

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

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, IDENTIFICAÇÃO DE QTLs DA
RESISTÊNCIA PARCIAL À FERRUGEM DA FOLHA E AVALIAÇÃO DO PERFIL
TRANSCRICIONAL DE GENES CANDIDATOS ASSOCIADOS AO CARÁTER EM
Avena sativa L.

Andriele Wairich
Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia/Uergs

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Área de concentração recursos genéticos, biotecnologia e melhoramento vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil
Fevereiro de 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Wairich, Andriele
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, IDENTIFICAÇÃO DE QTLs
DA RESISTÊNCIA PARCIAL À FERRUGEM DA FOLHA E
AVALIAÇÃO DO PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES
CANDIDATOS ASSOCIADOS AO CARÁTER EM Avena sativa L.
/ Andriele Wairich. -- 2016.
147 f.

Orientadora: Carla Andréa Delatorre.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia,
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto
Alegre, BR-RS,
2016.

1. aveia branca. 2. ferrugem da folha. 3.
resistência parcial. 4. caracterização fenotípica.
I. Delatorre, Carla Andréa, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

ANDRIELE WAIRICH
Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia - UERGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 29.02.2016
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 06.03.2017
Por

CARLA ANDRÉA DELATORRE
Orientadora - PPG Fitotecnia

SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

LUIZ CARLOS FEDERIZZI
PPG Fitotecnia/UFRGS

JOSÉ ANTÔNIO MARTINELLI
PPG Fitotecnia/UFRGS

ALICE CASASSOLA
Instituto de Desenvolvimento
Educativo de Passo Fundo

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de
Agronomia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe Bernardete pelo exemplo de vida que representa, por todas as lições valiosas, e pela dedicação e amor com que sempre me acolheu e me incentivou, principalmente nos momentos difíceis em que pensei em desistir, sem falar nos quilômetros que fez para ficar ao meu lado. Agradeço também ao meu pai. A minha avó Adelina, que perdoe toda minha ausência. As minhas madrinhas Tere e Maria, que sempre rezaram e torceram muito por mim. Juntas vocês são as quatro mulheres da minha vida.

A minha orientadora, professora Carla Andréa Delatorre, pela oportunidade de desenvolvimento do mestrado, pelos ensinamentos, pela atenção dedicada a mim mesmo quando doente. E, por no momento mais difícil acreditar em mim, me acalmar e me fazer acreditar que eu seria capaz, além do carinho maternal que me dedicou durante esses dois anos. Jamais esquecerei. Obrigada!

Ao professor Marcelo T. Pacheco, por toda a atenção e tempo dedicado à realização deste trabalho, pela parceria, inúmeras caronas, principalmente as de Kombi que jamais serão esquecidas e por todo ensinamento que me proporcionou, de genética a melhoramento e de estatística a “campeirismo”. Aos professores Itamar, Martinelli, Federizzi, Paulo Régis e Cristhian, tenham certeza que o aprendizado que eu tive com vocês é imensurável.

Aos colegas de PPG, em especial a Jéssica, Nicole e Chico que foram meus anjos em 2014 e Liliana, Geísa, Sara e Laís, que chegaram na minha vida em 2015 e tornaram essa tarefa muito mais tranquila e secaram alguma lágrima. Obrigada pela parceria, almoços, mates, cafés, desabafos e risos. Tenham certeza que foram mais que apenas colegas, são amigos. Ao Eduardo e a Laís, pela coragem que tiveram, ou fingiram ter, para me acompanharem nas madrugadas a cada nova inoculação. Vocês foram muito importantes pra mim. Ao Guilherme Fraga e a Vanessa Duarte pela ajuda com a coleta de dados e aguentarem firme o campo comigo. A Carolina (que realizou

parte deste trabalho), Andrew, Gustavo, Ernandes e Sibila, obrigada pela presença de vocês em minha vida nesses dois anos. Aos laboratoristas Fábio e Gustavo pelos ensinamentos e por todos os “galhos que quebraram”.

Aos meus amigos de Bento e da Serra, por entenderem os momentos em que me fiz distante, todos os convites recusados e as mensagens não respondidas por conta das provas, trabalhos, seminários, plantas para cuidar nos finais de semana e feriados e não poder ir pra Bento, e pela confiança que sempre me passaram.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade da realização deste mestrado, como também a CAPES, pela concessão da bolsa de estudos. Ao Departamento de Plantas de Lavoura, pelo convívio com os professores e com os funcionários, sempre dispostos a ajudar. Do Departamento de Fitossanidade, ao Prof. Martinelli, pelas vezes que precisei utilizar seu laboratório, pelas contagens de esporos, e à colega Sara Hartke pela paciência, tempo e atenção dedicada às minhas dúvidas.

E finalmente, agradeço a Deus pelo dom da vida, por ter guiado meus passos e me conduzido sempre para o melhor caminho a seguir. Agradeço por ser meu “companheiro” em muitos momentos difíceis. Pela oportunidade de mais uma conquista e a sorte de estar cercada de tantas pessoas maravilhosas.

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, IDENTIFICAÇÃO DE QTLs DA RESISTÊNCIA PARCIAL À FERRUGEM DA FOLHA E AVALIAÇÃO DO PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE GENES CANDIDATOS ASSOCIADOS AO CARÁTER EM *Avena sativa* L.¹

1

Autor: Andriele Wairich

Orientador: Carla Andréa Delatorre

RESUMO

A ferrugem da folha da aveia, causada pelo fungo *Puccinia coronata* Corda f. sp *avenae* Ericks é responsável por grandes perdas na produção. Tradicionalmente, a resistência utilizada pelos programas de melhoramento é de natureza qualitativa, e tem se mostrado efêmera. O emprego da resistência parcial, como forma de resistência genética eficiente para o controle da ferrugem da folha em aveia é uma opção promissora. Objetivando ampliar o conhecimento genético e molecular da expressão da resistência parcial, uma população de 167 linhagens recombinantes foi desenvolvida a partir dos genótipos UFRGS 19 (suscetível) e UFRGS 988012-1 (parcialmente resistente). A avaliação da resistência parcial a campo e o cálculo da área sob a curva de progresso da doença relativa (ASCPDNC), por três anos consecutivos (2013-2015), permitiram estimar o número de locos envolvidos na expressão deste caráter. Foram estimados quatro locos no ano de 2013 e três locos nos anos de 2014 e 2015, sendo dois locos de maior efeito sobre o fenótipo e um/dois de menor efeito. A resistência parcial apresentada pelos genótipos brasileiros não é conferida pela mesma região gênica que atribui esse caráter à linhagem MN841801. Os marcadores SNPs para o QTL *Pc.crc-14D* não se diferenciaram nos genótipos URS 21, URS 22, UFRGS 19, UFRGS 988012-1 e URS Galope, independentemente destes serem resistentes ou suscetíveis à ferrugem da folha. Plantas adultas de URS 21, URS 22, UFRGS 19 e UFRGS 988012-1 foram desafiadas com *P. coronata* e, amostras do tecido foliar foram coletadas nos tempos 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 hai. A partir de sequências do transcriptoma de plântulas de URS 21 induzidas sob essa mesma condição, iniciadores foram projetados e a expressão relativa avaliada ao longo do tempo. Sequências envolvidas no metabolismo secundário, fatores de transcrição da família WRKY, e o gene que confere resistência parcial a múltiplas doenças em trigo, *Lr34*, foram analisados. Para a maioria das sequências avaliadas, observou-se um perfil de expressão contrastante entre os genótipos irmãos, e parcialmente resistentes, URS 21 e UFRGS 988012-1, o que sugere a possibilidade de mecanismos ou isoformas de enzimas parcialmente distintas conferirem a resistência parcial a estes genótipos. Diferenças também foram detectadas entre plântulas e o estágio de planta adulta em URS 21, reforçando os indícios de que os mecanismos da resistência parcial em plântula e em planta adulta sejam distintos.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (144f.) Fevereiro, 2016.

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION, QTLs IDENTIFICATION OF CROWN RUST PARTIAL RESISTANCE AND TRANSCRIPTIONAL PROFILE OF CANDIDATE GENES IN *Avena sativa* L.¹

Author: Andriele Wairich

Adviser: Carla Andréa Delatorre

ABSTRACT

Crown rust caused by *Puccinia coronata* Corda f. sp. *avenae* Ericks is responsible for significant reduction in oat grain yield. Traditionally, oat breeders exploit qualitative resistance which has proved to be ephemeral. The use of partial resistance as a way to efficiently control oat crown rust is a promising option. Aiming to expand the genetic and molecular knowledge about the expression of partial resistance, a population of 167 recombinant inbred lines was developed from crossing UFRGS 19 (susceptible) and UFRGS 988012-1 (partially resistant). The evaluation of partial resistance in the field by calculating the relative area under the disease progress curve for three consecutive years (2013-2015) allowed the estimation of the number of loci involved in the expression of this character. Four loci were estimated in 2013, and three loci in the years 2014 and 2015, two loci conferring great effect on the phenotype and one / two with small effect. Partial resistance presented by the Brazilian genotypes is not conferred by the same genic region identified in MN841801 lineage. SNPs markers for the QTL *Pc.crc-14D* did not differ among the genotypes URS 21, URS 22, UFRGS 19, UFRGS 988012-1 and URS Galope, regardless their resistance to crown rust. Adult plants of URS 21, URS 22, UFRGS 19 and UFRGS 988012-1 were challenged with *P. coronata* and leaf tissue samples were collected at 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 and 120 hai. From sequences of the URS 21 seedlings transcriptome induced under the same condition, primers were designed and the relative expression evaluated over time. The sequences included some involved in secondary metabolism, transcription factors from WRKY family, and the gene conferring partial resistance for multiple diseases in wheat, *Lr34*. Most evaluated sequences showed a contrasting expression profile between the siblings and partially resistant genotypes URS 21 and UFRGS 988012-1. It suggests the possibility that distinct mechanisms or enzymes isoforms confer partial resistance to these genotypes. Differences were also detected between seedling and adult plant stage for URS 21, reinforcing the evidence of distinct mechanisms of partial resistance in these two developmental stages.

¹ Master's dissertation in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (144p.) February, 2016

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	3
1.1.1 Objetivo Geral.....	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Gênero <i>Avena</i>	5
2.1.1 Aveia branca (<i>A. sativa</i> L.): o hospedeiro.....	5
2.2 O patógeno.....	8
2.3 Resistência genética.....	14
2.4 Metodologia de avaliação da resistência à ferrugem da folha da aveia.....	22
2.5 Genética da resistência à ferrugem da folha em aveia.....	26
2.6 Interação planta patógeno.....	31
2.7 Genes de suscetibilidade.....	35
2.8 Sinalização hormonal.....	36
2.9 Aspectos moleculares, bioquímicos e histológicos associados à resistência parcial apresentada pela cultivar URS 21.....	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 Caracterização da área experimental.....	44
3.2 Ensaio a campo.....	44
3.2.1 Material Vegetal e condução dos ensaios.....	44
3.2.2 Avaliação dos ensaios.....	46
3.2.3 Determinação da Área Sob a Curva do Progresso da Doença (ASCPD).....	47
3.2.4 Determinação da Área Sob a Curva do Progresso da Doença Relativa (ASCPDNC).....	48
3.2.5 Distribuição de frequências da ASCPDNC.....	48
3.2.6 Determinação do número de locos envolvidos na expressão do caráter.....	49
3.3 Ensaio em condições controladas.....	50

3.3.1 Validação do caráter resistência parcial em plântulas	50
3.3.1.1 Material vegetal e condução dos ensaios.....	50
3.3.1.2 Obtenção do inóculo e inoculação.....	51
3.4 Avaliação do QTL <i>QPc.crc-14D</i>	53
3.4.1 Material vegetal	53
3.4.2 Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA)	54
3.4.3 Seleção dos marcadores SNPs.....	55
3.4.4 Reações em cadeia da polimerase (PCR).....	55
3.5 Avaliação da expressão de genes candidatos associados à resistência parcial a ferrugem da folha.....	56
3.5.1 Material vegetal	57
3.5.2 Extração do ácido ribonucleico (RNA)	57
3.5.3 Síntese do cDNA	58
3.5.3.1 Remoção do DNA genômico.....	58
3.5.3.2 Síntese do cDNA	58
3.5.3.3 PCRs para validação do cDNA	59
3.5.4 Escolha das sequências.....	60
3.5.5 RT-qPCR.....	61
4 RESULTADOS	63
4.1 Análise Genética da Resistência sob condições de campo.....	63
4.1.1 Progresso da severidade da doença	63
4.1.2 Distribuição de frequências	69
4.1.3 Estimativa do número de locos envolvidos com o caráter resistência parcial à ferrugem da folha na população recombinante obtida a partir do cruzamento entre UFRGS 988012-1 e UFRGS 19	70
4.2 Avaliação do caráter resistência parcial em plântulas	75
4.3 Avaliação do QTL <i>QPc.crc-14D</i>	76
4.4 Avaliação da expressão de genes candidatos associados à resistência parcial à ferrugem da folha.....	78
5 DISCUSSÃO.....	91
6 CONCLUSÕES	112
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
8 VITA.....	131

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Fontes de resistência à doenças em espécies de aveia.	27
2. Datas em que as leituras sequenciais da severidade foram realizadas durante os três anos de realização dos ensaios.	47
3. Reação, TIs e sintomas de <i>P. triticina</i> sob a primeira folha de plântulas de trigo.	52
4. Sequência dos marcadores SNPs selecionados para a identificação do <i>QTL QPc.crc-14D</i>	55
5. Condições de termociclagem para a realização das reações de PCR.	56
6. Condições de termociclagem para a realização das reações de PCR.	59
7. Iniciadores específicos para sequências obtidas por RNAseq analisadas.	60
8. Programa termociclagem para a realização da RT-qPCR em amostras de cDNA.	62
9. Análise de variância para a ASCPDNC média para as 167 linhagens recombinantes de aveia avaliadas durante os três anos de realização dos ensaios.....	67
10. Lista das linhagens recombinantes de aveia branca, obtidas do cruzamento entre UFRGS 988012-1 e UFRGS 19, com as 25 menores ASCPDNC média, para a ferrugem da folha, avaliadas ao longo de 2013 a 2015.....	68
11. Estimativa do número de locos responsáveis por conferirem o caráter resistência parcial à ferrugem da folha em aveia na população de linhagens recombinantes obtidas a partir do cruzamento entre UFRGS 988012-1 e UFRGS 19.	72
12. Análise de variância para o TI observado nas 167 linhagens recombinantes obtidas a partir do cruzamento entre UFRGS 988012-1 e UFRGS 19, avaliadas durante os três ensaios.	75

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Domínios estruturais das proteínas TIR-NBS-LRR.	33
2. Modelo zigzag que apresenta o resultado quantitativo do sistema imune vegetal.	35
3. Sintomas e tipo de infecção apresentados pelo ataque de <i>P. triticina</i> sob a primeira folha de plântulas de trigo.....	53
4. Sintomas e tipo de infecção apresentados pelo ataque de <i>P. coronata</i> sob a primeira folha de plântulas de aveia.....	53
5. Progresso da severidade média da ferrugem da folha da aveia nos parentais UFRGS 988012-1 e UFRGS 19 e nas linhagens recombinantes F _{6:9} durante o ciclo de epidemia em 2013.....	64
6. Progresso da severidade média da ferrugem da folha da aveia nos parentais UFRGS 988012-1 e UFRGS 19 e nas linhagens recombinantes F _{6:10} durante o ciclo de epidemia em 2014.....	66
7. Progresso da severidade média da ferrugem da folha da aveia nos parentais UFRGS 988012-1 e UFRGS 19 e nas linhagens recombinantes F _{6:11} durante o ciclo de epidemia em 2015.....	67
8. Distribuição das frequências da ASCPDNC média de ferrugem da folha da aveia, nos parentais UFRGS 988012-1 e UFRGS 19 e nas 167 linhagens recombinantes F _{6:9} no ano de 2013.....	69
9. Distribuição das frequências da ASCPDNC média de ferrugem da folha da aveia, nos parentais UFRGS 988012-1 e UFRGS 19 e nas 167 linhagens recombinantes F _{6:10} no ano de 2014.....	70
10. Distribuição das frequências da ASCPDNC média de ferrugem da folha da aveia, nos parentais UFRGS 988012-1 e UFRGS 19 e nas 167 linhagens recombinantes F _{6:11} no ano de 2015.....	70
11. Produtos de amplificação gerados por PCR convencional, a partir do DNA genômico dos genótipos UFRGS 19, URS 21, URS 22 e UFRGS 988012-1 com iniciadores do marcador SNP GMI_ES14_c1439_83.....	76
12. Produtos de amplificação gerados por PCR convencional, a partir do DNA genômico dos genótipos UFRGS 19, URS 21, URS 22, UFRGS 988012-1 com iniciadores do marcador SNP GMI_DS_LB_6480.....	77
13. Produtos de amplificação gerados por PCR convencional, a partir do DNA genômico da cultivar de aveia branca URS F Galope com iniciadores dos marcadores GMI_ES14_c1439_83 e GMI_DS_LB_6480.....	78

14. Perfil transcricional da sequência similar ao gene <i>WRKY73</i> em plantas adultas de aveia branca, genótipos UFRGS 988012-1 e UFRGS 19, após inoculação com <i>P. coronata</i> em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai.....	79
15. Perfil transcricional da sequência similar ao gene <i>WRKY73</i> em plantas adultas de aveia branca, genótipos URS 21 e URS 22, após inoculação com <i>P. coronata</i> em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai	80
16. Perfil transcricional da sequência similar ao gene <i>WRKY</i> em plantas adultas de aveia branca, genótipos UFRGS 988012-1 e UFRGS 19, após inoculação com <i>P. coronata</i> em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai.....	80
17. Perfil transcricional da sequência similar ao gene <i>WRKY</i> em plantas adultas de aveia branca, genótipos URS 22 e URS 21, após inoculação com <i>P. coronata</i> em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai	81
18. Perfil transcricional da sequência com homologia a peroxidase em plantas adultas de aveia branca, genótipos UFRGS 988012-1 e UFRGS 19, após inoculação com <i>P. coronata</i> em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai	82
19. Perfil transcricional da sequência com homologia a peroxidase em plantas adultas de aveia branca, genótipos URS 21 e URS 22, após inoculação com <i>P. coronata</i> em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai	82
20. Perfil transcricional da sequência com homologia a fenilalanina amônia liase plantas adultas de aveia branca, genótipos UFRGS 988012-1 e UFRGS 19, após inoculação com <i>P. coronata</i> em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai	83
21. Perfil transcricional da sequência com homologia a fenilalanina amônia liase em plantas adultas de aveia branca, genótipos URS 21 e URS 22, após inoculação com <i>P. coronata</i> em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai	84
22. Perfil transcricional da sequência com homologia a uma proteína MACPF em plantas adultas de aveia branca, genótipos UFRGS 988012-1 e UFRGS 19, após inoculação com <i>P. coronata</i> em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai	85
23. Perfil transcricional da sequência com homologia a uma proteína MACPF em plantas adultas de aveia branca, genótipos URS 21 e URS 22, após inoculação com <i>P. coronata</i> em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai	85
24. Perfil transcricional da sequência com homologia a enzima chalcona sintase em plantas adultas de aveia branca, genótipos UFRGS 988012-1 e UFRGS 19, após inoculação com <i>P. coronata</i> em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai	87
25. Perfil transcricional da sequência com homologia a enzima chalcona sintase em plantas adultas de aveia branca, genótipos URS 21 e URS 22, após inoculação com <i>P. coronata</i> em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai	87
26. Perfil transcricional da sequência codificante do gene <i>Lr34</i> de trigo em plantas adultas de aveia branca, genótipos UFRGS 988012-1 e UFRGS 19, após inoculação com <i>P. coronata</i> em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai	88
27: Perfil transcricional da sequência codificante do gene <i>Lr34</i> de trigo em plantas adultas de aveia branca, genótipos URS 21 e URS 22, após inoculação com <i>P. coronata</i> em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai.....	88

28. Perfil transcricional da sequência com homologia a enzima calose sintase em plantas adultas de aveia branca, genótipos UFRGS 988012-1 e UFRGS 19, após inoculação com *P. coronata* em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai 89
29. Perfil transcricional da sequência com homologia a enzima calose sintase em plantas adultas de aveia branca, genótipo URS 21, após inoculação com *P. coronata* em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai..... 90

RELAÇÃO DE SIGLAS

AJ	ácido jasmônico
AS	ácido salicílico
ASCPD	área sob a curva do progresso da doença
ASCPDNC	área sob a curva do progresso da doença normalizada e corrigida
<i>AsHHT</i>	hidroxiantranilato hidroxicinamoiltransferase
ASP	iniciador alelo específico
BRCA2A	BREAST CANCER2A
CC	<i>coiled coil</i>
<i>CCoAOMT</i>	cafeoil-CoA3-O-metiltransferase
cDNA	DNA complementar
CHS	chalcona sintase
CIA	clorofórmio : álcool isoamílico
CP	iniciador comum
CTAB	brometo de cetil trimetil amônio
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDS	ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EEA	Estação experimental agrônoma
ETI	<i>effector-triggered immunity</i>
ETS	<i>effector-triggered susceptibility</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
GA	giberelina
genes <i>avr</i>	genes de avirulência
genes <i>PR</i>	genes relacionados à patogenicidade
genes <i>R</i>	genes de resistência
genes <i>S</i>	genes de suscetibilidade
ha	hectares
hai	horas após a inoculação
ICS/SID2	enzima isocorismato sintase
KASP	reações em cadeia da polimerase competitiva alelo específica
LiCl	cloreto de lítio
loco <i>Rds</i>	<i>resistance-dependent supressor of cell death</i>

loco <i>Rih</i>	<i>resistance-independent hypersensitive cell death</i>
LRR	repetições ricas em leucina
MACPF	<i>Membrane attack complex perforin</i>
MAMPs	padrões moleculares associados a micróbios
MAPKs	proteínas quinases ativadas por mitógenos
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	cloreto de sódio
NBS	sítio central de ligação de nucleotídeo
NDR1	NON-RACE-SPECIFIC DISEASE RESISTANCE
NIMIN1	NIM1-INTERACTING
NO	óxido nítrico
NPR1	NONEXPRESSOR OF PR GENES
PAD4	PHYTOALEXIN DEFICIENT4
PAL	fenilalanina amônia liase
PAMPs	padrões moleculares associados ao patógeno
pb	pares de base
<i>Pc</i>	genes que conferem resistência à <i>P. coronata</i>
PCR	reações em cadeia da polimerase
<i>Pg</i>	genes que conferem resistência à <i>P. graminnis</i>
PRR	receptores de reconhecimento transmembrana
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
PVP40	polivinilpirrolidona 40
PVPP	polivinilpolipirrolidona
q.s.p	quantidade suficiente para
QTL	loco de caracter quantitativo
r	taxa de infecção
RAD51D	RAS ASSOCIATED WITH DIABETES51D
RH	reação de hipersensibilidade
RNA	ácido ribonucléico
ROS	espécies reativas de oxigênio
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real
SAR	resistência sistêmica adquirida
SNI	SUPPRESSOR OF <i>npr1</i> INDUCIBLE1
SNP	polismorfismos de um único nucleotídeo
SSN2	SUPPRESSOR OF <i>sni1 2</i>
TE	Tris-HCl e EDTA
TI	tipo de infecção
TIR	<i>Toll/Interleukin-1-Receptor</i>
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

1 INTRODUÇÃO

A aveia branca (*Avena sativa* L.) é um cereal pertencente à família Poaceae, de ciclo anual, alohexaplóide e com número básico de cromossomos igual a sete. Esse cereal se destaca por apresentar excelentes propriedades nutricionais, como por exemplo, a qualidade de suas proteínas como as globulinas (Mohamed *et al.*, 2009) e elevado teor de fibras solúveis. No Brasil, a aveia é cultivada principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná.

