



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**FONTES DE RESISTÊNCIA AO OÍDIO EM GERMOPLASMA DE  
ERVILHA (*Pisum sativum*) E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS  
FÚNGICOS**

**PAULO ROBERTO PEREIRA**

**TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA/DF**

**MARÇO/2019**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**FONTES DE RESISTÊNCIA AO OÍDIO EM GERMOPLASMA DE  
ERVILHA (*Pisum sativum*) E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS  
FÚNGICOS**

**PAULO ROBERTO PEREIRA**

**ORIENTADOR: WARLEY MARCOS NASCIMENTO**

**BRASÍLIA/DF**  
**MARÇO/2019**



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

**FONTES DE RESISTÊNCIA AO OÍDIO EM GERMOPLASMA DE  
ERVILHA (*Pisum sativum*) E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS  
FÚNGICOS**

**PAULO ROBERTO PEREIRA**

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDO AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO  
DO GRAU DE DOUTOR EM AGRONOMIA.**

---

**WARLEY MARCOS NASCIMENTO, PhD (Orientador) / Embrapa Hortaliças / CPF:  
329.264.056-34 / E-mail: warley.nascimento@embrapa.br**

---

**PATRÍCIA PEREIRA DA SILVA, Dra. (Examinador Externo) / PNPd Embrapa  
Hortaliças / CPF: 828.966.901-15 / E-mail: patricia.pereira@colaborador.embrapa.br**

---

**RICARDO CARMONA, PhD. (Examinador Interno) / Universidade de Brasília / CPF:  
183.492.181-34 / E-mail: rcarmona@unb.br**

---

**LEONARDO SILVA BOITEUX, PhD (Examinador Externo) / Embrapa Hortaliças /  
CPF: 381.496.721-68 / E-mail: leonardo.boiteux@embrapa.br**

**BRASÍLIA/DF, 19 de MARÇO de 2019.**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo autor

P436f	Pereira, Paulo Roberto Fontes de resistência ao oídio em germoplasma de ervilha ( <i>Pisum sativum</i> ) e caracterização de isolados fúngicos / Paulo Roberto Pereira; orientador Warley Marcos Nascimento. -- Brasília, 2019. 90 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Brasília, 2019. 1. Melhoramento Genético. 2. Oídio. 3. Acessos. 4. Ervilha. I. Nascimento, Warley Marcos, orient. II. Título.
	CDU: 631/63

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

**PEREIRA, P. R. Fontes de resistência ao oídio em germoplasma de ervilha (*Pisum sativum*) e caracterização de isolados fúngicos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2019, 90 p. Tese de Doutorado.

## CESSÃO DE DIREITOS

**AUTOR:** PAULO ROBERTO PEREIRA

**TÍTULO DA TESE:** FONTES DE RESISTÊNCIA AO OÍDIO EM GERMOPLASMA DE ERVILHA (*Pisum sativum*) E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS

**GRAU:** DOUTOR                      **ANO:** 2019

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta Tese de Doutorado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta Tese de Doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

---

Paulo Roberto Pereira

CPF: 736.005.981-04. Cel.: +55 61 99199-2763. E-mail: paulorobertop19@hotmail.com

Endereço: Q511, Conjunto 16, Casa 07, Recanto das Emas-Df.

*Ao meu pai Artur Pereira da Costa  
e minha Mãe Maria das Dores dos Santos Pereira,  
por serem os melhores pais que Deus poderia colocar em minha vida.  
Ao seu amor incondicional e exemplo de vida,  
sempre me foram espelhos para saber como agir.*

DEDICO

*Ao meu filho Charles Henrique Pereira Rodrigues,  
por ser a razão da minha força, pelo carinho  
e amor proporcionado durante esses anos.*

OFEREÇO

## AGRADECIMENTOS

Início agradecendo ao meu orientador Dr. Warley Marcos Nascimento, por ser um grande profissional na área e que apesar da vida corrida, com muitos compromissos sempre deu todo suporte necessário além de confiança e autonomia para o desenvolvimento dos trabalhos de pesquisa e à Dra. Patrícia Pereira da Silva pela ajuda principalmente no início do desenvolvimento do trabalho. Muito obrigada!

Agradeço o Dr. Leonardo Silva Boiteux, por todo o tempo disponibilizado para elaboração e finalização deste trabalho, por sua compreensão e humanidade, por ser meu coorientador, por abrir as portas do laboratório de genômica e da sua casa, à Dra. Maria Esther, pela ajuda e aulas. A vocês, meu muito obrigado e minha gratidão.

Agradeço a equipe do laboratório de genômica que me ensinaram toda a parte prática e me auxiliaram, Chico, Getúlio, Greice e Rafaela, sem a ajuda desta equipe este trabalho não seria possível.

Agradeço à Embrapa Hortaliças pela oportunidade e o apoio que alguns de seus funcionários, Ari, Domingos, Valdir, Lourenço. Agradeço ainda à equipe do Laboratório de Sementes, Karlão (Meu brother), Marçal, e Jorge (in memorian), o estagiário Roney, a mestre Carol e aos colegas do doutorado Dr. Shara e Fabiana. A vocês, minha gratidão!

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro durante todo o período de Doutorado.

Agradeço em especial a Jane (Minha namorada), por entrar em minha vida em um momento conturbado, e me ajudar a dar a volta por cima, por todo apoio e suporte emocional.

Agradeço meu amigo Diego, que me ajudou em uma parte da avaliação do meu trabalho.

Agradeço às pessoas mais importantes da minha vida: Meu pai, Artur Pereira, exemplo de força e de trabalho, honestidade, nunca desiste do que quer. Minha mãe, Maria das Dores, mulher de força e fé incomparável, minha fonte de força e coragem. Ao meu filho Charles Henrique, razão do meu viver, por quem faço o que posso e o que não posso. A minha sobrinha Lara Emanuely, pequena gordinha que gosta de encher saco, mas é muito importante na minha vida. Aos meus irmãos Artur e Mateus. A vocês minha gratidão. A minha tia Dra. Elonha, pelas palavras certas na hora certa. A minha gratidão. A minha Avó, Belchiolina, a minha tia Terezinha, as minhas primas Jessica, Gabi e Sophia, a minha tia Gasparina, agradeço por toda oração e fé.

Agradeço à Universidade de Brasília por me proporcionar conhecer e conviver com poucas, porém, pessoas maravilhosas que levarei para a vida.

Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram não só com este trabalho, mas com tantas outras tarefas do dia-a-dia e não teria espaço para citar aqui.

Agradeço a Deus, pois foi dele que tirei toda força necessária para finalizar meu trabalho, sem o qual não teria conseguido.

**Grato a todos**

## LISTA DE GRÁFICOS

### CAPÍTULO I

<b>Gráfico 1.</b> Dados climatológicos da área experimental da Embrapa Hortaliças, utilizados durante o ensaio. Embrapa Hortaliças, Brasília–DF, 2017. ....	41
---	----



## LISTA DE QUADROS

### Capítulo I

**Quadro 1.** Lista dos 145 genótipos (acessos) de ervilha (*Pisum sativum* L.) do BAG da Embrapa Hortaliças, utilizados para as avaliações. Embrapa Hortaliças, Brasília–DF, 2017... 42

### Capítulo II

**Quadro 1.** Acessos de germoplasma de ervilha com respostas contrastantes para oídio em condições de campo em Brasília-DF, 2017 e 2018. .... 62

**Quadro 2.** Primers do tipo SCAR para ampliação de marcadores ligados aos genes *er1*, *er2* e *Er3* (TIMMERMAN *et al.* 1994; TIWARI *et al.* 1998; JANILA & SHARMA, 2004; FONDEVILLA *et al.* 2008).. .... 65

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Resultado da análise de solo da área experimental empregada para cultivo da coleção de germoplasma de ervilha (*Pisum sativum* L.). Profundidade de 0-20 cm. Embrapa Hortaliças, Brasília–DF, 2017..... 45

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância para a escala de notas (Nota) de 1 a 5 para Oídio Terço Baixo da Planta (NPOTB), Nota de 1 a 5 para Oídio Terço Médio da Planta (NPOTM), Nota de 1 a 5 para Oídio Terços Alto da Planta (NPOTA), Tipo de Folha (1 = Normal, 2 = Áfila e 3 = Semi-Áfila), Altura de Planta (cm) (AP), Peso / Parcela (g) (PP), Número de Plantas (NP), Dias até o Aparecimento da 1ª flor (DAF) e Duração do Florescimento (DF) de 145 acessos de ervilha (*Pisum sativum* L.). Brasília–DF, 2017..... 46

**Tabela 3.** Médias dos dados de nota de Nota de 1 a 5 para Oídio Terço Baixo da Planta (NPOTB), Nota de 1 a 5 para Oídio Terço Médio da Planta (NPOTM), Nota de 1 a 5 para Oídio Terço Alto da Planta (NPOTA), Altura de Planta (cm) (AP), Peso / Parcela (g) (PP), Número de Plantas (NP), Dias até o Aparecimento da 1ª flor (DAF) e Duração do Florescimento (DF) de 145 acessos de ervilha (*Pisum sativum* L.). Brasília–DF, 2017..... 47

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Análise da presença de fatores de resistência ao oídio em acessos contrastantes para reação ao oídio de ervilha através de marcadores moleculares ligados ao gene *er1*. ..... 66
- Figura 2.** Análise da presença de fatores de resistência ao oídio em acessos contrastantes para reação ao oídio de ervilha através de marcadores moleculares ligados ao gene *er2*. ..... 67
- Figura 3.** Análise da presença de fatores de resistência ao oídio em acessos contrastantes para reação ao oídio de ervilha através de marcador molecular ligado ao gene *Er3*. ..... 68

### CAPÍTULO III

- Figura 1.** Plantas de ervilha em campo infectadas com oídio (*Erysiphe pisi*) (A, B e C). Conídios isolados elipsoide-ovóide a doliforme (D, E e I), Conidióforos eretos (F, G e H). Célula pé (F e G). ..... 82
- Figura 2.** Agrupamentos filogenéticos de espécies de *Erysiphe* reportadas como agentes causais do oídio em leguminosas, incluindo isolados de campo que foram reportados infectado cultivares de ervilha (*Pisum sativum*) em Brasília-DF. .... 83

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>17</b>
	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>19</b>
	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>19</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1	Aspectos Gerais da Ervilha .....	20
2.2	O Oídio e o Principal Agente Causal – <i>Erysiphe pisi</i> .....	22
2.3	Marcadores Moleculares para Seleção de Cultivares de Ervilha Resistentes ao Oídio 24	
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>28</b>

### **CAPÍTULO I: IDENTIFICAÇÃO DE GERMOPLASMA DE ERVILHA RESISTENTE AO OÍDIO (*Erysiphe pisi*) NO DISTRITO FEDERAL**..... **34**

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL &amp; MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
2.1	Condições Experimentais .....	39
2.2	Fonte de Inóculo e Critérios Adotados para Avaliar a Reação de Acessos de Ervilha ao Oídio .....	40
<b>3</b>	<b>RESULTADOS &amp; DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>53</b>

### **CAPÍTULO II: EMPREGO DE MARCADORES MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DOS GENES *er1*, *er2* e *Er3* EM GERMOPLASMA DE ERVILHA AVALIADO PARA RESISTÊNCIA AO OÍDIO NAS CONDIÇÕES BRASILEIRAS** . **57**

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>62</b>
2.1	Obtenção de Material Genético .....	62
2.2	Extração e Quantificação do DNA Genômico .....	62
2.3	Análise com Marcadores Moleculares .....	63
2.3.1	Marcadores RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”).....	63
2.3.3	Marcadores SCAR (“Sequence Characterized Amplified Region”) .....	64
<b>3</b>	<b>RESULTADOS &amp; DISCUSSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>69</b>

<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>69</b>
	<b>CAPÍTULO III: CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS CAUSADORES DE OÍDIO EM</b>	
	<b>ACESSOS D <i>EPisum sativum</i> L. PREVIAMENTE REPORTADOS COMO</b>	
	<b>RESISTENTES NAS CONDIÇÕES BRASILEIRAS</b> .....	<b>74</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL &amp; MÉTODOS</b> .....	<b>78</b>
2.1	Caracterização Morfológica e Morfométrica .....	79
2.2	Caracterização molecular dos isolados .....	79
2.3	Análise das Sequências .....	80
2.4	Patogenicidade dos Isolados Fúngicos Obtidos .....	81
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>81</b>
3.1	Caracterização Morfológica .....	81
3.2	Caracterização Molecular .....	83
3.3	Teste de Patogenicidade .....	84
4.	DISCUSSÃO .....	84
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>86</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>86</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>89</b>

## RESUMO GERAL

A ervilha (*Pisum sativum* L.; família Fabaceae) é uma leguminosa de inverno de grande importância econômica no Brasil e no mundo. O oídio (causada por espécies do gênero *Erysiphe*) é uma doença importante nas condições brasileiras, afetando folhas, caules e vagens e resultando em consideráveis perdas de produção. O uso de variedades resistentes é a medida de controle mais efetiva e sustentável. Até o presente momento, dois genes recessivos (*er1* & *er2*) e um gene dominante (*Er3*) foram identificados para resistência ao oídio em germoplasma de ervilha. Marcadores moleculares têm sido utilizados em diferentes programas de melhoramento de ervilha, proporcionando uma maior eficiência no processo de seleção e reduzindo o tempo para a incorporação destes três fatores de resistência ao oídio em diferentes materiais genéticos. Os objetivos do presente trabalho foram: (1) avaliar 145 acessos de ervilha em busca de novas fontes de resistência ao oídio nas condições brasileiras; (2) confirmar (através do emprego de marcadores moleculares) a presença dos loci de resistência *er1*, *er2* & *Er3* no germoplasma avaliado e (3) identificar/caracterizar os isolados fúngicos que foram capazes de “quebrar” a resistência de acessos de ervilha previamente identificados como fontes de resistência a essa doença no Brasil. A avaliação do germoplasma de ervilha para reação ao oídio foi conduzida sob condições de inóculo natural em 2017, na Embrapa Hortaliças, Brasília–DF, Brasil. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com 145 tratamentos (= acessos de *P. sativum*) e duas repetições (20 plantas cada). As plantas foram classificadas para a reação ao oídio empregando uma escala visual de notas de 1 a 5. Foram também avaliadas as seguintes características: (1) tempo para o início do florescimento; (2) altura das plantas; (3) tipo de folha; (4) cor da flor; (5) rendimento de grãos; (6) número final de plantas (*stand*); (7) dias até o florescimento e (8) duração do florescimento. Um subgrupo de acessos com resposta diferencial ao oídio também foi avaliado empregando seis marcadores moleculares (dois RAPDs e quatro SCARs) ligados aos três loci de resistência previamente descritos em ervilha (*er1*, *er2* & *Er3*). O acesso CNPH-144 = MK 13 (cultivar de ervilha de vagens comestíveis) apresentou os maiores níveis de resistência ao agente causal do oídio no Distrito Federal. Com base na avaliação com os marcadores moleculares, foi possível identificar que o acesso MK13 possui uma pirâmide de dois genes de resistência (*er1* + *er2*). De fato, os acessos com os maiores níveis de resistência ao oídio, sob essas condições de avaliação, foram aqueles portadores do gene *er2*. Acessos previamente identificados como resistentes ao oídio na região central do Brasil, tais como: ‘Triofin’ e ‘Kodama’, se mostraram como altamente

suscetíveis aos isolados de campo. De acordo com as análises de marcadores moleculares, 'Triofin' e 'Kodama', possuem a combinação dos genes *er1* + *Er3*, mas não o gene *er2*. Os elevados níveis de suscetibilidade desses dois acessos indicam a presença potencial de isolados fúngicos com perfil de virulência distinto daqueles prevalentes em décadas anteriores no Brasil Central. Estudos de filogenia usando a informação de sequência da região genômica rDNA-ITS de quatro isolados fúngicos causadores de oídio revelaram que aqueles capazes de "quebrar" a resistência de 'Triofin' e 'Kodama', pertencem à espécie *Erysiphe pisi*. Os resultados do presente estudo fornecem novas informações sobre a reação de cultivares, a presença de fatores de resistência distintos na coleção brasileira de germoplasma de ervilha, bem como a presença de isolados fúngicos com distintos padrões de virulência. Essas informações servirão de base para o planejamento dos programas de melhoramento genético da ervilha visando o desenvolvimento de cultivares com resistência mais estável e duradoura ao oídio.

**Palavras-chave:** *Pisum sativum*, Severidade, Acessos, Fabaceae, PCR, RAPD, Filogenia fúngica.

## GENERAL ABSTRACT

The pea (*Pisum sativum* L.) is a winter legume of great economic importance in Brazil and across the world. Powdery mildew (caused by *Erysiphe* species) is an important disease under Brazilian conditions, affecting leaves, stems and pods and causing significant yield losses. The employment of resistant varieties is the most effective and sustainable control measure. To date, two recessive genes (*er1* and *er2*) and a dominant gene (*Er3*) have been identified for resistance to powdery mildew in pea germplasm. Molecular markers have been used in different pea breeding programs, providing greater efficiency in the selection process and reducing the time for the incorporation of these three powdery mildew resistance factors into the same genetic background. The objectives of the present work were: **(1)** to evaluate 145 pea accessions in search for new sources of resistance to powdery mildew under Brazilian conditions; **(2)** to confirm (via molecular markers) the presence of the powdery mildew resistance loci *er1*, *er2* and *Er3* in the evaluated germplasm and **(3)** to characterize the fungal isolates that were able to breakdown the resistance in accessions previously identified as sources of resistance to this disease in Brazil. The germplasm evaluation for the reaction to powdery mildew was conducted under natural inoculum conditions in 2017 at Embrapa Vegetable Crops in Brasília–DF, Brazil. The experimental design was a randomized block design with 145 treatments (= *P. sativum* accessions) and two replications (20 plants each). The plants were classified for the reaction to powdery mildew using a visual scale from 1 to 5 grades. The following traits were also evaluated: **(1)** time to start flowering; **(2)** plant height; **(3)** leaf type; **(4)** flower color; **(5)** grain yield; **(6)** final number of plants (stand); **(7)** days until flowering, and **(8)** duration of flowering. A subgroup of accessions with differential response to powdery mildew was also evaluated using six molecular markers (two RAPDs and four SCARs) linked to the three resistance loci previously described in peas (*er1*, *er2*, and *Er3*). The accession CNPH-144 = MK 13 (pea cultivar with edible pods) displayed the highest levels of resistance to the causal agent of powdery mildew in the Federal District. Based upon the evaluation with the molecular markers, it was possible to identify that MK13 has a pyramid of two resistance genes (*er1* + *er2*). In fact, the accessions displaying the highest levels of resistance to powdery mildew under these evaluation conditions was the ones carrying the *er2* gene. Accessions previously identified as resistant to powdery mildew in the Central Brazil region such as: ‘Trio-fin’, and ‘Kodama’ were found to susceptible to field isolates. According to the molecular marker analyses, ‘Trio-fin’,



and 'Kodama' have a combination of *er1* + *Er3* genes, but not the *er2* gene. The high levels of susceptibility of these two accessions indicate the potential presence of fungal isolates with a virulence profile distinct from those prevalent in previous decades in Central Brazil. Phylogenetic studies employing the using sequence information from the rDNA-ITS genomic region of the fungal isolates revealed that the ones capable of 'breaking-down' the resistance of 'Trio-fin', and 'Kodama' belong to the species *Erysiphe pisi*. The present study provides new information on cultivar reaction, presence of distinct resistance factors in the Brazilian germplasm collection as well as the presence of fungal isolates with distinct virulent patterns. This information will serve as a basis for the planning of the pea breeding programs aimed at the development of cultivars with more stable and durable resistance to powdery mildew.

**Key-words:** *Pisum sativum*, Fabaceae, PCR, RAPD, Severity, Accessions, Fungal Phylogeny.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A ervilha (*Pisum sativum* L.; família Fabaceae) é uma espécie leguminosa anual de inverno, diploide ( $2n=2x=14$ ) e de grande importância econômica e nutricional (REHMAN *et al.*, 2014, NASCIMENTO *et al.*, 2016). Em geral, a ervilha tem sido cultivada em regiões de clima temperado, mas também pode ser explorada nos trópicos, desde que o cultivo em altitudes elevadas possa compensar latitudes desfavoráveis. A ervilha é muito tolerante a baixas temperaturas, embora possa ser prejudicada por geadas, principalmente na fase de florescimento e de formação de vagens (REIS, 1989; CARVALHO *et al.*, 2012).

Apresenta alto valor nutritivo, semelhante a outras leguminosas do tipo *pulse*, contendo valores médios entre 18–30 % de proteína, 35–50 % de amido e 4–7% de fibra. As proteínas da ervilha são deficientes em aminoácidos contendo enxofre, mas contêm níveis relativamente altos de lisina, tornando-se uma excelente fonte deste nutriente (PEREIRA, 1989; MCPHEE, 2003). As ervilhas de grãos exibem, normalmente, flores brancas, as vagens são fibrosas (não comestíveis) e apresentam porte determinado. As cultivares com vagens comestíveis apresentam flores roxas ou brancas e são de crescimento indeterminado, necessitando tutoramento (FILGUEIRA, 2008).

O oídio ou míldio pulverulento (causado por *Erysiphe pisi* D.C. e por outras espécies do gênero *Erysiphe*) afeta folhas, caule e vagens da ervilha, atingindo com maior intensidade as plantas mais velhas e órgãos mais velhos. Essa doença é favorecida pelo tempo seco e noites de temperaturas amenas, podendo reduzir drasticamente a produtividade e qualidade dos grãos. O sintoma inicial se caracteriza pelo aparecimento de pequenos pontos descoloridos na superfície superior das folhas mais velhas. Estes pontos correspondem ao início de formação de colônias fúngicas que evoluem até alcançar extensas áreas cobertas por um míldio (esporulação) de coloração branca na face superior das folhas (REILING, 1984; EK *et al.* 2005; FONDEVILLA *et al.*, 2011; GHAFOR & MCPHEE, 2012). A expansão da área afetada pela doença pode causar a seca e morte das folhas. O oídio é uma doença que afeta preferencialmente cultivares de ervilha de ciclo longo (maturação tardia) e pode causar redução de até 50% na produção (REHMAN *et al.*, 2014). Essas perdas podem atingir até 80% em cultivares suscetíveis sob condições de forte pressão de inóculo (SMITH *et al.* 1996; GHAFOR & MCPHEE, 2012). A severidade da doença é intensificada pelo clima seco, baixa precipitação e baixa umidade relativa durante o período de cultivo. Essas condições climáticas

são muito similares as observadas no Brasil Central e favorecem o desenvolvimento da doença em cultivos de ervilha conduzidos nessa região (SANTOS *et al.*, 1991).

O controle químico, manejo cultural e a utilização de cultivares resistentes, têm sido as principais formas de controle do oídio em ervilha (SANTOS *et al.*, 1991). Do ponto de vista ecológico e econômico, o melhoramento genético voltado para resistência ao oídio representa um fator de incremento nos níveis de sustentabilidade da cultura (HANAI, 2001). Outro fator positivo da resistência genética é a sua importância como um fator mitigador do uso mais intensivo de fungicidas, especialmente aqueles com a propriedade de inibir a síntese de ergosterol nas células fúngicas. Esse grupo de fungicidas, embora de grande eficiência, apresenta um maior risco de selecionar isolados fúngicos com resistência a esses princípios ativos (GUIMARÃES & SANTOS, 1991; HANAI, 2001; CAO *et al.*, 2011). Neste cenário, o emprego de variedades com resistência genética se constitui na maneira ideal para diminuir as perdas de produção, sem a necessidade do uso alternativo de fungicidas contra *E. pisi*. De fato, o emprego de variedades resistentes contra o oídio é considerado como a medida de controle mais efetiva (SANTOS *et al.*, 1991).

No entanto, isolados de *Erysiphe* spp. capazes de “quebrar” a resistência de alguns dos fatores de resistência empregados no melhoramento genético da ervilha têm sido reportados em diferentes regiões produtoras (SCHROEDER, 1965; FONDEVILLA *et al.*, 2013). Desta forma, existe a necessidade de uma permanente busca e exploração do germoplasma de ervilha por novas fontes de resistência com mais amplo espectro de eficiência contra uma ampla gama de variantes dos agentes causais do oídio da ervilha (REHMAN *et al.*, 2014). Para aumentar a eficiência dessa busca, marcadores moleculares têm sido utilizados em diferentes programas de melhoramento devido ao incremento na eficiência de seleção e reduzindo o tempo para a introgressão de genes de resistência.

Através de estudos de herança e de mapeamento genético, dois genes recessivos (*er1* e *er2*) e um gene dominante (*Er3*) foram identificados para resistência ao fungo *E. pisi* em germoplasma de ervilha (HARLAND 1948; HERINGA *et al.*, 1969; FONDEVILLA *et al.*, 2007). O gene de resistência ao oídio *er1* foi localizado no grupo VI da ligação da ervilha e foi identificado pelo sistema de marcadores RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA*). A região amplificada pelo RAPD foi posteriormente caracterizada via sequenciamento e transformada em um marcador do tipo SCAR (*Sequence characterized amplified region*). Marcadores de repetição de sequência simples (SSR) estreitamente ligados ao gene também foram identificados (TIMMERMAN *et al.* 1994; TIWARI *et al.*, 1998; JANILA & SHARMA,

2004; EK *et al.*, 2005). Embora o gene *er2* esteja caracterizado desde o final da década de 1960 (HERINGA *et al.*, 1969), esse fator recebeu relativamente pouca atenção dos programas de melhoramento genético de ervilha. Ainda assim, trabalhos com esse gene não foram descontinuados e TIWARI *et al.* (1998) identificaram marcadores AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) com distâncias do locus *er2* variando de 5 a 12 cM. KATOCH *et al.* (2010) também relataram o mapeamento genético do gene/locus *er2*, confirmando a sua localização genômica.

