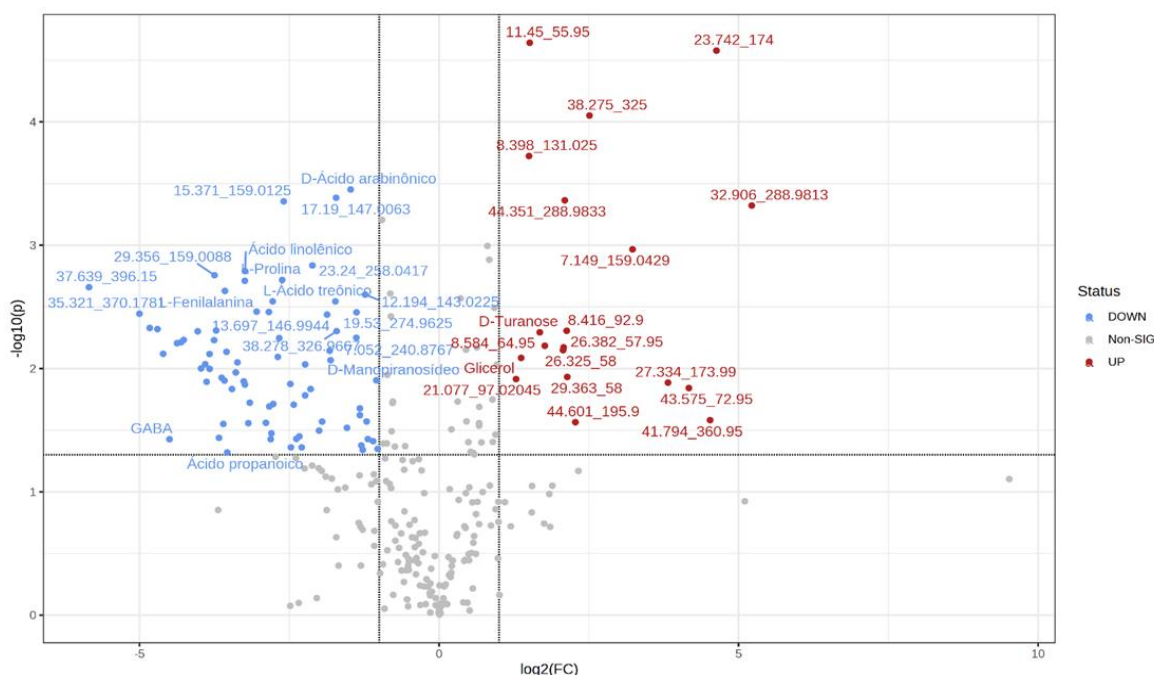
Já as amostras da cultivar ORS Premium com inoculação do fungo e as que não sofreram inoculação apresentaram 129 metabólitos diferentes ( $p < 0,05$ ) por avaliação de teste T de *Student*. Entre os compostos significativamente diferentes, 39 são conhecidos e foram categorizados por classe (Tabela 8). O *heatmap* mostra alguns desses metabólitos na figura 14 assim como os resultados da PLS-DA (Figura 16A), onde os componentes descrevem 74,6% da variância dos dados. A figura 16B ilustra o *VIP score*. Através do *volcano plot* (Figura 15) é possível identificar 40 metabólitos que foram encontrados em menores intensidades em ORS Premium inoculado com *P. oryzae*, e 89 em maiores intensidades, quando comparado com ORS Premium sem inoculação de patógeno.