Em decorrência da crescente demanda pelos produtos derivados deste cereal, a cultura do mesmo cresceu em importância e em área cultivada na região sul do país. Como consequência da expansão da área cultivada e da uniformidade genética das variedades cultivadas, tem-se um aumento do risco de epidemias diante de condições ambientais favoráveis e um aumento da severidade de doenças fúngicas. A ferrugem da folha, causada pelo fungo biotrófico *Puccinia coronata* Corda f. sp. *Avenae* Eriks é atualmente a doença economicamente mais importante da aveia. A infecção é responsável por induzir mudanças estruturais, bioquímicas e fisiológicas no hospedeiro. O principal dano causado pelo patógeno ocorre nas folhas, resultando em redução da taxa fotossintética, acarretando perdas tanto na qualidade quanto no rendimento de grãos, podendo ocasionar uma redução de até 50% no rendimento em cultivares suscetíveis ao patógeno.

Diante deste cenário, tem-se a necessidade do desenvolvimento de cultivares que apresentem formas de resistência genética eficientes no controle desta doença. Uma opção promissora é o emprego da resistência quantitativa ou resistência parcial, um tipo de resistência incompleta na qual o hospedeiro, mesmo sendo suscetível à infecção, apresenta baixa taxa de progresso da doença. É de natureza oligo ou poligênica e geralmente não específica à raça do patógeno. O emprego desse tipo de resistência em ambientes como o do sul do Brasil é adequado, pois este ambiente impõe elevada

pressão de seleção sobre a população do patógeno e apresenta condições ambientais, frequentemente, favoráveis à ocorrência da doença.

A resistência quantitativa é responsável por conferir um progresso lento da doença, quando observada a campo. Essa menor taxa de desenvolvimento da epidemia é o resultado dos efeitos combinados dos componentes que conferem a resistência parcial como a baixa eficiência de infecção, um maior período latente, uma menor produção de esporos por pústulas e a ocorrência de pústulas com tamanho reduzido. Assim, a resistência parcial, por conferir um progresso lento da doença pode ser considerada uma característica estável e efetiva por longos períodos, o que faz desta forma de resistência uma estratégia viável, embora trabalhosa durante o processo de seleção, a ser empregada nos programas de melhoramento.

No entanto, atualmente o controle da doença é realizado principalmente pelo emprego de cultivares que apresentam resistência qualitativa, a qual é conferida por genes de maior efeito sobre o fenótipo geralmente específicos a uma determinada raça do patógeno. Porém essa estratégia vem sendo restringida pela elevada capacidade do patógeno em superar este tipo de resistência, bem como pela complexidade da população de *P. coronata* na região do sul do Brasil, o que confere baixa efetividade no controle da doença.

Assim, a melhor perspectiva para o melhoramento visando o controle da ferrugem da folha, a qual vem desafiando os melhoristas há anos, consiste no emprego de combinações de genes, de maior e menor efeito sobre o fenótipo. Genótipos brasileiros apresentando resistência dessa natureza já foram desenvolvidos, sendo exemplo a linhagem UFRGS 988012-1 e as cultivares URS Brava e URS Altiva, as quais encontram-se em cultivo na região do sul do Brasil e a cultivar URS 21, a qual permaneceu expressando o caráter resistência parcial a campo por mais de uma década. Entretanto, tão importante quanto identificar e transferir fontes de resistência quantitativa é o entendimento das características genéticas da resistência parcial, bem como a elucidação dos mecanismos histopatológicos, bioquímicos, moleculares e fisiológicos que conferem esta forma de resistência.

Assim, buscando ampliar o conhecimento genético e molecular da resistência parcial à ferrugem da folha presente em genótipos brasileiros de aveia, foi desenvolvida uma população de linhagens recombinantes a partir dos genótipos contrastantes para o caráter, UFRGS 19 (suscetível) e UFRGS 988012-1 (parcialmente resistente), a qual será motivo de estudo ao longo deste trabalho.

O conhecimento das bases genéticas responsáveis por conferirem o caráter resistência parcial permitirá o desenvolvimento de marcadores moleculares associados a esta característica e aplicação dessa ferramenta em programas de melhoramento genético. Estes marcadores poderão auxiliar o processo de obtenção de novas variedades com resistência parcial à ferrugem da folha da aveia, as quais, por consequência, podem apresentar maior durabilidade da resistência mesmo em condições de elevada pressão de inóculo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Caracterizar fenotipicamente a resistência parcial à ferrugem da folha em uma população de linhagens recombinantes de aveia branca, identificar regiões gênicas e perfis transcricionais envolvidos na expressão do caráter resistência parcial e averiguar os mecanismos moleculares da resistência parcial;

1.1.2 Objetivos específicos

- Fenotipar a resistência parcial em linhagens recombinantes do cruzamento UFRGS 988012-1 x UFRGS 19 a campo em diferentes anos;
- Estimar o número de locos envolvidos com a expressão do caráter resistência parcial à ferrugem da folha na população de linhagens recombinantes;
- Fenotipar a resistência parcial em linhagens recombinantes do cruzamento UFRGS 988012-1 x UFRGS 19 sob condições controladas, em plântulas e verificar se a resistência parcial de UFRGS 988012-1 também ocorre nesse estágio de desenvolvimento;
- Validar a expressão diferencial das sequências gênicas identificadas via RNAseq em plântulas da cultivar URS 21, quando desafiada com *P. coronata* f. sp. *avenae*, utilizando RT-qPCR em plantas adultas dos genótipos URS 21, URS 22, UFRGS 988012-1 e UFRGS 19;
- Avaliar se a região gênica responsável pela resistência apresentada pela linhagem MN 841801 é a mesma responsável pela resistência presente nos genótipos brasileiros parcialmente resistentes;
- Avaliar a expressão ao longo do tempo de genes envolvidos na síntese de avenantramidas em UFRGS 988012-1, UFRGS 19, URS 21 e URS 22 através de

RT-qPCR a partir de iniciadores projetados das sequências obtidas através do RNA-seq;

- Inferir se o mecanismo que confere a resistência parcial em UFRGS 988012-1 é o mesmo que confere esse caráter a URS 21;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Avena*

As espécies pertencentes ao gênero *Avena* L., cujo mais provável centro de origem é a Ásia Menor ou a região correspondente ao norte da África, incluem inúmeras espécies cultivadas e silvestres, e ocorrem em três níveis de ploidia: espécies diploides ($2n = 2x = 14$ cromossomos), espécies tetraploides ($2n = 4x = 28$ cromossomos) e espécies hexaploides ($2n = 6x = 42$ cromossomos) (Holden, 1979), e apresentam quatro diferentes genomas: A, B (A'), C e D (A''), cada um com número básico de sete cromossomos (Linares *et al.*, 1998; Loskutov, 2008; Loskutov & Rines, 2011). Segundo Ladzinski (2012), as espécies biológicas do gênero *Avena* se dividem em sete espécies diploides, cinco espécies tetraploides e uma espécie hexaploide, a qual é subdividida em três subespécies (*Avena sativa*, *A. sterilis* e *A. fatua*).

Os 21 cromossomos que compõem a espécie hexaplóide *A. sativa* são denominados de acordo com o genoma ao qual cada um pertence. Os sete cromossomos pertencentes ao genoma A são denominados 8A, 11A, 13A, 15A, 16A, 17A e 19A. Os cromossomos pertencentes ao genoma C são denominados 1C, 2C, 3C, 4C, 5C, 6C e 7C. Enquanto que os cromossomos correspondentes ao genoma D são denominados 9D, 10Da, 10Db, 12D, 14D, 18D, 20D e 21D (Oliver *et al.*, 2013).

No Brasil, a cultura da aveia foi introduzida pelos espanhóis (Mori *et al.*, 2012) e o cultivo da mesma é realizado principalmente nos estados do sul e centro sul do país. As principais espécies cultivadas no país são a aveia branca (*A. sativa* L.) e a aveia preta (*A. strigosa* Schreb).

2.1.1 Aveia branca (*A. sativa* L.): o hospedeiro

A aveia branca, ou aveia hexaploide, é um cereal anual de inverno/primavera, autógena (taxa de fecundação cruzada inferior a 0,5%) pertencente à família Poaceae,

subfamília Poideae, tribo Aveneae (Ladizinsky, 2012). É uma espécie alohexaploide, originada a partir da fusão dos genomas de três espécies ancestrais diploides AA, CC e DD (Loskutov, 2008). Apresenta tamanho de genoma significativamente maior quando comparada com as demais gramíneas cultivadas (Thomas, 1992), o que confere a esta espécie uma elevada variabilidade genética.

Originalmente, a aveia desenvolveu-se como uma espécie invasora de culturas como o trigo e a cevada, até que quando inserida no continente Europeu, foi domesticada, passando a apresentar características como a perda da dormência e da debulha natural dos grãos fornecendo assim uma vantagem seletiva para o seu cultivo (Tavares *et al.*, 1993).

Como consequência da elevada variabilidade genética, este cereal apresenta satisfatória adaptação a diversas condições edafoclimáticas, o que permite que o mesmo possa ser cultivado em diferentes regiões do mundo (Holden, 1979). Atualmente está ranqueado como um dos cinco cereais de maior produção (Loskutov & Rines, 2011) em nível mundial, com destaque para a Austrália, Europa e América do Norte e do Sul (Leonard & Martinelli, 2005).

O sucesso no cultivo da aveia também se deve ao fato deste cereal ser uma alternativa técnica e economicamente viável, pois atua promovendo uma melhoria nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, reduzindo a incidência de doenças (quando empregada no sistema de rotação de culturas) e fornecendo um maior período de cobertura vegetal para o solo, reduzindo a ocorrência de plantas invasoras por apresentar propriedades alelopáticas (Jacobi & Fleck, 2000) e a erosão do solo (Federizzi & Mundstock, 2004).

A aveia é empregada para a produção de grãos para o consumo humano por apresentar benefícios nutricionais, além de ser uma importante fonte proteica (12 a 20%), conter elevados teores de fibras solúveis, como as β -glicanas que estão relacionadas com redução do risco de doenças coronarianas (Maki *et al.*, 2007), além de carboidratos, vitaminas e minerais quando comparada com outros cereais. Também vem recebendo atenção por possuir um grupo de compostos antioxidantes, avenantramidas, que se encontram associadas no auxílio à prevenção de arteriosclerose (Nie *et al.*, 2006).

Para o consumo animal, a aveia é utilizada na forma de grãos, forragem ou feno. Apresenta também emprego na indústria química, de alimentos e farmacêutica (Peterson, 2004; Mori *et al.*, 2012). Quando empregada na indústria de alimentos, a aveia branca necessita ter grãos que apresentem fácil debulha, palatáveis, de coloração

branca e com elevada qualidade nutricional, como alto percentual de cariopse, alto peso do hectolitro, e principalmente proteínas e fibras solúveis (Fontaneli *et al.*, 2012).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a produção mundial de aveia no ano de 2013 foi de aproximadamente 23,82 milhões de toneladas, colhidas em uma área de 9,78 milhões de hectares (FAOSTAT, 2016).

No hemisfério Sul, onde as condições climáticas variam de subtropical a temperado, Chile, Argentina e Brasil são os maiores produtores de aveia (FAOSTAT, 2016). No Brasil, o cultivo deste cereal para a produção de grãos está localizado principalmente nos estados da região sul do país. Já em estados como o Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, a aveia é cultivada objetivando a produção de forragem para a alimentação animal (Chaves & Martinelli, 2005).

A produção, a produtividade e a área cultivada com aveia branca no Brasil cresceram significativamente desde a década de 70, atingindo produção de grãos equivalente a 351,2 mil toneladas em uma área equivalente a 189,5 mil hectares (ha) na safra de 2015 (Federizzi *et al.*, 2015; CONAB, 2016), sendo o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor (118,4 mil ha e uma produtividade média de 2.426 kg.ha⁻¹), seguido pelo estado do Paraná. No entanto, o rendimento de grãos médio das lavouras no país ainda é considerado baixo.

De acordo com Federizzi & Pacheco (2009), até o final dos anos 70, as variedades de aveia cultivadas no Brasil eram provenientes dos Estados Unidos e da Argentina, e sob as condições brasileiras de cultivo, apresentavam baixa produtividade e grãos com qualidade insatisfatória para a indústria. Como consequência do aumento da demanda por grãos de melhor qualidade, houve a necessidade do melhoramento de variedades de aveia, permitindo assim transformar este cereal em uma espécie adaptada às condições do sul do Brasil.

Diante deste cenário e, desta demanda, em 1974 teve início o Programa de Melhoramento Genético da Aveia, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), objetivando o desenvolvimento de cultivares para a produção de forragem e de grãos com elevada qualidade e adaptadas ao ambiente brasileiro. Genótipos e populações segregantes foram introduzidas de programas de melhoramento genético dos Estados Unidos e, através da realização de cruzamentos intraespecíficos seguidos pelo processo de seleção, cultivares com caracteres desejáveis têm sido obtidas (Federizzi & Pacheco, 2009).

Dentre os principais caracteres selecionados pelo programa acima mencionado, destacam-se estatura reduzida, ciclo precoce, elevado rendimento de grãos, tolerância ao alumínio e resistência às principais doenças. Conseqüentemente, observou-se uma tendência ascendente quanto ao rendimento médio de grãos de aveia no ambiente do Sul do Brasil (Federizzi & Pacheco, 2009; Federizzi *et al.*, 2015).

Atualmente, a aveia branca apresenta ciclo que varia de 120 a mais de 200 dias, dependendo da cultivar (Castro *et al.*, 2012). Apresenta hábito de crescimento cespitoso ereto e pode atingir uma estatura de 0,70 a 2,00 metros e, apesar de ser considerada uma planta de dia longo, apresenta variabilidade quanto à responsividade ao fotoperíodo (Nava *et al.*, 2012).

Assim, a aveia tornou-se um dos principais cereais cultivados no inverno na região do Sul do Brasil, e vem se destacando no atual cenário agrícola por ser uma alternativa no sistema de rotação de cultura com o trigo e em sucessão com a soja ou outra espécie estival em ambientes onde o sistema de plantio direto é adotado (Floss, 2002).

Porém, associados à tendência ascendente da área cultivada com este cereal no país, surgiram os riscos da ocorrência de epidemias, as quais tendem a ser mais severas em função da elevada uniformidade genética das variedades cultivadas em uma determinada região e da tendência de equilíbrio entre as populações dos patógenos e dos hospedeiros, que estão sob constante coevolução (Chaves & Martinelli, 2005).

Dentre as moléstias que atacam a aveia branca, a ferrugem da folha é atualmente a doença economicamente mais importante (Chong *et al.*, 2011) e mais destrutiva, podendo causar reduções no rendimento e na qualidade dos grãos de até 50% (Martinelli *et al.*, 1994). Tal cenário salienta o grande desafio dos melhoristas, os quais devem concentrar esforços para disponibilizar no mercado variedades de aveia que apresentem formas de resistência genética eficientes às principais doenças, associadas às demais características de interesse agrônômico, como boa adaptação à região de cultivo, elevado rendimento de grãos e qualidade que atenda às demandas da indústria (Federizzi *et al.*, 2005).

2.2 O patógeno

As ferrugens que atacam hospedeiros pertencentes à família *Poaceae* são doenças que se caracterizam pela ocorrência de pústulas resultantes do desenvolvimento de urédias de fungos pertencentes ao filo Basidiomycota, ordem Uredinales, família

Pucciniacea. Esses fungos atuam como parasitas obrigatórios, em uma interação hospedeiro-patógeno específica, em nível de espécie (*formae specialis*) e em nível de cultivares (raças fisiológicas) (Agrios, 2005).

A doença mais destrutiva e de maior distribuição que afeta a cultura da aveia mundialmente é a ferrugem da folha (Leonard *et al.*, 2004). Há relatos de severas epidemias resultando em perdas de rendimento em todas as regiões em que este cereal é cultivado desde 1900 (Simons, 1985; Martinelli, 2004). Essa doença é causada pelo fungo biotrófico *Puccinia coronata* Corda f. sp. *avenae* Eriks, um fungo heteroecio, heterotático e policíclico (Agrios, 2005).

A ferrugem da folha se caracteriza pela ocorrência de urédias ovais, de coloração amarelo-laranja sobre as superfícies abaxial e adaxial da lâmina foliar. No entanto, quando epidemias severas ocorrem, pode-se observar o desenvolvimento de urédias em todas as partes verdes da planta como colmos, panículas e aristas (Simons, 1985).

Os danos causados por essa doença são resultantes das modificações estruturais, bioquímicas e fisiológicas causadas pelo desenvolvimento do fungo no hospedeiro (Harder & Haber, 1992). Durante a invasão intracelular do fungo e formação dos haustórios, é que ocorrem as modificações mais profundas sobre o hospedeiro (Chaves & Martinelli, 2005).

A ocorrência da doença provoca danos às folhas verdes e, conseqüentemente acarreta em alterações na fotossíntese ao longo do desenvolvimento da infecção, bem como na partição de fotoassimilados entre a fonte (folhas) e os órgãos dreno (grãos em desenvolvimento), resultando em grãos murchos que apresentam baixo valor nutricional (Simons, 1985).

Logo após a inoculação de plantas hospedeiras com *P. coronata* ocorre um decréscimo nas trocas gasosas. A redução da taxa fotossintética das folhas pode ser constatada nos períodos subsequentes à inoculação com o patógeno e, aproximadamente quatro a cinco dias após a inoculação é possível observar o crescimento de micélios intercelulares e a presença de manchas amarelas nas folhas, além de intensa redução da fotossíntese nessas regiões (Scholes & Rolfe, 1996).

Uma redução da taxa fotossintética ao longo de toda a folha é observada no momento em que ocorre a esporulação do fungo, sendo tal redução mais pronunciada nas regiões infectadas. Há inibição da fotossíntese em toda a área foliar aproximadamente onze dias após a inoculação e, quando a folha inicia o processo de senescência, nas regiões associadas com o micélio há a formação das “ilhas verdes”.

Nessas regiões ainda é possível detectar atividade fotossintética, mesmo que em baixos níveis (Scholes & Rolfe, 1996). Porém, a manutenção da fotossíntese em tecidos não infectados é o mecanismo que supre o patógeno com açúcar em quantidade suficiente para o seu desenvolvimento (Lapin & Ackerveken, 2013).

Como consequência do estresse fisiológico induzido pelo patógeno, dos danos causados às folhas e na partição de fotoassimilados, ocorrem perdas no rendimento e na qualidade dos grãos e já foi demonstrada uma alta correlação negativa entre o rendimento de linhagens de aveia e a severidade da ferrugem da folha (Caierão *et al.*, 2001). Isso significa que, mesmo presente em pequenas quantidades a ferrugem da folha pode reduzir de maneira significativa os rendimentos da cultura, redução essa que pode chegar a 100 kg por unidade percentual adicional na severidade da doença (Chaves *et al.*, 2008; Martinelli *et al.*, 1994).

Ao avaliar o desempenho de genótipos elites de aveia nas condições de cultivo do sul do Brasil, Chaves *et al.* (2002) observaram reduções no rendimento de grãos variando de 4 a 79,5% para as cultivares URS 21 e UFRGS 17, respectivamente. Esses resultados indicam que, embora haja uma correlação entre a intensidade da doença e o dano provocado, fatores como a composição genética de cada cultivar, bem como o ambiente no qual a interação hospedeiro–patógeno está ocorrendo, influenciam nos danos associados à infecção com *P. coronata* (Chaves & Martinelli, 2005).

P. coronata, como descrito anteriormente, é um fungo heteroecio, ou seja, necessita de duas espécies hospedeiras para completar o seu ciclo. *Rhamnus cathartica* L. é um dos hospedeiros alternativo deste patógeno, e atua como uma via pela qual novas combinações de patogenicidade ou raças se originam através da recombinação de genes existentes para a patogenicidade pela ocorrência do ciclo sexual (Simons, 1985). Nas regiões onde *R. cathartica* L. está presente, há um aumento do potencial de inóculo e, conseqüentemente, aumentam as chances de produção de novas combinações de virulência do patógeno (Harder & Haber, 1995).

No Brasil, pela não ocorrência do hospedeiro alternativo, a ferrugem da folha da aveia comporta-se de forma autoecia, não apresentando fase sexual, desenvolvendo-se em um único hospedeiro ao longo do seu ciclo de vida (Martinelli, 2004). No entanto, a elevada variabilidade patogênica, associada ao grande número de raças fisiológicas, bem como a presença de raças complexas (“super-raças”) de *P. coronata*, ocorrem no sul do Brasil principalmente em função da elevada taxa de mutação, a qual varia de um esporo mutante a cada 500 a 3000 esporos, os quais são produzidos ao longo do cultivo

de aveia durante todo o ano na região do Cone Sul (Vieira *et al.*, 2007). Não existem barreiras físicas ou temporais que impeçam a disseminação dos esporos e há disponibilidade de plantas verdes durante todo o ano, o que permite a ocorrência de “pontes verdes” para a manutenção do inóculo. Além disso, as condições ambientais comumente são favoráveis à ocorrência da doença e permitem inúmeros ciclos de infecção associados a longos períodos de esporulação (Martinelli *et al.*, 1998; McDonald & Linde, 2002).

Propriedades morfológicas e fisiológicas particulares de cada fase do ciclo de *P. coronata* podem ser observadas (Harder & Haber, 1992) e, como para as demais ferrugens que atacam os cereais, o ciclo de reprodução deste patógeno apresenta cinco estádios distintos de desenvolvimento: uredial, telial, basedial, picnial e aecial (Heath, 1997). Os estádios variam entre si em relação à ploidia, à caracterização fenotípica, à patogenicidade e à virulência associada, bem como com relação às estruturas formadas e ao mecanismo de penetração empregado para acessar o tecido hospedeiro (Heath, 1997).

O desenvolvimento da ferrugem da folha da aveia sobre o hospedeiro ocorre durante o estágio uredial, posterior a deposição dos uredosporos no hospedeiro e a sua germinação depende da ocorrência de alta umidade sobre a superfície foliar (Leonard & Szabo, 2005). Nesse estágio, o fungo apresenta-se como células dicarióticas que podem perpetuar-se via reprodução assexuada sobre o tecido vivo do hospedeiro (Simons, 1985). Com o avanço do ciclo do hospedeiro e início do processo de senescência, dá-se início ao estágio telial, o qual é caracterizado por células dicarióticas que se formam na região circundante às células urediais. Os teliosporos são células nas quais o fungo permanece dormente e, após a quebra da dormência ocorre a germinação dos teliosporos que produzem a basídia (Simons, 1985). Os teliosporos possuem projeções na forma de coroa nas células apicais, o que justifica o fato de a doença também ser conhecida por ferrugem da coroa (do inglês, *crown rust*) (Forcelini & Reis, 1997).

A estrutura denominada basídia sofre uma redução meiótica que resulta na produção dos basidiosporos. Essas células são haploides e caracterizam o estágio basidial. Os basídios são as estruturas capazes de infectar folhas jovens do hospedeiro alternativo, e assim prorrogar a fase sexual do desenvolvimento de *P. coronata* (Simons, 1985). A germinação dos basidiosporos sobre o hospedeiro alternativo dá início ao estágio picnial. Posterior à germinação, ocorre a produção de pínias com picniosporos e hifas receptivas. Ambas as estruturas são haploides. Neste estágio ocorre

a fecundação das hifas receptivas pelos picniosporos complementares e a produção de aécias, as quais são compostas por hifas dicarióticas e aeciosporos, também dicarióticos. Assim, os aeciosporos são o resultado da recombinação genética e podem diferir quanto ao grau de virulência e agressividade (Chaves *et al.*, 2008).

Os aeciosporos são as estruturas responsáveis pela infecção em hospedeiros pertencentes à família *Poaceae*. São hidrosopicamente liberados a partir dos aécios e são transportados pelo ar até a planta hospedeira. Quando ocorre a infecção de plantas hospedeiras por aeciosporos e a produção de urédias o fungo completa o seu ciclo de vida (Simons, 1985).

As condições ambientais para o desenvolvimento do patógeno e germinação dos uredosporos sob condições naturais são temperatura variando entre 2 e 33°C, com temperatura ótima entre 16 e 20°C, elevada umidade relativa do ar e formação de orvalho, fornecendo um período de molhamento foliar por no mínimo seis horas (Simons, 1985). A ocorrência de temperaturas acima de 30°C inibe a infecção (Simons, 1985). Sob invernos amenos e primaveras úmidas, a ferrugem da folha da aveia é uma doença altamente destrutiva (Forcelini, 2002).

Após a deposição dos uredosporos sobre a superfície foliar de plantas de aveia ocorre a germinação destes e a formação do tubo germinativo. Os tubos germinativos de *P. coronata* penetram através dos estômatos e se localizam na câmara subestomática. Quando o tubo germinativo reconhece o estômato, o mesmo diferencia-se numa estrutura denominada apressório (Harder & Haber, 1992).