Mais recentemente, o primeiro locus dominante de resistência ao *E. pisi* foi identificado em acessos de *P. fulvum* (ervilha silvestre), sendo denominado como *Er3* (FONDEVILLA *et al.*, 2007; 2008). Dois marcadores SCAR foram desenvolvidos por FONDEVILLA *et al.* (2008; 2011) que permitem a detecção molecular do locus *Er3* em populações oriundas de diferentes *backgrounds* genéticos, possibilitando assim um rastreio preciso e em grande escala deste fator de resistência em programas de melhoramento de ervilha.

Neste contexto, identificar novas fontes de resistência ao oídio nas condições brasileiras é uma ação de pesquisa necessária visto que essas informações poderão contribuir para o desenvolvimento de cultivares com resistência mais durável, contribuindo, desta forma, para o estabelecimento de um sistema de produção mais eficiente e menos oneroso a melhoristas e posteriormente a produtores.

## **OBJETIVO GERAL**

Avaliar um subgrupo de acessos do banco de germoplasma de ervilha (*Pisum sativum*) da Embrapa Hortaliças visando confirmar e/ou identificar fontes de resistência ao oídio nas condições brasileiras.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificação (através do uso de uma escala diagramática) de germoplasma de ervilha com resistência ao agente causal do oídio no Distrito Federal.
- Empregar marcadores moleculares para identificação dos genes de resistência *er1*, *er2* & *Er3* em germoplasma de ervilha avaliado para a reação ao oídio nas condições brasileiras.

- Caracterizar via morfologia e molecularmente, isolados causadores de oídio em acessos de *Pisum sativum* L. previamente reportados como resistentes ao fungo *Erysiphe pisi*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos Gerais da Ervilha

A ervilha (*Pisum sativum* L.) é uma espécie leguminosa anual de inverno, que tem sido muito cultivada em regiões de clima temperado, para produção de grãos secos ou verdes para consumo humano e animal. A planta é originária do continente Europeu e de regiões da Ásia, mas adaptou-se muito bem na região sul do Brasil e posteriormente nas condições do Cerrado (Brasil Central). No Cerrado, essa cultura apresentou melhor adaptação do que em qualquer outra região do país (FILGUEIRA, 2008). A ervilha pertence à família Fabaceae e ao gênero *Pisum*, que é constituído por apenas duas espécies diploides ( $2n=2x=14$ ): a espécie cultivada *P. sativum* e a espécie silvestre *P. fulvum* (HOEY *et al.*, 1996). A espécie *P. sativum* engloba as variedades botânicas *P. sativum* var. *sativum* e *P. sativum* var. *arvense*, ambas utilizadas na agricultura comercial. A variedade botânica *P. sativum* var. *sativum* apresenta flores brancas e sementes de cor verde ou amarela e a variedade botânica *P. sativum* var. *arvense* apresenta flores violetas e sementes coloridas (SCHIAVON *et al.*, 2018).

A ervilha é uma leguminosa altamente nutritiva, rica em proteína bruta, alcançando  $\approx 22\%$  da massa total do grão (TOMM & LIMA, 2000). Em sua composição encontramos também fósforo, cálcio e ferro, luteína,  $\beta$ -caroteno e violaxantina, a pró-vitamina A, vitaminas do complexo B (especialmente B1 e B2) e a vitamina C (PEREIRA, 1989; CARVALHO, 2007). Reconhecida como alimento de elevada qualidade desde épocas remotas, a ervilha foi consumida em forma de grãos secos (inteiros ou moídos) por um longo tempo. Só a partir do século XVIII é que a ervilha verde (recém colhida) passou a ser utilizada na alimentação humana. Entretanto, a cultura se destaca por ter múltiplos propósitos, pois pode ser utilizada na cobertura de solo, adubação verde, fixação de nitrogênio, na alimentação humana, como também para produção de forragem para alimentação de animais e na produção de silagem (SCHIAVON *et al.*, 2018).

A produção global de ervilha seca foi de 34,24 milhões de toneladas em 2016 (TRIDGE, 2016). De acordo com os dados de 2016, a China apresenta a maior parcela da produção mundial de ervilhas secas com 39,1 % (13,4 milhões de toneladas), seguido da Índia

17% (5,8 milhões de toneladas), Canadá 13,6% (4,67 milhões de toneladas), o continente Europeu com 15,1% (5,19 milhões de toneladas), África 1,6% (545 mil toneladas) e a Oceania com 1% (331 mil toneladas) (TRIDGE, 2016). A ervilha seca foi segunda *pulse* mais exportada em termos globais em 2015. A exportação de ervilhas secas, que foi de 31 mil toneladas em 2013, aumentou em 2014 para 24 mil toneladas. Em 2015, a exportação de ervilhas secas subiu para 62 mil toneladas, mas diminuiu em 2016 para 46 mil toneladas (MILLERMAGAZINE, 2016).

O Brasil tem uma participação ainda inexpressiva no mercado mundial de ervilhas. A área plantada em 2017 foi de apenas 1117 hectares, sendo Minas Gerais o estado com maior área plantada (542 hectares), seguido do Rio Grande do Sul (479 hectares), Paraná (54 hectares), Distrito Federal (32 hectares) e São Paulo (10 hectares) (IBGE, 2018). Segundo a CEAGESP, a maior oferta de ervilha ocorre no período de junho a outubro. A CEAGESP-SP registrou de janeiro a julho do ano de 2010 a comercialização de 1092 toneladas de ervilha vagem (AGRIANUAL, 2011).

A cultura da ervilha para grãos adapta-se melhor, no centro sul do país, em regiões serranas ou de planalto, com altitudes superiores a 700 metros (GIORDANO, 1997; FILGUEIRA, 2008), sendo as temperaturas ótimas às compreendidas entre 12 e 18° C, com máximas de 21 a 24° C e mínimas de 7°C. Temperaturas consecutivas, superiores a 30° C, resultam em decréscimo do rendimento, pois pode prejudicar a qualidade dos grãos, por favorecer a transformação dos açúcares em amido (REIS, 1989).

O Planalto Central (que compreende o Distrito Federal e parte dos Estados de Goiás e Minas Gerais) apresenta condições edafoclimáticas que possibilitam, com auxílio de irrigação, o cultivo da ervilha durante os meses de inverno. Porém, nos estádios finais de desenvolvimento da planta há uma menor exigência de água, devendo a mesma ser reduzida. Chuvas por ocasião da colheita provocam a descoloração ou amarelecimento dos grãos, prejudicando a qualidade do produto destinado à reidratação (GIORDANO, 1997). A necessidade de água no cultivo da ervilha varia principalmente em função das condições climáticas predominantes e do ciclo da cultivar. As cultivares de ciclo longo (110 a 120 dias) consomem de 300 a 500 mm de água ao longo do ciclo fenológico, enquanto as precoces consomem entre 200 e 400 mm (GIORDANO, 1997).

Apesar de tolerar baixas temperaturas, a geada pode prejudicar as flores e a formação das vagens (GIORDANO; REIFSCHNEIDER, 1984). Chuvas na época da colheita comprometem a qualidade dos grãos, ocasionando descoloração (FILGUEIRA, 2008). A

umidade do ar não afeta diretamente o rendimento dos grãos, mas o fotoperíodo longo e alta intensidade luminosa são favoráveis a cultura (REIS, 1989).

A ervilha é uma planta anual herbácea com hábito de crescimento indeterminado. A raiz é profunda podendo atingir cerca de 1 a 1,50 m, com muitas raízes secundárias. Possui nódulos nas raízes onde fixa o nitrogênio atmosférico por ação da simbiose que estabelece com a bactéria *Rhizobium leguminosarum*. Os caules possuem altura variável entre os 25 cm e os 3 metros; também possuem entrenós com diferentes comprimentos podendo variar entre os 5 cm e 50 cm. As folhas são alternas, compostas por folíolos ovais ou elípticos, inteiros ou dentados. A inflorescência é axilar, solitária ou em racimo floral de 2 ou 3 flores, de cor branca ou violeta com um pedúnculo de tamanho variável. A fecundação é autogâmica, regida por um mecanismo de cleistogamia que controla a deiscência das anteras no interior das flores, resultando em imediata auto-fecundação (GRITTON, 1986; SCHIAVON *et al.*, 2018).

A ervilha é uma planta de dias longos, que, na região Sul, é semeada no fim do outono (junho) para ser colhida no fim da primavera, dependendo do ciclo da cultivar (CAMPOS, 2014). A cultura está adaptada a regiões de clima seco, desde que a precipitação não seja inferior a 400 mm, no entanto, prefere climas temperados e requer condições úmidas e frias para a germinação. A temperatura média ótima para o seu desenvolvimento situa-se entre 13° e 18°C. A produção pode ser afetada negativamente se durante a floração e a frutificação ocorrerem temperaturas altas ou se, durante a primavera, ocorrerem geadas (JEUFFROY *et al.*, 1990; NEY, 1994).

As variedades de ervilha podem ser classificadas em três grupos de acordo com a precocidade da maturação (GRITTON, 1986). Assim, as variedades precoces necessitam de 1.150 a 1.200 graus-dia acumulados para atingirem a maturação; já as variedades tardias cerca de 1.550 graus-dia, e as variedades semi-tardias ou semi-precoces necessitam de valores que se situam no intervalo entre 1.200 e 1.550 graus-dia (GRITTON, 1986). As variedades precoces apresentam a primeira flor entre o 8° e 9° nó e as variedades tardias por volta do 13° ao 15° nó.

## **2.2 O Oídio e o Principal Agente Causal – *Erysiphe pisi***

Os fungos responsáveis pelo oídio (ou míldio pulverulento) da ervilha são ascomicetos pertencentes à ordem *Erysiphales*. Esta ordem contém apenas a família *Erysiphaceae* que é constituída por cinco tribos: *Erysipheae*, *Golovinomycetinae*,

*Cystothecaceae*, *Phyllactinieae* e *Blumerieae* (HÜCKELHOVEN, 2005; KIMATI *et al.*, 2005). Estes fungos são parasitas obrigatórios que invadem apenas as células da epiderme. Após o aparecimento dos esporos na superfície dos tecidos vegetais, os fungos precisam penetrar a cutícula e a parede celular da planta hospedeira. Para que a penetração ocorra é necessária a formação de apressórios que penetram na parede celular, desenvolvendo-se mais tarde, estruturas denominadas haustórios que se localizam dentro das células epidérmicas (SMITH *et al.*, 1996). Os haustórios transferem da planta hospedeira os nutrientes necessários para desenvolvimento do fungo (IGLESIAS-GARCÍA *et al.*, 2015).

Vários outros agentes causais do oídio já foram relatados em leguminosas incluindo: *E. difusa* (oídio-da-soja), *E. glycines*, *E. astragali*, *E. bremeri* e *E. trifoliorum* (BAISWAR *et al.*, 2015). No entanto, na ervilha, a principal espécie fúngica associada com essa doença é *Erysiphe pisi* D.C. (FONDEVILLA *et al.*, 2011). Este patógeno infecta células epidérmicas de folhas, caule e vagens, atingindo as plantas mais velhas com maior intensidade. A doença é favorecida pelo tempo seco e noites frescas, podendo reduzir drasticamente a produtividade. O sintoma inicial é o aparecimento de pequenos pontos descoloridos na superfície superior das folhas mais velhas. Estes pontos evoluem até alcançar extensas áreas com um míldio branco típico, quase sempre na face superior das folhas, até causar a seca e morte das folhas (REILING, 1984; EK *et al.*, 2005; SANTOS, 2010; FONDEVILLA *et al.*, 2011; GHAFOR & MCPHEE, 2012).

A doença prevalece principalmente durante a maturação tardia e em ervilhas de ciclo longo, podem causar redução na produção de até 50% (REHMAN *et al.*, 2014). Perdas na produção podem chegar até 80% sob forte pressão de infecção em cultivares altamente suscetíveis (SMITH *et al.* 1996; GHAFOR & MCPHEE 2012). A doença é mais intensificada devido ao clima seco, baixa precipitação e umidade relativa durante o período de cultivo, condições essas que favorecem o desenvolvimento da doença no Brasil Central. As correntes de ar espalham o fungo localmente e também por distâncias mais longas, enquanto a chuva reduz a incidência da doença lavando os esporos da superfície foliar para o solo e/ou fazendo com que eles estourem/colapsem ao invés de germinarem (HAGEDORN, 1989). Além disso, a liberação de uma massa grande de esporos (observadas em grandes epidemias) pode causar reações respiratórias alérgicas em trabalhadores rurais (EK *et al.*, 2005).

Para prevenir propagação do oídio, os agricultores costumam usar diferentes classes de fungicidas (KRAFT & PFLEGER, 2001). No entanto, a estratégia mais eficiente e mais sustentável para o controle desse fungo biotrófico é o uso de cultivares resistentes. De



fato, o controle de doenças através da resistência genética inerente à planta reduz a dependência de fungicidas dispendiosos, minimizando as suas ameaças potenciais ao meio ambiente e aos consumidores. Portanto, a resistência genética ao oídio é um componente vital na produção sustentável da ervilha (IGLESIAS-GARCÍA. R. *et al.*, 2015).

A base genética da resistência ao oídio na maioria dos cultivares de ervilha é do tipo monogênica (= qualitativa), sendo governada por um único gene/locus ou por poucos genes. Essa característica monogênica pode ocasionar uma maior pressão de seleção sobre o patógeno em termos de selecionar populações fúngicas com novos fatores de virulência. Ainda assim, a resistência qualitativa tem sido preferencialmente empregada em programas de melhoramento, pois pode ser facilmente incorporada em materiais genéticos de interesse através de estratégias simples via retrocruzamentos (MATIELLO *et al.*, 1997; FONDEVILLA *et al.*, 2008.; SANTOS, 2010).

Os três genes/loci de resistência ao oídio descritos até o presente momento em ervilha (*er1*, *er2* e *Er3*) têm se mostrado, com algumas poucas exceções, eficazes contra grande parte dos isolados de *E. pisi*. No entanto, mais recentemente, foi demonstrado que isolados de uma outra espécie fúngica (*E. trifoliorum*) se mostraram capazes de superar a resistência conferida pelos genes *er1* e *Er3* na Índia e na Espanha (FONDEVILLA *et al.* 2013). Esses isolados com perfil de virulência diferenciado estão amplamente distribuídos no mundo, onde existem fortes evidências da presença de raças fisiológicas de *E. pisi* (SCHOROEDER & PROVVIDENTI, 1965; SANTOS, 2010). Essa informação confirma o que alguns autores já haviam discutido, de que o oídio é um patógeno que possui alguns isolados mais virulentos que outros (TIWARI *et al.*, 1997). Esses estudos demonstram que reconhecer de maneira precisa a identidade do patógeno é um importante fator para o desenvolvimento de variedades com resistência durável (BAISWAR *et al.*, 2015).

### **2.3 Marcadores Moleculares para Seleção de Cultivares de Ervilha Resistentes ao Oídio**

O controle genético e o mecanismo de ação dos três genes de resistência foram estudados em acessos de ervilha (FONDEVILLA *et al.*, 2007; IGLESIAS-GARCÍA *et al.*, 2015). O gene *er1* confere uma resposta do tipo imune ou de alto nível de resistência, impedindo a penetração de isolados de *E. pisi* nas células epidérmicas da ervilha. Em contraste, a resistência conferida pelos genes *er2* e *Er3* é controlada, principalmente, por uma resposta

hipersensível que é desencadeada após a penetração (FONDEVILLA *et al.*, 2007). Contudo, a resistência completa resultante de *er2* se manifesta apenas a 25 °C ou em folhas com completa maturação. Além disso, a resistência ao oídio regulada pelo gene *er2* se mostrou específica para determinadas regiões geográficas (HERINGA *et al.* 1969; TIWARI *et al.*, 1997; VAID & TYAGI, 1997; FONDEVILLA *et al.*, 2006).

Marcadores moleculares baseados em DNA fornecem ferramentas poderosas para identificar e mapear genes e também podem ser usados para seleção assistida por marcadores (SAM). Os genes *er1*, *er2* e *Er3* foram identificados e mapeados em ervilha através de marcadores moleculares ligados a esses fatores (DIRLEWANGER *et al.*, 1994; TIMMERMAN *et al.* 1994; TIWARI *et al.*, 1998; JANILA & SHARMA 2004; EK *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2010; TONGUC & WEEDEN, 2010; SRIVASTAVA *et al.*, 2012).

Os genes *er1* e *er2* foram mapeados nos grupos de ligação VI e III, respectivamente (DIRLEWANGER *et al.*, 1994; TIMMERMAN *et al.*, 1994; KATOCH *et al.*, 2010). Por sua vez, o gene *Er3* foi localizado em um acesso desconhecido de ervilha estando ligado aos marcadores Scw4637 e OPAG05\_1240 (FONDEVILLA *et al.*, 2008). O gene *er1* é amplamente incorporado em um grande número de acessos e cultivares de ervilha (TIWARI *et al.*, 1997; VAID & TYAGI, 1997; LIU *et al.*, 2003; FONDEVILLA *et al.*, 2006). Além disso, existem poucos relatos descrevendo a “quebra” da resistência conferida por *er1*, indicando que esse fator pode fornecer resistência estável e durável ao oídio (TIWARI *et al.*, 1997; FONDEVILLA *et al.*, 2006; LAHOZ *et al.*, 2013).

Abordagens genômicas mais adequadas para usar em diferentes aspectos de biologia molecular e no melhoramento genético para resistência a estresses bióticos e abióticos, necessitam ser sempre criticamente avaliadas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). O emprego de estratégias de Seleção assistida por Marcador, para identificar linhagens resistentes contra o oídio em ervilha se justifica uma vez que essa seria a maneira mais simplificada de “piramidizar” em um único material genético todos os três fatores de resistência descritos (*er1*, *er2* e *Er3*). Os marcadores moleculares baseados em PCR são mais atraentes para a MAS porque é necessário apenas uma pequena quantidade de DNA e estas estratégias podem ser eficientemente aplicadas em grandes populações segregantes. A natureza dominante dos marcadores AFLP e RAPD impedem a identificação de indivíduos heterozigotos em populações segregantes. Por outro lado, a natureza codominante dos marcadores microsatélites e SCAR permite a detecção de indivíduos heterozigotos. A melhor combinação é encontrar marcadores codominantes funcionais (dentro do próprio gene) (HUANG & RODER, 2004).

Até agora, vários marcadores funcionais específicos ligados aos três genes de resistência foram desenvolvidos que podem facilitar a MAS no melhoramento da ervilha (TIMMERMAN *et al.*, 1994; TIWARI *et al.*, 1998; FONDEVILLA *et al.*, 2008; GANOPOULOS *et al.*, 2018).

Dois genes recessivos para resistência a *Erysiphe pisi* (*er1* & *er2*) foram descritos em acessos de ervilha cultivada, enquanto que um gene dominante (*Er3*) foi identificado em um acesso de ervilha selvagem (FONDEVILLA *et al.*, 2007). Todos três genes são independentes (isto é, se localizam em diferentes cromossomos).

O gene *er1* tem sido amplamente utilizado em programas de melhoramento, no entanto a eficiência desse gene tem sido ameaçada pela introdução de novos agentes causais do oídio (ONDREJ *et al.*, 2005; ATTANAYAKE *et al.*, 2010). Marcadores moleculares (RFLP, RAPD / SCAR e SSR) ligados aos genes *er1* e *er2* estão disponíveis. Recentemente foi demonstrado que o gene *er1* é, de fato, um membro da família de genes *mlo*, comumente usados em programas de melhoramento para resistência a oídio em diferentes plantas cultivadas (PEREIRA & LEITÃO, 2010).

Por sua vez, o gene *er2* não tem sido amplamente utilizado no melhoramento da ervilha. A expressão fenotípica do gene *er2* é influenciada pela temperatura e idade da folha (SMÝKAL *et al.*, 2012). O gene que governa a resistência é baseado principalmente na morte celular pós-penetração, complementada por uma redução da porcentagem de penetração fúngica bem-sucedidas em folhas maduras (FONDEVILLA *et al.*, 2006).

O gene *Er3* foi identificado mais recentemente e tem sido considerado um fator importante para ampliar a base genética da resistência ao oídio em *P. sativum* (FONDEVILLA *et al.*, 2008). A resistência conferida pelo gene *Er3* é devida a uma alta frequência de morte celular que ocorre tanto como resposta rápida à tentativa de infecção pelo fungo bem como no atraso no estabelecimento de colônias.

Ensaio de PCR (*polymerase chain reaction*), embora requeiram muito menos DNA genômico, dependem, em geral, do conhecimento parcial ou completo, da sequência de DNA do genoma do organismo ou do gene em estudo. No entanto, alguns sistemas de marcadores tais como o RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) requer apenas pequenas quantidades de DNA genômico e nenhum conhecimento prévio do genoma a ser analisado. A técnica RAPD baseia-se na amplificação ao acaso de fragmentos de DNA, por meio de PCR, usando iniciadores curtos (em torno de 10 pares de bases) e de sequências arbitrárias. A estratégia de RAPD detecta polimorfismos abundantes na maioria dos organismos e apresenta vantagens em certas circunstâncias, sendo uma ferramenta básica para estudos de relações

genéticas entre organismos e para exploração da diversidade (*fingerpriting*) de coleções de germoplasma de plantas (WILLIAMS *et al.*, 1990). O sistema RAPD tem proporcionado identificação de centenas de marcadores moleculares em ervilha, porém esta técnica pode apresentar algumas limitações, especialmente em termo de estabilidade de alguns dos polimorfismos detectados. FONDEVILLA *et al.* (2008) desenvolveram marcadores moleculares RAPD e SCAR para o gene *Er3*, visando facilitar trabalhos de seleção de materiais resistentes ao fungo *E. pisi*. Marcadores RAPD ligados ao gene *Er3* foram identificados e convertidos em marcadores do tipo SCAR (FONDEVILLA *et al.*, 2008; RUBIALES *et al.*, 2009). GHAFOR & MCPHEE (2012), selecionaram vários marcadores associados com a resistência ao oídio em ervilha reportados na literatura por diversos autores com o intuito de fazer a seleção dos mais estáveis para emprego em SAM. No entanto, esses autores indicaram a necessidade de uma crítica reavaliação desse conjunto de marcadores.

Marcadores do tipo SSR (= microssatélites) também têm sido desenvolvidos para ervilha. AHMAD *et al.* (2015) avaliaram 50 marcadores SSR que mostraram variabilidade significativa em 35 acessos de ervilha. Esses marcadores polimórficos podem ser combinados em reações multiplex e com outras ferramentas moleculares previamente desenvolvidas para a genotipagem de populações de ervilhas; isso sugere um uso potencial para esses marcadores em estudos de associação. SUN *et al.* (2014) também desenvolveram unicamente por marcadores SSR a construção de mapas genéticos de ervilha (*Pisum sativum* L.) do banco de germoplasma chinês. GANOPOULOS *et al.* (2018) mostraram que a análise genética usando uma combinação de marcadores microssatélites pode efetivamente genotipar e discriminar as variedades de ervilhas e variedades crioulas no banco de germoplasma grego como uma etapa de pré-melhoramento. Além disso, estes autores foram capazes de identificar a composição genética dessas variedades e acessos em termos de resistência ao oídio. De fato, a abordagem combinada do uso de análise de fusão de alta resolução (HRM) e marcador funcional para o alelo *er1-7* mostrou que a coleção possuía um acesso homozigoto resistente e outro acesso resistente heterozigoto e que ambos poderiam ser incorporados em um esquema de cruzamentos para transferir esse alelo *er1-7* para variedades elite através de um programa convencional de retro-cruzamento em combinação com SAM.

Neste contexto, em conclusão, podemos observar a crescente importância dos marcadores moleculares e de MAS para identificar acessos com mais ampla resistência contra os agentes causais do oídio em ervilha.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. **AGRIANUAL 2011**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP, 2011. 495 p.

AHMAD, S.; KAUR, S.; LAMB-PALMER, N. D.; LEFSRUD, M.; SINGH, J. Genetic diversity and population structure of *Pisum sativum* accessions for marker-trait association of lipid content. **The Crop Journal**, v. 3, n. 3, p. 238–245, 2015.

ATTANAYAKE, R. N.; GLAWE, D. A.; MCPHEE, K. E.; DUGAN, F. M.; CHEN, W. *Erysiphe trifolii* – a newly recognized powdery mildew pathogen of pea. **Plant Pathology**, v. 59, n. 4, p. 712–720, 2010.

BAISWAR, P.; NGACHAN, S. V.; VERMA, V. K.; KUMAR, R.; JHA, A. K.; CHANDRA, S. Molecular evidence of *Erysiphe pisi* on pea and *E. trifoliorum* on white clover in northeast India. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 10, n. 1, p. 12, 2015.

CAMPOS, C. de B. T. Avaliação da diversidade genética de uma coleção portuguesa de ervilha (*Pisum sativum* L.) através de marcadores morfológicos e moleculares. 93p. 2014.