**Figura 14.** *Heatmap* da análise de ORS Premium com e sem inoculação de *P. oryzae*.



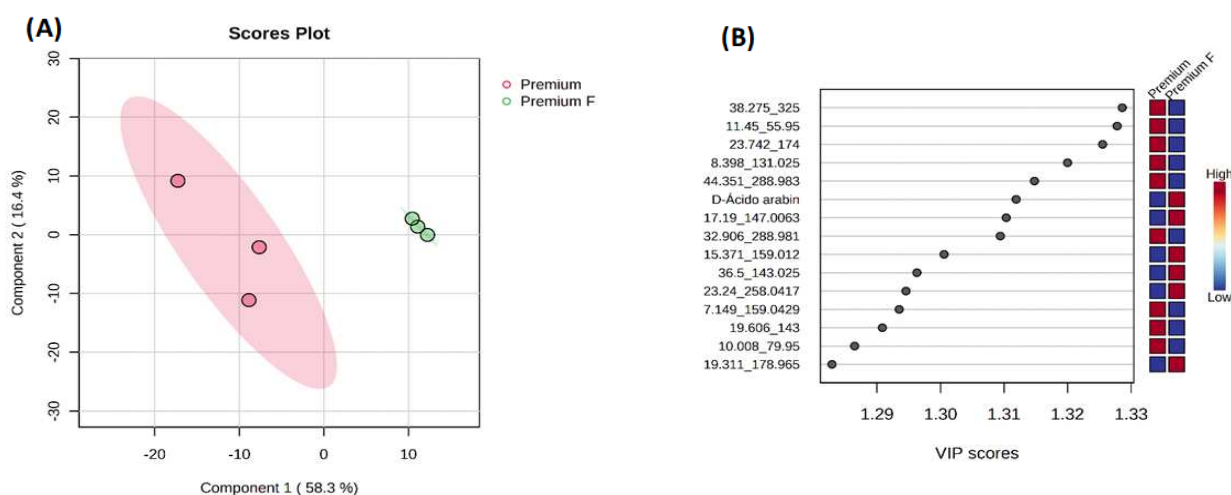
*Heatmap* dos 30 primeiros metabólitos significativos diferentes entre ORS Premium com e sem inoculação do patógeno. A barra colorida indica a abundância relativa de metabólitos, em vermelho é indicada a maior abundância do metabólito e em azul é indicada uma menor abundância do metabólito. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

**Figura 15.** Volcano plot da análise de ORS Premium com e sem inoculação de *P. oryzae*.



Volcano plot da identificação diferencial dos metabólitos das amostras de ORS Premium com e sem inoculação do patógeno. Os pontos vermelhos indicam metabólitos em maior intensidade e os pontos em azul indicam metabólitos em menor intensidade. Os pontos em cinza representam metabólitos sem significância estatística ( $p < 0,05$ ).

**Figura 16.** PLS-DA e VIP score da análise de ORS Premium com e sem inoculação de *P. oryzae*.



(A) Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais (PLS-DA) dos dados das amostras ORS Premium com e sem inoculação do patógeno. Os componentes apresentaram  $R^2 = 0,99686$  e  $Q^2 = 0,66671$  pelo método de validação cruzada. (B) VIP (variable influence on projection) scores. São indicados metabólitos contributivos para a separação dos grupos.

**Tabela 8.** Metabólitos conhecidos significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre ORS Premium com e sem inoculação de *P. oryzae*.