De sete a quatorze dias é o período necessário para que o patógeno complete cada ciclo do seu desenvolvimento e, por ser um patógeno policíclico, o mesmo apresenta vários ciclos secundários ao longo do processo infeccioso (Agrios, 2005).

A formação dos uredosporos e dos tubos germinativos ocorre na ausência de luz e a presença de água livre sobre a superfície foliar é o fator ambiental essencial para que ocorra a germinação do esporo (Yirgou & Caldwell, 1963). Após a penetração do patógeno na câmara subestomática, ocorre a formação da vesícula subestomática, a qual dá origem às hifas infectivas. Quando as hifas infectivas encontram a parede celular das células do mesófilo tornam-se aptas a se diferenciarem em células mãe do haustório. As células mãe do haustório formam um grampo estreito, o qual penetra na parede celular do hospedeiro, provavelmente por dissolução enzimática ou por pressão (Heath, 1997; Hu & Rijkedaberg, 1998; Leonard & Szabo, 2005).

Quando no interior da parede celular, no espaço periplasmático, uma célula especializada expande-se dando origem ao haustório. Esse processo é determinante para o sucesso da infecção, isso porque *P. coronata* é um fungo biotrófico e, como tal, absorve nutrientes a partir dessa estrutura. Contudo, o haustório também está envolvido em alterações no metabolismo e na supressão da resposta de defesa do hospedeiro (Heath, 1997; Veogele & Mendgen, 2003).

Após a formação do primeiro haustório, a hifa infectiva dá sequência ao seu desenvolvimento originando novas células mãe do haustório, salientando a importância do estabelecimento dessas estruturas para que a colônia fúngica se estabeleça. O desenvolvimento dos haustórios se dá no interior do lúmen, porém estes permanecem no lado externo da membrana plasmática das células hospedeiras (Heath, 1997; Leonard & Szabo, 2005).

A formação de pústulas é observada quando os esporos rompem a cutícula e, a massa de uredosporos, presentes no centro dos corpos de frutificação, confere às pústulas a coloração amarelo-laranja, típica da doença. Os uredosporos apresentam deiscência, são cobertos por espinhos e apresentam um diâmetro médio de 30 µm (Harder & Haber, 1992). Quando as pústulas são rompidas, estas liberam grandes quantidades de esporos. Estes esporos são carregados pelo vento por distâncias de até 2.000 km e repetem o ciclo de infecção (Harder & Haber, 1995; McDonald & Linde, 2002).

A colonização das células do hospedeiro pode ser facilitada pela produção de fitotoxinas e compostos semelhantes a hormônios vegetais pelo patógeno (Szabo & Bushnell, 2001; Leonard & Szabo, 2005).

Diante da reação de compatibilidade, o fluxo de transporte do floema é ajustado para o fornecimento de carbono orgânico, na forma de açúcar, e nutrientes para o tecido infectado, o qual apresenta uma elevada força de dreno. Além do intenso descarregamento do floema requerido para a realização do transporte de sacarose dos tecidos fontes para os tecidos drenos, também se observa nessa região uma intensa atividade respiratória, acúmulo de açúcar e aumento da atividade de invertases. Essas invertases atuam degradando açúcares para o desenvolvimento, crescimento e esporulação do patógeno (Leonard & Szabo, 2005; Lapin & Ackerveken, 2013).

Em função da complexa estrutura populacional e elevada variabilidade genética apresentada por *P. coronata* na região do sul do Brasil, a qual apresenta de dez a 26 genes de virulência, com uma média de 20 genes por isolado (Martinelli *et al.*, 1998), é

possível comparar o espectro de virulência presente nas raças dessa região com as presentes no centro de origem do patógeno, Israel (Leonard *et al.*, 2004).

Como consequência do aumento da variabilidade genética na população do patógeno na região do Cone Sul, associada a constantes e elevadas taxas de mutação, ao ambiente que favorece a ocorrência da doença e, o contínuo fluxo de raças do patógeno nas regiões produtoras de aveia, observa-se forte pressão de seleção sobre a população de *P. coronata* induzindo o surgimento e fixação de isolados mutantes e mais virulentos (Chaves & Martinelli, 2005). Esses novos isolados, mais virulentos, são capazes de superar os genes de resistência empregados nos genótipos cultivados nessa região em pequenos intervalos de tempo, o que salienta a necessidade do desenvolvimento de cultivares que apresentem formas de resistência genética eficientes no controle desta doença. Uma opção promissora é o emprego da resistência quantitativa ou resistência parcial, que por sua natureza não impõe sobre a população do patógeno intensa pressão de seleção.

De acordo com o modelo de risco do potencial evolucionário proposto por McDonald & Linde (2002), os patógenos que apresentam altas taxas de mutação, como *P. coronata*, apresentam maior risco para superarem genes de resistência quando comparados com patógenos que apresentam baixas taxas de mutação. Uma das possíveis explicações é o fato de que quanto maior a taxa de mutações, maior é a probabilidade de ocorrer uma mutação de um gene de avirulência para um gene de virulência, ou de uma menor para uma maior patogenicidade, em uma determinada população do patógeno.

2.3 Resistência genética

Levando-se em consideração que a população humana duplicou nos últimos 50 anos, e estimativas indicam que até 2050 a população atinja a marca de nove bilhões de pessoas, o tópico segurança alimentar entra em cena (FAOSTAT, 2016).

Aliado ao aumento da população mundial, estresses bióticos, incluindo fungos biotróficos e necrotróficos, bem como bactérias e vírus, atuam como protagonistas com relação às perdas de produção, principalmente pelo surgimento de raças que carregam novos genes de virulência (Pretorius *et al.*, 2000) e superam os genes de resistência empregados. Esse cenário salienta a necessidade do entendimento das interações entre os patossistemas (Boyd *et al.*, 2013).

Visando uma redução das perdas ocasionadas pela ferrugem da folha da aveia, práticas de manejo podem ser adotadas, como por exemplo, a aplicação de fungicidas foliares, a erradicação de hospedeiros alternativos de regiões próximas às lavouras (McCartney *et al.*, 2011), como o emprego de multilinhas ou o emprego de misturas varietais (Pink, 2002) e o emprego de cultivares resistentes ao ataque do patógeno (McCartney *et al.*, 2011). Porém, entre as estratégias de controle de doenças disponíveis atualmente, o emprego da resistência genética é considerada a estratégia mais eficiente, tanto econômica quanto ambientalmente. Portanto, o desenvolvimento de variedades que apresentam resistência ao ataque de *P. coronata* é o método mais seguro para o controle da ferrugem da folha da aveia (Sanz *et al.*, 2013).

A natureza genética da resistência das plantas contra o ataque de patógenos foi considerada a partir do momento da redescoberta das leis de Mendel, quando Biffen, em 1905, demonstrou que a resistência à ferrugem amarela do trigo, causada por *P. striiformis* f. sp. *tritici*, era controlada por um único loco (Pink, 2002). Essa descoberta permitiu que diversos programas de melhoramento objetivando seleção à resistência tivessem início no século XX. Entretanto, essa mesma descoberta criou a expectativa de que o desenvolvimento de novas variedades resistentes pudesse fornecer uma forma de controle permanente das doenças em plantas (Pink, 2002).

Porém, McRostie, em 1919, demonstrou que diferentes genes eram responsáveis pela resistência a diferentes variantes patogênicos (denominados patotipos). E, apenas em 1956, quando Flor apresentou a teoria gene-a-gene é que as relações entre patógenos e hospedeiros começaram a ser elucidadas (Pink, 2002).

De acordo com Parlevliet (1979), a resistência genética é definida pela habilidade do hospedeiro em impedir o crescimento e/ou o desenvolvimento do patógeno. Assim, a resistência pode ser agrupada e/ou classificada de acordo com: sua expressão, sendo considerada completa (qualitativa) ou parcial (quantitativa), sua herança (gene de efeito maior, gene de efeito menor sobre o fenótipo, mono, oligo ou poligênica), sua especificidade (raça específica, raça não específica) e seu mecanismo de ação (reação de hipersensibilidade (RH), não hipersensibilidade, pré-haustorial, pós-haustorial).

De acordo com a teoria gene-a-gene, postulada por Flor (1956) com o patossistema linho-ferrugem do linho (*Linum usitatissimum* L. x *Melampsora lini*), a resistência ocorre quando para cada gene que condiciona uma reação de resistência no hospedeiro existe um gene complementar no patógeno que condiciona a virulência.

Assim, a reação de resistência é o efeito do produto do gene de resistência do hospedeiro, geralmente de natureza dominante, e o produto do gene de avirulência do patógeno, geralmente expresso na forma recessiva.

Para a cultura da aveia diversos trabalhos indicam que a resistência genética quando efetiva proporciona proteção em níveis satisfatórios à cultura, permitindo assim a expressão do potencial de rendimento das variedades, mesmo quando essas são submetidas a severas epidemias de ferrugem da folha e cultivadas em ambientes que favoreçam o desenvolvimento da doença (Caierão *et al.*, 2001; Holland & Munkvold, 2001; Thomé *et al.*, 2001; Long *et al.*, 2006; Federizzi *et al.*, 2015).

O principal objetivo do melhoramento vegetal quanto à resistência a doenças é que esta seja eficiente contra as raças do patógeno prevalentes na região de cultivo e durável. No entanto, a resistência das cultivares à ferrugem da folha geralmente tem se apresentado efêmera (Parlevliet, 2002).

De acordo com Johnson (1984) para a resistência de um genótipo ser considerada durável, a mesma deve permanecer efetiva durante um prolongado período de tempo quando este genótipo for cultivado em uma ampla área e em condições ambientais favoráveis à ocorrência da doença.

Os programas de melhoramento genético de aveia tradicionalmente empregam a resistência qualitativa à ferrugem da folha (Chaves & Martinelli, 2005). Essa forma de resistência é caracterizada por ser governada por um ou poucos genes que apresentam grande efeito sobre o fenótipo, assim produzindo uma descontinuidade quando da avaliação do caráter resistência em uma população segregante, ou seja, é possível distinguir claramente os fenótipos resistentes dos suscetíveis (Parlevliet, 1979).

A preferência sobre a resistência qualitativa está associada à relativa facilidade com que a mesma pode ser transferida a genótipos elite. Porém essa resistência não tem sido durável por longos períodos de tempo para a interação aveia – ferrugem da folha (Chaves & Martinelli, 2005). A superação da resistência ocorre devido à grande habilidade do patógeno a adaptar-se geneticamente ao hospedeiro, o que resulta na evolução de novas raças virulentas (Niks & Rubiales, 2002; Pink, 2002; Chaves & Martinelli, 2005; Barbosa *et al.*, 2006).

Geralmente, essa resistência é conferida pelo mecanismo da RH, que é caracterizado pela morte celular localizada das células infectadas pelo patógeno quando ocorre interação incompatível entre os receptores de reconhecimento das plantas e as moléculas efetoras secretadas pelo patógeno (Heath, 2000; Yu *et al.*, 2001; Yao *et al.*,

2002), resultando numa rápida inibição do desenvolvimento do patógeno. A RH é um mecanismo eficiente para o controle de doenças causadas por bactérias ou vírus, porém apresenta-se de forma efêmera para o controle das ferrugens dos cereais (Niks & Rubilaes, 2002).

Os mecanismos pré-haustoriais permitem a expressão da resistência antes do primeiro haustório ser formado. São mecanismos tipicamente apresentados por reações de resistência não hospedeira e encontram-se, em diversos exemplos, associados há uma redução da penetração do fungo no tecido hospedeiro (Heath, 1981). A redução apresentada na taxa de penetração não é em função de uma baixa taxa de germinação dos uredosporos, mas sim, na dificuldade encontrada pelos tubos germinativos em localizar e reconhecerem os estômatos. Isso porque nas interações ferrugens x cereais, para que o tubo germinativo encontre o estômato o mesmo depende do reconhecimento da topografia da superfície foliar (Heath, 1981).

A resistência embasada em mecanismos pré-haustoriais, de acordo com Graichen (2009), é eficiente contra a ação de patógenos biotróficos. Análises histológicas realizadas com o patossistema aveia branca x ferrugem da folha demonstram a presença do apressório e de vesículas subestomatais em genótipos parcialmente resistentes (URS 21) e suscetíveis (URS 22) à ferrugem da folha no período de 12 horas após a inoculação (hai), porém em menor quantidade no genótipo que apresenta resistência parcial (URS 21) (Graichen *et al.*, 2011). Quanto ao desenvolvimento de hifas infectivas, estas foram observadas no período de 18 hai no genótipo suscetível URS 22 e em 24 hai para a cultivar parcialmente resistente URS 21. O estabelecimento do haustório foi observado para ambos os genótipos em 24 hai. Porém o número de vesículas subestomatais com desenvolvimento do haustório foi duas vezes maior em URS 22 se comparado com a cultivar parcialmente resistente URS 21 (Graichen *et al.*, 2011).

Em interações patógeno - não hospedeiro, a formação do haustório apresenta elevadas taxas de falha, assim sendo ineficiente, e existem evidências que para as interações que envolvam espécies hospedeiras compatíveis o fungo biotrófico induz a expressão de uma compatibilidade básica para a supressão dos mecanismos de defesa. Quando essa indução não ocorre, há o abortamento da tentativa de infecção antes mesmo da formação do haustório (Niks & Rubiales, 2002).

De acordo com Heath (1981) e Niks (1983), a baixa taxa de formação do haustório em interações incompatíveis não é uma consequência da falta de sinalização

da planta para desencadear a formação do haustório, mas sim uma resposta de defesa das células vegetais contra organismos invasores não adaptados. Existem alguns casos em que o mecanismo de defesa pré-haustorial encontra-se associado com a RH, porém para a grande maioria das respostas de defesa baseadas neste mecanismo, a RH não está associada e, a deposição de papilas sobre a parede celular é a única reação visível sob microscopia (Niks & Rubiales, 2002).

As papilas podem ser empregadas como barreiras para impedir a tentativa de penetração ou, podem ser uma reação de reparo da estrutura da parede celular após o abortamento da tentativa de infecção. Existe grande variação quantitativa entre diferentes genótipos quanto ao nível de resistência pré-haustorial contra organismos invasores não adaptados (Niks & Rubiales, 2002).

Em cevada (*Hordeum vulgare*) foi identificado o gene *Mlo*, responsável por conferir resistência pré-haustorial diante do ataque de oídio (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). Esse gene vem sendo empregado extensivamente em variedades de cevada europeias desde a década de 80 (Jorgensen, 1992). O mecanismo patológico associado a esse gene, quando presente na forma recessiva (*mlo*), é a rápida formação de papila, a qual contém principalmente calose, fenóis e proteínas. Linhagens de cevada cuja resistência ao oídio é baseada na ação de *mlo* apresentam a camada de papila, aproximadamente, 50% mais espessa que linhagens suscetíveis. Isso significa que a rápida formação de papila evita a penetração do fungo no tecido vegetal, atuando assim como uma barreira química e física à qual o grampo de infecção raramente é capaz de penetrar. Porém, associados à reação de defesa desencadeada pelo gene *mlo* observa-se a ocorrência de pontos de necrose foliar, os quais podem ser resultado de um elevado número de processos metabólicos desencadeados juntamente com a reação de defesa (Jorgensen, 1992).

A calose é sintetizada por uma classe de enzimas denominada calose sintase, e apresenta importante papel em diversos estádios do crescimento e desenvolvimento da planta, bem como em resposta a estresses. Esse polímero é depositado entre a membrana e a parede celular diante da ocorrência de determinados estresses bióticos ou abióticos (Chen & Kim, 2009). No entanto, a síntese de calose pode ter um duplo papel, pois a mesma pode atuar como uma barreira física, impedindo ou dificultando a penetração do patógeno, ou apresentar um efeito negativo sobre a resposta de defesa, dificultando a maquinaria de defesa vegetal desencadeada diante do ataque de patógenos (Jacobs *et al.*, 2003). Assim, quando da indução da síntese de calose pelo

patógeno, esse polímero atuaria regulando negativamente a via de sinalização do ácido salicílico (AS) (Nishimura *et al.*, 2003).

A resistência pós-haustorial é manifestada apenas após a formação do primeiro haustório. Os mecanismos de defesa pós-haustoriais são tipicamente apresentados por reações de resistência hospedeira e atuam inibindo o desenvolvimento do fungo mais do que matando este propriamente. Ou seja, ocorre ação mais fungistática do que fungitóxica (Heath, 1981).

A resistência apresentada pelos hospedeiros às ferrugens pode ser expressa morfológicamente de diferentes maneiras. A mais comum dessas formas é a morte celular do hospedeiro. Porém esse fenômeno não ocorre de maneira uniforme em um primeiro momento, e difere ultraestruturalmente (e provavelmente bioquimicamente também) a cada interação hospedeiro x patógeno (Heath, 1981).

Outras respostas do hospedeiro, que envolvem mecanismos pós-haustoriais, observadas por microscopia eletrônica, incluem a deposição de material fibrilar na matriz extra-haustorial, a redução da absorção de compostos do hospedeiro pelo haustório, mudanças na membrana extra-haustorial, o desenvolvimento de um colar de calose próximo do colo do haustório e o encapsulamento do haustório pela síntese contínua de calose (Heath, 1981). Dependendo do patossistema em questão, mais de um desses eventos pode ser detectado ocorrendo simultaneamente. No caso das ferrugens dos cereais, plantas hospedeiras e não-hospedeiras podem possuir mais que um tipo de resistência efetiva a um mesmo patógeno (Heath, 1981).

Outra forma de classificar a resistência presente nos cereais, de acordo com Parlevliet (1979), é quanto à especificidade da mesma à raça do patógeno. A resistência específica à raça também é denominada resistência total ou vertical. Essa forma de resistência é responsável por conferir a imunidade a uma determinada raça do patógeno. Geralmente é conferida por genes de grande efeito sobre o fenótipo, de herança mono ou oligogênica. Para esse tipo de resistência observa-se uma interação diferencial entre cultivares x raça (Parlevliet, 1997).

Resistência do tipo raça específica é geralmente não durável, pela forte pressão de seleção que exerce sobre a população do patógeno, podendo a durabilidade da resistência variar de zero anos, quando a mesma é neutralizada ainda nos últimos estágios do programa de melhoramento (Thomas & Blount, 1976) até de dois a quatro anos, em média (Niks & Rubiales, 2002). Isso remete à necessidade de constante desenvolvimento e lançamento de novas cultivares resistentes (Barbosa *et al.*, 2002).

O mecanismo de ação desta resistência é baseado na interação gene-a-gene, a qual acarreta na RH nas células infectadas pela raça do patógeno. Essa forma de resistência é o tipo de resistência mais comumente empregado pelos programas de melhoramento, tanto pelo mecanismo envolvido, quanto por ser controlada pela segregação de um único ou poucos genes responsáveis pelo caráter (Heath, 2000), o que faz da resistência raça específica uma forma menos laboriosa à seleção.

Particularmente para a interação aveia x ferrugem da folha na região sul do Brasil e no Uruguai, a resistência raça-específica não é durável, devido à elevada complexidade e a grande diversidade polimórfica da virulência da população de *P. coronata* presente na América do Sul (Leonard & Martinelli, 2005).

Contrastando, a resistência raça não específica, foi descrita por Parlevliet (1981) como uma forma de resistência ampla ou geral. Esse tipo de resistência se apresenta efetiva contra todas as raças conhecidas do patógeno, sem apresentar interação diferencial raça x cultivar. Isso significa que todas as raças do patógeno induzem uma resposta similar em um determinado genótipo do hospedeiro. No entanto, essa definição é relativa devido à dificuldade encontrada para testar um genótipo contra todas as raças existentes de um determinado patógeno. Assim, a resistência é efetiva contra todas as raças do patógeno que já foram testadas.

Quanto à expressão, a resistência pode ser classificada, como qualitativa e quantitativa. Quando a resistência é qualitativa observa-se a ocorrência de classes fenotípicas distintas (não de um continuum), as quais permitem diferenciar com clareza os genótipos resistentes, pela ausência dos sintomas da doença, dos genótipos suscetíveis os quais apresentam elevados níveis dos sintomas da doença (Vale *et al.*, 2001).

A resistência qualitativa é controlada por genes maiores, os quais são predominantemente herdados na forma dominante, porém em menor frequência podem ser herdados na forma recessiva. Muitas vezes estão presentes nos genomas em elevados números e ocorrem em agrupamentos, que se encontram em determinadas regiões cromossômicas, podendo até mesmo ser considerados como locos complexos (Vale *et al.*, 2001).

A resistência quantitativa ou resistência parcial é definida como um tipo de resistência incompleta. Incompleta porque, embora o hospedeiro seja suscetível à infecção, apresenta baixa taxa de progresso da doença. É de natureza oligo ou poligênica e, geralmente não específica à raça do patógeno. Não é baseada no

mecanismo de hipersensibilidade (Parlevliet, 1979; Parlevliet, 1985). A resistência quantitativa é expressa em uma escala contínua de variação fenotípica, o que dificulta a identificação de classes fenotípicas discretas presentes em uma população segregante para este caráter (Geiger & Heun, 1989). Assim, essa forma de resistência pode exibir desde extrema suscetibilidade até níveis adequados de resistência (Parlevliet, 1989).

A resistência parcial é caracterizada por uma redução na taxa de desenvolvimento da doença quando comparada com o desenvolvimento do patógeno em uma cultivar suscetível (Parlevliet, 1988). Essa redução observada é o resultado dos efeitos dos componentes da resistência, como uma menor frequência de infecção, maiores períodos latentes, pústulas com tamanho reduzido, redução da produção de esporos por pústula e um menor período infeccioso (Parlevliet, 1979; Parlevliet, 1985).

Assim, a resistência parcial, que é condicionada por genes de menor efeito sobre o fenótipo, é sugerida como uma alternativa promissora à resistência baseada na ação de genes maiores (Parlevliet, 1985) e, em função de não ser raça específica, não induz uma forte pressão de seleção sobre a população do patógeno. Ao contrário da resistência qualitativa, a resistência parcial não está baseada no modelo de interação gene-a-gene e, por ser uma característica quantitativa, de natureza oligo ou poligênica, geralmente ocorre interação com fatores ambientais, sendo a temperatura o fator de maior relevância com relação a alterações na expressão da característica, como observado em cultivares de trigo (Lagudah, 2011). A expressão desses genes responsáveis por conferir a resistência parcial pode ser modificada pela expressão de outros genes que conferem a mesma característica fenotípica, ocorrência de epistasia, (Wilcoxon, 1981; St.Clair, 2010) ou pelo estágio de desenvolvimento da planta e/ou tecido (Brake & Irwin, 1992).

Como consequência da sua genética ser de natureza oligo ou poligênica, os genes podem segregar ligados ou não e também podem apresentar pequeno e igual efeito sobre o fenótipo. Além disso, podem apresentar ação aditiva, ou seja, quando isolados cada gene produz um efeito de magnitude reduzida sobre o fenótipo (Wilcoxon, 1981).

Essa forma de resistência não pode ser avaliada em termos absolutos. A sua avaliação é sempre uma medida relativa que deve ser comparada com uma cultivar padrão, demandando assim por testemunhas que geralmente devem ser altamente suscetíveis à doença (Parlevliet, 1989).

2.4 Metodologia de avaliação da resistência à ferrugem da folha da aveia

Os dois principais impedimentos para a seleção à resistência parcial às ferrugens dos cereais são a dificuldade para a realização das avaliações de maneira acurada e a herança quantitativa da resistência parcial (Holland & Munkvold, 2001).

A avaliação da resistência parcial a campo pode ser realizada de diversas maneiras. A quantidade de tecido afetado pela doença é em geral um bom estimador da quantidade de patógeno presente. Assim, a proporção de folhas ou colmos que apresentam sintomas da doença, representados pela ocorrência de pústulas é avaliado/quantificado apenas uma vez, no momento em que a infecção atinge o final do ciclo da epidemia, ou várias vezes ao longo do ciclo, iniciando as avaliações assim que os primeiros sintomas da doença tornam-se visíveis no campo e finalizando no momento que os órgãos senescem (Wilcoxson, 1981; Parlevliet, 1985).