CAO, A.; XING, L.; WANG, X.; YANG, X.; WANG, W.; SUN, Y.; WANG, X. Serine/threonine kinase gene Stpk-V, a key member of powdery mildew resistance gene *Pm21*, confers powdery mildew resistance in wheat. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 108, n. 19, p. 7727–7732, 2011.

CARVALHO, A.; CARVALHO, J. de A.; REZENDE, F. C.; AQUINO, R. F.; FREITAS, W. A. DE.; OLIVEIRA, E. C. Produção da ervilha cultivada em ambiente protegido sob diferentes tensões de água no solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 16, n. 1, 2012.

CARVALHO, O. T. **Carotenóides e composição centesimal de ervilhas (*Pisum sativum* L.) cruas e processadas**. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2007.

DIRLEWANGER, E.; ISAAC, P. G.; RANADE, S.; BELAJOUZA, M.; COUSIN, R.; VIENNE, D. Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with disease resistance genes and developmental traits in *Pisum sativum* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, n. 1, p. 17–27, 1994.

- EK, M., EKLUND, M., VON POST, R., DAYTEG, C., HENRIKSSON, T., WEIBULL, P., TUVESSESON, S. Microsatellite markers for powdery mildew resistance in pea (*Pisum sativum* L.). **Hereditas**, v. 142, n. 2005, p. 86-91, 2005.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D., 1995. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília-DF: Embrapa – Cenargen.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2008. 421p.
- FONDEVILLA, S., CARVER T. L. W., MORENO, M. T., RUBIALES, D. Macroscopic and histological characterisation of genes *er1* and *er2* for powdery mildew resistance in pea. **European Journal of Plant Pathology**, v. 115, n. 3, p. 309–321, 2006.
- FONDEVILLA, S., CARVER, T. L. W., MORENO, M. T., RUBIALES, D. Identification and characterization of sources of resistance to *Erysiphe pisi* Syd. in *Pisum* spp. **Plant Breeding**, v. 126, n. 2, p. 113–119, 2007.
- FONDEVILLA, S., CUBERO, J. I., RUBIALES, Diego. Confirmation that the *Er3* gene, conferring resistance to *Erysiphe pisi* in pea, is a different gene from *er1* and *er2* genes. **Plant Breeding**, v. 130, n. 2, p. 281–282, 2011.
- FONDEVILLA, S., RUBIALES, D., MORENO, M. T., TORRES, A. M. Identification and validation of RAPD and SCAR markers linked to the gene *Er3* conferring resistance to *Erysiphe pisi* DC in pea. **Molecular Breeding**, v. 22, n. 2, p. 193–200, 2008.
- FONDEVILLA, S.; CHATTOPADHYAY, C.; KHARE, N.; RUBIALES, D. *Erysiphe trifolii* is able to overcome *er1* and *Er3*, but not *er2*, resistance genes in pea. **European Journal of Plant Pathology**, v. 136, n. 3, p. 557–563, 2013.
- GAÑOPOULOS, I.; MYLONA, P.; MELLIDOU, I.; KALIVAS, A.; BOSMALI, I.; KONTZIDOU, S.; MADEISIS, P. Microsatellite genotyping and molecular screening of pea (*Pisum sativum* L.) germplasm with high-resolution melting analysis for resistance to powdery mildew. **Plant Gene**, v. 15, p. 1–5, 2018.
- GHAFOOR, A., MCPHEE, K. Marker assisted selection (MAS) for developing powdery mildew resistant pea cultivars. **Euphytica**, v. 186, n. 3, p. 593–607, 2012.
- GIORDANO LB. 1997. Cultivo da ervilha (*Pisum sativum* L.). Brasília: EMBRAPA–CNPQ. 19p. (Instruções Técnicas 1).
- GIORDANO, L., B.; REIFSCHNEIDER, F., J. B. Resistência ao oídio (causado por *Erysiphe pisi* D.C.) em ervilha (*Pisum sativum* L. cv. Trioфин). **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.2, n.1, p.35–37, 1984.

GRITTON, E. T. Pea breeding. p. 283–319. In: BASSETT, M. J. **Breeding Vegetable Crops**. Florida: Avi Publishing Company, 1986.

GUIMARÃES, A.L., SANTOS, J.R.M. Nota preliminar sobre o controle químico de oídio (*Oidium* sp.) em ervilha *Pisum sativum* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, p.138–140, 1991.

HAGEDORN, D. J. (Org.). **Compendium of Pea Diseases**. 3rd ed. Minnesota: American Phytopathological Society, 1989. 57 p.

HANAI, S. M. Reação de linhagens de ervilha de vagens comestíveis (*Pisum sativum* L.) ao oídio (*Erysiphe pisi* DC.). 56 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, 2001.

HARLAND, S. C. Inheritance of immunity to mildew in Peruvian forms of *Pisum sativum*. **Heredity**, v. 2, n. 2, p. 263, 1948.

HERINGA, R. J., NOREL, A. V; TAZELAAR, M. F. Resistance to powdery mildew (*Erysiphe polygoni* DC) in peas (*Pisum sativum* L.). **Euphytica**, v. 18, n. 2, p. 163–169, 1969.

HOEY, B.K.; CROWE, K.R.; JONES, V.M.; POLANS, N.O. A phylogenetic analysis of *pisum* based on morphological characters, and allozyme and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 92: 92–100, 1996.

HUANG, X-Q; RODER, M. S. Molecular mapping of powdery mildew resistance genes in wheat: A review. **Euphytica**, v. 137, n. 2, p. 203–223, 2004.

HÜCKELHOVEN, R. Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, n. 1, p. 9–17, 2005.

IBGE. 2018. Área plantada, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor do valor da produção das lavouras temporárias. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/1612#resultado>>. Acesso em: 26 mar. 2019.

IGLESIAS-GARCÍA, R.; RUBIALES, D.; FONDEVILLA, S. Penetration resistance to *Erysiphe pisi* in pea mediated by *er1* gene is associated with protein cross-linking but not with callose apposition or hypersensitive response. **Euphytica**, v. 201, n. 3, p. 381–387, 2015.

JANILA, P.; SHARMA, B. RAPD and SCAR markers for powdery mildew resistance gene *er* in pea. **Plant Breeding**, v. 123, n. 3, p. 271–274, 2004.

JEUFFROY, M., DUTHION, C., MEYNARD, J., PIGEAIRE, A. Effect of a short period of high day temperatures during flowering on the seed number per pod of pea (*Pisum sativum* L.). **Agronomie**, v. 2, p. 139–145, 1990.

KATOCH, V., SHARMA, S., PATHANIA, S., BANAYAL, D. K., SHARMA, S. K., RATHOUR, R. Molecular mapping of pea powdery mildew resistance gene *er2* to pea linkage group III. **Molecular Breeding**, v. 25, n. 2, p. 229–237, 2010.

KIMATI, H.; AMORIM, A.B.F.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. Manual de Fitopatologia. Agronômica Ceres, São Paulo, SP, Brasil. 663p. 2005.

KRAFT, J. M.; PFLEGER, F. L. **Compendium of Pea Diseases and Pests**. American Phytopathological Society (APS Press), 2001.

LAHOZ, E.; CARRIERI, R.; PARISI, B.; PENTANGELO, A.; RAIMO, F. Overcoming of the resistance in resistant genotypes of dry pea (*Pisum sativum*) by an isolate of *Erysiphe pisi* in Italy. **Journal of Plant Pathology**, p. 171–176, 2013.

LIU, R. H., MENG, J. L. MapDraw: a microsoft excel macro for drawing genetic linkage maps based on given genetic linkage data. Yi chuan. **Hereditas**, v. 25, n. 3, p. 317–321, 2003.

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

MCPHEE, K. Dry pea production and breeding - A mini review. **Food Agriculture and Environment** v. 1, p. 64–69, 2003.

MILLERMAGAZINE. **World Dry Pea & Lentil Production**. Disponível em: < [www.millermagazine.com/english/world-dry-pea-lentil-production](http://www.millermagazine.com/english/world-dry-pea-lentil-production) > Acesso em: 27 de nov. de 2017.

NASCIMENTO, W. M.; SILVA, P. P.; FREITAS, R. A.; BOITEUX, L. S. Hortaliças Leguminosas. **Ervilha**. Ed. NASCIMENTO, W. M. N, Brasília–EMBRAPA, 232p, 2016.

NEY, B. Modélisation de la croissance aérienne d'un peuplement de pois. In: NEY, B.; DUCHÊNE, E.; CARROUÉE, B.; ANGEVIN, F. Agrophysiologie du Pois Protéagineux. **Applications à la Production Agricole**. 1994, p. 39–48.

ONDŘEJ, MICHAL.; DOSTÁLOVÁ, RADMILA.; ODSTRČILOVÁ, LENKA. Response of *Pisum sativum* germplasm resistant to *Erysiphe pisi* to inoculation with *Erysiphe baeumleri*, a new pathogen of peas. **Plant Protection Science**, v. 41, n. 3, p. 95–103, 2005.

PEREIRA, A.S. Ervilha: Integração pesquisa/iniciativa privada. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, n. 158, p. 52–64, 1989.

PEREIRA, G.; LEITÃO, J. Two powdery mildew resistance mutations induced by ENU in *Pisum sativum* L. affect the locus *er1*. **Euphytica**, v. 171, n. 3, p. 345, 2010.

PEREIRA, G.; MARQUES, C.; RIBEIRO, R.; FORMIGA, S.; DÂMASO, M.; SOUSA, M. T.; LEITÃO, J. M. Identification of DNA markers linked to an induced mutated gene



conferring resistance to powdery mildew in pea (*Pisum sativum* L.). **Euphytica**, v. 171, n. 3, p. 327, 2010.

REHMAN, A., MEHBOOB, S., SOHAIL, M., GONDAL, A. S., IDREES, M., ALI, H. Estimation of genetic diversity of pea germplasm against powdery mildew (*Erysiphe pisi*) disease and its chemosynthetic management. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v. 26, n. 2, p. 309–313, 2014.

REILLING, T.P. Powdery mildew. In: HAGEDORN, D.J. ed. Compendium of Pea Diseases. St. Paul, **American Phytopathological Society**, p. 21–22, 1984.

REIS, N. V. B. dos. O clima e a cultura da ervilha. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 4, n. 158, p. 8–9, 1989.

RUBIALES, D.; FERNANDEZ-APARICIO, M.; MORAL, A.; BARILLI, E.; SILLERO, J. C.; FONDEVILLA, S. Disease resistance in pea (*Pisum sativum* L.) types for autumn sowings in Mediterranean environments – a review. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 45, n. 4, p. 135–142, 2009.

SANTOS, J. R. M.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; GIORDANO, L. B.; COBBE, R. V. Doenças da ervilha (*Pisum sativum* L.). **Embrapa Hortaliças-Documentos (INFOTECA-E)**, 39p. 1991.

SANTOS, R. L dos. Herança da resistência a oídio em ervilha e aspectos relacionados à patogênese. 2010. vi, 52 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, **Faculdade de Ciências Agronômicas** de Botucatu, 2010.

SCHIAVON, J. S.; BEVILAQUA, G. A. P.; ALBUQUERQUE, T. S.; PINHEIRO, R. A.; EBERHARDT, P. E. R.; ANTUNES, I. F. **Brazilian Journal of Development**, v. 4, n. 6, p. 3147–3164, 2018.

SCHROEDER, W. T. Breakdown of the *er* resistance to powdery mildew in *Pisum sativum*. **Phytopathology**, v. 55, p. 1075, 1965.

SMITH, P. H. et al. The early development of *Erysiphe pisi* on *Pisum sativum* L. **Plant Pathology**, v. 45, n. 2, p. 302–309, 1996.

SMÝKAL, P.; AUBERT, G.; BURSTIN, J.; COYNE, C.J.; ELLIS, N.T.H.; FLAVELL, A.J.; FORD, R.; HÝBL, M.; MACAS, J.; NEUMANN, P.; MCPHEE, K.E.; REDDEN, R.J.; RUBIALES, D.; WELLER, J.L.; WARKENTIN. Pea (*Pisum sativum* L.) in the genomic era. **Agronomy**, v. 2, n. 2, p. 74–115, 2012.

SRIVASTAVA, R. K.; MISHRA, S. K.; SINGH, A. K.; MOHAPATRA, T. Development of a coupling-phase SCAR marker linked to the powdery mildew resistance gene 'er1' in pea (*Pisum sativum* L.). **Euphytica**, v. 186, n. 3, p. 855–866, 2012.

SUN, X.; YANG, T.; HAO, J.; ZHANG, X.; FORD, R.; JIANG, J.; ZONG, X. SSR genetic linkage map construction of pea (*Pisum sativum* L.) based on Chinese native varieties. **The Crop Journal**, v. 2, n. 2-3, p. 170–174, 2014.

TIMMERMAN, G. M., FREW, T. J., WEEDEN, N. F. Linkage analysis of *er-1*, a recessive *Pisum sativum* gene for resistance to powdery mildew fungus (*Erysiphe pisi* DC). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, n. 8, p. 1050–1055, 1994.

TIWARI, K. R.; PENNER, G. A.; WARKENTIN, T. D. Inheritance of powdery mildew resistance in pea. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 77, n. 3, p. 307–310, 1997.

TIWARI, K. R.; PENNER, G. A.; WARKENTIN, T. D. Identification of coupling and repulsion phase RAPD markers for powdery mildew resistance gene *er-1* in pea. **Genome**, v. 41, n. 3, p. 440–444, 1998.

TOMM, G. O.; LIMA, G. J. M. M. de. Desenvolvimento da cultura de ervilha para alimentação animal no Sul do Brasil. Passo Fundo: Embrapa Trigo (Embrapa Trigo. Comunicado Técnico Online, 54), 14 p. 2000.

TONGUÇ, M.; WEEDEN, N. F. Identification and mapping of molecular markers linked to *er1* gene in pea. **Journal of Plant Molecular Biology and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 1–5, 2010.

TRIDGED GLOBAL TRADE PLATAFORM. **TRIDGED**. (2016). Disponível em: <<https://www.tridge.com/intelligences/peas/production> >. Acesso em: 26 de mar. de 2019.

VAID, AMRISH.; TYAGI, P. D. Genetics of powdery mildew resistance in pea. **Euphytica**, v. 96, n. 2, p. 203–206, 1997.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J.; A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531–6535, 1990.

# CAPÍTULO I

---

## **IDENTIFICAÇÃO DE GERMOPLASMA DE ERVILHA RESISTENTE AO OÍDIO (*Erysiphe pisi*) NO DISTRITO FEDERAL**

## RESUMO

O oídio é uma doença que afeta a cultura da ervilha (*Pisum sativum* L.) em todas as regiões do mundo, ocasionando perdas de até 50% na produção. Resistência genética para essa doença é a forma mais economicamente viável de controle. No entanto, trabalhos que buscam novas fontes de resistência ainda são escassos nas condições brasileiras. Diante disso, objetivou-se com este estudo avaliar, em condições de campo aberto, a reação ao oídio de uma coleção de germoplasma de ervilha. A avaliação do germoplasma de ervilha para reação ao oídio foi conduzida sob condições de inóculo natural em 2017, na Embrapa Hortaliças, Brasília–DF, Brasil. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com 145 tratamentos (= acessos de *P. sativum*) e duas repetições (cada uma com 20 plantas). As plantas foram classificadas para a reação ao oídio empregando uma escala visual de notas de 1 a 5. Foram também avaliadas as seguintes características: (1) tempo para o início do florescimento; (2) altura das plantas; (3) tipo de folha; (4) cor da flor; (5) rendimento de grãos; (6) número final de plantas (*stand*); (7) dias até o florescimento e (8) duração do florescimento. Todas as características analisadas diferem de maneira significativa entre os 145 acessos. O acesso CNPH-144 = MK 13 (de ervilha de vagens comestíveis) apresentou os maiores níveis de resistência ao agente causal do oídio no Distrito Federal. Acessos previamente identificados como resistentes ao oídio na região central do Brasil, tais como: ‘Triofin’ e ‘Kodama’, se mostraram como altamente suscetíveis a essa doença em condições de campo. Estes resultados indicam a potencial presença de isolados fúngicos com um perfil de virulência distinto dos predominantes em décadas anteriores nessa região.

**Palavras-chave:** *Pisum sativum*, Avaliação de germoplasma, Fabaceae.

## ABSTRACT

Powdery mildew is a disease that affects the pea (*Pisum sativum* L.) crop across the world, causing yield losses of up to 50%. Genetic resistance is the most economically viable strategy to control this disease. However, studies searching for novel sources of resistance are still scarce under Brazilian conditions. The objective of the present study was to evaluate the reaction of pea germplasm to powdery mildew under open field conditions. Evaluation of pea germplasm for the reaction to powdery mildew was conducted under natural inoculum conditions in 2017 at Embrapa Vegetable Crops in Brasília-DF, Brazil. The experimental design was a randomized block design with 145 treatments (= *P. sativum* accessions) with two replications (20 plants each). The plants were classified for the reaction to powdery mildew using a visual scale of 1 to 5 grades. The following traits were also evaluated: (1) time to start flowering; (2) plant height; (3) sheet type; (4) flower color; (5) grain yield; (6) final number of plants (stand); (7) days until flowering and (8) duration of flowering. All traits differed significantly in the 145 evaluated accessions. The accession CNPH-144 = MK 13 (a pea cultivar with edible pods) displayed the highest levels of resistance to the causal agent of powdery mildew in the Federal District. Pea accessions previously identified as resistant to powdery mildew in central Brazil, such as ‘Triofin’ and ‘Kodama’, were found to be highly susceptible to this disease under field conditions. These results indicate the potential presence of fungal isolates with a virulence profile distinct from those prevalent in previous decades in this region.

**Key-words:** *Pisum sativum*, germplasm evaluation, Fabaceae.

## 1 INTRODUÇÃO

A ervilha (*Pisum sativum* L.; família Fabaceae) é uma *pulse* de grande importância econômica, sendo cultivada predominantemente em regiões de clima temperado (REHMAN *et al.*, 2014). Do ponto de vista da dieta humana, a ervilha apresenta elevado valor nutritivo contendo de 18 a 30% de proteína, 35 a 50% de amido, além de ser uma importante fonte (4-7%) de fibras (PEREIRA, 1989; MCPHEE, 2003). A ervilha pode ser consumida fresca (verde), na forma de grãos secos ou industrializada (CORAL *et al.*, 2017). As cultivares de ervilha de grãos normalmente exibem flores brancas, as vagens não são comestíveis e são de porte determinado. As cultivares de ervilha de vagens comestíveis apresentam flores roxas ou brancas e são majoritariamente de crescimento indeterminado (FILGUEIRA, 2008).

A produção global de ervilha seca foi de 34,24 milhões de toneladas em 2016 (TRIDGE, 2016). De acordo com os dados de 2016, a China apresenta a maior parcela da produção mundial de ervilhas secas com 39,1 % (13,4 milhões de toneladas), seguido da Índia 17% (5,8 milhões de toneladas), Canadá 13,6% (4,67 milhões de toneladas), o continente Europeu com 15,1% (5,19 milhões de toneladas), África 1,6% (545 mil toneladas) e a Oceania com 1% (331 mil toneladas) (TRIDGE, 2016). O Brasil ainda tem participação inexpressiva no mercado mundial de ervilhas. A área plantada no Brasil em 2017 foi de 1117 hectares, sendo que o Minas Gerais o estado com maior área plantada 542 hectares, seguido do Rio Grande do Sul com 479 hectares, Paraná 54 hectares, Distrito Federal com 32 hectares e São Paulo com 10 hectares plantados (IBGE, 2018). Esses valores de área ocupada representam um enorme retrocesso em relação as décadas de 1980-1990 quando a área ocupada por ervilha no Brasil atingiu próximo de 20.000 hectares (SANTOS *et al.*, 1993).

A ervilha é uma leguminosa muito tolerante a baixas temperaturas, embora possa ser prejudicada por geadas, principalmente na fase de florescimento e de formação de vagens (REIS, 1989; CARVALHO *et al.*, 2012). Por sua vez, os notáveis avanços do melhoramento genético da ervilha têm permitido a obtenção de cultivares que podem ser também cultivadas nos trópicos e subtropicais em locais com microclimas favoráveis e/ou regiões de maiores altitudes que atenuam e conseguem compensar o cultivo em latitudes consideradas desfavoráveis para essa espécie (GIORDANO, 1997; CARVALHO *et al.*, 2012). O Planalto Central (que engloba o Distrito Federal e parte dos Estados de Goiás e Minas Gerais) apresenta condições edafoclimáticas que possibilitam o cultivo da ervilha durante os meses de inverno,

com auxílio de irrigação (GIORDANO, 1997). De fato, a produção do Distrito Federal tem apresentado maiores rendimentos (7000 kg.ha<sup>1</sup>) quando comparada com as obtidas em Minas Gerais que apresentou  $\approx$  3817 kg.ha<sup>1</sup> (IBGE, 2018).

Um dos principais fatores limitantes da cultura é a doença foliar denominada de oídio que é causada por espécies fúngicas do gênero *Erysiphe* (MUNJAL *et al.*, 1963; WARKENTIN *et al.*, 1996). Esse fungo biotrófico infecta as folhas, gavinhas, hastes, estípulas, vagens e sementes, ocasionando perdas de rendimento de que podem alcançar entre 26-50%. Em casos severos, a doença por causar murchas e, eventualmente levar a morte da planta, gerando perdas qualitativas e quantitativas relevantes tanto em grãos frescos como em grãos secos (REILING, 1984; EK *et al.*, 2005; GHAFOR & MCPHEE, 2012).

A resistência genética é uma das estratégias mais eficientes e sustentáveis para controlar essa doença, minimizando ou até mesmo eliminando a necessidade de aplicação de fungicidas. Desta forma, o emprego de resistência genética facilita o manejo da doença na plantação com impactos positivos na redução do custo de produção. IGLESIAS-GARCÍA *et al.* (2015) consideram, a resistência genética da ervilha ao oídio um componente vital na produção sustentável dessa hortaliça. Através da análise de herança, dois genes recessivos (*er1* e *er2*) e um gene dominante (*Er3*) foram identificados para resistência a isolados de *Erysiphe pisi* (HARLAND, 1948; HERINGA *et al.*, 1969; FONDEVILLA *et al.*, 2007).

Fontes de resistência aos isolados causadores de oídio no Brasil (caracterizados como *Oidium* sp. e/ou *E. pisi*) foram previamente identificadas em algumas cultivares de grão seco tais como: 'Triofin', 'Luiza', 'Viçosa', 'Marina', 'Maria' e 'Kodama' (GIORDANO & REIFSCHNEIDER 1984; SANTOS *et al.*, 1993). No entanto, a base genética ou os genes/loci envolvidos com as reações resistência não foram ainda determinados nesses acessos. Além disso, ainda são relativamente escassos, nas condições brasileiras, os trabalhos de pesquisa que exploram a grande diversidade genética das coleções de germoplasma de ervilha para a reação ao oídio. Neste contexto, o principal objetivo do presente trabalho foi avaliar 145 acessos de uma coleção de germoplasma de ervilha em busca de novas fontes de resistência ao oídio.

## 2 MATERIAL & MÉTODOS

**2.1 Condições Experimentais** – O experimento foi conduzido em condições de campo aberto, na Embrapa Hortaliças, em Brasília–DF, situada a uma altitude de 1000 m, nas coordenadas 15°56'14.3'S; 048° 08'30.8'W, durante os meses de maio a outubro de 2017. O clima da região é do tipo Aw, com uma temperatura média de 21,8 ° C umidade relativa média de 50,9 % e precipitação média de 0 mm/dia (**Gráfico 1**). Os dados climatológicos observados durante a condução dos ensaios na área experimental da Embrapa Hortaliças estão apresentados na **Gráfico 1**. Para implantação do experimento foram utilizados 145 genótipos (acessos) de ervilha (*P. sativum* L.), pertencentes ao Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças. Algumas cultivares comerciais também foram incluídas no ensaio (**Quadro 1**). Antes da instalação do experimento, foi realizada a amostragem do solo, na camada de 0-20 cm de profundidade, para determinação da composição química do solo (**Tabela 1**). A adubação de semeadura foi realizada no sulco de plantio utilizando 400 kg.ha<sup>-1</sup> de adubo da fórmula 4-30-16 (NPK). Foi ainda utilizado o inoculante trufoso (TotalNitro) nas sementes para o plantio, com a dose de 60 g para cada 50 kg de semente. As sementes foram tratadas com fungicida Proteat®, na dose de 180 mL para 100 kg de sementes, sendo a semeadura realizada em 31 de maio de 2017. Os tratos culturais para controle de plantas daninhas consistiram em capina manual durante todo o ciclo da cultura. Foram realizados levantamentos periódicos de insetos-praga como vaquinha, pulgão, lagarta, minadora e percevejo. No entanto, não foi necessário realizar nenhum tipo de controle desses insetos. Durante a condução do experimento utilizou-se irrigação por gotejamento fornecendo 400 mm de água durante o ciclo. A irrigação foi interrompida no final do enchimento dos grãos nas vagens para possibilitar a maturação das plantas. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com 145 tratamentos e duas repetições. A parcela experimental foi formada por uma linha de 1 m, espaçadas de 0,50 m, totalizando uma área útil de 0,5 m<sup>2</sup> por parcela. Em cada linha foram semeadas, manualmente, 30 sementes. A colheita foi realizada manualmente no dia 13 de setembro de 2017. Na colheita, cada parcela foi identificada e colocada em sacos de papel separadamente, posteriormente levada a câmara de pré-secagem da Unidade Beneficiadora de Sementes (UBS) da Embrapa Hortaliças.