<b>Metabólito</b>	<b>FC</b>	<b><i>p</i>-valor</b>
<b>Carboidratos</b>		
alfa-Cetogluturato	2,4975	0,02104
D-Manopiranosídeo	2,0651	0,01246
D-Manose	1,746	0,00377
D-Ribose	0,5385	0,01786
D-Turanose	0,3117	0,00508
D-Xilose	1,706	0,01853
D-Xilulose	0,866	0,0312
Manobiose	2,2769	0,03734
Melibiose	1,4799	0,04263
Mio-inositol	0,7311	0,0070475
Sucrose	0,6121	0,03972
<b>Ácidos Orgânicos</b>		
Ácido arabinônico	2,7797	0,00035
Ácido cítrico	3,8647	0,02696
Ácido esteárico	3,5045	0,00856
Ácido isoferúlico	9,5736	0,01271
Ácido linolênico	9,4227	0,00162
Ácido octadecanoico	1,8283	0,04048
Ácido propanoico	11,587	0,04795
Ácido quínico	5,3673	0,01963
Ácido succínico	2,9002	0,03025
GABA	22,594	0,03746
L-Ácido treônico	3,3158	0,00286
<b>Aminoácidos</b>		
L-Ácido aspártico	7,0075	0,03744
L-Ácido glutâmico	0,5365	0,03938
L-Alanina	9,4417	0,01349
L-Fenilalanina	11,901	0,00235
L-Glicina	6,4508	0,00806
L-Glutationa	24,323	0,0076
L-Isoleucina	10,494	0,01077
L-Leucina	13,173	0,00492
L-Prolina	6,1347	0,00191
L-Serina	7,158	0,00348
L-Tirosina	7,1183	0,02033
L-Valina	5,5822	0,01335
<b>Outros compostos</b>		
1-Monopalmitina	1,9036	0,04058
5,6-Dihidouracila	6,3495	0,00566
Adenosina	13,491	0,00589
Glicerol	0,3867	0,0082
L-Iditol	0,6454	0,00675

## 5. DISCUSSÕES

Várias doenças acometem a cultura do trigo causando perdas no rendimento e na qualidade dos grãos. Essas perdas são oriundas da redução da capacidade fotossintética das folhas e também do mal desenvolvimento dos grãos quando o ataque é nas espigas (Hellemans *et al.*, 2018). No trigo *Pyricularia oryzae* é um patógeno que quando coloniza a planta é capaz de reduzir a capacidade fotossintética, reduzir a translocação de nutrientes para os grãos, tornando-os murchos e com baixo peso (Goulart; Sousa; Urashima, 2007).

Em países da América do Sul a brusone de trigo tem causado perdas variáveis entre 10 a 100% (kohli *et al.*, 2011), essa variação ocorre devido o comportamento da interação da cultura e doença em diferentes regiões, dependentes da resistência das cultivares, condições ambientais, população e virulência do patógeno entre outras.

No Brasil quando ocorre alta pressão da doença, tem se verificado maiores reduções na produtividade se comparado com outros países da América do Sul, principalmente Bolívia (Cruz *et al.*, 2019). No ano de 2019 houve uma epidemia de brusone no Cerrado brasileiro causando prejuízo aos tricultores de Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal com lavouras que alcançaram 100% de perda de produtividade, e o que mais chamou a atenção foi a ocorrência da doença mais cedo na cultura, no perfilhamento houve condições climáticas favoráveis proporcionando a infecção nas folhas e posteriormente espigas, alertando para antecipar o controle da doença, mesmo em anos sem epidemia como o de 2022, as oscilações de temperatura e umidade permite registrar lesões de brusone nas folhas em praticamente todas as regiões tritícolas do país (Embrapa, 2022).

Em se tratando de perda de rendimento, a FAO define que essa é obtida pela diferença entre o rendimento potencial (determinado pelo genótipo em um ambiente específico) e o rendimento real, que é realmente colhido (SAVARY *et al.*, 2012). Goulart *et. al* (2007) relata que em Mato Grosso do Sul, sob infecção natural as perdas de rendimento oscilaram entre 10,5 a 13%. Entretanto na mesma região uma cultivar altamente suscetível teve redução de produtividade de 51% (Goulart; Paiva, 2000). Em anos em que a brusone não ocorre em determinada região é necessário a inoculação para que se possa proceder pesquisa relacionadas a doença (Rios *et al.*, 2016). Neste estudo as perdas de produtividade variaram entre 1,8 a 12,28%.