A primeira forma de avaliação considera o resultado cumulativo de todos os fatores que conferem a resistência durante o progresso da epidemia, enquanto que a segunda forma sugerida para avaliação permite calcular a taxa aparente de infecção (r) e a área sob a curva do progresso da doença (ASCPD) (Wilcoxson, 1981; Parlevliet, 1985).

A ASCPD é uma forma usual de medir a resistência parcial em condições de campo e é uma maneira eficiente de identificar os níveis variáveis de resistência parcial em uma população recombinante, porém essa avaliação é considerada bastante laboriosa (Holland & Munkvold, 2001). As avaliações objetivando o cálculo da ASCPD devem ser realizadas em intervalos regulares de tempo (Chaves *et al.*, 2004a).

Objetivando avaliar e selecionar genótipos que apresentam resistência parcial a campo, os genótipos ou populações segregantes devem ser cultivados em pequenas parcelas adjacentes. A população do patógeno pode variar, sendo geralmente composta por uma mistura de raças, que pode ser inoculada artificialmente em linhas disseminadoras da doença (*spreaders*) ou ocorrer naturalmente (Parlevliet, 1985). Quando do emprego de linhas disseminadoras, há uma tendência à redução das diferenças aparentes da resistência, isso porque as parcelas suscetíveis produzem uma quantidade superior de esporos se comparadas com as parcelas parcialmente resistentes. Esses esporos serão transportados pelo vento para as parcelas adjacentes e assim as parcelas que apresentam resistência parcial recebem mais esporos do que produzem (Parlevliet, 1985; Woldeab *et al.*, 2007).

No caso de apenas uma avaliação da severidade da doença, o melhor momento para esta avaliação ser realizada é quando os genótipos mais suscetíveis ainda não atingiram níveis máximos de infecção. Avaliações realizadas após esse momento tendem a reduzir as diferenças entre os genótipos, enquanto que as avaliações realizadas anteriormente tendem a ser mais laboriosas ou menos acuradas (Parlevliet, 1985).

Quando há a presença de genes com maiores efeitos e a população de ferrugem for composta por uma mistura de raças para as quais esses genes são efetivos, a seleção para a resistência parcial pode ser confundida com a presença desses genes maiores (Parlevliet, 1985; Long *et al.*, 2006).

Outra forma de avaliação que também é amplamente empregada para a avaliação da resistência à doença quando esta é causada por patógenos foliares biotróficos, é a descrição do tipo de infecção (TI). A tipificação da doença leva em consideração o fato de que o hospedeiro pode responder a infecção pelo patógeno via RH (Parlevliet, 1979). Quando há a RH, ao redor do sítio de infecção o tecido hospedeiro torna-se necrótico ou clorótico. Diante desta reação do hospedeiro, o crescimento do patógeno é afetado tanto qualitativa, não ocorrendo esporulação, quanto quantitativamente, havendo uma restrição da esporulação (Parlevliet, 1979). Essa forma de avaliação compreende uma escala de zero (0) a quatro (4). Quando TI = zero não se observa qualquer esporulação ou outro sinal de infecção macroscopicamente; TI = ‘;’ não há qualquer lesão porém ocorrem pequenos pontos necróticos ou cloróticos; TI = 1 pequenas pústulas são observadas macroscopicamente circundadas por pontos necróticos; TI = 2 pústulas com tamanho pequeno a médio circundadas por pontos necróticos ou cloróticos; TI = 3 pústulas médias, que podem estar associadas com uma área clorótica; e TI = 4 pústulas grandes sem qualquer sinal de necrose ou clorose (Murphy, 1935).

Avaliações que apresentam TI equivalente a 0, ‘;’, 1 e 2 são consideradas indicativos da resistência do hospedeiro e avaliações que apresentam TI equivalente a 3 e 4 são consideradas indicativos da suscetibilidade do hospedeiro à raça ou mistura de raças do patógeno.

Em cereais, a resistência às ferrugens é geralmente distinguida em: resistência de plântula, resistência de planta adulta e, como descrito anteriormente, resistência parcial (Parlevliet & Van Ommeren, 1975). A resistência de plântula ocorre quando o genótipo apresenta um TI variando de 0 a 2 tanto no estágio de plântula quanto no estágio de planta adulta. A seleção para a resistência pode ser realizada ainda no estágio de plântula e será efetiva. O mecanismo que confere essa resistência é geralmente baseado

na ocorrência da RH, do tipo raça específica e muitas vezes não durável (Parlevliet & Van Ommeren, 1975).

Por outro lado, a resistência de planta adulta é caracterizada por um TI suscetível (3 a 4) no estágio de plântula, e um tipo de reação variando de 0 a 2 quando no estágio de planta adulta. Seleção para esse tipo de reação geralmente é conduzido a campo (Parlevliet & Van Ommeren, 1975).

Existem boas evidências que a resistência de planta adulta pode contribuir de maneira efetiva para aumentar a durabilidade da resistência presente nas variedades cultivadas, objetivando não eliminar totalmente o patógeno, mas sim evitar que a população patogênica atinja níveis prejudiciais à cultura hospedeira. Assim, essa forma de resistência é uma estratégia que vem sendo sugerida para as reduções de perdas dos componentes do rendimento pela ocorrência da doença.

No caso da seleção para a resistência quantitativa, a facilidade encontrada na seleção para resistência qualitativa não é observada. A seleção a favor da resistência quantitativa exige a realização de avaliações periódicas que irão permitir a sua correta identificação, principalmente para doenças policíclicas, como é o caso da ferrugem da folha da aveia.

O Programa de Melhoramento Genético da Aveia da UFRGS vem desenvolvendo genótipos que apresentam níveis consideráveis de resistência à ferrugem da folha. Esses genótipos se caracterizam por apresentar um menor tamanho de pústula, capacidade de redução das lesões, presença de pontos de necrose ou clorose na região circundante as pústulas, surgimento precoce da télia, bem como uma menor taxa de progresso da doença e menor ASCPD quando comparados com genótipos suscetíveis (Chaves *et al.*, 2004 a, b).

Dentre os genótipos desenvolvidos pelo programa que apresentam resistência parcial, destacam-se UFRGS 910906, UFRGS 960845-2, UFRGS 988012-1 e URS 21, sendo que este último foi cultivado na região Sul do Brasil, por mais de dez anos e se caracteriza por apresentar resistência tanto no estágio de plântula quanto no estágio de planta adulta. Ainda, de acordo com Graichen (2009), a durabilidade da resistência da cultivar URS 21 à ferrugem da folha é devida a ocorrência da RH tardia, 120 hai, associada ao acúmulo de compostos fenólicos.

O conhecimento da herança da resistência parcial facilita o desenvolvimento de genótipos que possuam este tipo de resistência. Com esse intuito, trabalhos recentes foram realizados para elucidar as características genéticas da herança da resistência

parcial no patossistema aveia branca x ferrugem da folha (Santos, 2009; Zambonato *et al.*, 2012) e os mecanismos histológicos e fisiológicos que conferem esta forma de resistência (Graichen, *et al.*, 2011; Figueiró *et al.*, 2015), dada a importância da identificação e posterior transferência da resistência quantitativa em programas de melhoramento.

Os componentes da resistência quantitativa, como maior período latente, baixa eficiência de infecção, menor tamanho de pústula e redução na produção de esporos contribuem para a redução da epidemia quando analisada a correlação entre os componentes da resistência e a intensidade de ferrugem da folha (Chaves *et al.*, 2004c). No entanto, tais componentes tornam-se mais eficientes quando combinados em um único genótipo, não havendo um componente que se destaque por apresentar uma maior participação na expressão da resistência parcial. Alguns componentes se mostram mais eficientes. Por exemplo, a quantidade de uredosporos foi o componente que melhor apresentou associação à resistência em um grupo de genótipos estudados por Brake & Irwin (1992).

Como descrito anteriormente, a resistência parcial apresenta herança quantitativa. No entanto, para os patossistemas trigo (*Triticum aestivum* L.) x ferrugem da folha (*Puccinia triticina* f. sp. *tritici*) e trigo x ferrugem estriada ou amarela, a resistência parcial pode ser conferida por poucos genes de maior efeito no fenótipo. Exemplos de herança monogênica da resistência parcial para esses patossistemas são os locos que contém os genes que cosegregam *Lr34/Yr18* (Lagudah *et al.*, 2006), *Lr46/Yr29* (Rosewarne *et al.*, 2006) e *Lr67/Yr46* (Herrera-Foessel *et al.*, 2014), sendo *Lr* correspondente a ferrugem da folha (do inglês, *leaf rust*) e *Yr* correspondente a ferrugem estriada/amarela (do inglês, *yellow rust*). Embora o efeito aditivo dos locos *Lr34/Yr18* e *Lr46/Yr29* ainda não esteja claro, quando tais genes são combinados em um mesmo genótipo podem conferir grau satisfatório de resistência (Lagudah, 2011). Outro gene que confere resistência a raças não específicas do patógeno e cuja herança é monogênica é o gene *MLO* de cevada (Jorgensen, 1992), o qual foi discutido anteriormente neste trabalho.

Na interação aveia x ferrugem da folha, a linhagem MN 841801, desenvolvida pela Universidade de Minnesota, Estados Unidos, é atualmente uma das principais fontes de resistência parcial, isso porque essa linhagem vem apresentando resistência parcial quando no estágio de planta adulta frente a diversas populações de *P. coronata*, por um período superior a 40 anos e em diversos ambientes nos quais a aveia é

cultivada e que favorecem a ocorrência da doença (Leonard, 2002; Carson & Stuthman, 2004; Martinelli *et al.*, 2009).

2.5 Genética da resistência à ferrugem da folha em aveia

A resistência genética à ferrugem da folha em aveia é conhecida desde o século XIX. De acordo com Simons (1985), Sivers, em 1887, após três anos sucessivos de perdas na produção em consequência da ocorrência de epidemias de ferrugem da folha em aveia, cultivou e avaliou 41 cultivares com o objetivo de encontrar variedades que poderiam ser suficientemente resistentes e, assim permitir o cultivo da aveia. Em 1920, Parker demonstrou que a resistência poderia ser encontrada em progênies derivadas do cruzamento entre um parental resistente e um parental suscetível à ferrugem da folha.

Avaliações realizadas com espécies silvestres de aveia demonstraram que à maioria dessas espécies apresenta elevado grau de resistência às principais doenças que atacam a cultura (Tabela 1) (Loskutov & Rines, 2011). Entre as espécies diploides e tetraploides, destacam-se pelo elevado grau de resistência às ferrugens da folha e do colmo, *A. clauda*, *A. pilosa*, *A. longiglumis*, *A. damascena*, *A. prostrata*, *A. canariensis*, *A. wiestii*, *A. hirtula*, *A. barbata*, *A. vaviloviana*, *A. abyssinica* e *A. magna* (Loskutov & Rines, 2011).

Ao considerar a diversidade de resistência à ferrugem da folha, elevados graus de resistência são encontrados em genótipos de espécies diploides, como por exemplo, *A. bruhnsiana*, *A. ventricosa*, *A. longiglumis*, *A. hirtula*, em espécies tetraploides, como *A. magna*, *A. insularis*, *A. murphyi*, e *A. macrostachya* e, em espécies hexaploides, *A. occidentalis*, *A. ludoviciana*, e *A. sterilis* (Loskutov & Rines, 2011).

A ferrugem da folha é uma doença endêmica em populações silvestres de *A. sterilis*, espécie que é considerada progenitora da aveia branca. Assim, genes para resistência raça específica à ferrugem da folha em populações naturais de *A. sterilis* têm sido amplamente explorados no melhoramento de cultivares de aveia branca, visto a grande diversidade de genes de resistência presentes em *A. sterilis* e a facilidade com a qual esses genes podem ser transferidos através de hibridização entre *A. sterilis* e *A. sativa* (Leonard *et al.*, 2004). Porém a base genética para a resistência à ferrugem da folha é bastante limitada, não existindo genes efetivos contra todas as raças do patógeno (Chaves *et al.*, 2008). A grande maioria dos acessos de *A. sterilis* empregados para a transferência dos genes de resistência à aveia branca foram coletados em Israel e outros

países da região do Mediterrâneo, durante a década de 60 e início da década de 70 (Leonard *et al.*, 2004).

TABELA 1. Fontes de resistência à doenças em espécies de aveia.

	Genoma	Oídio	Fonte de resistência à:			
			FF	FC	VNAC	Septória
<i>A. bruhnsiana</i>	Cv-	+	+			
<i>A. ventricosa</i>	Cv-	+	+	+		
<i>A. clauda</i>	Cp-	+	+	+	+	
<i>A. pilosa</i>	Cp-	+	+	+		
<i>A. prostrata</i>	Ap-	+	+			
<i>A. damascena</i>	Ad-	+	+	+	+	
<i>A. longiglumis</i>	Al-	+	+	+	+	
<i>A. canariensis</i>	Ac-	+	+	+	+	
<i>A. wiestii</i>	As-	+	+	+	+	
<i>A. hirtula</i>	As-	+	+	+	+	
<i>A. atlantica</i>	As-	+				
<i>A. strigiosa</i>	As-	+	+	+	+	+
<i>A. barbata</i>	AB-	+	+	+	+	+
<i>A. vaviloviana</i>	AB-	+	+	+	+	
<i>A. abyssinica</i>	AB-	+	+	+	+	
<i>A. agadiriana</i>	AB-?	+				
<i>A. magna</i>	AC-	+	+	+		
<i>A. murphyi</i>	AC-	+	+	+	+	
<i>A. insularis</i>	AC-?	+	+			
<i>A. macrostachya</i>	CC-?	+	+	+	+	
<i>A. fatua</i>	ACD-	+	+	+	+	+
<i>A. occidentalis</i>	ACD-	+	+	+	+	
<i>A. ludoviciana</i>	ACD-	+	+	+	+	
<i>A. sterilis</i>	ACD-	+	+	+	+	+

FF: Ferrugem da folha; FC: ferrugem do colmo; VNAC: vírus do nanismo amarelo da cevada. Adaptado de: Loskutov & Rines, 2011

A interação *P. coronata* x aveia é descrita de acordo com a teoria gene-a-gene e aproximadamente 100 genes que conferem resistência raça específica são conhecidos (Cabral & Park, 2014; Gnanesh *et al.*, 2015) denominados “Pc” (*Pc1* a *Pc96*) e *PcX*. Cada número corresponde a um loco específico. Similarmente, para esse patossistema há um diverso espectro de virulência do patógeno, o qual tem sido parcialmente caracterizado pela utilização de um sistema de nomenclatura estabelecido (Gnanesh *et al.*, 2015). Esse sistema de nomenclatura para designar os fenótipos de virulência de *P. coronata* foi proposto por Chong *et al.* (2000), com o objetivo de desenvolver cultivares resistentes e determinar as diferenças regionais de virulência na América do

Norte. Esse sistema de nomenclatura foi composto por 16 linhagens, cada uma contendo apenas um gene de resistência *Pc* (*Pc38*, *39*, *40*, *45*, *46*, *48*, *50*, *51*, *52*, *54*, *56*, *58*, *59*, *62*, *64*, e *68*), assim essas linhagens são consideradas linhagens diferenciadoras primárias.

A virulência e avirulência dos isolados de *P. coronata* para cada linhagem foi avaliada de acordo com o TI. Esse sistema de nomenclatura adotado para a interação aveia x ferrugem da folha é semelhante ao sistema adotado para as interações trigo x ferrugem da folha e trigo x ferrugem do colmo e permite calcular as frequências individuais de virulência e suas combinações nas populações de *P. coronata* (Chong *et al.*, 2000).

Com relação aos genes *Pc*, em alguns casos, diferentes números são designados para os genes que possivelmente são alelos em um mesmo loco. Ainda, a maioria dos genes confere resistência em plântula. Assim, tendem a ser expressos gerando TI baixas e são efetivos ao longo de todo o ciclo da planta (Marshall & Shaner, 1992).

Genótipos de espécies diploides que apresentam o loco *Pca*, o qual é controlado por no mínimo cinco genes distintos, designados *Pc81*, *Pc82*, *Pc83*, *Pc84* e *Pc85*, respondem a infecção por *P. coronata* desencadeando a RH. Observa-se a ocorrência de autofluorescência das células hospedeiras associada com pontos necróticos nos sítios de infecção (Yu *et al.*, 2001). Dois novos locos foram identificados mediando a RH independentemente da interação gene-a-gene em genótipos de aveia desafiados com *P. coronata*. O loco *Rds* (do inglês *resistance-dependent suppressor of cell death*) suprime a RH, mas não é capaz de suprimir a resistência mediada pelo gene *Pc82*. Já o loco *Rih* (do inglês *resistance-independent hypersensitive cell death*) desencadeia a RH em genótipos suscetíveis e resistentes ao ataque de *P. coronata*, e esse loco encontra-se fisicamente ligado ao loco *Pca* (Yu *et al.*, 2001). A descoberta desses novos locos indica que múltiplas vias atuam de forma sincronizada e podem afetar o processo de transdução de sinal que desencadeia a RH e, que a RH não é um mecanismo essencial para conferir resistência à ferrugem da folha em aveia (Yu *et al.*, 2001).

Inúmeros genes conhecidos por conferir resistência raça específica à ferrugem da folha da aveia já foram superados em consequência da elevada complexidade das raças do patógeno. No entanto, alguns genes ainda apresentam potencial para emprego em programas de melhoramento. Destaca-se o gene *Pc91*, que confere resistência em plântula e é altamente efetivo contra a população de *P. coronata* prevalente na América do Norte (Gnanesh *et al.*, 2013). Outro gene efetivo contra as populações de

P. coronata prevalentes na América do Norte é o gene *Pc94*. Esse gene foi transferido para a aveia branca a partir de acessos de *A. strigosa* (genótipo RL1697) (Aung *et al.*, 1996).

O gene *Pc68* foi transferido para cultivares de aveia branca a partir de acessos de *A. sterilis*. Esse gene encontra-se ligado a outros genes de resistência à ferrugem da folha e do colmo, como os genes *Pg3*, *Pg9*, *Pc44*, *Pc46*, *Pc50*, *Pc95* e *PcX*. As cultivares que carregam o gene *Pc68* em sua composição genética apresentam bom nível de resistência à ferrugem da folha, com exceção às raças predominantes no Canadá (Satheeskumar *et al.*, 2011).

Estudos baseados em mapeamento genético e na identificação de locos de caracteres quantitativos (QTLs) associados à resistência parcial à ferrugem da folha da aveia vêm sendo realizados e, com êxito, QTLs associados à esse caráter foram identificados e validados. Um QTL, neste trabalho é definido como uma região genômica que contenha um ou mais genes que apresentem associação estatisticamente significativa entre marcadores polimórficos e uma característica de variação quantitativa (St.Clair, 2010). Cinco QTLs associados à resistência parcial à ferrugem da folha em uma população segregante F₂ oriunda do cruzamento UFRGS 7 (suscetível) x UFRGS 910906 (linhagem que apresentava resistência parcial em nível moderado) foram identificados, os quais explicaram juntos 38% da variação fenotípica, enquanto três QTLs foram identificados para a geração F₆ desse mesmo cruzamento, os quais explicaram até 39% da variação fenotípica (Barbosa *et al.*, 2006).

Na população F_{6:9} resultante do cruzamento MN 841801-1 x 'Noble-2', um total de oito QTLs associados à resistência parcial do genótipo MN841801-1 foram identificados, sendo sete que haviam sido previamente identificados e um novo QTL (denominado *Prq8*) no grupo de ligação MN13 (Acevedo *et al.*, 2010). Ainda, os autores apresentam que a resistência parcial à ferrugem da folha no genótipo MN 841801-1 pode ser controlada principalmente por quatro QTLs (*Prq1a*, *Prq2*, *Prq7*, e *Prq8*), os quais foram detectados em diferentes experimentos e através de diferentes formas de avaliação da doença. Esses resultados confirmam a natureza complexa da resistência parcial à ferrugem da folha em genótipos de aveia, em função da interação e efeito aditivo de múltiplos QTLs controlando a característica no hospedeiro (Acevedo *et al.*, 2010).

Devido ao fato de a resistência de planta adulta ser baseada na resistência parcial, e ter provado ser durável para a linhagem MN 841801, essa linhagem foi

utilizada para o desenvolvimento de três populações segregantes. MN 841801 x AC Assinaboia, MN 841801 x AC Medallion, ambos genótipos canadenses, cultivados durante a primavera e que apresentam em sua composição genética os genes para resistência raça específica *Pc38*, *Pc39* e *Pc68*, e MN 841801 x Makuru, esta última, uma variedade proveniente da Nova Zelândia suscetível a todas as raças de *P. coronata* conhecidas no Canadá (Lin *et al.*, 2014). As populações foram avaliadas para a resistência ao isolado CR251, raça BRBB em múltiplos ambientes. A população MN 841801 x AC Assinaboia foi genotipada. Ensaio baseado em reações em cadeia da polimerase (PCR) competitiva alelo específica (KASP) foram realizados para selecionar polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) nas demais populações. Assim, esse estudo permitiu o desenvolvimento de um mapa genético de alta densidade para a população MN 841801 x AC Assinaboia e, associando as avaliações fenotípicas para resistência à ferrugem da folha com os dados genotípicos, foi possível identificar um QTL principal, localizado no cromossomo 14D, designado *QPc.crc-14D*, o qual é responsável por explicar até 76% da variação fenotípica do caráter resistência parcial de planta adulta (Lin *et al.*, 2014). Esse QTL é flanqueado por marcadores moleculares do tipo SNP. O marcador GMI_ES14_c1439_83 localizou próximo/junto ao pico do QTL para as populações MN 841801 x AC Medallion e MN 841801 x Makuru nos ambientes testados. Outro marcador SNP que tem potencial para diagnosticar a presença do QTL *QPc.crc-14D* é o marcador GMI_DS_LB_6480 (Lin *et al.*, 2014), tornando esses marcadores ferramentas que podem ser empregadas para a seleção genética assistida por marcadores. Assim, devido ao fato do QTL identificado nesse estudo fornecer uma proteção considerável contra *P. coronata* (isolado CR251) a piramidização deste loco com outros genes de resistência à ferrugem da folha pode ser um método efetivo de manejo contra a ocorrência desta doença (Lin *et al.*, 2014).

A incorporação em novas cultivares da combinação de genes de resistência de planta adulta, que geralmente resultam em um alto nível de resistência via a identificação de QTLs associados a esse caráter, e a piramidização desses QTLs com genes de pequeno efeito sobre o fenótipo, é a estratégia atualmente empregada em programas de melhoramento de trigo (Agenbag *et al.*, 2012).

As interações gênicas aditivas que ocorrem entre o efeito do(s) QTL(s) e do(s) gene(s) de resistência em planta adulta estão geralmente associadas a uma maior redução da severidade da doença. Neste trabalho, o termo severidade refere-se à área foliar afetada pela ferrugem da folha, sem levar em conta o tipo de infecção. Exemplos

para a interação trigo x ferrugens indicam que o resultado da piramidização de quatro ou cinco genes associados à resistência parcial é quase a imunidade à infecção (Singh *et al.*, 2000). Porém, o que ainda necessita ser elucidado é qual a combinação que produz um efeito aditivo ótimo quando da introdução de um reduzido número de genes (Lagudah, 2011).

Para a interação aveia x ferrugem da folha, trabalhos também demonstram que a resistência parcial não necessariamente é conferida por um grande número de genes e que mesmo em ambientes que apresentam condições adequadas à ocorrência da doença e diante de populações patogênicas complexas com elevado número de genes de virulência, poucos genes podem expressar níveis adequados de resistência (Chen *et al.*, 2000; Martinelli *et al.*, 2009). No entanto, devido ao espectro de virulência das raças de *P. coronata* encontradas na região do sul do Brasil, Chaves & Martinelli (2005) salientam para o fato de que a piramidização de genes maiores, estratégia sugerida por alguns pesquisadores como alternativa para estender a durabilidade das cultivares de aveia, deve receber uma atenção especial, pois dados sugerem que a sua utilização pode não alcançar os resultados esperados.

2.6 Interação planta patógeno

As plantas encontram-se permanentemente expostas a inúmeros patógenos potenciais. Entretanto, apenas um pequeno número desses é capaz de estabelecer interações com o hospedeiro, pois mecanismos são desencadeados iniciando o processo de imunidade inata básica da planta (Díez-Navajas *et al.*, 2008). O tempo e a intensidade com que o organismo infectado desenvolve o processo de defesa apresentam um grande componente genotípico (Bellin *et al.*, 2009). Dessa forma, o processo de indução à resistência é funcional, espacial e temporalmente complexo (Pinto *et al.*, 2012).