## **2.2 Fonte de Inóculo e Critérios Adotados para Avaliar a Reação de Acessos de Ervilha**

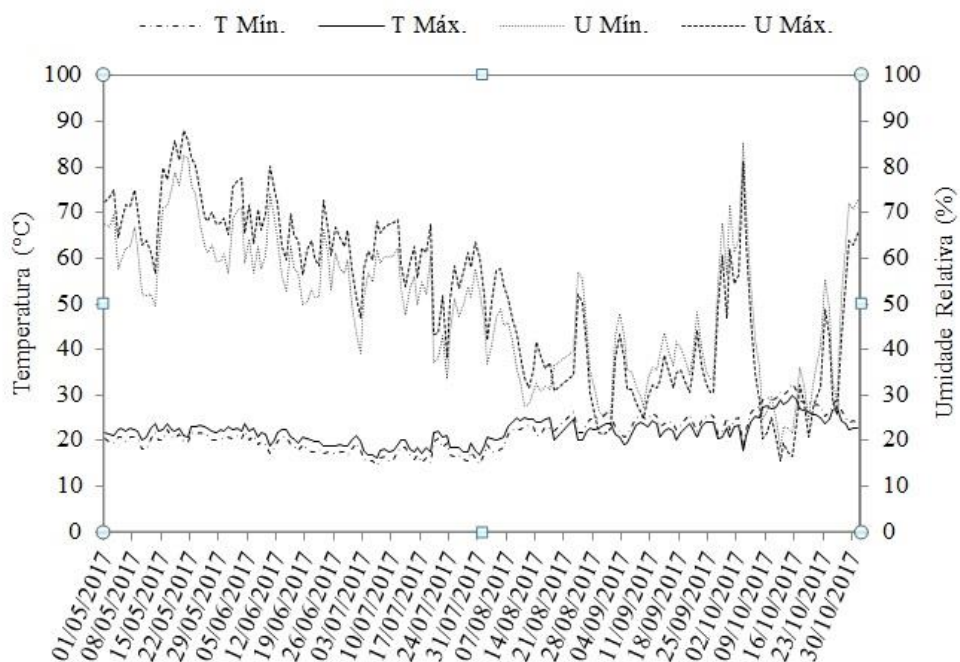
**ao Oídio** – A fonte de inóculo foi obtida naturalmente no ambiente de cultivo. As plantas foram classificadas visualmente quanto à resistência ou suscetibilidade ao oídio, com base na presença ou ausência dos sinais do patógeno. O grau de severidade de oídio, ocorrido naturalmente sob condições de campo, foi quantificado em cada parcela por dois avaliadores, aos 70 dias após o plantio (Quando as plantas estavam em pleno florescimento e início de produção de vagens) com o uso da seguinte escala diagramática proposta por HANAI (2001), determinando assim o grau de severidade da doença nos folíolos, onde **1** = incidência baixa doença (0 a 10% de folíolos infectados); **2** = incidência leve (11 a 20% de folíolos infectados); **3** = incidência intermediária (21 a 40% de folíolos infectados), **4** = incidência alta (41 a 75% de folíolos infectados) e **5** = incidência extrema (mais de 76 % de folíolos infectados). As características avaliadas foram: **(1)** Nota de severidade de oídio nos folíolos no terço baixo da planta; **(2)** Nota de severidade de oídio nos folíolos no terço médio da planta; **(3)** Nota de severidade de oídio nos folíolos no terço alto da planta;

## **2.3 Características Fenotípicas Adicionais Avaliadas nos Acessos de Ervilha**

– Outros critérios de avaliação foram incluídos nas análises: **(4)** data para início do florescimento (**F**), período que correspondeu ao número de dias decorridos entre a emergência das plântulas até 50% do florescimento das plantas da parcela; **(5)** Altura das plantas (**AP**), realizada na maturação medindo da base da planta até a inserção do racimo no ápice da haste principal, em cinco plantas da área útil; **(6)** Tipo de folha (áfila, semi-áfila ou normal); **(7)** Cor da flor (**CF**); **(8)** Rendimento de grãos por parcela (**RG**): determinado após a trilha das plantas e limpeza das sementes manualmente, com posterior correção da umidade dos grãos para 13%, convertendo-os em g planta<sup>-1</sup>, sendo a pesagem realizada em balança de precisão; **(9)** Número de plantas (**NP**), realizada na colheita; **(10)** Dias até o florescimento, contado desde a semeadura até o aparecimento das primeiras flores na parcela; **(11)** Duração média do florescimento, contado desde o início da floração até o aparecimento das primeiras vagens.

**2.4 Análise dos dados** – Os dados obtidos para todas as 11 características avaliadas foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott-Knott a o nível de 5% de significância (ANOVA,  $p > 0.05$ ).

**Gráfico 1** – Dados climatológicos da área experimental da Embrapa Hortaliças, utilizados durante o ensaio. Embrapa Hortaliças, Brasília–DF, 2017.



**Quadro 1** – Lista dos 145 genótipos (acessos) de ervilha (*Pisum sativum* L.) do BAG da Embrapa Hortaliças, utilizados para as avaliações. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2017.

<b>Nº DE CAMPO</b>	<b>CÓDIGO COLEÇÃO DE GERMOPLASMA DO CNPH</b>	<b>DENOMINAÇÃO DO ACESSO/CULTIVAR</b>	<b>TIPO DE FOLHA</b>
001	001	FROSTROY	NORMAL
002	002	PRIMEROY	NORMAL
003	003	HYDRA	NORMAL
004	004	FRILA	NORMAL
005	006	KWARTELLA	NORMAL
006	007	TRITON	NORMAL
007	008	PROFINO	NORMAL
008	009	FRIMENTO	NORMAL
009	010	VERDO	NORMAL
010	011	COMIROY	NORMAL
011	012	FILBY	NORMAL
012	013	SPIKET	NORMAL
013	014	ASTERIX	NORMAL
014	020	PRIMAVIL	NORMAL
015	021	SOMETTE	NORMAL
016	022	VILVENCE	NORMAL
017	024	RONDO	NORMAL
018	028	FRISKY	NORMAL
019	030	ABADAR	NORMAL
020	036	CLAUSE-50	NORMAL
021	037	KALIFE	NORMAL
022	039	VOLANTAIRE	NORMAL
023	040	ALDERMAN	NORMAL
024	041	SPRING	NORMAL
025	046	MYZAR	NORMAL
026	047	CENTURION CLAUSE	NORMAL
027	048	ONWARD	NORMAL
028	049	ORFÉO	NORMAL
029	051	EMA-RAMIFICADA	NORMAL
030	053	RITA	NORMAL
031	054	MORENINHA	NORMAL
032	055	ELEGANTE	NORMAL
033	057	PACEMAKER	NORMAL
034	058	TROJAN	NORMAL
035	059	PETROLINI	NORMAL
036	064	RAG-1020	NORMAL
037	076	CONSERVIL	NORMAL
038	079	ALDERMAN-(3-585)	SEMI-ÁFILA
039	085	RONDO (198-111)	NORMAL
040	171	MULTISTAR	NORMAL

041	180	WIS 716	NORMAL
042	412	SUGAR SNAP	NORMAL
043	417	WANDO	NORMAL
044	418	LITTLE MARVEL	NORMAL
045	419	GREEN ANOW	NORMAL
046	420	SPRING	NORMAL
047	421	BOLERO	NORMAL
048	424	RALLY 8818	NORMAL
049	696	GARFIELD	NORMAL
050	697	CV.M163	NORMAL
051	699	EDULA	NORMAL
052	700	HENDRIKS	NORMAL
053	704	PONTROY	NORMAL
054	705	ATIROY	NORMAL
055	706	PROFINO	NORMAL
056	708	ARIETTE	NORMAL
057	716	BRA-005126	NORMAL
058	717	BRA-005118/011703	NORMAL
059	723	RALLY	NORMAL
060	724	KLOS	NORMAL
061	725	TROLLY	SEMI-ÁFILA
062	727	BRA-005215	NORMAL
063	729	BRA-005231	NORMAL
064	731	BRA-005258	NORMAL
065	734	SKINADO	NORMAL
066	736	FONADO	NORMAL
067	737	CORONADO	NORMAL
068	738	JOF	NORMAL
069	806	STRATAGEN IMPROVED	NORMAL
070	807	STRATAGEN	NORMAL
071	808	WISC. 729	NORMAL
072	809	74 S N5	NORMAL
073	810	PI-140 165	NORMAL
074	812	WISC. 741	NORMAL
075	813	WISC 7105	NORMAL
076	815	PH 91-3	NORMAL
077	816	WIS 729	NORMAL
078	817	84-700	NORMAL
079	818	PIA 242 028	NORMAL
080	820	EMA	NORMAL
081	821	OREGON SUGAR POD	NORMAL
082	829	ALDERMAN	NORMAL
083	830	FREEZONIAN	NORMAL
084	831	PROGRESS#9	NORMAL
085	832	EARLY MARKET	NORMAL
086	833	OLYMPIA	NORMAL
087	834	NOVELLA	SEMI-ÁFILA
088	835	WANDO	NORMAL

089	836	EARLY SNAP	NORMAL
090	837	MAYFAIR (XPI71)	NORMAL
091	839	SUGAR SNAP	NORMAL
092	840	EARLY FROST	NORMAL
093	841	DWARF WHITESUGAR	NORMAL
094	842	SINILAS	NORMAL
095	843	ARVEJA GRANO DE ORO	NORMAL
096	845	WR-1167	NORMAL
097	846	RR-1178	NORMAL
098	847	WR-1158	NORMAL
099	849	NEW SESSON AJSTTL	ÁFILA
100	850	NEW SESSON AFTL	ÁFILA
101	851	NEW SESSON NORMAL	NORMAL
102	852	NEW SESSON-AJ	SEMI-ÁFILA
103	853	NEW SESSON-AJST	ÁFILA
104	855	NEW SESSON STTL	NORMAL
105	856	B 77-157	NORMAL
106	857	B77-158	NORMAL
107	858	B77-159	NORMAL
108	861	B77-162	ÁFILA
109	863	B77-164	NORMAL
110	864	B77-165	NORMAL
111	865	B 77-166	NORMAL
112	866	B77-167	NORMAL
113	867	B 77-168	NORMAL
114	870	B 77-171	ÁFILA
115	871	B77-172	NORMAL
116	883	IMPROVED CAMPBELL	NORMAL
117	884	TRACER 81	NORMAL
118	885	GARFIELD	NORMAL
119	886	HORAL	NORMAL
120	887	74-SN-3	NORMAL
121	888	79-2022	SEMI-ÁFILA
122	890	WR 1167	NORMAL
123	891	TRACER	NORMAL
124	892	RR 1178	NORMAL
125	893	ALASKH1	NORMAL
126	894	VR-1492-1	NORMAL
127	895	PI 189 171	NORMAL
128	896	T*4/WIS 7105 SBM	NORMAL
129	898	ERVILHA 1984	NORMAL
130	899	ERVILHA 1984	NORMAL
131	900	PEAS SEGREG.	SEMI-ÁFILA
132	901	PEAS 1983-F2	NORMAL
133	902	HYDRA RS	NORMAL
134	989	B81-255	NORMAL
135	991	B81-257	NORMAL
136	AMELIA 37/01	AMELIA 37/01	SEMI-ÁFILA

137	DILETA	DILETA	NORMAL
138	KODAMA	KODAMA	SEMI-ÁFILA
139	LUIZA 35/01	LUIZA 35/01	NORMAL
140	MARIA	MARIA	NORMAL
141	MARINA 14/02	MARINA 14/02	NORMAL
142	MIKADO	MIKADO	NORMAL
143	MIK x TRIOF02/16	MIK x TRIOF02/16	NORMAL
144	MK13	MK13	NORMAL
145	TRIOFIN	TRIOFIN	NORMAL

**Tabela 1** – Resultado da análise de solo da área experimental empregada para cultivo da coleção de germoplasma de ervilha (*Pisum sativum* L.). Profundidade de 0-20 cm. Embrapa Hortaliças, Brasília–DF, 2017.

#### MACRONUTRIENTES

pH (CaCl <sub>2</sub> )	CTC	H + Al	Al <sup>3+</sup>	Cb <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	P (Mehlich)	Sat. Bases
	.....cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> .....				.....mg dm <sup>-3</sup> ....			%
5,2	5,8	4,3	0,9	0,5	0,5	0,06	2,9	27

#### MICRONUTRIENTES

B	CU	Fe	Mn	Zn	S
mg dm <sup>-3</sup>					
0,03	1,6	84,0	22,3	1,9	2,6

### 3 RESULTADOS & DISCUSSÃO

O resumo da análise de variância e coeficientes de variação mostra que todas características analisadas nos 145 acessos avaliados diferem de maneira significativa (**Tabela 2**), demonstrando assim que há diferença entre os acessos, que possuem diferentes potenciais fisiológicos bem como reações diferenciadas em relação ao oídio, o que pode ser constatado no teste de médias (**Tabela 3**).

**Tabela 2** – Resumo da análise de variância para a escala de notas (Nota) de 1 a 5 para Oídio no Terço Baixo da Planta (NPOTB), Nota de 1 a 5 para Oídio no Terço Médio da Planta (NPOTM), Nota de 1 a 5 para Oídio no Terço Alto da Planta (NPOTA), Tipo de Folha (1 = Normal, 2 = Áfila e 3 = Semi-Áfila), Altura de Planta (cm) (AP), Peso / Parcela (g) (PP), Número de Plantas (NP), Dias até o Aparecimento da 1ª flor (DAF) e Duração do Florescimento (DF) de 145 acessos de ervilha (*Pisum sativum* L.). Brasília–DF, 2017.

FV	GL	QM								
		(NPOTB)	(NPOTM)	(NPOTA)	TF	AP	PP	NP	DAF	TF
Acessos	144	0.641**	1,289**	1.397**	0,473**	753,94**	418,578**	58,32**	69,444**	1,596**
Resíduo Méd.	144	0.388	0,658	0,387	0,00345	9,876	2,355	3,706	0,220	0,00345
Média Geral		4.41	3.67	2.031	1,148	73,5	15,61	17,44	43,81	7,64
CV (%)		14.12	22,05	30.63	5,11	4,28	9,83	11,03	1,07	0,77

\*\* Significativo a 1% de probabilidade;

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade;

<sup>ns</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

**Tabela 3** – Médias dos dados de nota de Nota de 1 a 5 para Oídio no Terço Baixo da Planta (NPOTB), Nota de 1 a 5 para Oídio no Terço Médio da Planta (NPOTM), Nota de 1 a 5 para Oídio no Terço Alto da Planta (NPOTA), Altura de Planta (cm) (AP), Peso / Parcela (g) (PP), Número de Plantas (NP), Dias até o Aparecimento da 1ª flor (DAF) e Duração do Florescimento (DF) de 145 genótipos (acessos) de ervilha (*Pisum sativum* L.). Brasília–DF, 2017.

GENÓTIPOS	(NPOTB)	(NPOTM)	(NPOTA)	Altura Planta	PP	NP	DAF	DF
MK13	1,5 a	1,0 a	1,0 a	76,0 e	9,3 b	21,0 d	56,0 x	8,0 d
B77-165	2,5 a	1,5 a	1,5 a	80,5 f	60,71	19,0 c	48,0 r	8,0 d
OREGON S. POD	2,5 a	2,5 a	1,5 a	72,0 e	38,7 h	17,0 c	48,0 r	7,0 c
VR-1492-1	2,5 a	2,5 a	1,0 a	62,0 d	24,7 f	20,5 d	46,0 p	9,0 e
B77-171	2,5 a	2,0 a	1,5 a	62,5 d	36,8 h	19,0 c	47,0 q	9,0 e
EMA-RAMIF.	3,0 b	1,5 a	1,5 a	74,5 e	62,01	21,0 d	47,0 q	9,0 e
PI-140 165	3,0 b	2,5 a	1,5 a	50,0 c	5,2 a	11,5 a	56,0 x	8,0 d
B77-159	3,0 b	1,5 a	1,0 a	70,5 e	47,9 j	16,0 b	47,0 q	9,0 e
EMA	3,5 b	2,5 a	1,0 a	55,0 c	54,1 k	17,0 c	48,0 r	8,0 d
MAYFAIR	3,5 b	2,5 a	1,5 a	76,5 e	35,0 h	16,0 b	43,0 m	8,0 d
JOF	3,5 b	2,0 a	1,0 a	83,0 f	11,2 b	15,0 b	47,0 q	8,0 d
WIS 729	3,5 b	2,5 a	1,5 a	55,0 c	6,0 a	11,0 a	48,0 r	8,0 d
B81-257	3,5 b	2,5 a	1,5 a	73,0 e	20,3 e	28,0 f	43,0 m	8,0 d
MIKADO	3,5 b	2,5 a	1,5 a	71,0 e	31,8 g	21,0 d	47,0 q	8,0 d
B77-162	3,5 b	2,5 a	1,0 a	77,0 e	47,6 j	17,0 c	43,0 m	8,0 d
B81-255	3,5 b	2,5 a	1,5 a	65,0 d	32,1 g	13,0 b	40,0 j	7,0 c
STRATAGEN I.	4,0 c	3,0 a	2,0 a	30,5 a	4,5 a	11,0 a	52,0 u	6,0 b
KALIFE	4,0 c	3,5 b	1,5 a	81,5 f	6,5 a	20,0 d	48,0 r	8,0 d
WR-1167	4,0 c	4,0 b	1,5 a	67,0 d	3,6 a	18,0 c	48,0 r	8,0 d
OLYMPIA	4,0 c	2,5 a	1,5 a	46,5 b	11,0 b	13,5 b	28,0 b	6,0 b
NS NORMAL	4,5 c	4,5 b	2,5 b	67,5 d	9,6 b	7,0 a	39,0 i	8,0 d
NS AJ	4,5 c	4,0 b	2,5 b	70,5 e	6,0 a	13,5 b	42,01	8,0 d
FRILA	4,5 c	3,5 b	1,5 a	65,5 d	25,9 f	17,0 c	48,0 r	7,0 c
WR-1158	4,5 c	4,5 b	2,5 b	62,0 d	7,2 a	12,5 b	43,0 m	8,0 d
NS AJSTTL	4,5 c	4,5 b	2,5 b	41,5 b	5,5 a	11,5 a	42,01	7,0 c
NS AFTL	4,5 c	4,0 b	2,5 b	73,0 e	4,0 a	13,0 b	48,0 r	8,0 d
NS AJST	4,5 c	3,5 b	2,0 a	56,0 c	6,9 a	8,0 a	42,01	8,0 d
B77-157	4,5 c	3,5 b	2,5 b	53,0 c	7,2 a	10,0 a	43,0 m	7,0 c
B77-158	4,5 c	2,5 a	2,5 b	70,0 e	60,11	23,0 d	44,0 n	8,0 d
KWARTELLA	4,5 c	3,5 b	2,5 b	64,5 d	12,3 b	22,0 d	47,0 q	9,0 e
B77-164	4,5 c	3,5 b	1,5 a	66,5 d	6,2 a	23,0 d	48,0 r	9,0 e
SPIKET	4,5 c	3,5 b	2,0 a	90,2 g	11,9 b	25,0 e	48,0 r	8,0 d
NS STTL	4,5 c	4,5 b	2,5 b	56,0 c	9,7 b	14,0 b	48,0 r	7,0 c
FREEZONIAN	4,5 c	3,5 b	4,0 c	86,0 f	9,7 b	14,0 b	28,0 b	6,0 b
PROGRESS*9	4,5 c	3,5 b	1,0 a	29,5 a	6,7 a	11,5 a	50,0 t	6,0 b
E. MARKET	4,5 c	3,5 b	3,5 c	89,0 g	6,4 a	11,0 a	33,0 e	6,0 b
TRITON	4,5 c	3,5 b	2,5 b	65,0 d	10,4 b	21,5 d	48,0 r	8,0 d
SOMETTE	4,5 c	3,5 b	2,0 a	123,5 j	11,2 b	25,0 e	42,01	6,0 b



PEA 242 028	4,5 c	3,5 b	2,0 a	110,0 i	13,8 c	9,0 a	40,0 j	8,0 d
PRIMAVIU	4,5 c	3,5 b	1,5 a	108,0 i	15,4 c	25,0 e	44,0 n	7,0 c
SINILAS	4,5 c	4,5 b	2,5 b	83,5 f	5,9 a	9,0 a	36,0 f	8,0 d
ARVEJA GRANO DE ORO	4,5 c	4,0 b	1,5 a	60,5 d	6,9 a	13,0 b	49,0 s	7,0 c
WR -1167	4,5 c	3,5 b	1,5 a	81,5 f	6,1 a	13,5 b	48,0 r	7,0 c
EARLY FROST	4,5 c	3,5 b	1,5 a	72,0 e	10,1 b	10,0 a	40,0 j	7,0 c
NOVELLA	4,5 c	4,5 b	2,5 b	53,5 c	10,1 b	13,5 b	43,0 m	8,0 d
ASTERIX	4,5 c	3,5 b	2,0 a	72,0 e	38,2 h	25,0 e	50,0 t	8,0 d
SUGAR SNAP	4,5 c	2,5 a	1,0 a	100,5 h	16,8 d	15,0 b	48,0 r	8,0 d
COMIROY	4,5 c	3,5 b	2,5 b	78,7 e	24,6 f	25,0 e	44,0 n	7,0 c
AMÉLIA 37/01	4,5 c	3,5 b	1,5 a	63,5 d	9,4 b	20,0 d	43,0 m	8,0 d
DILETA	4,5 c	3,5 b	1,5 a	71,0 e	16,3 d	21,0 d	45,0 o	6,0 b
FILBY	4,5 c	2,5 a	1,0 a	75,5 e	9,7 b	25,0 e	50,0 t	8,0 d
PEAS SEGREG	4,5 c	4,5 b	2,5 b	73,0 e	12,4 b	18,5 c	48,0 r	8,0 d
PEAS 1983-F2	4,5 c	3,5 b	2,0 a	82,0 f	7,9 a	21,5 d	45,0 o	6,0 b
HYDRA RS	4,5 c	3,5 b	1,5 a	57,0 c	12,0 b	12,0 b	47,0 q	8,0 d
MIK*TRIOF02/16	4,5 c	4,5 b	2,5 b	75,0 e	10,0 b	20,5 d	40,0 j	7,0 c
FROSTROY	4,5 c	4,5 b	2,5 b	69,0 d	8,5 a	22,0 d	44,0 n	8,0 d
TRIOFIN	4,5 c	3,5 b	1,5 a	91,0 g	14,4 c	21,0 d	47,0 q	9,0 e
VERDO	4,5 c	3,5 b	1,0 a	91,5 g	16,4 d	25,0 e	48,0 r	8,0 d
LUIZA 35/01	4,5 c	2,5 a	1,5 a	74,0 e	16,3 d	15,0 b	47,0 q	9,0 e
MARIA	4,5 c	3,5 b	1,5 a	69,5 d	11,1 b	21,0 d	46,0 p	8,0 d
MARINA 14/02	4,5 c	3,5 b	1,5 a	76,5 e	13,8 c	18,0 c	48,0 r	6,0 b
ERILHA 1984	4,5 c	4,5 b	1,5 a	92,5 g	30,7 g	21,5 d	41,0 k	7,0 c
IPV. CAMPBELL	4,5 c	4,5 b	2,5 b	85,0 f	4,5 a	12,0 b	39,0 i	7,0 c
TRACER 81	4,5 c	4,5 b	1,5 a	80,0 f	13,8 c	14,0 b	47,0 q	8,0 d
HORAL	4,5 c	4,0 b	1,5 a	69,0 d	9,3 b	20,0 d	47,0 q	9,0 e
B77-172	4,5 c	2,5 a	1,5 a	50,0 c	26,8 f	12,0 b	42,0 l	7,0 c
B77-167	4,5 c	3,5 b	1,5 a	85,0 f	45,7 j	19,0 c	43,0 m	8,0 d
B77-168	4,5 c	2,5 a	1,5 a	72,5 e	52,6 k	7,0 a	40,0 j	8,0 d
HYDRA	4,5 c	3,5 b	1,5 a	75,5 e	6,4 a	18,0 c	49,0 s	8,0 d
PI189 171	4,5 c	4,0 b	1,5 a	73,5 e	5,7 a	9,0 a	43,0 m	7,0 c
T*4/WIS 7105	4,5 c	3,5 b	1,5 a	110,0 i	7,6 a	15,0 b	48,0 r	8,0 d
ERVILHA 1984	4,5 c	4,5 b	2,5 b	110,0 i	18,6 d	14,0 b	37,0 g	7,0 c
PRIMERROY	4,5 c	2,5 a	1,0 a	74,5 e	7,1 a	19,0 c	49,0 s	9,0 e
79-2022	4,5 c	4,5 b	3,5 c	80,0 f	6,3 a	21,0 d	43,0 m	7,0 c
TRACER	4,5 c	4,5 b	2,5 b	97,0 g	7,4 a	11,5 a	47,0 q	9,0 e
ALASK H1	4,5 c	4,5 b	2,0 a	120,0 j	35,9 h	28,0 f	26,0 a	8,0 d
EDULA	4,5 c	3,5 b	1,5 a	74,5 e	5,4 a	18,0 c	47,0 q	5,0 a
HENDRIKS	4,5 c	4,5 b	3,5 c	110,0 i	7,5 a	22,0 d	40,0 j	7,0 c
CV.M163	4,5 c	4,5 b	4,5 d	61,0 d	8,4 a	20,5 d	32,0 d	8,0 d
FRIMENTO	4,5 c	2,5 a	1,0 a	75,7 e	5,8 a	20,0 d	49,0 s	8,0 d
GARFIELD	4,5 c	3,0 a	1,5 a	121,0 j	12,7 b	23,5 e	49,0 s	9,0 e
PONTIROY	4,5 c	4,0 b	2,5 b	64,5 d	5,4 a	18,5 c	42,0 l	8,0 d