Nosso estudo observa que duas cultivares após a infecção tiveram maiores reduções, sendo elas as cultivares ORS Premium com redução de 1002,6 kg/ha que representa 16,71 Sc/ha por hectare e 9,95% de perda e ORS Senna com redução 766,8 kg/ha que representa 12,78 Sc/ha e 7,59% de perda, duas cultivares consideradas resistentes a brusone, as demais cultivares obtiveram menores perdas de produtividade. Gomes *et al.*, (2006), analisando genótipos de trigo com níveis diferentes de resistência, observou redução de produtividade de 19 a 42% após inoculação com brusone. Em 2016 Coelho *et. al.*, estudando um grupo de genótipos de trigo, na cidade de Patos de Minas, relatou que a perda mínima de rendimento de grãos foi de 62,8%.

A característica de resistência genética é atualmente a mais viável tanto economicamente como ambientalmente para o manejo da brusone do trigo, e observa-se que quanto maior a severidade da doença na folha ou na espiga, maior as perdas de rendimentos e qualidade dos grãos (Rios *et al.*, 2017), condizente com os resultados observados neste trabalho, onde as cultivares que apresentaram maior severidade na folha bandeira apresentaram menor produtividade, sendo elas as cultivares ORS Premium e ORS Senna.

Entre as cultivares utilizadas no presente trabalho todas possuem o segmento da translocação 2NS / 2AS, desde 2002 a detentora destas cultivares a OR Melhoria de Sementes vem pesquisando sobre este segmento, o qual em primeiro momento foi utilizado visando introduzir fontes de resistência a ferrugem na folha, ferrugem linear e ferrugem do colmo e verificou-se ao longo dos estudos que esse segmento era capaz de agregar resistência a uma elevada gama de fungos. Segundo Camila Turra pesquisadora da OR Melhoria de Sementes o segmento da translocação 2NS / 2AS tem expressado defesa nas plantas para brusone (*Pyricularia oryzae*), porém é necessário a seleção a campo em áreas experimentais com irrigação e pressão da doença buscando aliar resistência genética com a expressão fenotípica (Embrapa, 2022).

Na América do Sul e em Bangladesh, materiais com o segmento da translocação 2NS / 2AS, têm sido usados, frequentemente, em pesquisas buscando novas fontes de resistência a brusone do trigo (Cruppe *et al.*, 2020). Nestas pesquisas se tem observado que existe variabilidade de resistência dentre materiais que apresentam o segmento da translocação, o que tornar necessário encontrar novas fontes de resistência à brusone ligadas ao segmento da translocação 2NS / 2AS (Cruz;

Valente, 2017), resultados semelhantes foram encontrados neste trabalho onde duas cultivares ORS Premium e ORS Senna que tem em seu genoma o referido segmento da translocação, após a infecção por brusone apresentaram maior severidade da brusone na folha bandeira e isso refletiu em menor produtividade e menor peso hectolitro (PH) se comparadas com as demais cultivares que também possuem o segmento da translocação, esse comportamento diferente das duas cultivares evidencia a variabilidade de resistência de cada cultivar ao ataque de *Pyricularia oryzae*.

Outro fato que vale destacar é com relação ao peso hectolitro (PH) das duas cultivares ORS Premium e ORS Senna que após a infecção por brusone, sofreu redução, ficando abaixo de 78 kg/hct, demonstrando que a brusone afetou a qualidade dos grãos, que com essa característica de peso hectolitro abaixo de 78, possui baixa qualidade industrial sendo classificado como tipo 2. Esses resultados corroboram com Nunes *et al.*, 2018, que evidenciaram que o peso hectolitro (PH) de grãos de trigo quando contaminados por brusone tendem a reduzir sua massa à medida que aumenta a contaminação o que afeta a sanidade e conseqüentemente a qualidade dos mesmos, tornando-os cochos, pequenos, murchos