Os mecanismos moleculares envolvidos na interação planta-patógeno estão bem elucidados para a resistência qualitativa (Jones & Dangl, 2006). No entanto, pouco ainda é sabido sobre os mecanismos que governam a resistência parcial. Quando iniciada a reação de defesa através do reconhecimento de sinais exógenos do patógeno pelo hospedeiro, a resposta imune é continuada através de mecanismos de transdução de sinal ocorrendo uma significativa reprogramação do metabolismo celular da planta envolvendo mudanças na atividade gênica (Pinto *et al.*, 2012). Os genes de resistência (genes R) são determinantes para a especificidade da resposta imune das plantas, uma

vez que o sistema imune vegetal envolve interações genéticas alelo-específicas entre os genes R do hospedeiro e os genes de avirulência (genes *avr*) do patógeno (Flor, 1956), e apenas quando a interação incompatível hospedeiro-patógeno ocorre, a resposta de defesa é desencadeada (Belkhadir *et al.*, 2004). A ativação de genes R, os quais codificam receptores celulares que detectam a presença de um determinado patógeno, leva à ativação das vias de transdução de sinal (Wang *et al.*, 2013). O reconhecimento do patógeno desencadeia reações de resistência localizadas como, por exemplo, a RH (Durrant & Dong, 2004).

As plantas, ao contrário dos mamíferos não apresentam células de defesa móveis, nem o sistema imune adaptativo. Assim, os vegetais utilizam no sistema imune inato de cada célula e nos sinais sistêmicos originados dos sítios de infecção (Jones & Dangl, 2006). A hipótese da guarda considera que muitas proteínas R podem ser ativadas indiretamente pelos efetores codificados pelo patógeno e não pelo reconhecimento direto do patógeno. Isso significa que as proteínas R atuam reconhecendo indiretamente os efetores codificados pelo patógeno pelo monitoramento da integridade dos alvos celulares do hospedeiro sobre os quais os efetores iriam atuar (Dangl & Jones, 2001).

Atualmente, sabe-se que existem duas vias no sistema imune vegetal. A primeira emprega receptores de reconhecimento transmembrana (PRRs) que respondem lentamente envolvendo os padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) ou aos micróbios (MAMPs), tais como as flagelinas de bactérias e a quitina no caso de fungos (Jones & Dangl, 2006). A segunda via atua num formato mais amplo no interior das células, utilizando os produtos das proteínas TIR(CC)-NBS-LRR, as quais são codificadas pelos genes R. Os efetores dos patógenos são reconhecidos pelas proteínas TIR(CC)-NBS-LRR e ativam respostas de defesa similares. A resposta de defesa mediada pelas proteínas TIR(CC)-NBS-LRR é efetiva apenas contra patógenos biotróficos obrigatórios ou hemibiotróficos, porém não contra necrotróficos (Jones & Dangl, 2006).

Os genes R codificam proteínas que apresentam três domínios principais (Figura 1): as repetições ricas em leucina (LRR), um sítio central de ligação de nucleotídeo (NBS) e um domínio variável amino-terminal (*coiled coil* (CC) ou o domínio homólogo *Toll/Interleukin-1-Receptor* (TIR)). Essas proteínas são determinantes da especificidade da resposta imune das plantas (Takken *et al.*, 2006; Díez-Navajas *et al.*, 2008; Dry *et al.*, 2010). O domínio LRR é o domínio responsável pelo reconhecimento de um efector

do patógeno, o domínio variável amino-terminal é responsável pela determinação da especificidade da sinalização e o domínio NBS é um domínio conservado que apresenta a função de “interruptor” molecular da transdução de sinal (Takken *et al.*, 2006; Dry *et al.*, 2010). Estudos relatam que o domínio NBS encontra-se relacionado com mudanças nas interações intra e intermoleculares sob a percepção de proteínas *Avr* (Mestre & Baulcombe, 2006).

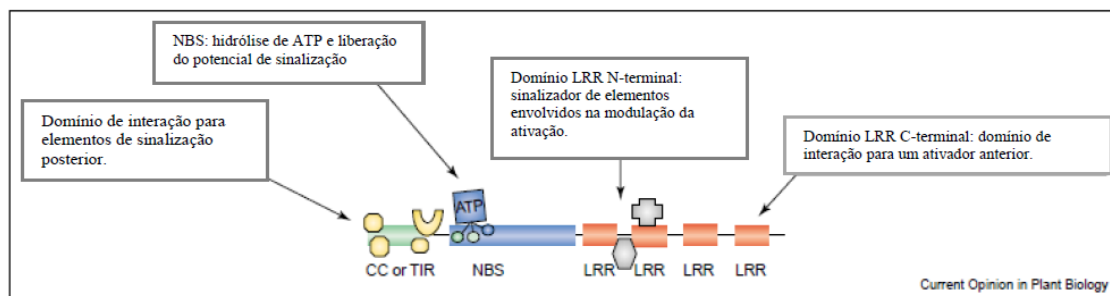


Figura 1. Domínios estruturais das proteínas TIR-NBS-LRR. Essas proteínas apresentam um domínio baseado na plataforma para montagem dos vários fatores regulatórios possíveis. Fonte: Adaptado de Belkhadir *et al.*, 2004.

A ativação das proteínas R resulta na indução de uma rápida resposta de defesa que é caracterizada por rápidos fluxos de cálcio e de ferro, uma explosão oxidativa extracelular, a reprogramação transcricional nos sítios infectados e nas regiões periféricas a estes, e termina com a ocorrência da RH. O somatório desses eventos cessa o crescimento do patógeno (Belkhadir *et al.*, 2004; Jones & Takemoto, 2004; Greenberg & Vinatzer, 2003; Nimchuk *et al.*, 2003). A RH não permite que ocorra a extensão da infecção além da célula infectada, o que pode retardar o crescimento do patógeno em muitas interações, particularmente as que envolvem os parasitas haustoriais (Jones & Dangl, 2006).

O conhecimento do sistema imune vegetal pode ser representado como um modelo que apresenta quatro fases, denominado modelo “zigzag” (Figura 2). A primeira fase desse modelo refere-se à imunidade basal. Barreiras químicas e físicas nos tecidos são desenvolvidas pela planta para evitar a invasão pelo patógeno e a resposta imune induzida é desencadeada pelo reconhecimento dos PAMPs ou MAMPs pelos receptores extracelulares especializados do hospedeiro tipo quinase (Jones & Dangl, 2006). Os PAMPs podem ser considerados elicitores de defesa e são moléculas evolucionariamente conservadas e estáveis sendo, muitas vezes, indispensáveis para a sobrevivência do patógeno, como por exemplo a quitina, que é um componente da

parede celular dos fungos (Nürnberg *et al.*, 2004; Zipfel & Felix, 2005; Dry *et al.*, 2010).

A resposta imune basal compreende uma variedade de mecanismos de defesa, como por exemplo, rearranjos na estrutura do citoesqueleto e a indução de compostos antimicrobianos como as fitoalexinas (Dry *et al.*, 2010). A resposta basal desencadeada pelas plantas não inibe a colonização do patógeno. No entanto, limita a extensão da propagação, pois a ação das proteínas R acelera e amplifica o processo de resposta inata basal (Belkhadir *et al.*, 2004).

Na segunda fase do modelo, os patógenos empregam efetores que contribuem para a virulência, ou seja, os patógenos encontraram vias de evitar e/ou suprimir ativamente a resposta imune basal do hospedeiro através da evolução das moléculas efetoras. Consequentemente, esses patógenos manipulam as funções celulares da planta a fim de facilitarem a infecção. Os efetores podem interferir com a PTI (do inglês *PAMP-triggered immunity*), o que resulta na suscetibilidade desencadeada pelos efetores (ETS, do inglês *effector-triggered susceptibility*) (Jones & Dangl, 2006; Takken *et al.*, 2006; Dry *et al.*, 2010).

Na terceira fase, um dado efector é especificamente reconhecido por uma das proteínas TIR(CC)-NBS-LRR, o que resulta no efector desencadeando a imunidade (ETI, do inglês *effector-triggered immunity*). Esse reconhecimento pode ser indireto ou pelo reconhecimento direto de um efector por uma proteína TIR(CC)-NBS-LRR (Jones & Dangl, 2006). Nessa fase é desencadeado o processo de defesa gene-a-gene, o qual é baseado na presença das proteínas codificadas pelos genes R que atuam no reconhecimento dos efetores raça específica (proteínas *Avr*). As proteínas R monitoram a integridade dos componentes do sistema imune basal, baseado no reconhecimento dos PAMPs. Qualquer perturbação dos componentes pela ação efector/proteínas *Avr* pode desencadear uma maior tradução das proteínas R (Takken *et al.*, 2006).

Este é o estágio inicial da disputa planta-patógeno envolvendo a resistência específica através dos genes R, os quais permitem que a planta detecte os efetores que suprimem a defesa. Essa interação inicia a resposta imune desencadeada pelo efector, restaurando dessa forma a resistência ao patógeno, através da indução da expressão dos genes R (Dry *et al.*, 2010).

A resposta ETI é similar a resposta do tipo PTI, porém amplificada e ocorrendo em um menor período de tempo, resultando na resistência e geralmente acarreta na RH

em torno do sítio de infecção, evitando assim o avanço do patógeno (Jones & Dangl, 2006).

Na quarta fase do modelo, a seleção natural direciona o patógeno a evitar a ETI, pela diversificação dos efetores reconhecidos ou pela aquisição de efetores adicionais que suprimem a ETI. Assim, a seleção natural resulta em novos genes R específicos, e permite que a ETI possa ser desencadeada novamente (Jones & Dangl, 2006).

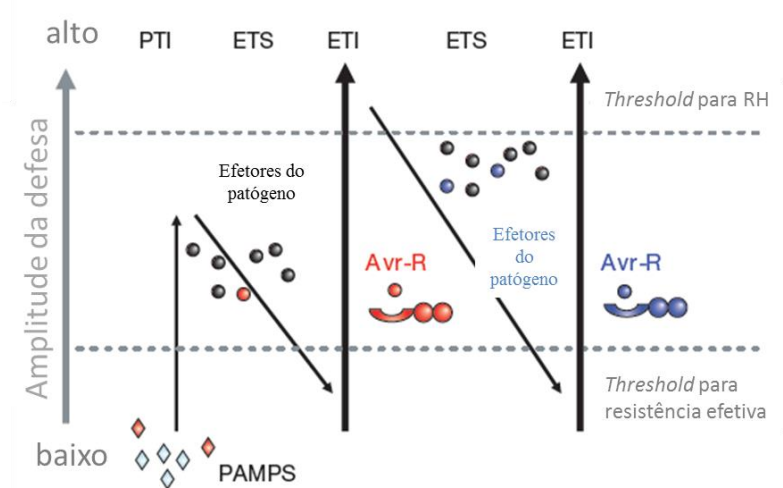


Figura 2. Modelo “zigzag” o qual apresenta o resultado quantitativo do sistema imune vegetal. Adaptado de Jones & Dangl (2006).

2.7 Genes de suscetibilidade

Após 1905, quando Biffen demonstrou que para a interação trigo x ferrugem amarela a herança da resistência era monogênica, um crescente número de estudos indicou que, em muitos casos, a herança do caráter resistência ocorre de uma maneira simples, geralmente monogênica e dominante. A ocorrência de genes de resistência monogênicos recessivos também é observada, porém menos frequentemente (Parlevliet, 1995).

Nas últimas décadas, em consequência da evolução no conhecimento genético das bases da resistência, considera-se que a resistência pode ser alcançada por diferentes maneiras. Uma delas é pela presença de um gene R que irá atuar reconhecendo o correspondente efector do patógeno. Uma segunda maneira de alcançar a resistência é pela ausência de genes S, genes requeridos para a suscetibilidade (Pavan *et al.*, 2010). Genes S são responsáveis pela codificação de moléculas alvo dos efetores que irão atuar tanto como fatores de suscetibilidade quanto como reguladores negativos da resposta de defesa, assim inibindo a transdução de sinal que desencadearia a RH (Pavan *et al.*,

2010). Dessa forma, um gene S pode ser definido como um gene dominante e, quando da perda de sua função ou quando presente na forma recessiva, este permite a expressão da resistência (Eckardt, 2002).

A caracterização funcional de genes S tem revelado que estes genes codificam proteínas que são essenciais para o patógeno, tanto para o seu crescimento quanto para o processo de infecção induzido por este nas células. Esses processos são essenciais para que o patógeno estabeleça e mantenha o processo de infecção nas plantas. Porém, as proteínas S também podem estar associadas à regulação negativa da resposta de defesa (Pavan *et al.*, 2010).

Para a interação cevada x oídio, a resistência conferida pela perda de função do gene *MLO* tem sido considerada um tipo único de imunidade vegetal. No entanto, atualmente sabe-se que a ausência da proteína hospedeira (*MLO*) é quem converte a interação compatível hospedeiro x patógeno em uma interação incompatível, apresentando um mecanismo molecular similar ao apresentado pela resistência não hospedeira (Humphry *et al.*, 2006). Ou seja, a perda da funcionalidade do gene S é que resulta na resistência contra o patógeno especializado, a qual apresenta características similares à resistência não hospedeira, amplo espectro e durável. E, como descrito anteriormente, a resistência apresentada por cultivares de cevada que apresentam o alelo mutante (*mlo*) ao oídio é bastante durável (Jorgensen, 1992) e é manifestada pela incapacidade do fungo em penetrar a parede celular de células da epiderme devido à reestruturação e fortalecimento desta conferida pelo acúmulo de calose (Huckelhoven *et al.*, 1999).

Assim, a exploração de alelos de genes S, insensíveis à manipulação pelos efetores do patógeno, é uma estratégia que pode ser adotada pelos programas de melhoramento e assim complementar a resistência conferida pelos genes R (Pavan *et al.*, 2010).

2.8 Sinalização hormonal

Após a ativação da PTI ou da ETI, vários hormônios vegetais atuam como moléculas chaves e desencadeiam uma rede de transdução de sinal do sistema imune vegetal. Os hormônios vegetais, assim como em animais, foram primeiramente relacionados como moléculas reguladoras do crescimento e do desenvolvimento (Santner & Estelle, 2009). O ácido salicílico (AS) e o ácido jasmônico e seus derivados, coletivamente denominados jasmonatos (AJ), estão intimamente relacionados com o

processo de defesa (Browse, 2009). No entanto, hormônios como o etileno, ácido abscísico, giberelinas, auxinas, citocininas, brassinosteróides e o óxido nítrico (NO) também estão envolvidos com o processo de modulação do sistema imune vegetal (Pieterse *et al.*, 2013).

Mudanças nas concentrações hormonais ou na sensibilidade a estes são desencadeadas durante as interações planta x patógeno e, tais mudanças, mediam uma gama de respostas adaptativas das plantas, as quais, geralmente, acarretam em um custo associado ao crescimento e ao desenvolvimento da planta (Pieterse *et al.*, 2013; Leone *et al.*, 2014).

Interações antagônicas e sinérgicas entre diversas vias de transdução de sinal hormonais adicionam uma camada extra de regulação, do balanço entre o crescimento, desenvolvimento e as respostas de defesa, denominada interação hormonal, que fornece à planta a capacidade para regular finamente seu sistema imune, bem como utilizar seus recursos de maneira eficiente (Pieterse *et al.*, 2013; Leone *et al.*, 2014).

A via de resposta do AS é efetiva contra patógenos biotróficos. O AS é um composto fenólico que pode ser sintetizado a partir do corismato através de duas vias enzimáticas distintas. Uma via envolve a fenilalanina amônia liase (PAL) e a segunda via envolve a enzima isocorismato sintase (ICS/SID2) (Pieterse *et al.*, 2013). A biossíntese do AS é desencadeada durante a PTI e ETI diante do reconhecimento dos PAMPs ou efetores do patógeno e a mudança nos níveis de Ca^{2+} é um evento sinalizador para induzir a biossíntese do AS (Pieterse *et al.*, 2013).

Durante a PTI, imediatamente após a indução da biossíntese de AS, as proteínas do tipo lipase EDS (do inglês, ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1) e PAD4 (do inglês, PHYTOALEXIN DEFICIENT4) atuam na biossíntese deste hormônio. No entanto, quando a ETI é iniciada pelas proteínas TIR-NBS-LRR, a biossíntese do AS é mediada pelas mesmas proteínas que mediam quando da ocorrência da PTI (EDS e PAD4), já quando a ETI é iniciada por proteínas do tipo CC-NBS-LRR, a indução à biossíntese do AS é desencadeada pelas proteínas NDR1 (do inglês NON-RACE-SPECIFIC DISEASE RESISTANCE) (Bernoux *et al.*, 2011; Pieterse *et al.*, 2013).

A sinalização após a biossíntese do AS é em grande parte controlada pela proteína reguladora NPR1 (do inglês, NONEXPRESSOR OF PR GENES), a qual quando ativada pelo AS atua como coativadora da transcrição de genes relacionados com a resposta de defesa. Assim, numerosos estudos têm revelado que as proteínas NPR1 são reguladoras importantes da resistência sistêmica adquirida (SAR) (Dong,

2004; Moore *et al.*, 2011; Pajerowska-Mukhtar *et al.*, 2014). A SAR é considerada uma consequência da ação concomitante da PTI e/ou ETI, desencadeando mudanças transcricionais, elevando a concentração celular de AS, na indução de múltiplas cascatas de sinalização, bem como na produção de proteínas antimicrobianas como as proteínas PR (Pajerowska-Mukhtar *et al.*, 2014).

As proteínas PR (do inglês, PATHOGENESIS RELATED) são codificadas pelos genes PR, que compõem uma família gênica que codifica inúmeras proteínas com atividade antimicrobiana. Entre os genes PR, o melhor caracterizado é o gene *PR-1*, o qual é empregado como um marcador associado à resposta de defesa dependente do AS (Pieterse *et al.*, 2013).

O AS é considerado o principal fitohormônio sinalizador à resposta de defesa. Esse hormônio atua tanto induzindo a morte celular programada quanto suprimindo a ocorrência desta, dependendo do fator de avirulência do patógeno ou da interação hospedeiro x patógeno (Greenberg & Yao, 2004).

Vários fatores de transcrição da família WRKY apresentam indução da sua expressão sob infecção com vírus, bactérias ou oomicetos, pela ação dos elicitores do fungo e, também há aumento dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) de WRKY pela sinalização desencadeada por substâncias como o AS (Eulgem *et al.*, 2000). Esses fatores de transcrição atuam ativando ou reprimindo as respostas de defesa dependentes do AS, o que salienta o papel desses fatores de transcrição na resistência mediada pelo AS (Pieterse *et al.*, 2013).

A proteína NPR1 está envolvida no crescimento, desenvolvimento e em diversas vias de sinalização do sistema imune, tais como na SAR, na resistência sistêmica induzida, na ETI, bem como mediando a interação entre AS e outros fitohormônios. Plantas em que NPR1 não é funcional apresentam deficiência na expressão dos genes PR e, no geral, não são capazes de induzir a SAR em resposta à infecção do patógeno (Pajerowska-Mukhtar *et al.*, 2014).

A translocação nuclear da proteína NPR1 é um passo regulatório importante durante a sinalização dependente do AS. Nas células não infectadas, a maioria das proteínas NPR1 está sequestrada no citoplasma, na forma de oligômeros através de ligações dissulfeto intermoleculares. Os monômeros de NPR1 que constitutivamente translocam para o núcleo, mesmo que em pequena quantidade, são ubiquitinados e marcados para degradação via proteossomo, para prevenir a ativação de genes alvos de NPR1 (Spoel *et al.*, 2009). Nas células induzidas pelo AS, grandes quantidades de

monômeros de NPR1 translocam para o núcleo via proteínas presentes nos poros nucleares. No núcleo, os monômeros de NPR1 interagem com membros da subclasse TGA da família de fatores de transcrição bZIP (do inglês, *basic leucine zipper*), os quais se ligam aos promotores dos genes responsivos ao AS, tais como *PR1*, resultando assim na ativação destes genes (Després *et al.*, 2000; Pieterse *et al.*, 2013). Concomitantemente, NPR1 é fosforilado, ubiquitinado via E3 ubiquitina ligase e marcado para a degradação pelo proteossomo (Pieterse *et al.*, 2013).

Proteínas como NIMIN1, 2 e 3 (do inglês, NIM1-INTERACTING1, 2 e 3) e SNI1 (do inglês, SUPPRESSOR OF *npr1* INDUCIBLE1) interagem com NPR1 e atuam como reguladores negativos. Essas proteínas mantêm os genes regulados pelo AS e por NPR1 sob controle (Pieterse *et al.*, 2013). As proteínas NIMINs inibem a atividade promotora dos genes de defesa, provavelmente por interagirem com os fatores de transcrição TGA, enquanto que SNI1 reprimem os genes de defesa através de associação com a região promotora desses, provavelmente pela interação com uma proteína de ligação ao DNA (Song *et al.*, 2011).

Sob ativação da sinalização do AS, SIN1 é removido da região promotora através de interação física com proteínas de reparo de danos do DNA como SSN2 (do inglês, SUPPRESSOR OF *snl 2*) e RAD51D (do inglês, RAS ASSOCIATED WITH DIABETES51D). Um complexo de RAD51 (um parólogo de RAD51D) e BRCA2A (do inglês, BREAST CANCER2A) são também recrutados para a região promotora de *PR-1*, os quais juntamente com SSN2 e RAD51D induzem a expressão dos genes associados às respostas de defesa, provavelmente permitindo o acesso ao DNA (Durrant *et al.*, 2007; Pieterse *et al.*, 2013).

Assim que a via do AS é ativada no sítio de infecção, a resistência é induzida nas partes distais da planta, com o objetivo de proteger os tecidos não afetados contra possíveis invasões do patógeno, ou seja, em função dos custos associados ao mecanismo de defesa, as plantas evoluíram mecanismos que podem ser ativados ou amplificados em resposta ao ataque (Heil & Ton, 2008).

Mesmo que a RH não seja necessária à ocorrência da SAR, em alguns casos tem se observado a ocorrência da SAR em tecidos sadios durante ou logo após a ocorrência da RH no sítio de infecção (Mishina & Zeier, 2007).

O reconhecimento do produto dos genes *Avr* pelos receptores do hospedeiro induz a cascata de transdução de sinal, a qual ocorre como uma consequência da mudança conformacional que ocorre nas proteínas receptoras do hospedeiro e acarretam

na resposta de defesa. No caso da RH, os principais sinais envolvidos na ativação deste mecanismo são os canais iônicos, as proteínas de ligação GTP (proteínas G) e as proteínas quinases, espécies reativas de oxigênio (ROS), NO, bombas de influxo de prótons e Ca^{2+} e efluxo de K^{+} e Cl^{-} , proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), o AS e o etileno (Iakimova *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005). As MAPKs encontram-se envolvidas na regulação da homeostase redox e na via de sinalização do AS em *Arabidopsis* (Love *et al.*, 2008).

2.9 Aspectos moleculares, bioquímicos e histológicos associados à resistência parcial apresentada pela cultivar URS 21

As ROS, especialmente H_2O_2 , O_2^{-} , OH^{-} e a espécie reativa de nitrogênio, NO, atuam como importantes moléculas sinalizadoras regulando a RH. Essas moléculas são produzidas nos sítios de infecção e apresentam função antimicrobiana (Love *et al.*, 2008). Entre os efeitos que essas moléculas apresentam sobre a resposta de defesa, destaca-se o fortalecimento das paredes celulares.

A cultivar URS 21 reduz o acúmulo de ROS após infecção pela indução da síntese de compostos fenólicos associados à parede celular, o que indica que o mecanismo de resistência parcial apresentado por essa cultivar, ao contrário da RH, induz primeiramente à morte do fungo e posteriormente a morte das células infectadas (Figueiró *et al.*, 2015). Esses resultados indicam que a resistência parcial apresentada por URS 21 provavelmente não está associada com a ocorrência de estresse oxidativo, pois a expressão e a atividade de enzimas como ascorbato peroxidase, catalase e glutathione redutase, cuja atividade está associada à detoxificação de ROS após inoculação com *P. coronata*, não apresentam aumento (Figueiró *et al.*, 2015).

As fitoalexinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular que apresentam atividade antimicrobiana. São induzidas pela ocorrência de estresse e fazem parte do repertório de defesa. Assim, esses metabólitos compõem um grupo heterogêneo de compostos que apresentam atividade biológica contra uma ampla variedade de patógenos e são considerados marcadores moleculares da resposta de defesa (Ahuja *et al.*, 2012).

Em aveia, o grupo de compostos antioxidantes fenólicos denominados avenantramidas tem sido caracterizado como fitoalexinas. O acúmulo de avenantramidas é desencadeado por elicitores tais como quitina, victorina e benzotiadiazol (agroquímico que elícita a SAR). Quando da ocorrência de interação

incompatível entre aveia e *P. coronata* há um acúmulo desses compostos, os quais passam de níveis não detectáveis a níveis significativamente maiores após a interação e/ou a SAR ser elicitada (Wise, 2011). O acúmulo de avenantramidas é considerado um importante mecanismo de defesa contra patógenos.

Tanto na ocorrência de interação compatível quanto incompatível entre aveia e *P. coronata* há acúmulo de transcritos de hidroxiantranilato hidroxicinamoiltransferase (*AsHHT*) e cafeoil-CoA3-O-metiltransferase (*CCoAOMT*), os quais estão envolvidos na biossíntese de fitoalexinas. No entanto, na interação incompatível, o acúmulo de transcritos ocorre mais precocemente e apresenta diferença significativa quanto ao acúmulo de avenantramidas (Yang *et al.*, 2004). Assim, esses genes são considerados importantes para a defesa contra o agente causador da ferrugem da folha e podem estar envolvidos na biossíntese de avenantramidas.

A biossíntese de avenantramidas e a RH ocorrem nas mesmas células. Portanto a produção de avenantramidas pode ser um dos eventos que compõem a cascata de sinalização que culmina na RH (Ahuja *et al.*, 2012).

A expressão relativa de *CCoAOMT*, gene que codifica a enzima responsável pela conversão de cafeoil CoA em feruloil CoA, apresentou um aumento significativo no genótipo URS 21 (parcialmente resistente à ferrugem da folha da aveia) quando inoculado com *P. coronata* em 48 e 120 hai, enquanto que na cultivar URS 22 (suscetível à ferrugem da folha) observou-se redução da expressão relativa do gene após a inoculação (Figueiró *et al.*, submitted). Por outro lado, para o gene *AsHHT*, envolvido na catalise da N-acilação de hidroxiantranilato com hidroxicinamoil-CoA para a formação de avenantramidas, apresentou um aumento da sua expressão para o genótipo parcialmente resistente 24 hai, enquanto que para o genótipo suscetível houve uma redução da expressão relativa desse gene após o desafio com *P. coronata*.

Maiores níveis de compostos fenólicos em plantas adultas da cultivar URS 21, foram detectados no período entre 24 e 72 hai quando comparado com 0 hai (controle) e 6 hai (Figueiró *et al.*, 2015). Porém não houve correlação com o aumento da expressão dos genes *AsHHT1* e *CCoAOMT* para esse genótipo, mas apenas para o genótipo URS 22 (Figueiró *et al.*, submitted).

Muitos elicitores fúngicos estimulam a via dos fenilpropanoides, em função dessa via induzir um acúmulo de compostos fenólicos e outros compostos requeridos para o fortalecimento da parede celular. Esse processo ocorre como uma barreira física que bloqueia a propagação do patógeno (Zhao *et al.*, 2005).

O depósito de calose nos tecidos é considerado um dos primeiros passos da resposta de defesa das células vegetais contra a invasão de patógenos. Calose é um polissacarídeo linear (β -1,3 glicana) que apresenta um importante papel em diferentes estágios de desenvolvimento da planta, bem como na resposta de defesa (Pirselová & Matusiková, 2013). A indução ao acúmulo de calose está associado a estrutura morfológica das papilas, que são rapidamente criadas no sítio de infecção do patógeno. As papilas, localizadas no espaço entre a membrana plasmática e a parede celular atuam como barreiras mecânicas, e são compostas por toxinas antimicrobianas, compostos fenólicos, pectina, celulose, suberina, lipídios, silício bem como proteínas específicas da parede celular além da calose (Heath, 2002).

O mecanismo de acúmulo de calose é controlado por diversas vias de sinalização, as quais variam de acordo com as condições ambientais e com os PAMPs que interagem com as células do hospedeiro. O controle da síntese de calose é mediado pelas proteínas G (Pirselová & Matusiková, 2013).

Em URS 21, não se observaram diferenças no período latente, nem na área das colônias individuais produzidas pelo patógeno, indicando que os mecanismos de resistência não previnem o desenvolvimento das colônias, mas sim retardam ou limitam o desenvolvimento das pústulas, o que resulta no desenvolvimento de uma menor quantidade de pústulas. O tipo de infecção observado diferiu do apresentado pela cultivar suscetível URS 22, sugerindo que o desenvolvimento inicial de *P. coronata* nos genótipos avaliados é bastante similar em função de não haver um mecanismo que retarde a taxa de desenvolvimento do fungo nas primeiras 120 hai (Graichen *et al.*, 2011).

Como consequência da morte celular tardia observada para o genótipo URS 21, e sendo sabido que em genótipos que apresentam um nível de resistência intermediário, a morte celular ocorre relativamente tarde, se comparada com genótipos que apresentam a resistência conferida pela ação de genes de efeitos maiores. Não ocorre a morte do fungo subitamente, assim ele pode continuar a se desenvolver lentamente de tal forma que a reação não pode ser designada como RH *per se* (Barilli *et al.*, 2009; Graichen *et al.*, 2011).

Assim, devido ao fato de a morte celular no genótipo URS 21 ocorrer a partir de 120 hai e em grupos de células dispersas (não uniformemente), é sugerido que esse genótipo apresente um mecanismo de resistência distinto, o qual induz primeiro à morte do fungo e posteriormente a morte das células da planta (Graichen *et al.*, 2011). O

desenvolvimento de colônias associadas a compostos fenólicos com ocorrência de autofluorescência no período de 120 hai, foi observado, o que indica que a presença dos compostos fluorescentes no genótipo URS 21 previne o desenvolvimento do patógeno, a redução do tecido esporogênico. A morte celular que ocorre nesse genótipo, provavelmente, não ocorre devido a RH, mas sim em consequência do acúmulo de compostos fenólicos, agindo assim na prevenção do desenvolvimento de futuras colônias do fungo.

A herança genética da resistência parcial de URS 21, avaliada a partir de uma população segregante obtida do cruzamento entre as cultivares URS 21 e URS 22 parece ser raça não específica e foi caracterizada como oligogênica (Zambonato *et al.*, 2012). Sendo esse caráter conferido por dois locos de efeito maior sobre o fenótipo, parcialmente dominantes, e três locos completamente dominantes, com menor efeito sobre o fenótipo, sendo que um dos locos de maior efeito sobre o fenótipo confere a resistência quando na forma recessiva.

Nos últimos anos, o desenvolvimento de técnicas permitiram o estudo do transcriptoma. Assim, análises do transcriptoma são realizadas objetivando a identificação de componentes moleculares que sejam responsáveis por conferirem mecanismos fisiológicos. Neste contexto, Figueiró *et al.* (submitted) realizaram um RNA-seq para identificar transcritos induzidos em plântulas do genótipo URS 21 quando desafiado com *P. coronata*. Dentre as sequências induzidas identificadas, inúmeras delas encontram-se associadas com processos relacionados ao metabolismo secundário, como por exemplo, sequências relacionadas à biossíntese de compostos fenólicos e saponinas, bem como sequências cujas prováveis proteínas codificadas encontram-se associadas com o reconhecimento do patógeno, como as proteínas NBS-LRR, relacionadas com o processo de sinalização, estresse oxidativo, defesa e membros da família gênica MACPF (do inglês, *Membrane attack complex perforin*). Esses resultados corroboram trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa indicando que o possível mecanismo associado à resistência parcial à ferrugem da folha no genótipo URS 21 se deve a indução do metabolismo secundário e não a ocorrência de estresse oxidativo (Figueiró *et al.*, submitted).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização da área experimental

Os ensaios foram realizados na Estação Experimental Agronômica (EEA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), localizada as margens da BR-290, no interior do município de Eldorado do Sul, RS, a 30°07'S de latitude e 51°40'W de longitude. O local apresenta altitude média de aproximadamente 46 metros acima do nível do mar.

O local é caracterizado, de acordo com a classificação de Köeppen, por apresentar clima do tipo Cfa, ou seja, subtropical úmido de verão quente. Apresenta uma precipitação anual média de 1400 mm e temperatura média variando entre 14 e 25°C, ao longo de ano (Bergamaschi *et al.*, 2003).

O solo na região, de acordo com a classificação brasileira de solos, é do tipo Argissolo Vermelho Distrófico Típico, pertencendo à unidade de mapeamento de São Jerônimo, RS (Streck *et al.*, 2008).

3.2 Ensaios a campo

3.2.1 Material Vegetal e condução dos ensaios

Os experimentos foram conduzidos em condições de campo, durante os anos de 2013, 2014 e 2015 ao longo das estações inverno/primavera. Durante os três anos, uma população segregante composta por 167 linhagens recombinantes F_{6:9}, F_{6:10} e F_{6:11}, respectivamente aos anos descritos acima, foi avaliada para a caracterização da herança do caráter resistência parcial à ferrugem da folha da aveia. Cada linhagem foi denominada de Linhagem 1 a Linhagem 168. A Linhagem 55 não foi avaliada ao longo dos três anos de realização dos ensaios pois a mesma foi extinta.

As linhagens recombinantes foram obtidas pelo método descendente de semente única modificado, resultantes do cruzamento entre a linhagem UFRGS 988012-1 e a

cultivar UFRGS 19. Os parentais utilizados nesse estudo se classificam como parcialmente resistente e altamente suscetível à ferrugem da folha, respectivamente. A linhagem UFRGS 988012-1 é descendente do cruzamento UFRGS 10 / CTC 84B993, enquanto a cultivar UFRGS 19 se origina do cruzamento UFRGS 841110 / UFRGS 884021-1.

UFRGS 988012-1 e UFRGS 19 são aparentadas através dos ancestrais Coronado e Cortez, as quais são cultivares irmãs (oriundas do mesmo cruzamento), desenvolvidas pela Universidade Texas A&M. As genealogias dos genitores dos genótipos em estudo são: UFRGS 10 = C1217 / (Coronado x BCLA); CTC 84B993 = CI8235 / Ken631 / MN720183; UFRGS 841110 = CRcpx / SRcpx // Barrow 79; UFRGS 884021-1 = Coker 81C72 // Coronado² / Cortez³ / Pendek / ME 1563. Onde CRcpx (do inglês, *crown rust complex*) significa que é uma de várias combinações de cultivares comerciais cruzadas com *A. sterilis*, desenvolvidas pela Universidade do Texas, sem saber-se que combinação parental é essa. Enquanto que SRcpx é uma das várias combinações envolvendo as linhagens TAMO-301, TAMO-312, Coker 227, Coker 234 e CI 9221, também desenvolvidas pela Universidade Texas A&M.

Os experimentos foram conduzidos em uma área na qual o sistema de plantio direto associado ao emprego de semeadura mecânica foi realizado, utilizando uma semeadora de parcelas experimentais. Nessa área, ocorre o processo de rotação de culturas, sendo que no inverno/primavera ocorre a semeadura de aveia seguido do cultivo de milho durante a primavera/verão. No ano seguinte, durante o inverno ocorre o cultivo de alguma cobertura (nabo forrageiro ou ervilhaca) ou pousio da área, seguido pelo cultivo de soja na próxima primavera/verão.

O delineamento empregado foi o de blocos completamente casualizados, com três repetições, para cada ano, sendo cada parcela composta por duas linhas com 1,5 m de comprimento, com espaçamento de 0,2 m entre as linhas e 0,4 m entre parcelas. Em cada parcela foram utilizadas aproximadamente 100 sementes.

As semeaduras ocorreram nos dias 28 de junho de 2013, nove de julho de 2014 e primeiro de julho de 2015, com as germinações nos dias sete de julho, 18 de julho e dez de julho, respectivamente. Os parentais, UFRGS 19 e UFRGS 988012-1, foram repetidos aleatoriamente a cada 50 genótipos e, como marcador morfológico foram utilizadas plantas de trigo, sendo essas semeadas a cada 50 genótipos.

Durante os três anos, os ensaios receberam os tratos culturais indicados para a cultura da aveia, de acordo com as recomendações da Comissão Brasileira de Pesquisa

da Aveia (2006). A adubação de base foi realizada empregando-se 300 kg.ha⁻¹ de NPK (na fórmula 5-30-15). Quando as plantas se encontravam com três a quatro e seis folhas foram realizadas adubações de nitrogênio em cobertura, na forma de uréia, contendo a aproximadamente 27 kg.ha⁻¹ de nitrogênio.

A inoculação do patógeno ocorreu naturalmente em todos os anos de avaliação, por consequência, a população de *P. coronata* era composta por uma mistura de raças que ocorrem na região do sul do Brasil. Nenhum controle químico foi realizado para o controle da doença durante os três anos.

3.2.2 Avaliação dos ensaios

Para a caracterização da herança do caráter resistência parcial à ferrugem da folha da aveia na população segregante obtida a partir do cruzamento entre UFRGS 988012-1 e UFRGS 19, foi avaliada a severidade da ferrugem da folha. A severidade foi estimada de forma sequencia sobre cada parcela, em intervalos de 3 a 14 dias.

As avaliações tiveram início quando do surgimento das primeiras pústulas e findaram quando as parcelas iniciaram o processo de senescência foliar, ao final do ciclo das plantas. A severidade foi considerada como percentagem média da área foliar infectada na parcela considerando, portanto, todas as plantas da parcela, avaliadas de modo visual.

Para a avaliação da severidade, utilizou-se o aplicativo computacional DISTRAIN (Disease Training), o qual foi desenvolvido por Tormelin & Howell (1988), para a realização do treinamento e posterior avaliação da doença a campo, isso porque o aplicativo através de imagens permite simular a avaliação da percentagem de área foliar que apresenta sintomas da doença e ratifica o avaliador durante série contínua de simulações.

O progresso da doença foi avaliado através de leituras sequenciais da severidade. A severidade foi avaliada visualmente, como a porcentagem de área foliar coberta por pústulas da doença relativa à área foliar da parcela como um todo. A severidade da doença na última avaliação foi considerada e denominada severidade final, e também foi expressa em percentagem. As avaliações foram feitas individualmente para cada parcela.

Em 2013, foram realizadas doze avaliações e, em 2014 e 2015, onze avaliações. As avaliações referentes ao ano de 2013 foram realizadas pela mestre Carolina Tessele. As datas nas quais as leituras sequenciais da severidade da ferrugem da folha foram

avaliadas, ao longo dos três anos de realização dos ensaios, são apresentadas na Tabela 2. As leituras apresentaram um intervalo médio de seis dias para os anos de 2013 e 2014 e sete dias para o ano de 2015.

Tabela 2. Datas em que as leituras sequenciais da severidade foram realizadas durante os três anos de realização dos ensaios.

Leitura/ano	2013	2014	2015
Leitura 1	30/08	24/08	07/08
Leitura 2	05/09	07/09	18/08
Leitura 3	19/09	14/09	21/08
Leitura 4	24/09	17/09	25/08
Leitura 5	27/09	22/09	28/08
Leitura 6	30/09	25/09	01/09
Leitura 7	03/10	28/09	08/09
Leitura 8	08/10	03/10	15/09
Leitura 9	15/10	10/10	23/09
Leitura 10	18/10	15/10	06/10
Leitura 11	22/10	21/10	13/10
Leitura 12	31/10	-	-

Eldorado do Sul, 2013, 2014 e 2015.

3.2.3 Determinação da Área Sob a Curva do Progresso da Doença (ASCPD)

A partir dos dados coletados da severidade da doença, foram traçadas as curvas de progresso da doença para cada linhagem da população avaliada e se calculou a área sob a curva de progresso da doença (ASCPD), através da integração trapezoidal da curva de cada linhagem para cada parcela, conforme a fórmula proposta por Das *et al.* (1992):

$$ASCPD = \sum_{i=1}^n \left[\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right] * (t_{i+1} - t_i)$$

Onde:

y_i = percentagem da área foliar afetada pela ferrugem da folha na i -ésima observação;

t_i = tempo (em dias após o aparecimento da primeira pústula) no momento da i -ésima observação;

n = número total de observações

3.2.4 Determinação da Área Sob a Curva do Progresso da Doença Relativa (ASCPDNC)

Para poder realizar a comparação dos resultados obtidos através do cálculo da ASCPD entre os genótipos que apresentaram diferença quanto ao número de dias de avaliação, os valores da ASCPD foram normalizados e corrigidos, para obtenção da ASCPD relativa (ASCPDNC), pela divisão dos valores calculados da ASCPD pelo número de dias da primeira à última avaliação da severidade para cada linhagem avaliada, e multiplicação dos valores resultantes pelo número de dias entre a primeira e a última leitura de severidade do ensaio, conforme proposto por Graichen (2006). Assim, a fórmula empregada para o cálculo da ASCPDNC foi:

$$ASCPDNC = \left\{ \left\{ \sum \left[\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right] * (t_{i+1} - t_i) \right\} / n \right\} * c$$

Onde:

y_i = percentagem da área foliar afetada pela ferrugem da folha na i -ésima observação;

t_i = tempo (em dias após o aparecimento da primeira pústula) no momento da i -ésima observação;

n = número de dias entre o início da doença e a última avaliação da doença para a linhagem em questão;

c = período total da duração da epidemia para o ensaio como um todo.

3.2.5 Distribuição de frequências da ASCPDNC

A análise de distribuição de frequências foi realizada levando-se em consideração a média da ASCPDNC, em cada ano de avaliação, para cada linhagem recombinante da população em estudo. A distribuição de frequências também foi realizada para as parcelas de cada genótipo parental, dentro de cada ano de avaliação.

A construção dos histogramas de distribuição de frequências permitiu a representação gráfica da distribuição da ASCPDNC para cada linhagem. Estas linhagens foram classificadas como resistentes, intermediárias e suscetíveis à ferrugem da folha da aveia. Essa classificação foi realizada tomando por base os valores obtidos para a ASCPDNC dos parentais. Assim, foram consideradas resistentes as linhagens que apresentaram valores de ASCPDNC menores ou iguais, ao maior valor apresentado pelo

parental parcialmente resistente, UFRGS 988012-1, em qualquer das parcelas avaliadas naquele ano. As linhagens foram consideradas suscetíveis quando apresentaram valores da ASCPDNC iguais ou maiores que o menor valor da ASCPDNC do parental suscetível, UFRGS 19. E as linhagens que apresentaram valores da ASCPDNC entre os valores dos parentais foram consideradas intermediárias. A realização dessa classificação permite a realização de testes de modelos genéticos, bem como a determinação do número de locos envolvidos na expressão do caráter resistência parcial à ferrugem da folha.

3.2.6 Determinação do número de locos envolvidos na expressão do caráter

Para a estimativa do número de locos envolvidos na expressão do caráter resistência parcial à ferrugem da folha na população de linhagens segregantes em estudo, foram desenvolvidos e testados modelos genéticos diferentes com base distribuições de frequência das classes de resistência, dentro de cada ano de avaliação, conforme descrito no item 3.2.5.

Dessa forma, através das frequências genéticas, esperadas e observadas, para cada classe fenotípica ao longo dos três anos de avaliação, estimou-se o número de locos envolvidos na expressão do caráter. Modelos com três, quatro e cinco locos foram testados com base na distribuição de frequências e submetidos ao teste de aderência de qui-quadrado (χ^2), a 5% de probabilidade.

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

Onde:

observado = número de linhagens observadas para uma determinada classe fenotípica;

esperado = número de linhagens esperadas para uma determinada classe fenotípica – de acordo com o modelo genético de segregação da resistência proposto;

n= número de classes fenotípicas de cada modelo de segregação (n=3).

Para o cálculo do número de genótipos esperados (frequência esperada) para cada modelo genético testado, aplicaram-se a fórmulas:

$$Gp = x^2 - 1$$

Onde:

Gp = genótipos possíveis;

x = n.º de locos envolvidos na expressão do caráter;

$$Fe = n * \frac{1}{(x^2) - 1}$$

Onde:

n = número de linhagens recombinantes (167)

x = n.º de locos envolvidos na expressão do caráter;

A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do programa SAS[®] 8.2 (*SAS Enterprise Guide – SAS Institute Inc.*).

3.3 Ensaios em condições controladas

3.3.1 Validação do caráter resistência parcial em plântulas

Devido ao fato de a resistência parcial em muitos casos ser efetiva apenas no estádio de planta adulta, realizaram-se ensaios em plântulas com o objetivo de avaliar o caráter resistência parcial nesse estádio para a população recombinante obtida do cruzamento entre UFRGS 988012-1 e UFRGS 19, bem como no parental parcialmente resistente.

3.3.1.1 Material vegetal e condução dos ensaios

A população recombinante composta por 167 linhagens F_{6:9}, F_{6:10} e F_{6:11} foi avaliada quanto a resistência à ferrugem da folha na fase de plântula, durante os anos 2013, 2014 e 2015, respectivamente. Os genótipos parentais também foram avaliados quanto a expressão do caráter nesse mesmo estádio de desenvolvimento, em todos os anos.

Os genótipos foram semeados em copos e/ou bandejas plásticas com capacidade para 150 mL. Esses recipientes foram preenchidos com substrato a base de turfa, e mantidos sob condições controladas de temperatura (22 ± 2°C) e fotoperíodo (12h luz :

12h escuro), nas dependências do Departamento de Fitossanidade, da Faculdade de Agronomia da UFRGS, nos anos de 2013 e 2014, e nas dependências do Departamento de Plantas de Lavoura, da mesma instituição, no ano de 2015. As plântulas foram mantidas sob essas condições até apresentarem a primeira folha completamente expandida, aproximadamente 12 dias após a semeadura. Após foram submetidas à inoculação com *P. coronata*. Como suplementação nutricional foi adicionada a solução nutritiva Hoagland, quando as plântulas apresentavam 15 dias.

3.3.1.2 Obtenção do inóculo e inoculação

Os esporos de ferrugem da folha da aveia empregados para a realização das inoculações em condições controladas foram obtidos a partir de coleta realizada nas dependências da EEA, durante o ano de 2013, de folhas de aveia das cultivares UFRGS 19 e URS 22, que apresentavam pústulas características da ocorrência da doença. Essas folhas foram levadas até o laboratório de Biotecnologia do Departamento de Plantas de Lavoura e os uredosporos foram coletados com o emprego de uma bomba de vácuo e armazenados em cápsulas de gelatina.

Inoculações em condições controladas sobre os genótipos URS 22 e UFRGS 19 foram realizadas com esses uredosporos objetivando a purificação do inóculo. Quinze dias após a inoculação, uredosporos de uma única pústula foram coletados. Após quinze dias, o procedimento de inoculação foi repetido para cada monopústula isolada. Essa estratégia, a qual é baseada em dois isolamentos de monopústulas, foi escolhida para garantir uma maior pureza dos esporos obtidos. Os uredosporos, após a segunda purificação, foram liofilizados a -40°C por 24h (L10 - Liotop) e armazenados a -80°C até o dia da inoculação. A purificação dos uredosporos foi realizada objetivando eliminar esporos de outras doenças, como ferrugem do colmo e mancha negra e assim, permitir a inoculação apenas de isolados de *P. coronata*.

Quando da realização dos ensaios para a avaliação da segregação da resistência parcial em plântula, entre três e quatro cápsulas de gelatina, cada uma contendo esporos isolados de uma única pústula, foram retiradas do ultrafreezer, aquecidas em banho – maria, a 41°C por dez minutos e então os esporos foram ressuspendidos em óleo mineral (Soltrol 170; Philips Petroleum Co.) a uma concentração de 1×10^5 esporos por mL.

As plântulas foram inoculadas por aspersão, mantidas em temperatura ambiente por cerca de 30 minutos, para que todo o óleo secasse e, posteriormente, foram

incubadas no escuro, em condições de câmara úmida, com umidade relativa de 100%, por um período de 16 a 20h. Após a incubação em câmara úmida, as plântulas foram transferidas para câmara de crescimento nas mesmas condições descritas anteriormente. Quinze dias após a inoculação, as plântulas foram avaliadas através da qualificação do TI apresentada pela plântula, adotando-se uma escala que varia de 0 a 4.