005118/011703	4,5 c	4,0 b	1,5 a	55,0 c	6,2 a	9,0 a	33,0 e	8,0 d
ONW ARD	4,5 c	4,0 b	1,5 a	68,0 d	17,3 d	14,0 b	48,0 r	8,0 d
BRA-005126	4,5 c	3,5 b	1,5 a	67,0 d	10,1 b	15,0 b	42,0 l	8,0 d
ATIROY	4,5 c	4,0 b	4,0 c	45,5 b	10,8 b	22,5 d	26,0 a	9,0 e
PROFINO	4,5 c	4,0 b	3,0 b	56,0 c	5,5 a	18,0 c	39,0 i	7,0 c
RAG-1020	4,5 c	4,5 b	3,0 b	65,0 d	6,2 a	20,0 d	50,0 t	8,0 d
PETROLINI	4,50 c	3,5 b	1,0 a	73,0 e	18,9 d	13,5 b	51,0 t	8,0 d
CONSERVIL	4,5 c	4,5 b	3,0 b	76,0 e	9,7 b	15,0 b	49,0 s	8,0 d
ALDERMAN	4,5 c	3,5 b	2,0 a	78,0 e	7,4 a	22,0 d	49,0 s	7,0 c
RONDO(198-111)	4,5 c	4,5 b	2,5 b	75,0 e	8,3 a	10,0 a	42,0 l	6,0 b
PACEMAKER	4,5 c	4,5 b	3,5 c	57,0 c	12,0 b	17,5 c	37,0 g	7,0 c
BOLERO	4,5 c	4,5 b	2,0 a	62,5 d	10,4 b	24,5 e	42,0 l	7,0 c
RITA	4,5 c	3,5 b	2,0 a	80,5 f	9,1 b	22,0 d	49,0 s	7,0 c
ELEGANTE	4,5 c	3,5 b	2,0 a	85,5 f	9,4 b	8,0 a	40,0 j	7,0 c
WANDO	4,5 c	3,5 b	2,0 a	72,5 e	6,4 a	20,0 d	49,0 s	7,0 c
L. MARVEL	4,5 c	3,0 a	1,5 a	56,5 c	24,6 f	24,0 e	38,0 h	6,0 b
WISC.729	4,5 c	3,5 b	1,0 a	106,0 h	41,1 i	21,5 d	47,0 q	8,0 d
CLAUSE-50	4,5 c	4,5 b	2,5 b	113,5 i	7,2 a	16,0 b	42,0 l	8,0 d
STRATAGEN	4,5 c	4,5 b	2,0 a	37,0 b	5,5 a	10,0 a	50,0 t	7,0 c
VOLANTAIRE	4,5 c	4,5 b	2,0 a	93,0 g	12,5 b	22,0 d	37,0 g	7,0 c
VILVENCE	4,5 c	3,5 b	2,5 b	74,0 e	17,5 d	18,0 c	41,0 k	7,0 c
ABADAR	4,5 c	4,5 b	3,0 b	27,5 a	14,3 c	23,0 d	47,0 q	9,0 e
RONDO	4,5 c	3,5 b	2,0 a	74,0 e	9,1 b	24,0 e	40,0 j	9,0 e
PH91-3	4,5 c	3,5 b	1,5 a	84,5 f	7,6 a	18,0 c	40,0 j	7,0 c
FRISKY	4,5 c	4,5 b	3,0 b	90,0 g	15,0 c	18,0 c	47,0 q	9,0 e
PROFINO	4,5 c	4,5 b	2,5 b	80,5 f	13,5 c	16,0 b	48,0 r	8,0 d
WISC.741	4,5 c	3,5 b	2,0 a	77,0 e	78,5 c	17,5 c	47,0 q	8,0 d
ALDERMAN	4,5 c	4,5 b	2,0 a	58,7 c	11,3 b	21,0 d	48,0 r	8,0 d
BRA-005215	4,5 c	3,5 b	1,5 a	86,0 f	76,7 c	18,0 c	48,0 r	7,0 c
BRA-005231	4,5 c	4,0 b	2,5 b	127,0 k	9,8 b	15,0 b	46,0 p	6,0 b
TROLLY	4,5 c	4,0 b	2,5 b	74,5 e	18,2 d	21,0 d	40,0 j	7,0 c
KLOS	4,5 c	3,5 b	1,5 a	71,0 e	9,0 b	21,0 d	48,0 r	8,0 d
CENTURION	4,5 c	4,0 b	1,5 a	43,0 b	6,5 a	17,0 c	57,0 z	10,0 f
MYZAR	4,5 c	4,5 b	2,5 b	64,0 d	7,0 a	10,0 a	40,0 j	8,0 d
SKINADO	4,5 c	4,5 b	2,5 b	65,0 d	12,6 b	22,5 d	33,0 e	8,0 d
SPRING	4,5 c	3,5 b	1,5 a	74,0 e	10,1 b	18,0 c	48,0 r	8,0 d
BRA-005258	4,5 c	4,50 b	2,5 b	63,0 d	10,1 b	16,0 b	47,0 q	8,0 d
KODAMA	5,0 c	4,5 b	1,5 a	62,0 d	7,6 a	7,0 a	48,0 r	8,0 d
MORENINHA	5,0 c	4,5 b	2,5 b	84,7 f	11,3 b	24,5 e	47,0 q	8,0 d
TROJAN	5,0 c	4,5 b	2,5 b	80,5 f	5,4 a	18,0 c	39,0 i	7,0 c
ORFÉO	5,0 c	5,0 b	5,0 d	33,0 a	5,3 a	11,0 a	32,0 d	8,0 d
RR1178	5,0 c	4,0 b	1,5 a	66,0 d	12,8 b	17,0 c	47,0 q	8,0 d
EARLY SNAP	5,0 c	4,5 b	1,5 a	69,0 d	11,5 b	13,0 b	36,0 f	8,0 d
WANDO	5,0 c	3,5 b	1,0 a	55,5 c	22,0 e	13,5 b	48,0 r	9,0 e

FONADO	5,0 c	4,5 b	2,5 b	68,0 d	6,5 a	14,0 b	43,0 m	7,0 c
RR-1178	5,0 c	4,5 b	2,5 b	61,0 d	5,1 a	7,0 a	38,0 h	8,0 d
WHITE SUGAR	5,0 c	5,0 b	5,0 d	91,5 g	13,3 c	12,5 b	37,0 g	7,0 c
WISC 7105	5,0 c	3,5 b	1,5 a	46,0 b	11,5 b	17,0 c	49,0 s	7,0 c
84-700	5,0 c	3,5 b	1,5 a	83,0 f	7,0 a	20,5 d	32,0 d	7,0 c
ALDERMAN	5,0 c	3,5 b	1,5 a	128,2 k	14,8 c	13,0 b	43,0 m	7,0 c
CORONADO	5,0 c	4,5 b	4,5 d	44,0 b	12,2 b	22,5 d	31,0 c	8,0 d
74 S N5	5,0 c	3,5 b	1,5 a	40,0 b	6,2 a	14,0 b	48,0 r	7,0 c
RALLY	5,0 c	4,5 b	2,0 a	66,5 d	10,6 b	23,5 e	42,0 l	6,0 b
GARFIELD	5,0 c	4,0 b	3,0 b	105,0 h	8,1 a	22,5 d	42,0 l	8,0 d
SUGAR SNAP	5,0 c	4,5 b	2,5 b	77,0 e	18,8 d	20,0 d	46,0 p	10,0 f
WIS 716	5,0 c	4,5 b	3,5 c	93,0 g	9,8 b	16,0 b	37,0 g	7,0 c
MULTISTAR	5,0 c	4,0 b	1,5 a	57,0 c	4,5 a	22,0 d	55,0 v	8,0 d
74-SN-3	5,0 c	3,5 b	1,5 a	107,5 i	11,0 b	21,5 d	41,0 k	7,0 c
RALLY 8818	5,0 c	4,5 b	2,5 b	82,0 f	12,3 b	20,0 d	38,0 h	7,0 c
ARIETTE	5,0 c	3,5 b	1,5 a	74,0 e	38,2 h	23,0 d	43,0 m	8,0 d
B 77-166	5,0 c	4,0 b	1,0 a	77,0 e	16,1 d	11,0 a	39,0 i	7,0 c
GREEN ANOW	5,0 c	3,5 b	2,0 a	80,0 f	13,1 b	23,0 d	46,0 p	9,0 e
SPRING	5,0 c	4,5 b	4,5 d	41,5 b	4,8 a	10,0 a	28,0 b	6,0 b

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

A temperatura média no período de condução do experimento foi de 21,8 °C e umidade relativa média de 50,9 % (**Gráfico 1**). Essas condições de temperatura e umidade são consideradas favoráveis para o desenvolvimento do agente causal do oídio da ervilha (PLOPER, 1981; GHAFOR & MCPHEE, 2012).

Quanto as notas de severidade para Oídio no Terço Baixo da Planta (NPOTB), foram detectados três grupos distintos pelo teste de Scott-Knott a 5%, sendo as notas do primeiro grupo compreendidas entre os valores de 1,5 a 2,5, receberam a classificação de incidência baixa e incidência leve da doença (= 25% ou menos dos folíolos cobertos pelo oídio). No segundo grupo as notas variaram de 3 a 3,5, sendo os acessos classificados como de incidência média (= menos de 40% dos folíolos cobertos por oídio). O terceiro grupo englobou acessos com notas que variaram entre 4 a 5, recebendo classificação de extrema suscetibilidade à doença (= 41 a 100 % dos folíolos cobertos por oídio). Os resultados observados (com os acessos pertencentes ao segundo e ao terceiro grupos) corroboraram dados de VIEIRA *et al.* (2000) que indicaram o mês de março como sendo a época de plantio mais favorável em termos de intensidade/severidade da doença. REHMAN *et al.* (2014), observaram a maior severidade

(52,34%) na cultivar Meteor, mostrando-se, segundo estes autores, altamente suscetível ao oídio.

Para nota de severidade para Oídio no Terço Médio da Planta (NPOTM), foram formados apenas dois grupos, sendo o grupo 1 com notas que variam 1 a 3, sendo classificado como incidência baixa, incidência leve, incidência média da doença. E o segundo grupo com notas de 4 a 5, incidência alta e extrema da doença. Para nota de severidade para Oídio no Terço Alto da Planta (NPOTA), foram formados três grupos, sendo que o primeiro englobou acessos com notas 1 e 2 (classificados com notas de incidência leve e baixa da doença) e o segundo grupo foi composto por acessos de ervilha com notas variando entre 2,5 e 3, (classificado como de incidência média a doença). O terceiro grupo englobou acessos com notas variando entre 3,5 e 5, com incidência alta e extrema a doença. REHMAN *et al.* (2014) avaliando dez variedades de ervilha, verificou que os acessos 018337, 019309, 026721, 018398 e 018395 apresentaram valores de severidade da doença de 6,71%, 7,59%, 7,12%, 8,64%, 9,21%, respectivamente. Todos esses acessos foram classificados como moderadamente resistentes ao oídio (REHMAN *et al.*, 2014). Interessante salientar que o acesso CNPH-144 correspondendo a cultivar MK 13 (acesso de ervilha de vagens comestíveis), que apresentou os mais elevados níveis de resistência para a resposta ao agente causal do oídio (*Erysiphe* sp.) em todos os critérios empregados nas nossas condições experimentais (**Tabela 3**). No entanto, MK 13 não diferiu estatisticamente dos acessos B77-165, OREGON, SUGAR POD, VR-1492-1 e B77-171.

Para o tipo de folha, foram formados três grupos distintos, sendo a maioria dos genótipos com folhas normais. Acessos que apresentaram folhagem do tipo áfila, tiveram notas em relação ao oídio consideradas baixas, a exemplo os genótipos CNPH-108 e CNPH-114 (**Tabela 2**). A arquitetura da planta de ervilha e as altas densidades de plantio, aliadas a outros fatores, podem ajudar a criar um microclima mais ou menos favorável às doenças fúngicas (OLIVEIRA *et al.*, 1999), incluindo o oídio. De fato, observações de campo indicam que cultivares áfilas ou semi-áfilas de ervilha podem apresentar menores níveis de severidade dessa doença e também facilitar o controle químico (SANTOS, 1990; OLIVEIRA *et al.* 1999).

Avaliações realizadas no Paraná com ervilha forrageira mostraram que altura média da planta pode variar entre 60–80 cm do solo (CALEGARI & POLA, 2009), resultados intermediários aos encontrados neste trabalho que variaram de 27,5 a 128,2 cm, havendo diferença significativa entre os acessos.

Na característica Peso/Parcela houve diferença significativa com formação de 11 grupos distintos, e pode ser observado que acessos apresentando notas 1, 2 e 3 de incidência ao

oídio no terço baixo foram, com algumas raras exceções, as mais produtivas. Esse resultado indica que os acessos de ervilha respondem de maneira diferenciada ao patógeno e que a doença pode impactar negativamente a produção. Esses dados corroboram os obtidos por REHMAN *et al.* (2014), onde foi observado nas variedades suscetíveis uma considerável redução na produção por parcela, sendo que o grupo de cultivares mais produtivas rendeu, em média, 38,7 g/parcela enquanto que as suscetíveis renderam, em média, 26,63 g/parcela. VIEIRA *et al.* (2000) também relataram que quanto mais tardio o plantio maior a incidência da doença e a perda de rendimento.

Foram observadas diferenças significativas para número de plantas, sendo formados cinco grupos distintos, mostrando que o patógeno pode ter influenciado de forma prejudicial, reduzindo o estande em acessos mais suscetíveis. Houve uma grande diferença no número de plantas, que variou de 7 a 25. O acesso CNPH-846 (= RR-1178) apresentou o menor número de plantas no final do ciclo. Coincidentemente, esse mesmo acesso recebeu nota 5 para severidade do oídio, indicando que o oídio pode influenciar negativamente a produção e também o estande final em um subgrupo de acessos mais sensíveis a essa doença.

A temperatura média durante a condução do ensaio ficou em torno de 21,8 °C, favorecendo o desenvolvimento da doença. Em caso de infecção grave, o rendimento tende a diminuir drasticamente (PLOPER, 1981). Sob condições de doença favoráveis, o peso da vagem pode apresentar reduções na ordem de 26-47% e reduções entre 21-31% podem ser observadas para a quantidade de vagens (MUNJAL *et al.*, 1963). A incidência do oídio é mais severa em épocas de semeadura tardia e em acessos de ervilha de maturação tardia, onde os níveis de redução de produtividade podem aumentar em 50% (REHMAN *et al.* 2014).

Para dias até o florescimento (DAF) houve formação de 23 grupos distintos (Tabela 2), variando de 26 a 56 dias o início do aparecimento das flores, demonstrando a diferença entre os acessos precoces e os acessos mais tardios, onde a duração do florescimento (DF) variou entre 6 e 10 dias aproximadamente. VIEIRA *et al.* (2000) relatou resultados próximos aos obtidos nessa variável e SCHIAVON *et al.* (2018) avaliando 35 genótipos de ervilha verificaram que o florescimento ocorreu após 61 a 83 dias.

A duração do florescimento variou de 6 a 10 dias aproximadamente, havendo diferença significativa entre os genótipos avaliados. VIEIRA *et al.* (2000) avaliando seis épocas de plantio de ervilha em Patos de Minas – MG, verificaram uma variação da duração de florescimento entre 15 e 25 dias, sendo que períodos de floração mais longos coincidiram com os meses mais frios (junho-agosto).

Neste presente trabalho, encontrou-se diferentes níveis de resistência ao oídio nos acessos de ervilha avaliados, demonstrando a variabilidade genética para essa doença. IGLESIAS-GARCÍA *et al.* (2015) consideram que a resistência genética da ervilha ao oídio um componente vital na produção sustentável dessa hortaliça.

#### 4 CONCLUSÕES

1. O acesso de ervilha de vagens comestíveis (CNPB-144 = MK 13) comercializado pela Sakata Seed Sudamerica apresentou os mais elevados níveis de resistência ao agente causal do oídio (*Erysiphe* sp.) nas nossas condições experimentais de campo.
2. Acessos previamente identificados como resistentes na região do Brasil Central tais como 'Triofin', 'Luiza', 'Viçosa', 'Marina', 'Maria' e 'Kodama', se mostraram suscetíveis.
3. Estes resultados indicam a potencial presença de isolados fúngicos com um perfil de virulência distinto dos predominantes em décadas anteriores.
4. Nenhum acesso de ervilha destinado a indústria apresentou níveis elevados de resistência ao oídio. Neste contexto, seria de interesse para o melhoramento da ervilha para enlatamento e colheita verde iniciar cruzamentos envolvendo o acesso de ervilha de vagens comestíveis (CNPB-144 = MK 13) visando incorporar o(s) fator(es) de resistência desse material nesse grupo morfo-agronômico.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CALEGARI, A.; POLA, J. N. Ervilha forrageira IAPAR 83. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 2009. 5 p. 1 Folder.

CARVALHO, A.; CARVALHO, J. de A.; REZENDE, F. C.; AQUINO, R. F.; FREITAS, W. A. DE.; OLIVEIRA, E. C. Produção da ervilha cultivada em ambiente protegido sob diferentes tensões de água no solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 16, n. 1, 2012.

CORAL, C.; EDUARDO, O.; ACOSTA.; B.; ESTEFANY, J.; TAIMAL, N.; CRISTINA, O. Evaluación agronómica y económica de arveja arbustiva (*Pisum sativum* L.) en diferentes

épocas de siembra y sistemas de tutorado. **Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica**, v. 20, n. 2, p. 279–288, 2017.

EK, M.; EKLUND, M.; VON POST, R.; DAYTEG, C.; HENRIKSSON, T.; WEIBULL, P.; CEPLITIS, A.; ISAAC, P.; TUVESON, S. Microsatellite markers for powdery mildew resistance in pea (*Pisum sativum* L.). **Hereditas**, v. 142, p. 86–91, 2005.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia Moderna na Produção e Comercialização de Hortaliças**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2008. 421p.

FONDEVILLA, S.; TORRES, A. M.; MORENO, M. T.; RUBIALES, D. Identification of a new gene for resistance to powdery mildew in *Pisum fulvum*, a wilt relative of pea. **Breeding Science**, Tokyo, v. 57, p. 181–184, 2007.

GHAFOOR, A.; MCPHEE, K. Marker assisted selection (MAS) for developing powdery mildew resistant pea cultivars. **Euphytica**, v. 186, p. 593–607, 2012.

GIORDANO, L. de B. Cultivo da ervilha (*Pisum sativum* L.). **Embrapa Hortaliças**, 3. ed. Brasília-DF, 1997. 14 pp.

GIORDANO, L. B.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Resistência ao oídio (causado por *Erysiphe pisi* D.C.) em ervilha (*Pisum sativum* L. cv. Triofin). **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.2, n.1, p.35–37, 1984.

HANNAI, S. M. **Reação de Linhagens de Ervilha de Vagens Comestíveis (*Pisum sativum* L.) ao Oídio (*Erysiphe pisi* DC.)**. 2001. 56 f. Dissertação (Área de Concentração em Proteção de Plantas.) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp, Botucatu-SP, 2001.

HARLAND, S. C. Inheritance of immunity to mildew in Peruvian forms of *Pisum sativum*. **Heredity**, New York, v. 2, p. 263–269, 1948.

HERINGA, R. J.; VANNOREL, A.; TAZELAAR, M. F. Resistance to powdery mildew in pea. **Euphytica**, Wageningen, v. 18, p. 163–169, 1969.

IBGE. 2018. Área plantada, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor do valor da produção das lavouras temporárias. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612#resultado> >. Acesso em: 26 mar. 2019.

IGLESIAS-GARCÍA, R.; RUBIALES, D.; FONDEVILLA, S. Penetration resistance to *Erysiphe pisi* in pea mediated by *er1* gene is associated with protein cross-linking but not with callose apposition or hypersensitive response. **Euphytica**, v. 201, n. 3, p. 381–387, 2015.

MCPHEE, K. Dry pea production and breeding – A mini review. **Food Agriculture and Environment** v. 1, p. 64–69, 2003.

MUNJAL, R. L., V. V. Chenulu, and T. S. Hora, 1963: Assessment of losses due to powdery mildew (*Erysiphe polygoni*) on pea. **Indian Phytopathology**, v. 19, p. 260–267.

OLIVEIRA, C.A.S.; MAROUELLI, W.A.; SANTOS, J.R.M.; BOITEUX, L.S. Produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* e severidade de oídio em cultivares de ervilha sob diferentes lâminas de irrigação. **Horticultura Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 16–20, 1999.

PEREIRA, A. S. Ervilha: Integração pesquisa/iniciativa privada. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, n. 158, p. 52–64, 1989.

PLOPER, S.I. Biochemical changes occurring in pea leaves under pathogenesis of powdery mildew. **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology**. v. 12, p. 329–330, 1981.

REHMAN, A., MEHBOOB, S., SOHAIL, M., GONDAL, A. S., IDREES, M., ALI, H. Estimation of genetic diversity of pea germplasm against powdery mildew (*Erysiphe pisi*) disease and its chemosynthetic management. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v. 26, n. 2, p. 309–313, 2014.

REILLING, T.P. Powdery mildew. In: HAGEDORN, D.J. ed. Compendium of Pea Diseases. St. Paul, **American Phytopathological Society**, p. 21–22, 1984.

REIS, N. V. B. dos. O clima e a cultura da ervilha. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 4, n. 158, p. 8–9, 1989.

SANTOS, J.R.M. Efeito de cultivares e densidades de plantio na produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em ervilha. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 2, p. 135, 1990. Resumo.

SANTOS, J.R.M.; PESSOA, H.B.S.V.; GIORDANO, L.B. Resistência de campo a oídio (*Oidium* sp.) em germoplasma de ervilha (*Pisum sativum*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 1, p. 123–125, 1993.

SCHIAVON, J. S; BEVILAQUA, G. A. P.; ALBUQUERQUE, T. S.; PINHEIRO, R. A.; EBERHARDT, P. E. R.; ANTUNES, I. F. Microsatellite genotyping and molecular screening of pea (*Pisum sativum* L.) germplasm with high-resolution melting analysis for resistance to powdery mildew. **Brazilian Journal of Development**, v. 4, n. 6, p. 3147–3164, 2018.

TRIDGED GLOBAL TRADE PLATAFORM. **TRIDGED**. (2016). Disponível em: <<https://www.tridge.com/intelligences/peas/production> >. Acesso em: 26 de mar. de 2019.

VIEIRA, R. F.; RESENDE, M. A. V.; SANTOS, C. M. Épocas de plantio de ervilha em Patos de Minas, Uberaba e Janaúba, Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.74–80, 2000.



WARKENTIN, T. D.; RASHID, K. Y.; XUE, A. G. Fungicidal control of powdery mildew in field pea. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 76, p. 933–935, 1996.

## **CAPÍTULO II**

---

### **EMPREGO DE MARCADORES MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DOS GENES *er1*, *er2* e *Er3* EM GERMOPLASMA DE ERVILHA AVALIADO PARA RESISTÊNCIA AO OÍDIO NAS CONDIÇÕES BRASILEIRAS**

## RESUMO

A cultura da ervilha (*Pisum sativum* L.) apresenta grande importância econômica no Brasil. O oídio é uma importante doença da ervilha nas condições brasileiras, causando importantes perdas de produção e qualidade de grãos. O uso de variedades resistentes é considerado como sendo a medida de controle mais efetiva e sustentável. Marcadores moleculares ligados a genes/loci de resistência aos agentes causais do oídio de ervilha têm sido utilizados em diferentes programas de melhoramento. Esses marcadores proporcionam uma maior eficiência no processo de seleção, reduzindo o tempo necessário para piramidizar os distintos genes de resistência em diferentes materiais genéticos. Até o presente momento, dois genes recessivos (*er1* & *er2*) e um gene dominante (*Er3*) foram identificados para resistência ao oídio em germoplasma de ervilha. O objetivo do presente trabalho foi confirmar (através do emprego de marcadores moleculares) a potencial presença dos loci de resistência *er1*, *er2* e *Er3* no germoplasma de ervilha da Embrapa Hortaliças. Um subgrupo de 20 acessos com resposta diferencial ao oídio foi avaliado empregando seis marcadores moleculares (dois RAPDs e quatro SCARs) ligados a esses três loci de resistência previamente descritos em ervilha (*er1*, *er2* e *Er3*). Os resultados indicaram que o acesso CNPH-144 = MK 13 (de ervilha de vagens comestíveis) que apresentou os maiores níveis de resistência ao oídio possui uma pirâmide de dois genes recessivos de resistência (*er1* e *er2*). De acordo com as análises de marcadores moleculares, 'Trioфин' e 'Kodama' (duas cultivares previamente reportadas como resistentes que apresentaram respostas suscetíveis em condições de campo) possuem os marcadores moleculares associados com os genes *er1* e *Er3*, mas não o gene *er2*. De fato, acessos com os maiores níveis de resistência ao oídio, sob essas condições de avaliação, foram os portadores do gene *er2*.