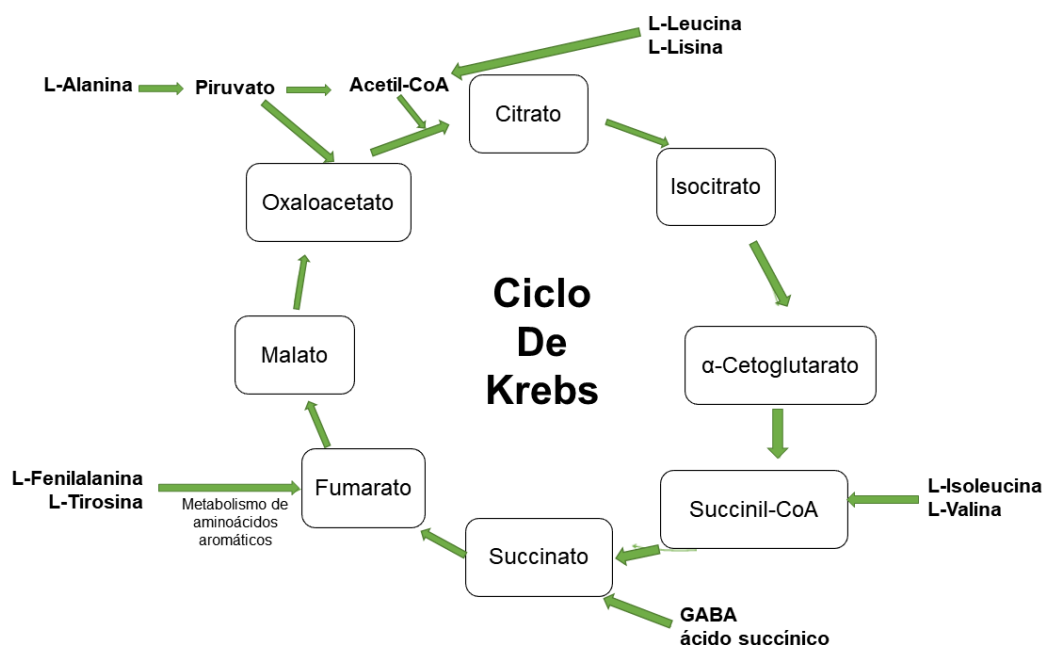
As cultivares ORS Absoluto e ORS 1403 foram as que apresentaram menor severidade de brusone na folha bandeira após a infecção, e também maiores produtividades 10080 kg/ha e 9822,6 kg/ha respectivamente, em relação ao peso hectolitro (PH) dessas cultivares esse se manteve acima de 78 kg/hct, demonstrando que *Pyricularia oryzae* não interferiu na qualidade industrial dos mesmos. A cultivar ORS 1403 teve menor perda de rendimentos de grãos após a infecção por brusone, redução de 1,86%, que representa 3,11 Sc/ha e 186,6 kg/ha, esses dados são condizentes com os dados dos ensaios corporativos da Rede RECORBE 2020/2021 (Circular Técnica 69, Embrapa, 2022) onde essa cultivar havia se mostrado como uma das com melhor desempenho frente a brusone.

As demais cultivares do presente trabalho com o segmento da translocação 2NS / 2AS, ORS Absoluto, ORS Soberano, ORS Guardião e ORS Feroz não tiveram diferença significativa para severidade, produtividade e peso hectolitro (PH) quando comparadas a ORS 1403, evidenciando que a resistência a *Pyricularia oryzae* desse grupo é bem semelhante. No nosso estudo 71,4% das cultivares analisadas apresentaram baixas perdas de produtividade, demonstrando o elevado grau de resistência a brusone do trigo destas cultivares, sendo excelentes opções para serem

usadas no manejo da brusone no cerrado brasileiro, evitando maiores perdas de produtividade.

O ciclo do ácido cítrico, comumente conhecido como ciclo de Krebs ou ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), é uma das vias metabólicas mais importantes dos seres vivos, uma vez que está diretamente relacionada a respiração celular e é capaz suprir grande parte da demanda energética do sistema biológico (Akram, 2014). Estudos indicam que, durante situações de estresse, metabólitos intermediários do ciclo TCA são encontrados em concentrações alteradas (Nunes-Nesi *et al.*, 2013). A Figura 17 esquematiza resumidamente o funcionamento do ciclo de Krebs.