O patossistema trigo x *P. triticina* foi utilizado como base para as avaliações realizadas para a interação aveia x ferrugem da folha. A reação de resistência ou suscetibilidade, os TIs e os sintomas de *P. triticina* na primeira folha de plântulas de trigo (Roelfs *et al.*, 1995) foram usados como modelo (Tabela 3).

Tabela 3. Reação, TIs e sintomas de *P. triticina* sob a primeira folha de plântulas de trigo.

Reação	Tipo de infecção	Sintomas
R	0	não se observa qualquer esporulação ou outro sinal de infecção macroscopicamente
R	;	não há qualquer lesão porém ocorrem pequenos pontos necróticos ou cloróticos
R	1	pequenas pústulas são observadas macroscopicamente circundadas por pontos necróticos ou cloróticos
R	2	pústulas com tamanho pequeno a médio circundadas por pontos necróticos ou cloróticos
S	3	pústulas médias, que podem estar associadas com uma área clorótica
S	4	pústulas grandes sem qualquer sinal de necrose ou clorose

Adaptado de Roelfs *et al.*, 1985.

Genótipos que apresentaram TI equivalente a 0, ‘;’, 1 e 2 foram considerados resistentes e aqueles que apresentaram TI equivalente a 3 e 4 foram considerados como suscetíveis à ferrugem da folha.

A Figura 3 apresenta os sintomas e os tipos de infecção de *P. triticina* na primeira folha de plântulas de trigo (Roelfs *et al.*, 1985), patossistema utilizado como base para as avaliações realizadas para a interação aveia x ferrugem da folha. Um modelo foi desenvolvido neste trabalho para apresentar os sintomas e TIs na primeira folha de plântulas de aveia para a interação de *P. coronata* x *A. sativa* (Figura 4).

Estes ensaios tiveram delineamento experimental inteiramente ao acaso, sendo o número de repetições igual a quatro, nos anos de 2013 e 2014 e igual a três no ano de 2015. Assim como para os ensaios conduzidos a campo, as avaliações referentes ao ano de 2013 foram realizadas pela mestre Carolina Tessele.

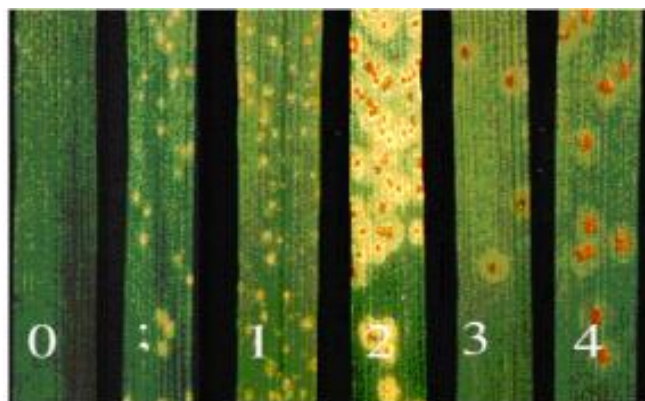


Figura 3. Sintomas e tipo de infecção apresentados pelo ataque de *P. triticina* sob a primeira folha de plântulas de trigo. Adaptado de Roelfs *et al.*, 1985.



Figura 4. Sintomas e tipo de infecção apresentados pelo ataque de *P. coronata* sob a primeira folha de plântulas de aveia. Porto Alegre, 2015.

3.4 Avaliação do QTL *QPc.crc-14D*

3.4.1 Material vegetal

Dada a identificação, na literatura, de um QTL principal, localizado no cromossomo 14D, grupo de ligação 17 (Oliver *et al.*, 2013), designado *QPc.crc-14D*, responsável por explicar até 76% da variação fenotípica do caráter resistência parcial de planta adulta à ferrugem da folha em três populações obtidas entre os cruzamentos MN 841801 e AC Assinaboia, MN 841801 e AC Medallion e MN 841801 e Makuru, por Lin *et al.* (2014), aliado ao desenvolvimento de marcadores moleculares SNPs que

flanqueiam esse QTL, objetivou-se testar se a fonte de resistência parcial da cultivar MN 841801 era a mesma presente nos genótipos desenvolvidos pelo programa de melhoramento genético da aveia da UFRGS, UFRGS 988012-1 e URS 21, as quais são linhagens irmãs, cuja genealogia encontra-se descrita no item 3.2.1.

Para realizar esse teste, sementes de URS 21, URS 22, UFRGS 19, UFRGS 988012-1 e da cultivar URS F Galope foram colocadas para germinar em substrato, a temperatura de 26°C e na ausência de luz. Os coleótilos foram coletados para a extração do DNA genômico. As cultivares UFRGS 19 e URS 22 são oriundas do mesmo cruzamento (genealogia descrita no item 3.2.1), enquanto a cultivar URS F Galope tem como genealogia LA 9339E17 / LA 0-591-NZ 0553 (AC Medallion/OT 257).

3.4.2 Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA)

O DNA genômico dos cinco genótipos foi extraído de acordo com o protocolo modificado de Lodhi *et al.* (1994) e Lefort & Douglas (1999). O tampão de extração foi composto por 1,0 g de brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), 2,0 g de polivinilpirrolidona 40 (PVP40), 0,5 g de monolaurato de polioxietilenosorbitan (Tween 20[®]), 5 mL Tris-HCl pH 8,0 1 M, 4,0 mL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,5 M, 22 mL de cloreto de sódio (NaCl) 5 M, 4 mL de cloreto de lítio (LiCl) 10 M e água em quantidade suficiente para (q.s.p.) 100 mL. O tampão foi autoclavado por 20 minutos a temperatura de 120°C. Minutos antes da utilização, adicionou-se 2 µL/mL de β-mercaptoetanol.

O tecido vegetal (0,1 a 0,2 g) foi macerado com nitrogênio líquido em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. A cada tubo foi adicionado 600 µL do tampão de extração e os tubos foram submetidos à agitação intensa. Após, adicionou-se uma pequena quantidade de polivinilpolipirrolidona (PVPP) em cada tubo e estes foram submetidos à agitação intensa.

Os tubos contendo o tecido macerado imerso no tampão de extração foram incubados em banho-maria a 60°C por 25 minutos e posteriormente resfriados a temperatura ambiente. Adicionou-se 600 µL de CIA (24:1, clorofórmio:álcool isoamílico) a cada tubo e o conteúdo dos mesmos foi gentilmente agitado por inversão dos tubos, durante 4 minutos, até obter-se a formação de uma emulsão. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a temperatura ambiente e a fase aquosa

(aproximadamente 500 μL) foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.

Foram adicionados à solução aquosa, 250 μL de NaCl e 750 μL de isopropanol gelado (-20°C). Os tubos foram então agitados vigorosamente e armazenados a -20°C por um período de 15 a 20 minutos. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos, a temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado.

O precipitado, composto pelo DNA, foi lavado com 1000 μL de etanol 75% gelado. Após a lavagem, as amostras foram centrifugadas rapidamente por 7 segundos e com o auxílio de uma micropipeta removeu-se o excesso de etanol. O precipitado foi seco em estufa a 37°C por 10 minutos, e ressuspendido em um volume variando entre 50 e 100 μL de Tris-HCl e EDTA (TE) e RNase ($20 \mu\text{g} * \text{mL}^{-1}$). Após, incubou-se a 50°C por 15 minutos em banho-maria. O DNA foi quantificado com espectrofotômetro (Genesys™ 2) e visualizado em eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio e armazenado a -20°C .

3.4.3. Seleção dos marcadores SNPs

Dos cinco marcadores SNPs, disponíveis na literatura, associados ao QTL *QPc.crc-14D*, dois foram selecionados com base na proximidade com o pico do QTL para as três populações avaliadas no artigo original, GMI_ES14_c1439_83 e GMI_DS_LB_6480 (Lin *et al.*, 2014) (Ver Tabela 4).

Tabela 4. Sequência dos marcadores SNPs selecionados para a identificação do *QPc.crc-14D*.

Marcador	Iniciador alelo específico 1 (5'–3')	Iniciador alelo específico 2 (5'–3')	Iniciador comum 1 (5'–3')	Iniciador comum 2 (5'–3')
GMI_ES14_c1439_83	CACTGAAACTCA	GCACTGAAACTC	GGACAATAACA	CACCACCTTGC
	GAAGAGTAGACG	AGAAGAGTAGAC A	CCACCTTGCGG TTT	GGTTTACAGCA TAA
GMI_DS_LB_6480	AAGTTCTTTTTTG	CTAAGTTCTTTTT	CAATCTGGAAA	GCAAGCTACAA
	CATGGCACAAAA TG	TGCATGGCACAA AATT	CCTTTCAAATT TCATCCTA	TCTGGAAACCT TTCAAAT

Adaptado de Lin *et al.* (2014).

3.4.4 Reações em cadeia da polimerase (PCR)

Cada reação foi composta por 4 μL de DNA genômico de cada genótipo (totalizando $60 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 0,3 μL do iniciador alelo específico (ASP) 1 ou 2 e 0,3 μL do iniciador comum (CP) 1 ou 2, ambos na concentração de 10 μM , 1,5 μL do tampão 10x (Invitrogen® - Life Technologies®), 0,75 μL de MgCl_2 50 mM, 0,3 μL da mistura de

dNTPs 10 mM, 0,2 µL de Taq Platinum DNA Polimerase 5U/µL (Invitrogen® - Life Technologies®) e água ultrapura (miliQ) em q.s.p para 15 µL.

As condições de termociclagem diferiram entre os marcadores. Para o marcador GMI_ES14_c1439_83 a temperatura de pareamento foi 50°C, enquanto que para o marcador GMI_DS_LB_6480 a temperatura foi 55°C. Também houve diferença quanto ao número de ciclos empregados para a obtenção de amplicons entre os genótipos. Para os genótipos URS 21, URS 22, UFRGS 19 e UFRGS 988012-1 o número de ciclos equivaleu a 38 enquanto que para o genótipo URS F Galope esse número equivaleu a 28 ciclos. As condições de termociclagem aplicadas estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Condições de termociclagem para a realização das reações de PCR.

Etapa	Descrição	Temperatura	Tempo
1	Denaturação inicial do DNA	94°C	3min
2	Denaturação do DNA	94°C	45seg
3	Pareamento dos iniciadores	50°/55°C	45seg
4	Amplificação do DNA	72°C	60seg
	Repetição das etapas 2 a 4		38/28vezes
5	Última amplificação do DNA	72°C	5min
6	Armazenamento	4°C	ilimitado

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese e visualizados em gel de agarose 2% com brometo de etídeo. O marcador de peso molecular utilizado foi GeneRuler™ Low Range DNA Ladder 100 pares de base (pb) (Fermentas, Life Sciences).

3.5 Avaliação da expressão de genes candidatos associados à resistência parcial a ferrugem da folha

Através da realização de análise de RNAseq, a partir de folhas de plântulas de aveia da cultivar URS 21, inoculadas com *P. coronata* Figueiró (2012) identificou transcritos que foram induzidos 12 hai com o patógeno. Do total de sequências obtidas, 33.418 sequências diferiram entre plântulas inoculadas de plântulas controle (não inoculadas). Essas sequências foram comparadas com sequências de arroz, devido à indisponibilidade de dados referentes ao genoma da aveia hexaploide. Cerca de 47% desses *contigs* apresentaram semelhança às sequências anotadas para arroz. Dessas 10.410 *contigs* apresentaram um aumento da expressão em folhas quando desafiadas com o patógeno. Dentre as sequências induzidas, foram identificadas sequências

associadas a diversos processos biológicos, metabólicos e celulares. Assim, buscou-se comparar a expressão diferencial dessas sequências gênicas obtidas a partir de plântulas de URS 21 em plantas adultas, dos genótipos UFRGS 19, URS 21, URS 22 e UFRGS 988012-1 utilizando PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

3.5.1 Material vegetal

Sementes dos genótipos UFRGS 19, URS 21, URS 22 e UFRGS 988012-1 foram postas para germinar em vasos com capacidade de 3 L. Os vasos foram preenchidos com substrato a base de turfa.

As plantas foram mantidas sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo (12h luz : 12h escuro), até atingirem a fase adulta, aqui considerada quando do florescimento das plantas, em câmara de crescimento. Quando todos os genótipos floresceram, e diante da inexistência de qualquer sintoma da ocorrência de estresse biótico ou abiótico, as folhas bandeira foram inoculadas com uma suspensão contendo $1,5 \times 10^5$ esporos/mL de *P. coronata*. Esse ensaio foi realizado em triplicatas biológicas e o procedimento de inoculação foi realizado como descrito anteriormente no item 3.3.1.2.

Uma folha por replicata biológica foi coletada em zero (tempo utilizado como controle) seis, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 hai. Essas folhas foram armazenadas em tubos de fundo cônico de 15 mL (Falcon TPP[®]), congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a -80°C até o processamento.

3.5.2. Extração do ácido ribonucleico (RNA)

O RNA total foi extraído de acordo com o protocolo TRIzol[®] Reagent (*Thermo Fisher Scientific Inc.*). O tecido vegetal foi pulverizado em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL com nitrogênio líquido. Um mililitro de TRIzol foi adicionado e o extrato foi homogeneizado por agitação intensa.

Os tubos contendo o tecido macerado imerso no TRIzol foram centrifugados a 10.000 rpm, por 25 minutos a 4°C . Os sobrenadantes (aproximadamente 600 μL) foram transferidos para novos tubos de microcentrífuga e mantidos a temperatura ambiente por cinco minutos. Duzentos microlitros de CIA (24:1) foram adicionados a cada amostra e os tubos foram submetidos a agitação vigorosa por 15 segundos e posteriormente mantidos em temperatura ambiente por cinco minutos.

As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (aproximadamente 400 µL) foi transferida para novos tubos de microcentrífuga e foram adicionados 200 µL da solução precipitadora de RNA (0,8 M de citrato de sódio + 1,2 M de cloreto de sódio) e 200 µL de isopropanol gelado (-20°C). As amostras foram misturadas gentilmente e mantidas a temperatura ambiente por dez minutos. Posteriormente, foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a lavagem do *pellet* foi realizado com 1000 µL de etanol 75% gelado (-20°C).

As amostras foram submetidas a centrifugação por 8.000 rpm por cinco minutos a 4°C e o excesso de etanol foi removido cuidadosamente com o auxílio de uma micropipeta. O *pellet* foi seco com ar seco por sete minutos, a 37°C e ressuscitado em 50 µL de deDEPC-dH₂O. Posteriormente, as amostras foram incubadas em banho maria, a 55°C por 10 minutos para a ressuspensão do *pellet*. O RNA foi então quantificado com espectrofotômetro, utilizando-se 300 µL de uma diluição 1:100 e visualizado em eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio (2 µL de RNA + 2 µL de tampão de carregamento da amostra). O RNA foi estocado a -80°C até a síntese do ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA).

3.5.3 Síntese do cDNA

3.5.3.1. Remoção do DNA genômico

A remoção do DNA genômico foi realizada com kit comercial DNA-free™ KitDNase Treatment and Removal Reagents de acordo com as orientações do fabricante. Em gelo, uma alíquota de 1 µg de RNA total foi tratada com 1 µL de 10x DNase I Reaction Buffer (Invitrogen®, Life Technologies®), 1 µL da enzima DNase I (Invitrogen®, Life Technologies®) e água livre de RNase em q.s.p. 10 µL.

As amostras foram incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente, e posteriormente foi adicionado a cada amostra 1 µL de EDTA 25 mM (Invitrogen®, Life Technologies®) e incubadas por 10 minutos a 65°C em termociclador (C100 Touch™, Thermal Cycler). As amostras foram então transferidas para o gelo, por um minuto, e centrifugadas por cinco segundos.

3.5.3.2. Síntese do cDNA

A síntese do cDNA com o kit comercial SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen®, Life Technologies™) foi realizada de acordo com as orientações do

fabricante. Em gelo, a cada amostra foi adicionado 1 μL de mix primers oligo(dT) 50 μM , 11 μL do RNA total purificado (1 μg) na etapa anterior (3.5.3.1), 1 μL de dNTP Mix, 10 mM e água livre de RNase em q.s.p. 14 μL . As amostras foram incubadas por cinco minutos a 65°C em termociclador e, posteriormente, por pelo menos um minuto, em gelo.

Após, as amostras foram centrifugadas brevemente (cinco segundos) e a cada amostra foi adicionado 4 μl 5X First-Strand Buffer (Invitrogen®, Life Technologies™), 1 μl 0,1 M DTT (Invitrogen®, Life Technologies™) e 1 μl de SuperScript III RT (200 unidades. μl^{-1}) (Invitrogen®, Life Technologies™). Com a própria ponteira misturou-se suavemente as reações. Os tubos foram incubados em termociclador a 50°C por 60 minutos e a reação foi inativada por aquecimento a 70°C durante 15 minutos.

3.5.3.3. PCRs para validação do cDNA

O cDNA obtido na etapa anterior (item 3.5.3.2.) foi validado por PCR convencional, com o kit comercial Platinum® Taq DNA Polimerase 5U/ μL (Life Technologies™). Em tubos de microcentrífuga de 0,2 mL foram adicionados 2 μL de cDNA (na diluição de 1:10), 1,5 μL do tampão 10X Invitrogen®, Life Technologies™), 0,75 μL de MgCl_2 50 mM (Invitrogen®, Life Technologies™), 0,3 μL do iniciador direto e 0,3 μL do iniciador reverso, ambos na concentração de 10 μM do gene 18S rRNA que corresponde ao gene RNA ribossomal 18S (F: GTGACGGGTGACGGAGAATT; R: GACACTAATGCGCCCGGTAT - número de acesso: M82356, (Bogdanović *et al.*, 2013)), cujo produto de amplificação apresenta 151 pb, 0,3 μL da mistura de dNTPs 10 mM, 0,2 μL da enzima Platinum Taq 5U/ μL (Invitrogen®, Life Technologies™) e 9,65 μL de água ultrapura (miliQ). As reações foram realizadas em termociclador (C100 Touch™, Thermal Cycler). As etapas de amplificação foram realizadas conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Condições de termociclagem para a realização das reações de PCR.

Etapa	Descrição	Temperatura	Tempo
1	Denaturação inicial do DNA	94°C	3min
2	Denaturação do DNA	94°C	45seg
3	Pareamento dos iniciadores	60°C	45seg
4	Amplificação do DNA	72°C	60seg
	Repetição das etapas 2 a 4		40 vezes
5	Última amplificação do DNA	72°C	10 min
6	Armazenamento	4°C	ilimitado

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese e visualizados em gel de agarose 2% com brometo de etídio. O marcador de peso molecular utilizado foi o GeneRuler™ Low Range DNA Ladder 100 pb (Fermentas, Life Sciences).

3.5.4 Escolha das sequências

A realização da análise do transcriptoma, pela técnica de RNAseq, da cultivar URS 21 após desafio com *P. coronata*, gerou um grande número de sequências de RNA induzidas e, quando da comparação das sequências obtidas com o genoma do arroz, observou-se que muitas dessas sequências de RNA encontram-se associadas com processos relacionados ao metabolismo secundário, como por exemplo, sequências relacionadas à biossíntese de compostos fenólicos e saponinas, bem como, sequências cujas prováveis proteínas codificadas encontram-se associadas com o reconhecimento do patógeno, como as proteínas NBS-LRR, relacionadas com o processo de sinalização, indução da SAR (como por exemplo, os fatores de transcrição WRKY), estresse oxidativo, defesa e membros da família gênica MACPF. Assim, sequências cuja anotação encontram-se relacionadas a essas categorias e que diferiram pelo teste de Baggerley em 0,05, tanto para *e-value* quanto para o *p-value* foram selecionadas.

Iniciadores direto e reverso, específicos para cada sequência candidata, foram desenhados com o auxílio do programa computacional Primer3 (v. 0.4.0), respeitando o tamanho de aproximadamente 200 pb para o produto de cada gene candidato. Os iniciadores foram analisados no software *online OligoAnalyzer 3.1* (Integrated DNA Technologies, IDT) respeitando os seguintes critérios: temperatura de pareamento próxima a 60°C, conteúdo GC em torno de 50%, e energia de formação de homo ou heterodímeros menor que 6. A sequência dos iniciadores está indicada na Tabela 7.

Tabela 7: Iniciadores específicos para as sequências obtidas por RNAseq analisadas.

Nome do iniciador	Sequência D e R	Amplicon (n.º de pb)
WRKY	D: GGGACAATGTCAAGCCAGTT R: TTCCAGCAGGGGTGTA AAAAG	169
WRKY73	D: CGACGGA ACTCCCTCTGTTA R: CGACCAACTGT CGAATCTGA	205
PDR <i>like</i> ABC transportador	D: TGGGGATATGGAGTTGAGGA R: GACGTGACAGGGTTTGTGAA	172

Continuação. Tabela 7. Iniciadores específicos para as sequências obtidas por RNAseq analisadas.

MACFP	D: ACAGCCAATCTCCAAAAGGA R: CCAGCTTGTATTACCACCA	156
Chalcona sintase (EC 2.3.1.74)	D: CGATTATTTGTCCGCCTCTT R: ACAAAGAGCCACCATCCAAC	163
Peroxidase	D: ACGCCATATAGGCAAACACC R: GCTACAGTTCGGAAGTCCC	151
PAL (EC 4.3.1.5)	D: ACGCCATATAGGCAAACACC R: GCTACAGTTCGGAAGTCCC	150
<i>Lr34</i> (FJ436983)	D: AATTTCAAGTCTCGGCTGAT R: GGAGCAGAGAAAGAGGCTAACG	184
<i>Mlo</i> de trigo (KM017011.1)	D: TATGGCAACACCTGGTCTGA R: TCGTTTGCTCCTCGAAGATT	158
Calose sintase	D: CCCACAGGGGAAAGGTAGAG R: ACGGCATCTCGGTCAACTAC	106

D: direto; R: reverso

3.5.5. RT-qPCR

O cDNA sintetizado e validado nas etapas anteriores (itens 3.5.4.2 e 3.5.4.3) foi usado nas reações de RT-qPCR, para a obtenção dos perfis transcricionais das sequências quando desafiadas com *P. Coronata*, ao longo do tempo. A leitura da fluorescência a cada ciclo de amplificação foi realizada pelo equipamento Applied Biosystems 7300 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies®) e a análise dos dados foi realizada pelo software Microsoft Office Excel® v.10.0. Utilizou-se SYBR® Green (1:10000) como fluoróforo (Life Technologies®) e 18S rRNA como gene referência (Bogdanović *et al.*, 2013), para normalizar os dados.

O gene 18S rRNA foi empregado para a normalização dos dados. Este gene foi escolhido como controle endógeno dos experimentos, pois em ensaios realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa apresentou estabilidade, curva de amplificação adequada e curva de dissociação com pico único (Figueiró, 2012).

Para cada repetição biológica foram feitas triplicatas técnicas. As reações foram realizadas em placas de 96 poços e a cada poço foi adicionado 10 µL do cDNA (1:50), 0,4 µL do iniciador direto e 0,4 µL do iniciador reverso, ambos na concentração de 10 µM, 0,5 µL da mistura de dNTPs 10 mM, 2 µL do tampão 10x (Invitrogen®, Life

Technologies[®]), 0,8 µL de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen[®], Life Technologies[®]), 2 µL de SYBR[®] Green (1:10000) (Invitrogen[®], Life Technologies[®]), 0,2 µL de ROX 50x (Invitrogen[®], Life Technologies[®]) e 0,1 µL da enzima Platinum Taq DNA Polimerase 5U/µL (Invitrogen[®], Life Technologies[®]) e 3,6 µL de água ultrapura (miliQ). As reações foram submetidas ao programa de termociclagem apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. Programa de termociclagem para a realização da RT-qPCR em amostras de cDNA.

Etapa	Descrição	Temperatura	Tempo
1	Digestão da UNG (Uracil-N-Glicosilase)	50°C	2min
2	Desativação da UNG	95°C	10 min
3	Denaturação do cDNA	95°C	15s
4	Pareamento dos iniciadores	60/61/62°C	60s
5	Amplificação do cDNA	72°C	30s
	Repetição das etapas 3 a 5		40 vezes
6	Denaturação final do cDNA	95°C	15s

Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência ROX 50x (Invitrogen[®], Life Technologies[®]), para a correção de qualquer erro na leitura decorrente de artefato técnico ou variação do volume devido à evaporação ao longo da reação.