**Palavras-chave:** *Pisum sativum*, PCR, RAPD, marcadores moleculares.

## ABSTRACT

The pea (*Pisum sativum* L.) crop has great economic importance in Brazil. Powdery mildew is an important disease of peas under Brazilian conditions, causing important grain yield and quality losses. The use of resistant varieties is considered to be the most effective and sustainable control measure. Molecular markers have been used in different pea breeding programs, providing higher efficiency in the selection process and reducing the time for the incorporation of different resistance genes into different genetic materials. To date, two recessive genes (*er1* and *er2*) and one dominant gene (*Er3*) have been identified for resistance to powdery mildew in pea germplasm. The objective of the present work was to confirm the potential presence of the resistance loci *er1*, *er2* and *Er3* in the pea germplasm bank from Embrapa Vegetable Crops. A subgroup of 20 accessions with differential response to powdery mildew was evaluated using six molecular markers (two RAPDs and four SCARs) linked to the three resistance loci previously described in pea (*er1*, *er2* and *Er3*). The results indicated that the accession CNPH-144 = MK 13 (a pea cultivar with edible pods), which displayed the highest levels of resistance to powdery mildew has a pyramid of two recessive resistance genes (*er1* and *er2*). According to the molecular markers, ‘Triofin’ and ‘Kodama’ (two cultivars previously reported as resistant that displayed susceptible responses under field conditions) have molecular markers associated with *er1* and *Er3* genes but not with the *er2* gene. In fact, the accessions with the highest levels of resistance to powdery mildew under these evaluation conditions were those with the *er2* gene.

**Key-words:** *Pisum sativum*, PCR, RAPD, molecular markers.

## 1 INTRODUÇÃO

A ervilha (*Pisum sativum* L.) é uma leguminosa de grande importância e é afetada por vários estresses bióticos e abióticos durante todos os estágios de crescimento (ALI *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 2007). Na produção de ervilha, o oídio (ou míldio pulverulento) é uma doença que pode resultar em perdas de rendimento que variam de 25 a 50% (MUNJAL *et al.*, 1963; WARKENTIN *et al.* 1996; FONDEVILLA *et al.*, 2011). As perdas de rendimento podem atingir até 80% em condições de forte pressão de inóculo com o emprego de cultivares altamente suscetíveis (SMITH *et al.*, 1996; GHAFOR & MCPHEE, 2012).

O principal agente causal do oídio em ervilha é o fungo *Erysiphe pisi* DC. O ataque desse fungo pode limitar consideravelmente a produção de ervilhas (SMITH *et al.*, 1996). A doença pode acelerar a maturidade da colheita e reduzir o rendimento total da biomassa (GRITTON & EBERT, 1975; BANYAL & TYAGI, 1997; FALLON & VILJANEN-ROLLINSON, 2001). Para controlar o oídio, os agricultores muitas vezes usam tratamentos químicos, que não são muito eficientes e ainda provocam danos ambientais (FONDEVILLA & RUBIALES, 2012). O uso de variedades com fatores naturais de resistência continua a ser o método de controle mais eficaz e econômico da doença (GHAFOR & MCPHEE, 2012; FONDEVILLA & RUBIALES, 2012). HARLAND (1948) foi o primeiro a relatar a resistência ao oídio em ervilha e revelou que a resistência foi devido a um único gene recessivo. Posteriormente, muitos acessos de ervilha de diferentes regiões geográficas foram identificados como resistentes a *E. pisi* com base nos resultados de rastreamento fenotípico (FONDEVILLA & RUBIALES, 2012; GHAFOR & MCPHEE, 2012).

Dois genes recessivos para resistência a *E. pisi* (*er1* & *er2*) são conhecidos em ervilha cultivada, enquanto que um gene dominante (*Er3*) foi identificado em um acesso de ervilha silvestre (FONDEVILLA *et al.*, 2007). Todos três genes são independentes um do outro (isto é, se localizam em diferentes cromossomos). Os genes *er1* e *er2* foram descritos e caracterizados até agora apenas em acessos de *P. sativum*. O gene *er1* tem sido amplamente utilizado em programas de melhoramento, no entanto a sua eficiência tem sido ameaçada pela introdução/surgimento de novos agentes causais do oídio (ONDREJ *et al.*, 2005; ATTANAYAKE *et al.*, 2010). Marcadores moleculares (RFLP, RAPD / SCAR e SSR) ligados aos genes *er1* e *er2* já estão disponíveis. Recentemente foi demonstrado que o gene *er1* é, de fato, um membro da família de genes *mlo*, comumente usados em programas de melhoramento para resistência a oídio em diferentes plantas cultivadas (PEREIRA & LEITÃO, 2010). Por sua

vez, o gene *er2* não tem sido amplamente utilizado no melhoramento da ervilha. A expressão fenotípica do gene *er2* é influenciada pela temperatura e idade da folha (SMÝKAL *et al.*, 2012). O mecanismo associado com a resistência é baseado principalmente na morte celular pós-penetração, complementada por uma redução da porcentagem de penetrações fúngicas bem-sucedidas na epiderme de folhas maduras (FONDEVILLA *et al.*, 2006). O gene *Er3* foi identificado mais recentemente e tem sido considerado um fator importante para ampliar a base genética da resistência ao oídio em *P. sativum* (FONDEVILLA *et al.*, 2008). A resistência conferida pelo gene *Er3* se caracteriza por uma alta frequência de morte celular que ocorre tanto como resposta rápida à tentativa de infecção pelo fungo como se manifesta em um atraso no estabelecimento de colônias fúngicas.

Os mecanismos e modo de expressão dos três genes de resistência foram estudados por FONDEVILLA *et al.* (2007) e IGLESIAS-GARCÍA *et al.* (2015). O gene *er1* confere propriedades sistêmicas e imune ou de alto nível de resistência, impedindo isolados de *E. pisi* de penetrar nas células epidérmicas da ervilha. Em contraste, a resistência conferida pelos genes *er2* e *Er3* é principalmente controlada por uma resposta hipersensível que ocorre pós-penetração da célula hospedeira (FONDEVILLA *et al.*, 2007). Contudo, a resistência completa resultante da ação do gene *er2* se manifesta apenas a 25 °C ou em folhas com completa maturação. Além disso, a resistência ao oídio regulada pelo gene *er2* se mostrou específica para determinadas regiões geográficas (HERINGA *et al.*, 1969; TIWARI *et al.*, 1997; VAID & TYAGI, 1997; FONDEVILLA *et al.*, 2006).

Marcadores moleculares baseados em DNA fornecem ferramentas poderosas para identificar e mapear genes e também podem ser usados para seleção assistida por marcadores (SAM). Os genes *er1*, *er2* e *Er3* foram identificados e mapeados em ervilha através de marcadores moleculares ligados a esses fatores (DIRLEWANGER *et al.*, 1994; TIMMERMAN *et al.* 1994; TIWARI *et al.*, 1998; JANILA & SHARMA, 2004; EK *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2010; TONGUC & WEEDEN, 2010; SRIVASTAVA *et al.*, 2012). Os genes *er1* e *er2* foram mapeados nos grupos de ligação VI e III, respectivamente (DIRLEWANGER *et al.*, 1994; TIMMERMAN *et al.*, 1994; KATOCH *et al.*, 2010). Por sua vez, o gene *Er3* foi localizado em um acesso desconhecido de ervilha estando ligado aos marcadores Scw4637 e OPAG05\_1240 (FONDEVILLA *et al.*, 2008).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi empregar marcadores moleculares ligados aos genes *er1*, *er2* e *Er3* para identificar a presença desses fatores em germoplasma de ervilha avaliado para resistência ao oídio nas condições brasileiras.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

**2.1 Obtenção de Material Genético de Ervilha:** Foram selecionados 20 acessos com respostas contrastantes ao oídio (**Quadro 1**). Estes materiais genéticos foram selecionados por escala diagramática quanto a severidade ao oídio incluindo acessos resistentes, suscetíveis e bem como um acesso com resposta intermediária. As sementes desses acessos foram semeadas em bandejas de isopor de 200 células, utilizando substrato Plantmax<sup>®</sup>. As bandejas foram posteriormente levadas para casa de vegetação. Após 30 dias foram coletadas (folhas jovens e livre de infecção) genético para extração de DNA e análise molecular.

**Quadro 1-** Acessos de germoplasma de ervilha com respostas contrastantes para oídio em condições de campo em Brasília-DF, 2017 e 2018.

Código de campo dos acessos resistentes	Designação da linhagem ou acesso	Código de campo dos acessos suscetíveis (S) ou intermediário (I)	Designação da linhagem ou acesso
E-051	Ema-ramificada	Amélia (S)	Amélia
E-738	JOF	E-006 (S)	Kwartella
E-857	B77-158	E-054 (S)	Moreninha
E-858	B77-159	E-419 (S)	Green Anow
E-864	B77-164	E-697 (S)	M-163
E-870	B77-171	E-851 (S)	New Sesson-Normal
E-871	B77-172	E-855 (S)	New Sesson-stte
E-894	VR-1492-171	Kodama (S)	Kodama
E-991	B81-257	Triofin (S)	Triofin
MK13	MK13	Mikado (I)	Mikado

## 2.2 Extração e Quantificação do DNA Genômico

Após a avaliação por escala diagramática foram selecionados para extração de DNA dez acessos mais resistentes, nove suscetíveis e um acesso com resposta intermediária. O DNA genômico foi extraído de tecido foliares dos 20 acessos de ervilha por meio do método CTAB usando um protocolo modificado (BOITEUX *et al.*, 1999). O DNA genômico foi utilizado

como molde em ensaios com diferentes sistemas de marcadores, baseados em PCR: Colocou-se seis *billes* no tubo Precellys® e logo após a coleta de 2 disquinhos da folha, foi adicionado 750 µL de CTAB no tubo já com o material; logo em seguida, foi realizado a maceração em dois ciclos de 30 segundos a 2000 rpm em agitador (Precellys® – Bertin Technologies) (Programa 2), e após os tubos foram incubados a temperatura de 65°C por 10 minutos, sendo então retirados do banho-maria e deixado ao ar livre por 3 minutos. Em seguida foram adicionados 750 µL de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico) e agitados (em vórtex). Os tubos foram então centrifugados por 5 minutos a 9.000 rpm, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo e a este foi adicionado 300 µL de isopropanol. Após agitação lenta dos tubos, os mesmos permaneceram a temperatura ambiente por 20 minutos para precipitação do DNA. Após este período, os tubos foram centrifugados por 13 minutos a 12.000 rpm, e o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 600 µL de etanol 70% gelado; a lavagem foi repetida duas vezes. Após as lavagens, o sobrenadante foi eliminado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 100 µL TE (Tampão de extração), sendo então deixado por 12 horas em um refrigerador com temperatura em torno de 5°C. A quantificação e determinação da pureza do DNA extraído foram obtidas por comparação visual de cada amostra com padrões de DNA de concentração conhecida em gel de 1% de agarose e por espectrofotometria, por leitura da absorvância a 260 nm. As amostras de DNA de trabalho foram obtidas por diluição com água destilada até a concentração final de 20 ng/µL.

## **2.3 Análise com Marcadores Moleculares**

### **2.3.1 Marcadores RAPD (“Randomly Amplified Polymorphic DNA”)**

A técnica de RAPD permite a amplificação de fragmentos de DNA a partir de um único *primer* (constituído por 10 bases) com sequência de nucleótidos arbitrária (WILLIAMS *et al.*, 1990). Foram preparados dois conjuntos separados de DNA a partir de dez plantas resistentes homozigotas e dez plantas homozigotas suscetíveis. Foi produzido um *pool* de cada acesso, os quais continham uma quantidade igual de DNA. O volume final da reação de PCR para o RAPD foi de 12,5 mL. O *mix* da reação consistiu em 5,95 µL de água destilada, 1,25 µL de tampão 10X, 0,6 µL MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µL de dNTP, 0,2 µL da enzima *Taq* DNA polimerase, 2 µL do primer iniciador e 2,0 µL de DNA genômico (20 ng/µL). O DNA molde para a PCR foi desnaturado durante 2 minutos a 94 °C e amplificado durante 35 ciclos (30



segundos a 94 °C, 60 segundos a 36 °C e 90 segundos a 72 °C) em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700. Após o ciclo final, todos os filamentos foram completados com um segmento de 10 minutos a 68 °C seguido de armazenamento a 4 °C. A eletroforese foi realizada em agarose a 1,6% com um tampão Tris-Acetato-EDTA (Tris-acetato 40 mM mais EDTA 1 mM) para 3,5. 4 horas a 100 V (tensão constante). Os géis corados com brometo de etídio foram visualizados num transiluminador de luz ultravioleta e fotografados. *Primers* RAPD capazes de gerar marcadores ligados ao locus *er1* (TIWARI *et al.*, 1998; FONDEVILLA, 2008, KATOCH *et al.*, 2010) foram: **OPO-18** (*er1*) (5'-CTCGCTATCC-3') que amplifica um fragmento polimórfico de aproximadamente 1200 pb no progenitor suscetível e *primer* OPX-17\_1400 *er1* (5'-GGACCAAGCT-3') que amplifica um fragmento polimórfico de aproximadamente 1400 pb ligados ao alelo resistente.

### 2.3.3 Marcadores SCAR (“Sequence Characterized Amplified Region”)

Nesta técnica, utilizam-se pares de “primers” que amplificam fragmentos genômicos de DNA específicos previamente isolados e sequenciados. As reacções de amplificação foram realizadas num volume de 20 µl contendo na reacção (10,48 µL de água destilada (H<sub>2</sub>O), 2,0 µL de tampão 10X, 1,2 µL MgCl<sub>2</sub>); 0,32 µL de *Taq* DNA polimerase, 2,0 µL de dNTP; 0,5 µL de cada “primer” e 3,0 µL de DNA (20 ng/µL). As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo inicial de 4 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 16 segundos a 50 °C, 2 minutos a 72 °C, finalizando com 7 minutos a 72 °C, seguido de armazenamento a 4 °C. Amostras dos produtos das reacções de PCR (5 µL) da reacção foram aplicados em gel de agarose a 1%, utilizando marcador de peso molecular 1Kb DNA *ladder* (Invitrogen® Life Technologies), em cuba por 2 horas de 100 V. Os géis foram corados com brometo de etídio e visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta e fotografados.

**Quadro 2:** *Primers* do tipo SCAR empregados para ampliação de marcadores ligados aos genes de resistência ao oídio – *er1*, *er2* e *Er3* (TIMMERMAN *et al.*, 1994; TIWARI *et al.*, 1998; JANILA & SHARMA, 2004; FONDEVILLA *et al.*, 2008).

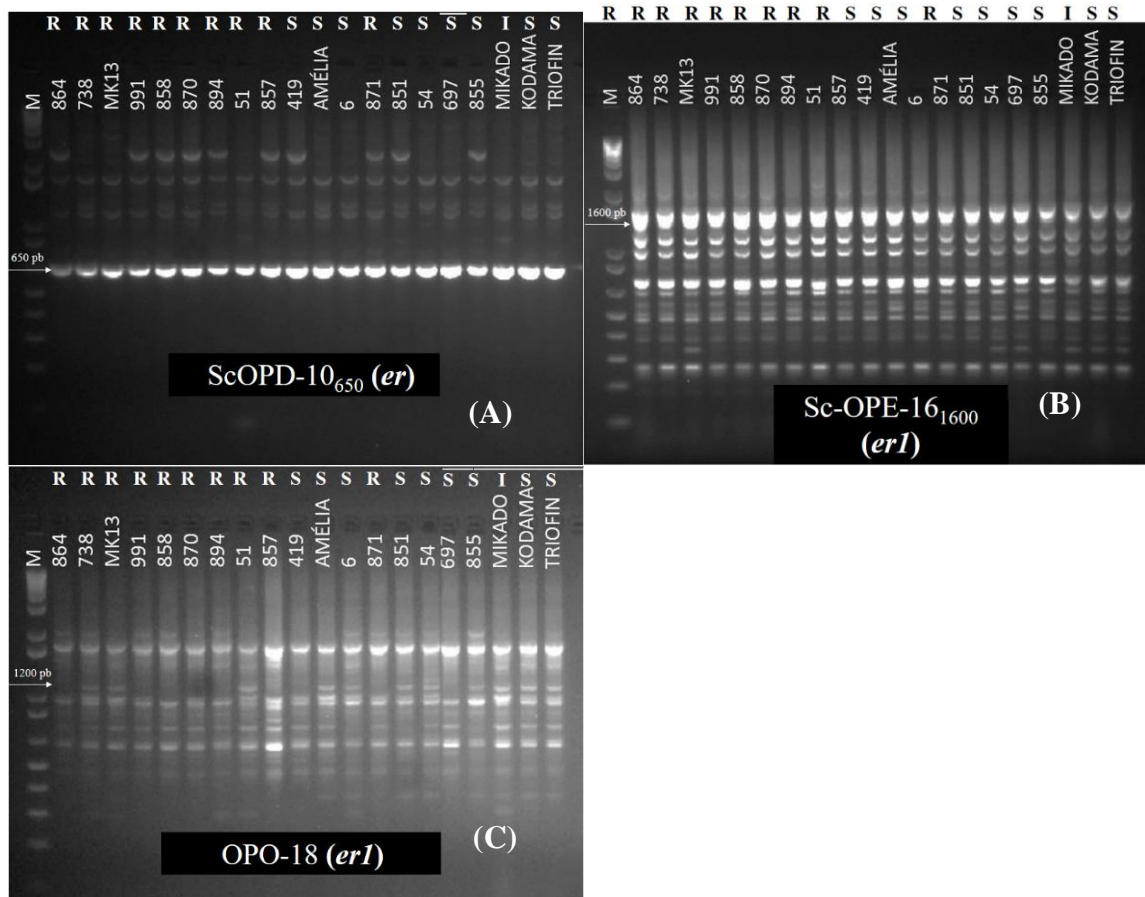
Marcador SCAR	Fragmento RAPD original	Código do primer	Sequência do primer (5' para 3')
ScOPD-10 <sub>650</sub> ( <i>er</i> )	OPD-10 <sub>650</sub>	ScOPD-10 <sub>650</sub> -F	GGTCTACACCTCATATCTTGATGA
		ScOPD-10 <sub>650</sub> -R	GGTCTACACC TAAACAGTGTCCGT
ScX17_1400 ( <i>er2</i> )	OPX17_1400	ScX17_1400-F	GGACCAAGCTCGGATCTTTC
		ScX17_1400-R	GACACGGACCCAATGACATC
SCW4 <sub>637</sub> ( <i>Er3</i> )	OPW04_637	SCW4F1-F	CAGAAGCGGATGAGGCGGA
		SCW4R1-R	CAGAAGCGGATACAGTACTAAC
Sc-OPE-16 <sub>1600</sub> ( <i>er1</i> )	OPE-16	Sc-OPE-16 <sub>1600</sub> -F	GGTGACTGTGGAATGACAAA
		Sc-OPE-16 <sub>1600</sub> -R	GGTGACTGTGACAATTCCAG

F = forward; e R = reverse primer.

### 3 RESULTADOS & DISCUSSÃO

Foram utilizados seis marcadores moleculares do tipo RAPD e SCAR (SCW4<sub>637</sub>, Scx17-1400, ScOPD-10<sub>650</sub>, SC-OPE-16<sub>(1600)</sub>, OPX17-1400 e OPO-18). De acordo com a **Figura 1 (A)**, o produto da amplificação do marcador Sc-OPE-16<sub>1600</sub> (*er*) é um fragmento de aproximadamente 1600 pb. Não foi possível fazer a diferenciação dos acessos avaliados em relação ao gene de resistência *er1*, pois em todos os acessos (resistentes, intermediário e susceptíveis) apresentaram a mesma banda de 1600 pb. O mesmo resultado foi observado na amplificação do marcador ScOPD<sub>650</sub> (*er1*) (**Figura 1 B**), que amplificou um marcador de 650 pb em suposta ligação com o gene *er1* em todos os acessos analisados.

**Figura 1** – Análise da presença de fatores de resistência ao oídio em acessos contrastantes para reação ao oídio de ervilha através de marcadores moleculares ligados ao gene *er1*.

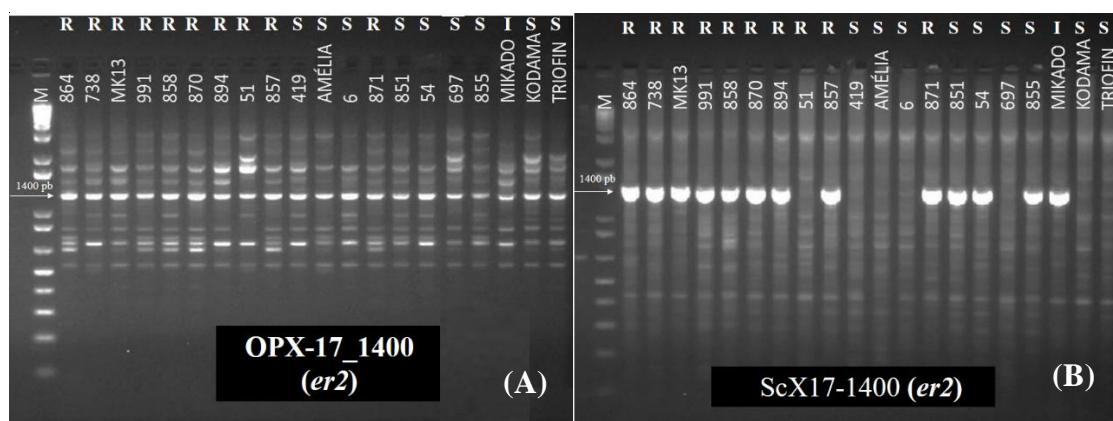


R: Resistente; S: Suscetível; I: Intermediário.

Desta forma, esses marcadores não foram capazes de gerar polimorfismos entre os acessos avaliados. Desta forma, não foi possível identificar marcadores ligados à resistência ou à suscetibilidade ao oídio usando esses dois marcadores. Por sua vez, o marcador OPO-18 (*er1*) (**Figura 1 C**), revelou polimorfismo para o gene de resistência *er1*, sendo que, onze dos acessos analisados apresentaram uma banda esperada de 1200 pb (738 (R), MK 13 (R), 51 (R), Amélia (S), 6 (S), 851 (S), 54 (S), 855 (S), Mikado (I), Kodama (S), Trioфин (S)). Dentre eles estão acessos considerados resistentes, intermediários e suscetíveis, e nove acessos (864 (R), 991 (R), 858 (R), 870 (R), 894 (R), 419 (S), 871 (R), 697 (S)) não apresentaram essa banda. TIWARI *et al.* (1998) identificaram dois marcadores RAPD (OPE16\_1600 e OPO18\_1200) ligados ao gene de resistência ao oídio presente na cultivar Highlight. No entanto, no presente estudo, apenas marcador OPO18\_1200 foi capaz de revelar a presença de polimorfismo

associado com esse gene de resistência em alguns dos acessos. O gene *er1* recessivo fornece resistência estável e durável ao oídio causado pelo patógeno *E. pisi* (LAHOZ *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2016). No entanto, de acordo com os resultados das amplificações dos géis, o gene *er1* não está manifestando o esperado fenótipo de resistência nos acessos avaliados em campo. Nota-se que nesse trabalho foi verificado diferentes níveis de resistência ao oídio, demonstrando a variabilidade genética para essa doença.

**Figura 2** – Análise da presença de fatores de resistência ao oídio em acessos contrastantes para reação ao oídio de ervilha através de marcadores moleculares ligados ao gene *er2*.



R: Resistente; S: Suscetível; I: Intermediário.

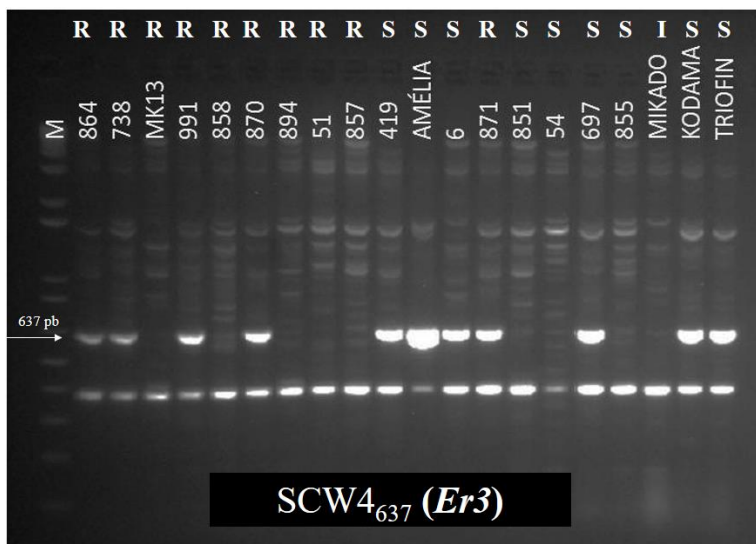
O marcador OPX-17-1400 (*er2*) que amplifica um fragmento polimórfico de aproximadamente 1600 pb, não revelou polimorfismos entre os acessos analisados neste trabalho (**Figura 2**). Desta forma, não foi possível identificar marcadores ligados quer à resistência quer à suscetibilidade ao oídio. Porém, o marcador ScX17-1400 (*er2*) que amplifica um fragmento polimórfico de aproximadamente 1400 pb foi capaz de revelar polimorfismo, onde treze acessos apresentam essa banda [864 (R), 738 (R), MK13 (R), 991 (R), 858 (R), 870 (R), 894 (R), 857 (R), 871 (R), 851 (S), 54 (S), 855 (S) e Mikado (I)] e sete não apresentam a referida banda [51 (R), 419 (S), Amélia (S), 6 (S), 697 (S), Kodama (S) e Trioфин (S)].