**Figura 17.** Ciclo TCA com destaque para os metabólitos identificados nas análises.



Esquematização simplificada do Ciclo de Krebs ou ciclo do ácido tricarboxílico (TCA).

Fonte: Autor.

Dentre os 11 metabólitos diferenciais acusados durante as análises estatísticas que envolviam ORS 1403 com e sem inoculação de *P. oryzae*, 8 foram identificados com sucesso. carboidratos como glicose ( $p = 0,01707$ ; FC = 2,2572) e psicopirranose ( $p = 0,00174$ ; FC = 1,4779) foram encontrados em maior quantidade nas amostras inoculadas com patógeno, assim como os ácidos orgânicos alfa-cetoglutarato ( $p =$

0,00081; FC = 1,4733) e ácido propanoico ( $p = 0,03609$ ; FC = 1,6412). Por outro lado, frutose ( $p = 0,03531$ ; FC = 0,2803), glicopirranose ( $p = 0,00174$ ; FC = 0,4246) e ácido piroglutâmico ( $p = 0,03859$ ; FC = 0,4288) foram encontrados em menor concentração na mesma, quando comparados seus dados com aqueles da ORS 1403 (Tabela 6). Apesar de valores elevados de alguns metabólitos, o que evidencia a contaminação, a baixa proporção de metabólitos significativos indica a resistência da cultivar à brusone. É possível observar a presença de ácido pirúvico, que participa do ciclo TCA como precursor de piruvato.

As análises entre as cultivares ORS Premium com e sem inoculação de patógeno apresentaram 129 compostos diferenciais, com 39 identificados. De acordo com a Tabela 8, alguns compostos importantes como glicerol ( $p = 0,00820$ ; FC = 0,3867), ácido glutâmico ( $p = 0,03938$ ; FC = 0,5365) e alguns carboidratos, como turanose ( $p = 0,00585$ ; FC = 0,3117), ribose ( $p = 0,01786$ ; FC = 0,5385) e sucrose ( $p = 0,03972$ ; FC = 0,6121), se apresentam em maior concentração nas amostras de ORS Premium sem inoculação de *P. oryzae*. Já os demais compostos se apresentam mais abundantes nas amostras inoculadas, sendo representados por 12 aminoácidos, entre eles 4 essenciais (isoleucina ( $p = 0,01077$ ; FC = 10,4940), leucina ( $p = 0,00492$ ; FC = 13,1730), fenilalanina ( $p = 0,00235$ ; FC = 11,9010) e valina ( $p = 0,01335$ ; FC = 5,5822)), carboidratos, e todos os ácidos orgânicos identificados.

A presença mais abundante de diversos compostos na cultivar ORS Premium após inoculação de patógeno leva a indícios que a planta está respondendo ao estresse (Seybold *et al.*, 2020). A começar pelos ácidos cítrico e ácidos succínico e  $\gamma$ -aminobutírico, que são precursores de citrato e succinato, respectivamente (Li *et al.*, 2021). Os aminoácidos também desempenham funções importantes, como a L-alanina que é precursora de piruvato, L-fenilalanina e L-tirosina precursoras de fumarato pelo metabolismo de aminoácidos aromáticos, L-isoleucina e L-valina precursoras de succinil-CoA e, por fim, mas não menos importante, L-lisina e L-leucina que são metabolizadas à acetil-CoA (Seybold *et al.*, 2020; Divon, 2007). É possível observar também que existem apenas 2 compostos significantes comuns para ORS Premium e ORS 1403 inoculadas, 4-cetoglutarato e ácido propanoico, o que apoia a hipótese de aumento da atividade do ciclo TCA pela cultivar que sofreu mais perdas de produtividade (ORS Premium).