KATOCH *et al.* (2010) converteram o marcador RAPD OPX-17\_1400 (em estreita ligação com o gene *er2*) em um marcador de SCAR (ScX17\_1400), visando facilitar a genotipagem desse gene via PCR. Segundo eles o marcador SCAR irá garantir introgressão rápida e precisa do gene *er2* em cultivares de ervilha suscetíveis, permitindo a seleção de portadores do gene *er2* e subseqüentes gerações de *backcross* sem testes de progênie e triagem de resistência. A precisão da seleção *er2* pode ser mais melhorada pelo uso combinado de

ScX17\_1400 e o marcador RAPD OPY17\_550 em SAM. O uso simultâneo de ambos os marcadores é estimado em resultar em uma maior eficiência de seleção comparável à obtida com um único marcador localizado. O ScX17\_1400 representa uma ferramenta eficiente para a genotipagem em larga escala de *er2* em comparação com os marcadores AFLP relatados anteriormente (TIWARI *et al.* 1999).

O marcador SCW4<sub>637</sub> para o gene *Er3* (**Figura 3**), que amplifica um fragmento polimórfico de aproximadamente 637 pb, apresentou polimorfismo entre os acessos avaliados, sendo que onze acessos [864 (R), 738 (R), 991 (R), 870 (R), 419 (S), Amélia (S), 6 (S), 871 (R), 697 (S), Kodama (S), Trioфин (S)] apresentaram a banda e nove acessos [MK13 (R), 858 (R), 894 (R), 51 (R), 857 (R), 851 (S), 54 (S), 855 (S) e Mikado (I)] não apresentaram a banda.

**Figura 3** – Análise da presença de fatores de resistência ao oídio em acessos contrastantes para reação ao oídio de ervilha através de marcador molecular ligado ao gene *Er-3*.



R: Resistente; S: Suscetível; I: Intermediário.

As cultivares Kodama (semi-áfila) e Trioфин (folha normal) apresentaram perfis de bandas idênticos para todos os marcadores moleculares avaliados, reforçando a hipótese de que a primeira cultivar é, muito provavelmente, um mutante natural da segunda (COELHO *et al.*, 1991).

FONDEVILLA *et al.* (2008) estudando uma população F<sub>2</sub> de ervilha segregando para resistência ao oídio, identificou dois marcadores moleculares (SCAB1<sub>874</sub> e SCW4<sub>637</sub>) fortemente ligados a um novo gene de resistência dominante (*Er3*). Para FONDEVILLA *et al.* (2011) o uso destes marcadores facilitará a introgressão deste gene de *P. fulvum*, um parente

selvagem de ervilha com características agrônômicas indesejáveis, em ervilha comercialmente competitiva. De fato, um marcador do tipo SCAR (SCW4<sub>637</sub>) descrito por FONDEVILLA *et al.* (2008) se mostrou informativo e muito simples de ser avaliado nas condições experimentais utilizadas no presente trabalho (ver Figura 3).

Desta forma, o emprego combinado de marcadores moleculares já disponíveis em ligação com o gene *er1* (TIMMERMAN-VAUGHAN *et al.*, 1994; TIWARI *et al.*, 1998; JANILA & SHARMA, 2004; EK *et al.*, 2005) com o gene *er2* (KATOCH *et al.*, 2010) e com o gene *Er3* (FONDEVILLA *et al.*, 2008), vai facilitar o processo de piramidização desses três fatores em um mesmo material genético de ervilha, aumentando a possibilidade de obtenção de cultivares resistentes com maior durabilidade e amplitude.

#### 4 CONCLUSÕES

1. O acesso MK13, baseado na avaliação dos marcadores, possui a combinação dos genes *er1* e *er2*, porém o gene que demonstrou ser mais eficiente ao oídio nessas condições de avaliação foi o *er2*.
2. Acessos previamente identificados como resistente na região do Brasil Central tais como: ‘Triofin’, e ‘Kodama’ se mostraram suscetíveis. Estes acessos possuem marcadores ligados aos genes *er1* e *Er3*, mas possuem o gene *er2*.
3. Estes resultados indicam a potencial presença de isolados fúngicos com um perfil de virulência distinto dos predominantes nas décadas anteriores, podendo infectar, de maneira eficiente, cultivares contendo os genes *er1* e *Er3*.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, S. M.; SHARMA, B.; AMBROSE, M. J. Current status and future strategy in breeding pea to improve resistance to biotic and abiotic stresses. p. 540–558. In: **Expanding the production and use of cool season food legumes**. Springer, Dordrecht, 1994.
- ATTANAYAKE, R. N.; GLAWE, D. A.; MCPHEE, K. E.; DUGAN, F. M.; CHEN, W. *Erysiphe trifolii* – a newly recognized powdery mildew pathogen of pea. **Plant Pathology**, v. 59, n. 4, p. 712–720, 2010.

BANYAL, D. K.; TYAGI, P. D. Resistance of pea genotypes in relation to sporulation by *Erysiphe pisi*. **Crop Protection**, v. 16, n. 1, p. 51–55, 1997.

BOITEUX, L. S.; FONSECA, M. E. N.; SIMON, P. W. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 124, n. 1, p. 32–38, 1999.

COELHO, P. D. A.; FONSECA, M. E. N.; GIORDANO, L.B. Análise isoenzimática de cultivares de ervilha. **Horticultura Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 90–91. 1991.

DIRLEWANGER, E.; ISAAC, P. G.; RANADE, S.; BELAJOUZA, M.; COUSIN, R.; VIENNE, D. Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with disease resistance genes and developmental traits in *Pisum sativum* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, n. 1, p. 17–27, 1994.

EK, M., EKLUND, M., VON POST, R., DAYTEG, C., HENRIKSSON, T., WEIBULL, P., TUVESON, S. Microsatellite markers for powdery mildew resistance in pea (*Pisum sativum* L.). **Hereditas**, v. 142, p. 86–91, 2005.

FALLOON, R. E., VILJANEN-ROLLINSON, S. L. H. Powdery mildew. p 28–29. *In*: Kraft JM, Pfleger FL (eds) Compendium of pea diseases and pests. **American Phytopathological Society**, St. Paul, 2001.

FONDEVILLA, S., CARVER T. L. W., MORENO, M. T., RUBIALES, D. Macroscopic and histological characterisation of genes *er1* and *er2* for powdery mildew resistance in pea. **European Journal of Plant Pathology**, v. 115, n. 3, p. 309–321, 2006.

FONDEVILLA, S., CARVER, T. L. W., MORENO, M. T., RUBIALES, D. Identification and characterization of sources of resistance to *Erysiphe pisi* Syd. in *Pisum* spp. **Plant Breeding**, v. 126, n. 2, p. 113–119, 2007.

FONDEVILLA, S., RUBIALES, D., MORENO, M. T., TORRES, A. M. Identification and validation of RAPD and SCAR markers linked to the gene *Er3* conferring resistance to *Erysiphe pisi* DC in pea. **Molecular Breeding**, v. 22, n. 2, p. 193–200, 2008.

FONDEVILLA, S., CUBERO, J. I., RUBIALES, D. Confirmation that the *Er3* gene, conferring resistance to *Erysiphe pisi* in pea, is a different gene from *er1* and *er2* genes. **Plant Breeding**, v. 130, n. 2, p. 281–282, 2011.

FONDEVILLA, S., RUBIALES, D. Powdery mildew control in pea. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA, v. 32, n. 2, p. 401–409, 2012.

GHAFOOR, A., MCPHEE, K. Marker assisted selection (MAS) for developing powdery mildew resistant pea cultivars. **Euphytica**, v. 186, n. 3, p. 593–607, 2012.

GRITTON, E.T.; R.D. Interaction of planting date and powdery mildew on pea plant performance. **Journal of the American Society for Horticultural Science** v. 100, p. 137–142, 1975.

HARLAND, S. C. Inheritance of immunity to mildew in Peruvian forms of *Pisum sativum*. **Heredity**, v. 2, n. 2, p. 263, 1948.

HERINGA, R. J., NOREL, A. V; TAZELAAR, M. F. Resistance to powdery mildew (*Erysiphe polygoni* DC) in peas (*Pisum sativum* L.). **Euphytica**, v. 18, n. 2, p. 163–169, 1969.

IGLESIAS-GARCÍA, R., RUBIALES, D., FONDEVILLA, S. Penetration resistance to *Erysiphe pisi* in pea mediated by *er1* gene is associated with protein cross-linking but not with callose apposition or hypersensitive response. **Euphytica**, v. 201, n. 3, p. 381–387, 2015.

JANILA, P.; SHARMA, B. RAPD and SCAR markers for powdery mildew resistance gene *er* in pea. **Plant Breeding**, v. 123, n. 3, p. 271–274, 2004.

KATOCH, V., SHARMA, S., PATHANIA, S., BANAYAL, D. K., SHARMA, S. K., RATHOUR, R. Molecular mapping of pea powdery mildew resistance gene *er2* to pea linkage group III. **Molecular Breeding**, v. 25, n. 2, p. 229–237, 2010.

LAHOZ, E., CARRIERI, R., PARISI, B., PENTANGELO, A., RAIMO, F. Overcoming of the resistance in resistant genotypes of dry pea (*Pisum sativum*) by an isolate of *Erysiphe pisi* in Italy. **Journal of Plant Pathology**, v. 95, n.1, p. 171–176, 2013.

MUNJAL, R. L. Assessment of losses due to powdery mildew (*Erysiphe polygoni*) on pea. **Indian Phytopathology**, v. 19, p. 260–267, 1963.

ONDŘEJ, MICHAL.; DOSTÁLOVÁ, RADMILA.; ODSTRČILOVÁ, LENKA. Response of *Pisum sativum* germplasm resistant to *Erysiphe pisi* to inoculation with *Erysiphe baeumleri*, a new pathogen of peas. **Plant Protection Science**, v. 41, n. 3, p. 95–103, 2005.

PEREIRA, G.; LEITÃO, J. Two powdery mildew resistance mutations induced by ENU in *Pisum sativum* L. affect the locus *er1*. **Euphytica**, v. 171, n. 3, p. 345, 2010.

PEREIRA, G., MARQUES, C., RIBEIRO, R., FORMIGA, S., DÂMASO, M., SOUSA, T., FARINHO, M., LEITÃO, J. M. Identification of DNA markers linked to an induced mutated gene conferring resistance to powdery mildew in pea (*Pisum sativum* L.). **Euphytica**, v. 171, n. 3, p. 327, 2010.

SMÝKAL, P.; AUBERT, G.; BURSTIN, J.; COYNE, C.J.; ELLIS, N.T.H.; FLAVELL, A.J.; FORD, R.; HÝBL, M.; MACAS, J.; NEUMANN, P.; MCPHEE, K.E.; REDDEN, R.J.;



RUBIALES, D.; WELLER, J.L.; WARKENTIN. Pea (*Pisum sativum* L.) in the genomic era. **Agronomy**, v. 2, n. 2, p. 74–115, 2012.

SUN, S.; DENG, D.; WANG, Z.; DUAN, C.; WU, X.; WANG, X.; ZHU, Z. A novel er1 allele and the development and validation of its functional marker for breeding pea (*Pisum sativum* L.) resistance to powdery mildew. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, n. 5, p. 909–919, 2016.

SMITH, P. H. et al. The early development of *Erysiphe pisi* on *Pisum sativum* L. **Plant Pathology**, v. 45, n. 2, p. 302–309, 1996.

SRIVASTAVA, R.K., MISHRA, S. K., SINGH, K., MOHAPATRA, T. Development of a coupling-phase SCAR marker linked to the powdery mildew resistance gene ‘er1’ in pea (*Pisum sativum* L.). **Euphytica**, v. 186, n. 3, p. 855–866, 2012.

TIMMERMAN, G. M., FREW, T. J., WEEDEN, N. F. Linkage analysis of *er-1*, a recessive *Pisum sativum* gene for resistance to powdery mildew fungus (*Erysiphe pisi* DC). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, n. 8, p. 1050–1055, 1994.

TIWARI, K. R.; PENNER, G. A.; WARKENTIN, T. D. Inheritance of powdery mildew resistance in pea. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 77, n. 3, p. 307–310, 1997.

TIWARI, K. R.; PENNER, G. A.; WARKENTIN, T. D. Identification of coupling and repulsion phase RAPD markers for powdery mildew resistance gene *er-1* in pea. **Genome**, v. 41, n. 3, p. 440–444, 1998.

TIWARI, K. R.; PENNER, G. A.; WARKENTIN, T. D. Identification of AFLP markers for powdery mildew resistance gene *er2* in pea. **Pisum Genet**, v. 31, p. 27–29, 1999.

TONGUÇ, M., WEEDEN, N. F. Identification and mapping of molecular markers linked to *er1* gene in pea. **Journal of Plant Molecular Biology and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 1–5, 2010.

VAID, A., TYAGI, P. D. Genetics of powdery mildew resistance in pea. **Euphytica**, v. 96, n. 2, p. 203–206, 1997.

WANG, X. M.; ZHU, Z. D.; DUAN, C. X.; ZONG, X. X. Identification and control technology of disease and pest on faba bean and pea. **Chinese Agricultural Science and Technology Press**, Beijing, China, 2007.

WARKENTIN, T. D., RASHID, K. Y., XUE, A. G. Fungicidal control of powdery mildew in field pea. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 76, n. 4, p. 933–935, 1996.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J.; A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531–6535, 1990.

## **CAPÍTULO III**

---

### **CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS CAUSADORES DE OÍDIO EM ACESSOS DE *Pisum sativum* L. PREVIAMENTE REPORTADOS COMO RESISTENTES NAS CONDIÇÕES BRASILEIRAS**

## RESUMO

A cultura da ervilha (*Pisum sativum* L.) é mais adaptada a regiões de temperaturas amenas ou em regiões subtropicais com altitudes elevadas. No Brasil, o oídio é uma das principais doenças da ervilha, apresentando alta incidência e severidade. Essa doença é mais importante na região do Planalto Central durante o período de inverno, onde ocorrem condições favoráveis ao desenvolvimento da doença (baixa umidade relativa, temperaturas amenas e formação de orvalho). Os fungos descritos causando o oídio da ervilha são ascomicetos do gênero *Erysiphe*. A principal espécie fúngica associada com o oídio da ervilha no mundo é *Erysiphe pisi*. A estratégia mais eficiente e mais sustentável para o controle desse fungo biotrófico é o uso de variedades resistentes. Três genes de resistência ao oídio foram descritos em ervilha (*er1*, *er2* e *Er3*) e eles têm se mostrado, com algumas poucas exceções, eficazes contra grande parte dos isolados de *E. pisi*. No entanto, isolados de *E. pisi* e de outras espécies de *Erysiphe* com perfil de virulência diferenciando estão amplamente distribuídos no mundo. Estudos de caracterização molecular dos agentes causais de oídio em ervilha ainda não foram conduzidos no Brasil. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar isolados atípicos que se mostraram capazes de induzir severos sintomas de oídio em acessos de *P. sativum* ('Trioфин' e 'Kodama') previamente reportados como resistentes a essa doença. Aspectos morfométricos das estruturas de quatro isolados (denominados de EryPea1, EryPea2, EryPea3 e EryPea4) foram analisados e para confirmar a identificação, o DNA genômico foi extraído de suspensões conidiais usando um protocolo CTAB modificado. Estudos da filogenia usando a informação de sequência da região genômica rDNA-ITS revelaram que os isolados capazes de "quebrar" a resistência das cultivares 'Trioфин' e 'Kodama' (portadoras de uma combinação dos genes *er1* + *Er3*) formaram um agrupamento com o isolado de referência da espécie *E. pisi* (LC163915). Esses resultados indicam a potencial presença de variantes desse patógeno que apresentam um perfil de virulência distinto daqueles prevalentes em décadas anteriores no Brasil Central. Os resultados fornecem novas informações sobre o perfil de virulência de isolados de *E. pisi*, que podem, muito provavelmente, estar representando novas raças fisiológicas deste patógeno.

**Palavras-chave:** Filogenia, oídio, Erysiphaceae, quebra de resistência.

## ABSTRACT

The pea (*Pisum sativum* L.) crop is more adapted to areas of mild temperature or subtropical regions with high altitudes. In Brazil, powdery mildew is one of the major pea diseases displaying high incidence and severity, especially in the Central Plateau region, during the winter period when favorable conditions for disease development (low relative humidity, mild temperatures, and dew formation) are present. The fungi responsible for the powdery mildew are ascomycetes of the genus *Erysiphe*. The main fungal species associated with the pea powdery mildew around the world is *Erysiphe pisi*. The most efficient and sustainable strategy for the control of this biotrophic fungus is the use of resistant varieties. Three powdery mildew resistance genes described in peas (*er1*, *er2* and *Er3*) have been shown, with few exceptions, to be effective against a large number of *E. pisi* isolates. However, isolates of *E. pisi* and other *Erysiphe* species with distinct virulence profiles are also worldwide distributed. Molecular characterization studies of the causal agents of powdery mildew in pea have not yet been conducted in Brazil. In this context, the objective of this work was to characterize atypical isolates that were able to induce severe powdery mildew symptoms in *P. sativum* accessions (e.g. ‘Triofin’ and ‘Kodama’) previously reported as resistant to this disease. Morphometric aspects of the structures of four isolates (named EryPea1, EryPea2, EryPea3 and EryPea4) were analyzed. In order to confirm the fungal identification, the total genomic DNA of four isolates (designated as EryPea1, EryPea2, EryPea3, and EryPea4) was extracted from conidial suspensions using a modified CTAB protocol. Studies of phylogeny using sequence information from the sequence of the rDNA–ITS genomic region revealed that the isolates capable of “breaking-down” the resistance of the cultivars ‘Triofin’ and ‘Kodama’ (carrying a combination of the *er1* + *Er3* genes) belong to a cluster together with the reference *E. pisi* isolate (LC163915). These results indicate the potential presence of variants of this pathogen with a distinct virulence profile from those isolates prevalent in previous decades in Central Brazil. The results provide new information on the virulence profile of *E. pisi* isolates, which may most likely represent new physiological races of this pathogen.

**Key-words:** Phylogeny, powdery mildew, Erysiphaceae, resistance breakdown.

## 1 INTRODUÇÃO

A ervilha (*Pisum sativum* L.) pertencente à família Fabaceae adapta-se melhor a regiões de temperatura amena ou a regiões tropicais com altitudes elevadas (GRITTON, 1980). A produção nacional de ervilha se expandiu consideravelmente a partir de 1983, principalmente em razão do incremento das áreas plantadas no Planalto Central, sendo empregada como uma opção de cultivo no período de inverno na entressafra das grandes culturas (COUTO, 1989).

Uma das principais doenças na cultura da ervilha é o oídio (REILING, 1984). Esta doença afeta a produtividade e também a qualidade dos grãos (MUEHLBAUER *et al.*, 1983). Ataques nos primeiros estádios de crescimento causam maiores prejuízos. No Brasil, a doença possui alta incidência e severidade, principalmente na região do Planalto Central durante o período de inverno, onde ocorre baixa umidade relativa, temperaturas amenas e formação de orvalho, condições favoráveis ao desenvolvimento do oídio (GIORDANO *et al.*, 1997). O oídio prevalece principalmente durante a maturação tardia e em ervilhas de ciclo longo, podem causar redução na produção de até 50% (REHMAN *et al.*, 2014). Perdas na produção podem chegar até 80% sob forte pressão de infecção em cultivares altamente suscetíveis (SMITH *et al.*, 1996; GHAFOR & MCPHEE, 2012).

Os agentes causais do oídio (ou míldio pulverulento) da ervilha e de outras hospedeiras leguminosas são ascomycetos pertencentes à ordem *Erysiphales*. Esta ordem contém apenas a família *Erysiphaceae* que é constituída por cinco tribos: *Erysipheae*, *Golovinomycetinae*, *Cystotheceae*, *Phyllactinieae* e *Blumerieae* (HÜCKELHOVEN, 2005; KIMATI *et al.*, 2005; MEEBOON *et al.*, 2017). Estes fungos são parasitas obrigatórios que invadem apenas as células da epiderme. Os esporos (conídios) após atingirem a superfície dos tecidos vegetais de plantas hospedeiras, precisam germinar e penetrar através da cutícula e da parede celular. Para que a penetração ocorra, é necessária inicialmente a formação de apressórios e a subsequente formação de estruturas denominadas haustórios (SMITH *et al.*, 1996). Os haustórios são formados dentro das células epidérmicas da planta hospedeira e têm a função de transferir os nutrientes necessários para desenvolvimento do fungo que ocorre na superfície externa do órgão afetado (IGLESIAS-GARCÍA *et al.*, 2015). Estes patógenos infectam folhas, caules e vagens, atingindo as plantas mais velhas com maior intensidade (SMITH *et al.*, 1996).

Vários outros agentes causais do oídio já foram relatados em leguminosas incluindo: *E. difusa* (oídio-da-soja) (ALMEIDA *et al.*, 2008), *E. glycines*, *E. astragali*, *E.*

*bremeri* e *E. trifoliorum* (BAISWAR *et al.*, 2015). No entanto, a principal espécie fúngica associada com o oídio da ervilha é *Erysiphe pisi* D.C. (FONDEVILLA *et al.*, 2011). Para prevenir propagação da doença, os agricultores costumam usar diferentes classes de fungicidas (KRAFT & PFLEGER, 2001). No entanto, a estratégia mais eficiente e mais sustentável para o controle desse fungo biotrófico tem sido o uso de variedades resistentes.

Os três genes/loci de resistência ao oídio descritos em ervilha (*er1*, *er2* e *Er3*) têm se mostrado, com algumas poucas exceções, eficazes contra grande parte dos isolados de *E. pisi*. No entanto, mais recentemente, foi demonstrado que isolados *E. trifoliorum* (outra espécie causadora de oídio em ervilha) são capazes de superar a resistência conferida pelos genes *er1* e *Er3* na Índia e na Espanha (FONDEVILLA *et al.*, 2013). Esses estudos demonstram que reconhecer de maneira precisa a identidade do patógeno é um importante fator para o desenvolvimento de cultivares resistentes (BAISWAR *et al.*, 2015).

Isolados de *E. pisi* e de outras espécies de *Erysiphe* com perfil de virulência diferenciando estão amplamente distribuídos em áreas de cultivo de ervilha no mundo, existindo evidências da presença de raças fisiológicas (SCHOROEDER & PROVVIDENTI, 1965; TIWARI *et al.*, 1997; SANTOS, 2010). No entanto, estudos de caracterização molecular dos agentes causais de oídio bem como de isolados capazes de quebrar a resistência conferida pelos fatores *er1*, *er2* e *Er3* ainda não foram conduzidos no Brasil. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar isolados considerados atípicos uma vez que eles induziram severos sintomas de oídio em acessos de *P. sativum* previamente reportados como resistentes ao oídio no Brasil.

## **2 MATERIAL & MÉTODOS**

Durante a estação seca (julho de 2017), sintomas severos de oídio (branco, colônias circulares no tecido foliar seguido por necrose progressiva devido à coalescência da lesão e esporulação profusa) foram observados em plantas de ervilha cultivadas em condições de campo em Brasília. Distrito Federal, Brasil. Os ensaios foram realizados em campos experimentais da Embrapa Hortaliças em Brasília-DF.

## 2.1 Caracterização Morfológica e Morfométrica dos Isolados Fúngicos

Amostras das folhas sintomáticas foram examinadas ao microscópio e imagens das estruturas fúngicas foram capturadas com uma câmera Leica DFC 490 conectada a um computador. As análises morfométricas foram realizadas com o auxílio do programa Leica QWin-Plus. Medidas de conídios e conidióforos (comprimento e largura) foram obtidas de 30 conidióforos e de 30 conídios.