Em condições ideais de crescimento e sem a exposição ao patógeno, as amostras das cultivares ORS 1403 e Premium mostraram diferenças nas abundâncias

de carboidratos, ácidos orgânicos e até mesmo em aminoácidos produzidos (Tabela 4). Entre os açúcares com diferenças significativas nas suas intensidades, a maioria é encontrado nas amostras da cultivar ORS 1403 (Figura 5).

Quando expostas ao patógeno, as amostras das duas variedades infectadas com o causador de brusone apresentaram diferenças apenas na abundância de ácidos orgânicos e alguns carboidratos (Tabela 5). A D-manose ( $p = 0,02575$ ;  $FC = 0,7457$ ), que antes se mostrava significativamente mais presente na cultivar ORS 1403, após a inoculação apresenta maior concentração na cultivar ORS Premium. O aumento desse carboidrato pode estar relacionado com a atividade antioxidante, como descrito por Hameed *et al.* (2008) que estudou a indução de apoptose em células da raiz do trigo causadas com o aumento da manose. Esse metabólito induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que regulam algumas enzimas antioxidantes presentes nas folhas da planta de trigo, as quais são tóxicas e levam a morte da célula vegetal (Hameed *et al.*, 2009; Rossi, 2012), fato que pode justificar a maior presença de injúrias nas folhas bandeira de ORS Premium inoculadas com *P. oryzae*, quando comparadas às demais uma vez que a resistência da planta está relacionada com a remoção de espécies reativas de oxigênio (Debona *et al.*, 2012).

## 6. CONCLUSÕES

No experimento sem inoculação de *P. oryzae* em sistema de cultivo irrigado, as variáveis analisadas, rendimento de grãos e peso hectolitro não se diferenciaram estatisticamente, demonstrando que as cultivares estudadas apresentam potencial de produtividade e qualidade industrial equivalentes nas condições os quais foram cultivados. No entanto após a inoculado com *P. oryzae* as cultivares apresentaram dois grupos com distinta resistência a *P. oryzae* se diferenciando estatisticamente em perda de produtividade e redução de qualidade industrial, correlacionada com severidade, onde as cultivares ORS 1403, ORS Absoluto, ORS Feroz, ORS Guardiã, ORS Soberano que apresentaram com menor severidade na folha bandeira (PH), obtiveram menor perda de rendimento de grãos e peso hectolitro, por outro lado as cultivares ORS Premium e ORS Senna apresentaram maior severidade na folha bandeira obtiveram maior perda de rendimento de grãos e peso hectolitro (PH) demonstrando o comportamento diferente de resistência das cultivares de trigo estudadas que possuem a translocação 2NS a infecção a *P. oryzae*. Essa diferença

de resistência a brusone fica evidente quando se compara através da análise metabolômica. As plantas de trigo das cultivares estudadas se diferenciaram quanto aos compostos e as intensidades com que foram encontrados, principalmente açúcares, e após a contaminação pelo fungo causador da brusone a intensidade desses compostos se modificaram. Na ORS 1403 as mudanças na intensidade e nos metabólitos ocorreu de forma leve enquanto na ORS Premium foram mudanças em muitos compostos e suas intensidades que relacionam com o resultado encontrado em campo, com significativa prevalência de ácidos orgânicos e carboidratos, indicando estes compostos como marcadores para identificação de severidade de patógenos.