## 2.2 Caracterização Molecular dos Isolados Fúngicos

A fim de confirmar essa identificação, o DNA genômico total de quatro isolados (EryPea1, EryPea2, EryPea3 e EryPea4) foi extraído de suspensões conidiais usando um protocolo CTAB 2X modificado (BOITEUX *et al.*, 1999). Os três primeiros isolados foram obtidos de plantas de ervilha infectada enquanto o quarto isolado foi obtido da planta daninha *Desmodium incanum*. Amostras de micélio obtidas de culturas puras, foram maceradas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, contendo 750 µL de Tampão CTAB (2% de CATB; 100 mM de Tris-HCl; pH 8,0, 50 mM NaCl e 0,2% de 2-β-mercaptoetanol). A maceração foi realizada em dois ciclos de 30 segundos a 2.000 rpm em agitador (Precellys® – Bertin Technologies), e a seguir, os tubos foram incubados a temperatura de 65°C por 10 minutos, sendo então retirados do banho-maria e deixado ao ar livre por 3 minutos. Em seguida, foram adicionados 750 µL de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico) e agitados (em vórtex). Os tubos foram então centrifugados por 5 minutos a 9.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a este foi adicionado 300 µL de isopropanol. Após agitação lenta dos tubos, os mesmos permaneceram a temperatura ambiente por 20 min para precipitação do DNA. Após este período os tubos foram centrifugados por 13 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 400 µL de etanol 70% gelado. A lavagem foi repetida duas vezes. Após as lavagens, o sobrenadante foi eliminado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspensionado em 200 µL TE (Tampão de extração), sendo então deixado por 12 horas em um refrigerador com temperatura em torno de 5°C. A concentração de DNA nas preparações foi determinada com a utilização de um espectrofotômetro (NANODROP®) e, então, ajustada para 50 ng/µL. A amplificação das sequências ITS foi realizada por meio da técnica de PCR, com o uso de iniciadores ITS1 (5'-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G-3') e ITS4 (5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3'), visando



amplificar segmentos da região ITS do rDNA (CUNNINGTON *et al.*, 2003). As reações apresentaram um volume final de 50 µL contendo 3 µL de DNA (50 ng/µL), 5 µL de tampão, 1 µL de dNTP 10 mM, 4 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2,6 µL de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (10 mM) e ITS4 (10 mM), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5 u/µL Invitrogen® Life Technologies) e água Milli-Q ultrapura para completar o volume final da reação. Os microtubos contendo as reações foram submetidos ao termociclador PCR System 9700 (Applied Biosystems), respeitando-se a seguinte sequência: desnaturação inicial (94 °C por 5 minutos) seguida de 39 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação (94 °C por 60 segundos), uma etapa de anelamento de (55 °C por 60 segundos) e extensão de (72 °C durante 60 segundos), seguida de uma etapa final de 72 °C por 8 minutos. Ao final da reação, o produto foi mantido a 4°C. Amostras dos produtos das reações de PCR (5 µL) foram aplicados em gel de agarose a 1%, utilizando marcador de peso molecular 1Kb DNA *ladder* (Invitrogen® Life Technologies), em cuba de voltagem de 100V. Os produtos obtidos pela PCR foram purificados e sequenciados.

### 2.3 Análise das Sequências

A qualidade das sequências foi avaliada com o uso do programa SeqMan (Lasergene, Madison, WI). As sequências correspondentes ao fragmento do genoma dos diferentes isolados foram obtidas a partir do consenso dos fragmentos sequenciados com os iniciadores senso e anti-senso, também com o auxílio do programa SeqMan (Lasergene, Madison, WI). Foram realizadas pesquisas para a verificação da autenticidade de todas as sequências nucleotídicas, sendo comparadas com as disponíveis no banco de dados do GenBank, na página eletrônica do National Center for Biotechnology Information – NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e analisadas para níveis de identidade, usando o algoritmo BLASTn. O alinhamento múltiplo das sequências obtidas neste trabalho e as disponíveis no GenBank foi realizado por meio do software Megalign (Lasergene, Madison, WI), utilizando-se o método Clustal W. Este alinhamento permitiu também o cálculo da identidade de nucleotídeos entre as várias sequências analisadas.

## 2.4 Patogenicidade dos Isolados Fúngicos Obtidos de Ervilha e *Desmodium*

Ensaio de patogenicidade dos isolados de campo foram realizados em casa de vegetação inoculando 20 plantas de cada um dos acessos de *P. sativum* ('Triofin' e 'Kodama') previamente reportados como resistentes a essa doença (GIORDANO & REIFSCHNEIDER, 1984; SANTOS *et al.*, 1991). Inoculação foi conduzida via contato folha-a-folha (REIFSCHNEIDER & BOITEUX, 1988).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Caracterização Morfológica de Isolados de Oídio Obtidos de Ervilha e *Desmodium*

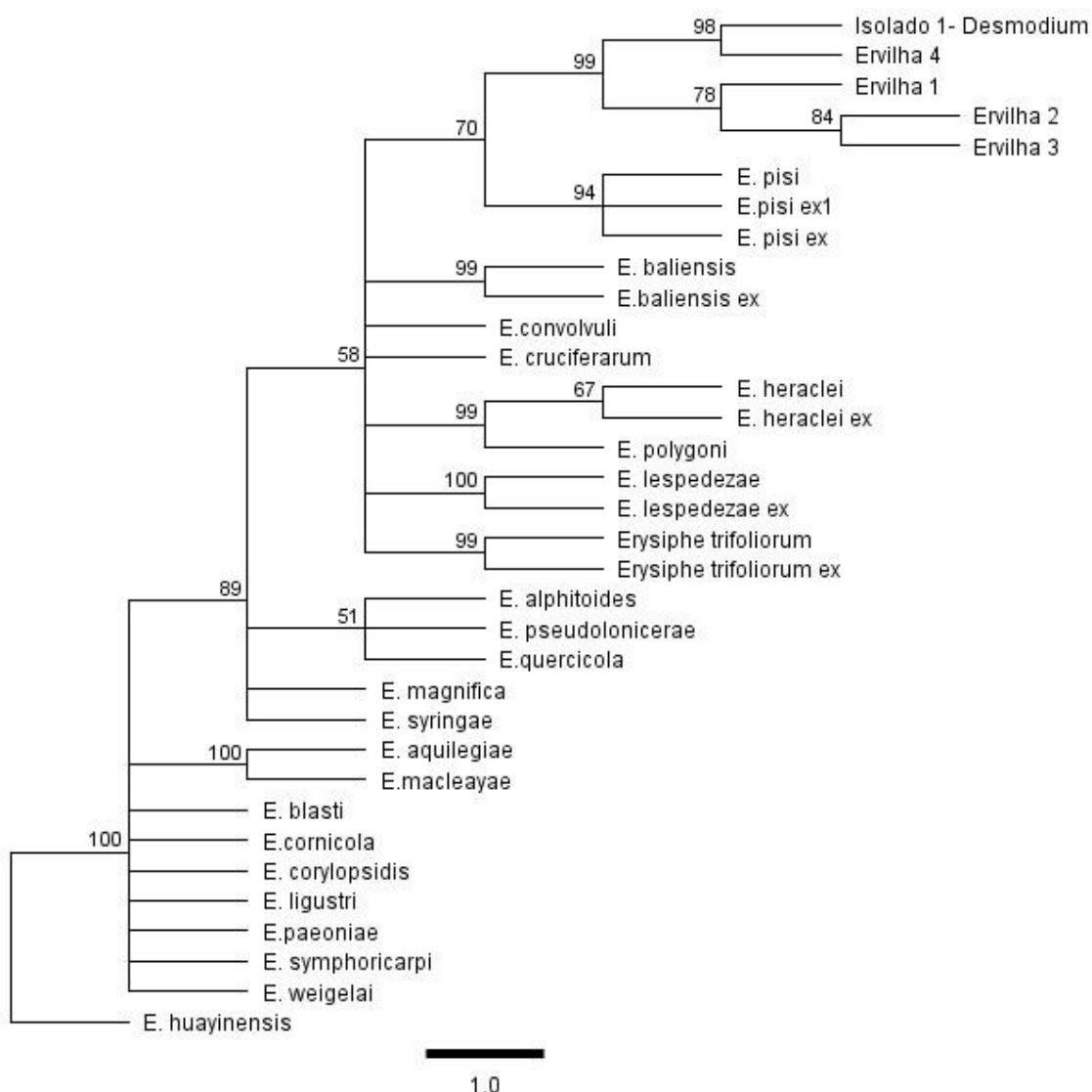
Medidas de conídios e conidióforos (comprimento e largura) foram obtidas de 30 conidióforos e conídios. Observou-se micélio persistente ou evanescente, apressórios lobados, solitários, ocasionalmente em pares opostos; conidióforos com comprimento entre 74–123  $\mu\text{m}$ , eretos, surgindo na maior parte central ou um pouco lateralmente do topo da célula-mãe; células pé 35–70  $\times$  8–12,5  $\mu\text{m}$ , cilíndricas, retas, curvas seguidas por 0–2 células, geralmente mais curtas, às vezes com o comprimento da célula pé, formando conídios isolados; conídios 30–44  $\times$  12–19  $\mu\text{m}$ , elipsoide-ovóide a doliforme. Todas essas características se enquadram com aspectos morfológicos e morfométricos de isolados do fungo *Erysiphe pisi* (**Figura 1**).



**Figura 1:** Plantas de ervilha em campo infectadas com oídio (*Erysiphe pisi*) (A, B e C). Conídios isolados elipsoide-ovóide a doliforme (D, E e I), Conidióforos eretos (F, G e H). Célula pé (F e G).

### 3.2 Caracterização Molecular dos Isolados de Oídio Obtidos de Ervilha e *Desmodium*

Os amplicons purificados em gel foram seqüenciados diretamente usando o mesmo par de *primers*. Amplicons simples (~ 526 pb) foram obtidos. Foi realizada uma análise de inferência Bayesiana com as seqüências obtidas (Geneious R8), juntamente com várias outras referências do GenBank. *Erysiphe huayinensis* ex isolado (AB015914) foi usado como grupo externo. A filogenia revelou agrupamento de isolados com outros isolados de *Erysiphe pisi* (LC163915) (MEEBOON *et al.*, 2017), com 0,99 de probabilidade posterior (**Figura 2**).



**Figura 2:** Agrupamentos filogenéticos de espécies de *Erysiphe* reportadas como agentes causais do oídio em leguminosas, incluindo isolados de campo que foram reportados infectado cultivares de ervilha (*Pisum sativum*) em Brasília-DF.

### 3.3 Teste de Patogenicidade dos Isolados Obtidos de Ervilha e *Desmodium*

Ensaio de patogenicidade dos isolados de campo foram realizados em casa de vegetação inoculando (via contato folha-a-folha) 20 mudas dos acessos de *P. sativum* ('Trioфин' e 'Kodama') previamente reportados como resistentes a essa doença. Sintomas idênticos aos observados em condições de campo foram observados em plantas inoculadas 10-15 dias após a inoculação. De acordo com as análises de marcadores moleculares, 'Trioфин' e 'Kodama' (duas fontes previamente reportadas como resistentes, mas que apresentaram respostas suscetíveis nos ensaios de campo) possuem os marcadores moleculares associados com os genes *er1* e *Er3*, mas não o gene *er2* (**VER CAPÍTULO 2**). Estes resultados também indicam a presença de isolados fúngicos com perfil de virulência distinto daqueles prevalentes em décadas anteriores no Brasil Central, podendo infectar, de maneira eficiente, cultivares contendo os genes de resistência *er1* e *Er3*. Um dos isolados de *E. pisi* estudados foi obtido da planta daninha *Desmodium incanum* e foi capaz de também infectar as duas cultivares de ervilha. Desta forma, essa planta é uma hospedeira alternativa do oídio da ervilha nas condições brasileiras.

## 4. DISCUSSÃO

A identificação e caracterização de patógenos fúngicos são cruciais para o desenvolvimento de estratégias eficazes para a incorporação de fatores de resistência no melhoramento genético. Os métodos morfológicos e moleculares de diagnose utilizados na detecção de plantas sintomáticas confirmaram a infecção por isolados de *Erysiphe pisi* D.C. de acessos de *P. sativum* ('Trioфин' e 'Kodama') previamente reportados como resistentes a essa doença (GIORDANO & REIFSCHNEIDER, 1984; SANTOS *et al.*, 1991). Esses resultados confirmam o oídio da ervilha nas condições de campo no Distrito Federal é causada por isolados de *E. pisi*. Taxas de incidências de *E. pisi* relativamente altas foram verificadas para a maioria das cultivares estudadas nos anos de 2017 e 2018. A severidade variou em função do material genético (**VER CAPÍTULO 1**).

De acordo com as análises de marcadores moleculares (**VER CAPÍTULO 2**), 'Trioфин' e 'Kodama' (reportadas como resistentes, mas que apresentaram respostas suscetíveis nos ensaios de campo em 2017) possuem os marcadores moleculares associados com os genes *er1* e *Er3*, mas não o gene *er2*. Ou seja, esses fatores de resistência foram, muito provavelmente, "quebrados" pela população de isolados de *E. pisi* presentes em condições naturais no Brasil

Central. Estudos conduzidos com o objetivo de avaliar a reação de diferentes populações de ervilha ao oídio, entre elas a cultivar Triofin foi considerada uma das melhores fontes de resistência a essa doença em ensaios conduzidos em Brasília–DF (MARQUES, 1993). Esses resultados indicam a potencial presença de variantes desse patógeno que apresentam um perfil de virulência distinto daqueles prevalentes em décadas anteriores no Brasil Central (GIORDANO & REIFSCHNEIDER, 1984; SANTOS *et al.*, 1991; MARQUES, 1993), podendo infectar, de maneira eficiente, cultivares contendo os genes de resistência *er1* e *Er3*.

Nesse estudo, também foi possível observar ocorrência de *E. pisi* em plantas daninhas como (*Desmodium incanum*). As plantas daninhas associadas à cultura podem funcionar como reservatório constante de fonte de inóculo de oídio, dessa forma pode ocorrer infecção nos primeiros dias após emergência das plântulas. O conhecimento de possíveis hospedeiros alternativos também é de grande importância para realizar uma boa estratégia de controle do fungo, sendo que relatos na Índia indicam a presença *E. pisi* e *E. trifoliorum* em trevo branco, ao lado de campos de produções de ervilha (BAISWAR *et al.*, 2015). Recomenda-se, portanto, utilizar materiais genéticos resistentes ou tolerantes, eliminar plantas doentes no início da epidemia e eliminar plantas hospedeiras alternativas tais como *D. incanum*.

Como conclusão, estudos da filogenia empregando a informação de sequência da região genômica rDNA–ITS revelaram que os isolados capazes de “quebrar” a resistência das cultivares ‘Triofin’ e ‘Kodama’ (portadoras de uma combinação dos genes *er1* + *Er3*) são todos classificados como pertencentes a espécie *E. pisi*. Esses resultados indicam uma atual predominância de variantes desse patógeno contendo um perfil de genes de virulência distinto das populações fúngicas observadas em décadas anteriores no Brasil Central. Os resultados apresentados aqui fornecem novas informações sobre o perfil de virulência de isolados de *E. pisi*, que podem, muito provavelmente, estar representando novas raças fisiológicas deste patógeno. Além disso, a superação dos fatores de resistência *er1* e *Er3* por esses isolados representa uma preocupação adicional para os programas de melhoramento genético da ervilha no Brasil. Neste cenário, a busca por novas fontes de resistência é uma ação de pesquisa recomendada para essa região geográfica.

#### 4 CONCLUSÕES

1. Os estudos morfológicos e moleculares indicaram que os isolados obtidos em condições de campo no Distrito Federal pertencem a espécie *Erysiphe pisi* D.C.
2. Um dos isolados de *E. pisi* estudados foi obtido da planta daninha *Desmodium incanum* e foi capaz de infectar ervilha. Desta forma, essa planta é uma hospedeira alternativa do oídio da ervilha nas condições brasileiras.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.M.R., BINNECK, E., PIUGA, F.F., MARIN, S.R.R., VALLE, P.R.Z.R.DO, SILVEIRA, C.A. Characterization of powdery mildews strains from soybean, bean, sunflower, and weeds in Brazil using rDNA-ITS sequences. **Tropical Plant Pathology**, v. 1, p. 20–26, 2008.
- BAISWAR, P.; NGACHAN, S. V.; VERMA, V. K.; KUMAR, R.; JHA, A. K.; CHANDRA, S. Molecular evidence of *Erysiphe pisi* on pea and *E. trifoliorum* on white clover in northeast India. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 10, n. 1, p. 12, 2015.
- BOITEUX, L. S.; FONSECA, M. E. N.; SIMON, P. W. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 124, n. 1, p. 32–38, 1999.
- CUNNINGTON, J. H.; TAKAMATSU, S.; LAWRIE, A. C.; PASCOE, I. G. Molecular identification of anamorphic powdery mildews (Erysiphales). **Australasian Plant Pathology**, v. 32, n.3, p.421–428, 2003.
- COUTO, F. A. A. Aspectos históricos e econômicos da cultura da ervilha. **Informe Agropecuário**, v. 158, p. 5–7, 1989.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2013. **Sistemas de Produção 16: Tecnologias de Produção de Soja** - Região Central do Brasil 2014. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 265p.

- FONDEVILLA, S.; CHATTOPADHYAY, C.; KHARE, N.; RUBIALES, D. *Erysiphe trifolii* is able to overcome *er1* and *Er3*, but not *er2*, resistance genes in pea. **European Journal of Plant Pathology**, v. 136, n. 3, p. 557–563, 2013.
- GHAFOOR, A., McPHEE, K. Marker assisted selection (MAS) for developing powdery mildew resistant pea cultivars. **Euphytica**, v. 186, n. 3, p. 593–607, 2012.
- GIORDANO, L. B. (Org.), LOPES, C. A., FRANÇA, F. H., SILVA, H. R., PESSOA, H. B. S. V., SANTOS, J. R. M., MAROUELLI, W. A., PEREIRA, W. **Cultivo da Ervilha (*Pisum sativum* L.)**. 3.ed. Brasília: Embrapa-CNPQ, 1997. 19p.
- GONÇALVES, E.C.P., DI MAURO, A.O., CENTURION, M.A.P.C. Genetics of resistance to powdery mildew (*Microsphaera diffusa*) in Brazilian soybean populations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 3, p. 339–342, 2002.
- GRAU, C.R. 1985. **Powdery mildew, a sporadic but damaging disease of soybean**. p. 568–574. *In*: Proceedings of the III World Soybean Research Conference. SHIEBLES R (Ed.) Iowa, USA. Westview Press, Boulder.
- GRITTON, E. T. 1980. Field pea. p.347–356. *In*: FEHR, WR; HADLEY, HH (eds.). Hybridization of crop plants. Madison. **American Society of Agronomy**.
- HÜCKELHOVEN, R. Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. **FEMS Microbiology letters**, v. 245, n. 1, p. 9–17, 2005.
- IGLESIAS-GARCÍA, R., RUBIALES, D., FONDEVILLA, S. Penetration resistance to *Erysiphe pisi* in pea mediated by *er1* gene is associated with protein cross-linking but not with callose apposition or hypersensitive response. **Euphytica**, v. 201, n. 3, p. 381–387, 2015.
- KIMATI, H.; AMORIM, A.B.F.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. 2005. **Manual de Fitopatologia. Agrônômica Ceres**, São Paulo, SP, Brasil. 663p.
- KRAFT, J. M.; PFLEGER, F. L. *Compendium of pea diseases and pests*. **American Phytopathological Society** (APS Press), 2001.
- MARQUES, M.R.C. Herança da resistência da ervilha (*Pisum sativum* L.) ao oídio (*Erysiphe pisi* DC.). Viçosa-MG, 1993. 66p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa.
- MEEBOON, J.; TAKAMATSU, S.; MEEBOON, J.; TAKAMATSU, S. Notes on powdery mildews (Erysiphales) in Thailand III. *Erysiphe* species on Fabaceae, Fagaceae, Hydrangeaceae and Lamiaceae. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 4, p. 239–249, 2017.
- MUEHLBAUER, F.J., SHORT, R.W., KRAFT, J.M. *Description and Culture of Dry Peas*. **Oakland: USDA**, 1983. p. 92.



- REHMAN, A., MEHBOOB, S., SOHAIL, M., GONDAL, A. S., IDREES, M., ALI, H. Estimation of genetic diversity of pea germplasm against powdery mildew (*Erysiphe pisi*) disease and its chemosynthetic management. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v. 26, n. 2, p. 309–313, 2014.
- REIFSCHNEIDER, F. J. B.; BOITEUX, L. S. A vacuum-operated settling tower for inoculation of powdery mildew fungi. **Phytopathology**, v. 78, n. 11, p. 1463–1465, 1988.
- REILLING, T.P. Powdery mildew. In: HAGEDORN, D.J. ed. Compendium of Pea Diseases. St. Paul, **American Phytopathological Society**, p. 21–22, 1984.
- SANTOS, R. L. dos. Herança da resistência a oídio em ervilha e aspectos relacionados à patogênese. 2010. vi, 52 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, **Faculdade de Ciências Agronômicas** de Botucatu, 2010.
- SCHROEDER, W. T. Breakdown of the *er* resistance to powdery mildew in *Pisum sativum*. **Phytopathology**, v. 55, p. 1075, 1965.
- SILVA, O.C., SEGANFREDO R. 1999. Quantificação de danos ocasionados por doenças de final de ciclo e oídio, em duas variedades de soja. p 460. In: Congresso Brasileiro de Soja, Embrapa Soja, Londrina-PR, Brasil.
- SMITH, P. H. et al. The early development of *Erysiphe pisi* on *Pisum sativum* L. **Plant Pathology**, v. 45, n. 2, p. 302-309, 1996.
- TIWARI, K. R.; PENNER, G. A.; WARKENTIN, T. D. Inheritance of powdery mildew resistance in pea. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 77, n. 3, p. 307–310, 1997.
- YORINORI, J.T. 1997. Oídio da Soja. Londrina: EMBRAPA–CNPSO, 1997. 5p. (EMBRAPA–CNPSO. Comunicado Técnico, 59).

## 6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultura da ervilha (*Pisum sativum* L.) apresenta grande importância econômica no Brasil. O oídio (causado por espécies do gênero *Erysiphe*) é uma das principais doenças que acometem a cultura tanto nas condições do Brasil quanto a nível mundial. No presente estudo, uma coleção de germoplasma de ervilha foi avaliada para reação ao oídio em condições de inóculo natural em 2017, na Embrapa Hortaliças, Brasília–DF, Brasil. As plantas de 145 acessos de *P. sativum* foram classificadas para a reação ao oídio empregando uma escala visual de notas de 1 a 5. Foram também avaliadas as seguintes características: (1) tempo para o início do florescimento; (2) altura das plantas; (3) tipo de folha; (4) cor da flor; (5) rendimento de grãos; (6) número final de plantas (*stand*); (7) dias até o florescimento e (8) duração do florescimento. O acesso CNPH-144 (= MK 13) de ervilha de vagens comestíveis apresentou os mais elevados níveis de resistência ao agente causal do oídio (*Erysiphe* sp.). Um resultado atípico foi a reação de suscetibilidade de acessos previamente identificados como resistentes na região do Brasil Central tais como ‘Trioфин’, ‘Luiza’, ‘Viçosa’, ‘Marina’, ‘Maria’ e ‘Kodama’. De fato, nenhum acesso de ervilha destinado a indústria apresentou níveis elevados de resistência ao oídio. Neste contexto, seria de interesse para o melhoramento da ervilha para enlatamento e colheita verde iniciar cruzamentos envolvendo o acesso de ervilha de vagens comestíveis (CNPH-144 = MK 13) visando incorporar o(s) fator(es) de resistência desse material nesse grupo morfo-agronômico. Marcadores moleculares ligados aos três genes/loci de resistência aos agentes causais do oídio da ervilha (*er1*, *er2* & *Er3*) têm sido utilizados para ‘piramidizar’ estes fatores em diferentes materiais genéticos. No entanto, estes marcadores não foram ainda validados nas condições brasileiras. No presente trabalho, um subgrupo de 20 acessos do banco de germoplasma de ervilha (apresentando respostas contrastantes ao oídio) foi avaliado com um painel de marcadores moleculares (dois RAPDs e quatro SCARs) ligados aos loci de resistência *er1*, *er2* & *Er3*. Os resultados indicaram que as cultivares ‘Trioфин’, e ‘Kodama’ possuem marcadores ligados aos genes *er1* & *Er3*, mas não apresentam o gene *er2*. Por sua vez, o acesso MK13 apresenta uma combinação de dois genes de resistência (*er1* & *er2*). Os resultados indicaram que, no presente estudo, os acessos apresentando os maiores níveis de resistência foram aqueles portadores do gene recessivo *er2*. Os resultados dos **CAPÍTULOS 1 & 2** indicaram a potencial presença de isolados fúngicos com um perfil de virulência distinto dos predominantes em décadas anteriores. Os fungos descritos causando o oídio da ervilha são ascomicetos do gênero *Erysiphe*, sendo que *Erysiphe pisi* é a principal espécie fúngica

associada com essa doença no mundo. Os genes de resistência ao oídio descritos até o momento em ervilha (*er1*, *er2* & *Er3*) têm se mostrado, com algumas poucas exceções, eficazes contra grande parte dos isolados de *E. pisi*. No entanto, isolados de *E. pisi* e de outras espécies de *Erysiphe*, com perfil de virulência diferenciado estão amplamente distribuídos em outras partes mundo. Neste contexto, foram conduzidos no presente trabalho estudos (ainda inéditos no Brasil) de caracterização morfométrica e molecular de isolados do(s) agente(s) causa(is) do oídio em ervilha. Estas análises indicaram que os isolados obtidos em condições de campo no Distrito Federal pertencem a espécie *Erysiphe pisi* D.C. Um dos isolados de *E. pisi* estudados foi obtido da planta daninha *Desmodium incanum* e foi capaz de também infectar acessos de *P. sativum* ('Triofin' e 'Kodama'). Desta forma, *D. incanum* é uma nova hospedeira alternativa do oídio da ervilha se constituindo no primeiro relato no Brasil e, muito provavelmente, no mundo. Estes resultados também indicaram a presença de isolados capazes de induzir severos sintomas de oídio em acessos de *P. sativum* 'Triofin' e 'Kodama' (ambos contendo uma combinação dos genes *er1* & *Er3*). Estes acessos haviam sido previamente reportados como resistentes a essa doença no Brasil. Em conclusão, as informações obtidas no presente estudo representam um importante avanço no conhecimento do oídio da ervilha nas condições brasileiras e poderão servir de base para o planejamento dos programas de melhoramento genético da ervilha visando o desenvolvimento de cultivares com resistência mais estável e duradoura a essa doença.