## REFERÊNCIAS

- AKRAM, Muhammad. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 68, n. 3, p. 475-478, 2014.
- ANGRA, D. C.; PRESTES, A. M.; BARBOSA, M. M. **Avaliação de genótipos de *Agropyron sp* para resistência à ferrugem da folha do trigo**. Fitopatologia Brasileira, v. 19, p. 294, ago. 1994. Suplemento, ref. 165. Edição de Resumos do XXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Itajaí, SC, ago. 1994.
- ARENDDT, Pablo Fernando et al. **Resistência de genótipos de trigo a brusone**. 2006.
- BELL, G. D. H. **The history of wheat cultivation**. In: LUPTON, F. G. H. **Wheat breeding**. London: Chapman and Hall, p. 31-50, 1987.
- CARVALHO, André Mundstock Xavier de et al. SPEED Stat: a free, intuitive, and minimalist spreadsheet program for statistical analyses of experiments. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. e327420312, 2020.
- DANELLI, Anderson Luiz Durante et al. Pyricularia oryzae: virulência de isolamentos, densidade de conídios no ar e efeito do nitrogênio na suscetibilidade do trigo. 2015.
- DIVON, Hege H.; FLUHR, Robert. Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. **FEMS microbiology letters**, v. 266, n. 1, p. 65-74, 2007.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de **Pesquisa de Trigo**., 2021.
- FREITAS, Deisy dos Santos et al. NMR-based metabolomic analysis of Huanglongbing-asymptomatic and-symptomatic citrus trees. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 34, p. 7582-7588, 2015.
- GOULART, A. C. P.; PAIVA, F. de A. Perdas no rendimento de grãos de trigo causadas por Pyricularia grisea, nos anos de 1991 e 1992, no Mato Grosso do Sul. **Summa Phytopathologica**, v. 26, n. 2, p. 279-282, 2000.
- HAMEED, Amjad; IQBAL, Nayyer; MALIK, Salman A. New apoptotic effect of D-mannose in wheat roots. **Pak J Bot**, v. 40, p. 1609-1620, 2008.
- HAMEED, Amjad; IQBAL, Nayyer; MALIK, Salman A. Mannose-induced modulations in antioxidants, protease activity, lipid peroxidation, and total phenolics in etiolated wheat leaves. **Journal of plant growth regulation**, v. 28, p. 58-65, 2009.
- Hill, C. B.; Roessner, U. Metabolic profiling of plants by GC- MS. In The Handbook of Plant Metabolomics; Weckwerth, W., Kahl, G., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: **Weinheim, Germany, 2013**; pp 1-23.
- LEEGOOD, R. C. & SCHOLES, J. D. Metabolic changes following infection of leaves by fungi and viruses. In: GURR, S. J.; McPHERSON, M. J.; BOWLES, D. J. (ed.). Molecular Plant Pathology: A practical approach. Oxford, Oxford University Press, 1991, v. II, p.223-232

LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F. Hospedeiro: alterações fisiológicas induzidas por fitopatógenos. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**, 1995.

LEITE, Victor SA; REIS, Marcelo R.; PINTO, Frederico G. Untargeted Metabolomics Reveals Metabolic Changes Linked to Bulb Purpling in Garlic (*Allium sativum* L.). **ACS Food Science & Technology**, v. 1, n. 2, p. 242-248, 2021.

LI, Li et al. The versatile GABA in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 16, n. 3, p. 1862565, 2021.

MAC KEY, James. The boundaries and subdivision of the genus *Triticum*. **Proc. 12th Int. Bot. Congr., Leningrad**, p. 1-23, 1975.

NUNES-NESI, Adriano et al. Regulation of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle. **Current opinion in plant biology**, v. 16, n. 3, p. 335-343, 2013.

OU, Shu Huang. **Rice diseases**. IRRI, 1985.

REIS, Erlei Melo; DANELLI, Anderson Luiz Durante; ZOLDAN, Sandra. Brusone do trigo–ciclo da doença. 2013.

ROSSI, M. F.; COSTA, M. F. Mecanismo antioxidante em plantas. **10º mostra acadêmica UNIMEP. 10º**, 2012.

SAIA, Sergio et al. Metabolomics provides valuable insight for the study of durum wheat: a review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 11, p. 3069-3085, 2019.

SANTANA et al. **Eficiência de fungicidas para controle de brusone de trigo**, resultados dos ensaio cooperativos, safra 2019. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2020.

SEYBOLD, Heike et al. A fungal pathogen induces systemic susceptibility and systemic shifts in wheat metabolome and microbiome composition. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1910, 2020.