A análise da especificidade da reação de PCR foi realizada por meio da interpretação da curva de dissociação. A expressão gênica relativa de cada sequência foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001) e a significância das diferenças observadas entre amostras foi avaliada estatisticamente pelo teste t ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Análise Genética da Resistência sob condições de campo

4.1.1. Progresso da severidade da doença

A avaliação do progresso da doença, através da realização de leituras sequenciais da severidade da ferrugem da folha e posteriormente a determinação da ASCPDNC é uma ferramenta importante para a caracterização de genótipos a campo.

Em 2013, na área experimental da EEA da UFRGS, os primeiros sintomas de ferrugem da folha foram observados no dia 25 de agosto e a epidemia apresentou um ciclo de aproximadamente 70 dias. A quantificação dos parâmetros epidemiológicos, ASCPD e severidade final da doença, permitiu observar que as reações apresentadas à ferrugem da folha da aveia variaram de forma contínua, entre os extremos correspondentes à resistência e à suscetibilidade, para a população recombinante resultante do cruzamento entre UFRGS 988012-1 e UFRGS 19.

A linhagem UFRGS 988012-1 (parcialmente resistente) apresentou ASCPDNC média igual a 7,77, enquanto a cultivar UFRGS 19 (suscetível) apresentou ASCPDNC média equivalente a 1136,36. Entre as linhagens recombinantes, as linhagens 26, 97, 130, 61 e 158 apresentaram as menores ASCPDNC médias, estas equivalendo a 4,62, 5,12, 5,90, 6,47 e 6,97, respectivamente. Em contraste, a linhagem 47 teve a maior ASCPDNC (1417,59).

Com relação à severidade máxima, a linhagem UFRGS 988012-1 mostrou severidade máxima média igual a 0,84%, enquanto a cultivar UFRGS 19 atingiu o equivalente a 100% (Figura 5). Entre as linhagens recombinantes, as linhagens 158, 26 e 97 apresentaram severidade máxima média igual a 0,4%, as linhagens 62 e 77 alcançaram severidade máxima média equivalente a 0,67% e nas linhagens 135 e 162 a severidade máxima média foi equivalente a 0,7%. Enquanto que as linhagens 27, 29, 45, 47, 85, 94, 163, 164 e 168 tiveram severidade máxima média equivalente a 100%, assim como o parental suscetível.

Para os três anos de realização dos ensaios, através do progresso da severidade média e considerando o valor da ASCPDNC, as linhagens recombinantes, foram classificadas em três categorias: resistentes, intermediárias e suscetíveis. Para o ano de 2013, observa-se pela Figura 5, que as 36 linhagens classificadas como resistentes obtiveram valor de severidade final média muito semelhante ao apresentado pelo parental parcialmente resistente. As 121 linhagens recombinantes classificadas como intermediárias, como a própria classificação subentende, alcançaram valores de severidade final média entre os valores apresentados pelos parentais, atingindo aproximadamente 40% durante o ciclo de epidemia. Enquanto que as dez linhagens classificadas como suscetíveis apresentaram valores de severidade que se assemelham aos obtidos pelo parental suscetível desde o início da epidemia, e no final do ciclo esse valor se aproximou de 100%.

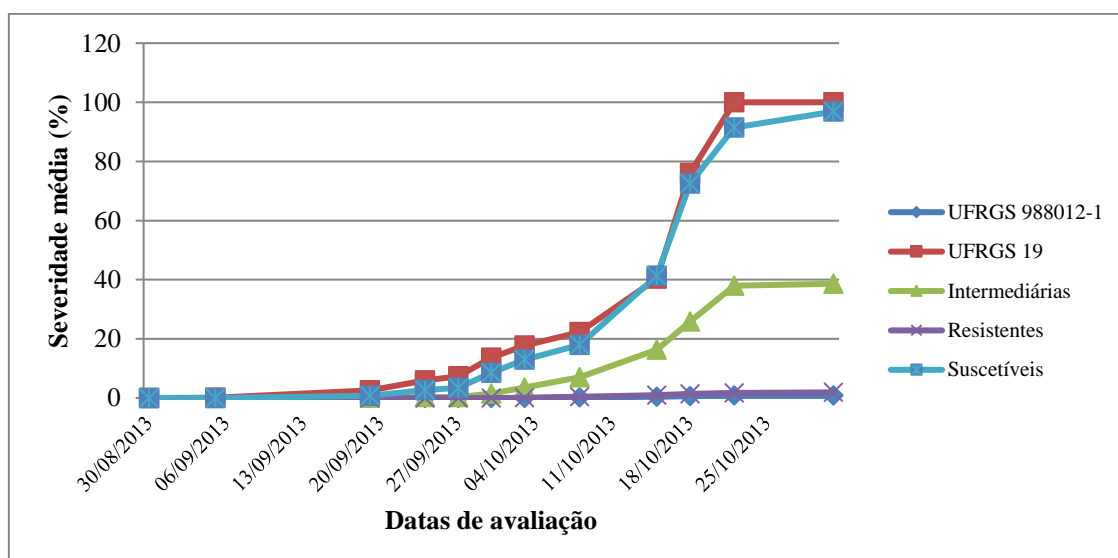


Figura 5. Progresso da severidade média da ferrugem da folha da aveia nos parentais UFRGS 988012-1 e UFRGS 19 e nas linhagens recombinantes $F_{6,9}$ durante o ciclo de epidemia em 2013. Eldorado do Sul, 2013.

Em 2014, os primeiros sintomas de ferrugem da folha foram observados em 19 de agosto e a epidemia apresentou um ciclo de aproximadamente 65 dias. Novamente, a quantificação dos parâmetros epidemiológicos, ASCPD e severidade final da doença, permitiu observar que as reações à ferrugem da folha da aveia variaram de forma contínua para a população recombinante em estudo.

A linhagem UFRGS 988012-1 apresentou ASCPDNC média igual a 4,51, enquanto a cultivar UFRGS 19 alcançou ASCPDNC média equivalente a 1703,69.

Entre as linhagens recombinantes, as linhagens 86, 95, 109 e 141 tiveram as menores ASCPDNC médias, equivalentes a 0,95, 3,60, 3,85 e 4,04, respectivamente. Em contraste, a linhagem com o maior valor médio da ASCPDNC foi a linhagem 27, com ASCPDNC equivalente a 2069,79, comportamento semelhante foi observado em 2013, quando essa linhagem também apresentou um valor médio da ASCPDNC superior ao apresentado pelo parental suscetível.

Com relação à severidade máxima, a linhagem UFRGS 988012-1 apresentou severidade máxima média igual a 0,56%, enquanto que a cultivar UFRGS 19 atingiu severidade máxima média equivalente a 88,05%. Entre as linhagens recombinantes, a linhagem 86 apresentou severidade máxima média igual a 0,003%, a linhagem 95 equivalente a 0,033 e as linhagens 109, 141, 150 e 158 obtiveram severidade máxima média igual a 0,33%. Por outro lado, a linhagem 27, assim como para o parâmetro ASCPDNC, apresentou maior severidade final média, equivalendo a 90% (Figura 6).

Observou-se que, as 50 linhagens classificadas como resistentes apresentaram valor de severidade final média semelhante ao apresentado pelo parental parcialmente resistente. As 99 linhagens que foram classificadas como intermediárias apresentaram valores finais da severidade próximos de 30%, enquanto que as 18 linhagens classificadas como suscetíveis, mesmo se comportando de maneira semelhante ao parental suscetível ao longo do ciclo, apresentaram valor de severidade final média próximo a 72%, enquanto que no parental suscetível esse valor atingiu quase 90%.

Durante o ensaio realizado em 2015, os primeiros sintomas de ferrugem da folha foram observados em sete de agosto e a epidemia apresentou um ciclo de aproximadamente 75 dias. Assim como para os ensaios realizados durante 2013 e 2014, a quantificação dos parâmetros epidemiológicos, ASCPD e severidade final da doença, permitiu observar que as reações à ferrugem da folha variaram de forma contínua para a população segregante.

A linhagem UFRGS 988012-1 apresentou ASCPDNC média igual a 174,79, enquanto a cultivar UFRGS 19 alcançou ASCPDNC média equivalente a 2335,72. Entre as linhagens recombinantes, apenas a linhagem 158 teve ASCPDNC média menor que o parental parcialmente resistente, sendo este valor equivalente a 142,74. Nenhuma linhagem apresentou o valor médio da ASCPDNC maior que o parental suscetível, mas, a linhagem 27, assim como nos dois anos anteriores, obteve novamente um dos valores mais altos se comparado com as demais linhagens, ASCPDNC média 2287,8, confirmando sua suscetibilidade.

Com relação à severidade máxima, a linhagem UFRGS 988012-1 apresentou severidade máxima média igual a 12,1%, enquanto que a cultivar UFRGS 19 atingiu severidade máxima média equivalente a 84,3%. Entre as linhagens recombinantes, as linhagens 6, 37, 79, 95 e 158 tiveram severidade média máxima inferior à apresentada pelo parental parcialmente resistente, sendo estes valores equivalentes a 7,66, 10, 10,66, 11 e 12%, respectivamente. Nenhuma linhagem apresentou severidade média superior ao parental UFRGS 19 (Figura 7).

As 31 linhagens classificadas como resistentes tiveram valor de severidade final médio semelhante ao apresentado pelo parental parcialmente resistente, cerca de 12%, enquanto que as 119 linhagens classificadas como intermediárias, apresentaram valores finais da severidade próximos a 40%, e as 17 linhagens classificadas como suscetíveis, mesmo se comportando de maneira semelhante ao parental suscetível até a penúltima leitura, apresentaram valor de severidade final médio próximo a 72%, enquanto no parental suscetível, a severidade máxima média atingiu o valor de aproximadamente 85% (Figura 7).

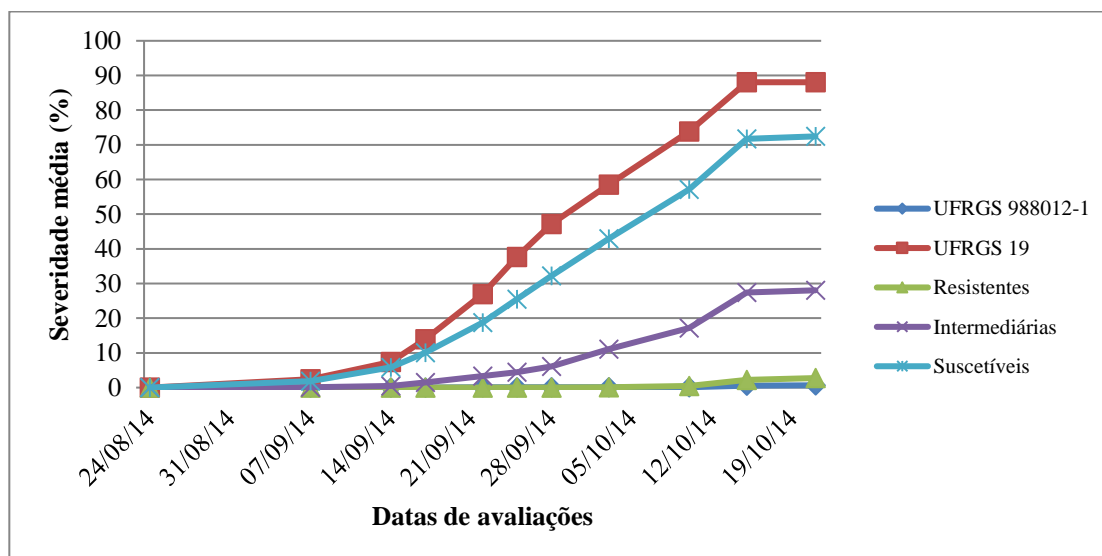


Figura 6. Progresso da severidade média da ferrugem da folha da aveia nos parentais UFRGS 988012-1 e UFRGS 19 e nas linhagens recombinantes F_{6:10} durante o ciclo de epidemia em 2014. Eldorado do Sul, 2014.

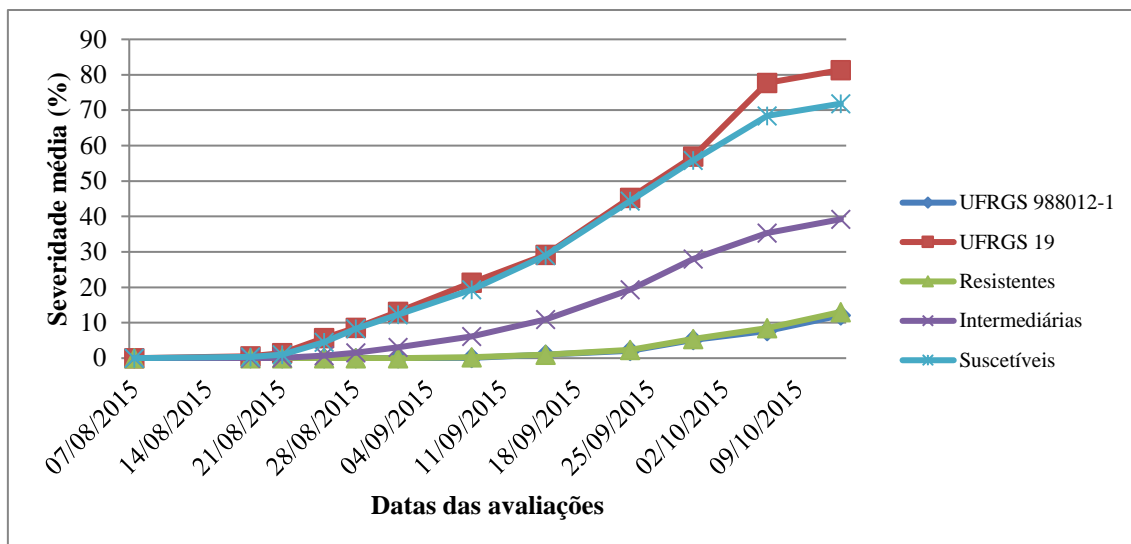


Figura 7. Progresso da severidade média da ferrugem da folha da aveia nos parentais UFRGS 988012-1 e UFRGS 19 e nas linhagens recombinantes $F_{6:11}$ durante o ciclo de epidemia em 2015. Eldorado do Sul, 2015.

A análise de variância indicou diferenças significativas entre as linhagens recombinantes (gen), entre os anos de realização dos ensaios, entre as repetições que compunham o ensaio em um mesmo ano (rep(ano)) e a ocorrência de interação entre as linhagens e o ano de realização do ensaio (ano*gen) (Tabela 9). O coeficiente de variação apresentou valor equivalente a 44,59%.

Tabela 9. Análise de variância para a ASCPDNC média para as 167 linhagens recombinantes de aveia branca avaliadas durante os três anos de realização dos ensaios.

Fonte	GL	SQ	QM	F	P > F
ano	2	127225228,1	63612614,0	1083,88	<0,0001
rep(ano)	6	9304225,8	1550704,3	26,42	<0,0001
gen	166	227005183,5	1367501,1	23,30	<0,0001
Ano*gen	332	52175292,1	157154,5	2,68	<0,0001

GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: teste F

Analisando os valores obtidos para o parâmetro ASCPDNC para os três anos de realização do ensaio, observou-se estabilidade da resistência parcial apresentada pelas linhagens. Objetivando uma melhor demonstração desta estabilidade, um ranqueamento foi realizado para as 25 linhagens recombinantes que menor valor de ASCPDNC apresentaram para cada ano de realização do ensaio e este ranqueamento foi comparado entre os três anos (Tabela 10).

Ao levar em consideração os valores obtidos para o parâmetro ASCPDNC para os três anos de avaliações, as linhagens 61, 77, 79, 97, 135, 158 e 162 classificaram-se entre as 25 linhagens mais resistentes dentre as 167 linhagens recombinantes avaliadas. Já quando se considerou apenas os dados obtidos para dois anos de avaliação, 2013 e 2014, 2013 e 2015 e 2014 e 2015, as linhagens 21, 109, 116, 130 e 153, as linhagens 19, 57 e 123 e, as linhagens 6, 9, 50, 63, 95, 141 e 150, respectivamente, classificaram-se entre as 25 linhagens mais resistentes dentre as 167 linhagens recombinantes avaliadas (Tabela 10).

Tabela 10. Lista das linhagens recombinantes de aveia branca, obtidas do cruzamento entre UFRGS 988012-1 e UFRGS 19, com as 25 menores ASCPDNC média, para a ferrugem da folha, avaliadas ao longo de 2013 a 2015 em Eldorado do Sul (RS).

Classificação	2013		2014		2015	
	Genótipo	ASCPDN*	Genótipo	ASCPDN*	Genótipo	ASCPDN*
1°	Linhagem 26	4.63	Linhagem 141	0.95	Linhagem 158	142.74
2°	Linhagem 97	5.13	Linhagem 95	3.61	Linhagem 77	184.98
3°	Linhagem 130	5.90	Linhagem 109	3.86	Linhagem 57	185.26
4°	Linhagem 61	6.48	Linhagem 86	4.04	Linhagem 150	194.99
5°	Linhagem 158	6.98	Linhagem 9	5.96	Linhagem 37	205.83
6°	Linhagem 77	8.07	Linhagem 6	6.24	Linhagem 135	206.57
7°	Linhagem 116	8.20	Linhagem 150	6.29	Linhagem 95	215.70
8°	Linhagem 162	8.36	Linhagem 158	7.00	Linhagem 61	232.26
9°	Linhagem 79	8.87	Linhagem 135	7.24	Linhagem 6	233.82
10°	Linhagem 57	10.24	Linhagem 153	7.38	Linhagem 123	234.67
11°	Linhagem 62	10.63	Linhagem 162	7.41	Linhagem 130	238.18
12°	Linhagem 135	10.85	Linhagem 134	7.69	Linhagem 79	242.02
13°	Linhagem 44	14.73	Linhagem 54	8.67	Linhagem 50	245.19
14°	Linhagem 24	15.37	Linhagem 77	9.50	Linhagem 38	252.78
15°	Linhagem 84	15.81	Linhagem 80	10.44	Linhagem 141	257.97
16°	Linhagem 123	18.78	Linhagem 79	10.98	Linhagem 162	266.17
17°	Linhagem 21	20.84	Linhagem 21	11.18	Linhagem 116	302.63
18°	Linhagem 153	20.84	Linhagem 111	11.52	Linhagem 19	305.56
19°	Linhagem 19	20.99	Linhagem 97	11.59	Linhagem 129	330.32
20°	Linhagem 109	21.47	Linhagem 63	11.65	Linhagem 167	334.51
21°	Linhagem 131	22.58	Linhagem 102	11.93	Linhagem 132	334.67
22°	Linhagem 1	22.99	Linhagem 61	12.50	Linhagem 9	339.70
23°	Linhagem 41	23.38	Linhagem 33	13.35	Linhagem 63	346.86
24°	Linhagem 58	23.76	Linhagem 50	14.75	Linhagem 139	360.79
25°	Linhagem 6	26.38	Linhagem 24	17.34	Linhagem 97	361.04

ASCPDN*: ASCPDNC média

4.1.2. Distribuição de frequências

Para a classificação das linhagens recombinantes em resistentes, intermediárias e suscetíveis à ferrugem da folha da aveia, realizou-se a construção dos histogramas de distribuição de frequências. Através da distribuição de frequências da ASCPDNC da progênie, no ensaio realizado durante o ano de 2013, 22, 73 e 5% das linhagens recombinantes foram classificadas como resistentes, intermediárias e suscetíveis à ferrugem da folha, respectivamente (Figura 8). No ensaio realizado ao longo do inverno/primavera de 2014, observou-se que aproximadamente 25, 65 e 10% das linhagens classificaram-se como resistentes, intermediárias e suscetíveis, respectivamente (Figura 9). Enquanto que, pela distribuição de frequências da ASCPDNC média da progênie, no ano de 2015, 18,5, 71,25 e 10,1% das linhagens recombinantes classificaram-se como resistentes, intermediárias e suscetíveis, respectivamente, ao patógeno causador da ferrugem da folha da aveia (Figura 10). Em todos os anos, a progênie apresentou, aproximadamente, 90% das linhagens com fenótipo variando de parcialmente resistente a intermediário.

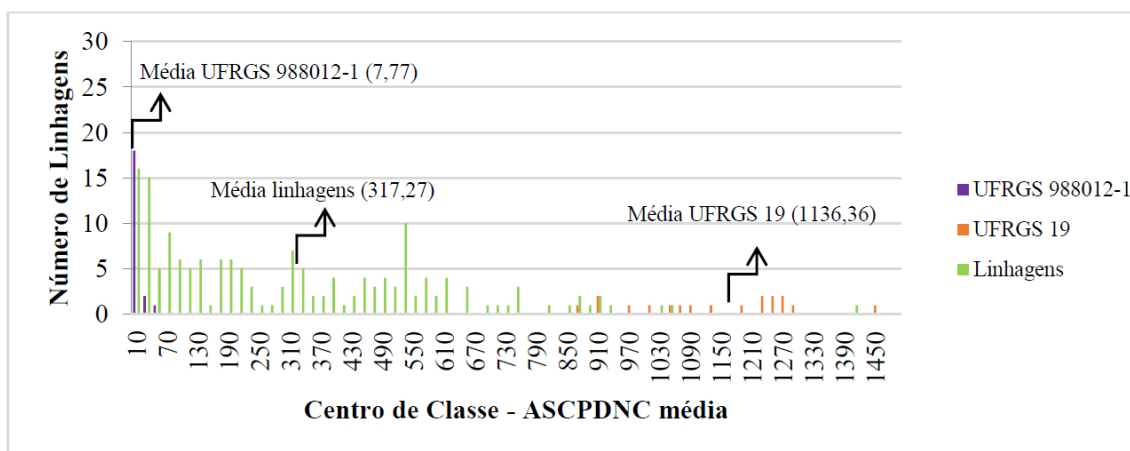


Figura 8. Distribuição das frequências da ASCPDNC média de ferrugem da folha da aveia, nos parentais UFRGS 988012-1 e UFRGS 19 e nas 167 linhagens recombinantes $F_{6;9}$ no ano de 2013. Eldorado do Sul, 2013.

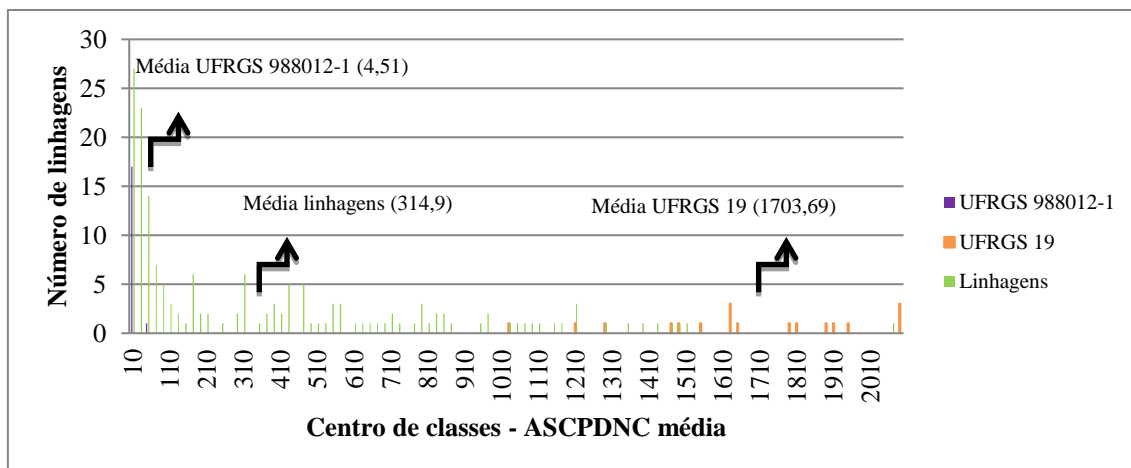


Figura 9. Distribuição das frequências da ASCPDNC média de ferrugem da folha da aveia, nos parentais UFRGS 988012-1 e UFRGS 19 e nas 167 linhagens recombinantes F_{6:10} no ano de 2014. Eldorado do Sul, 2014.

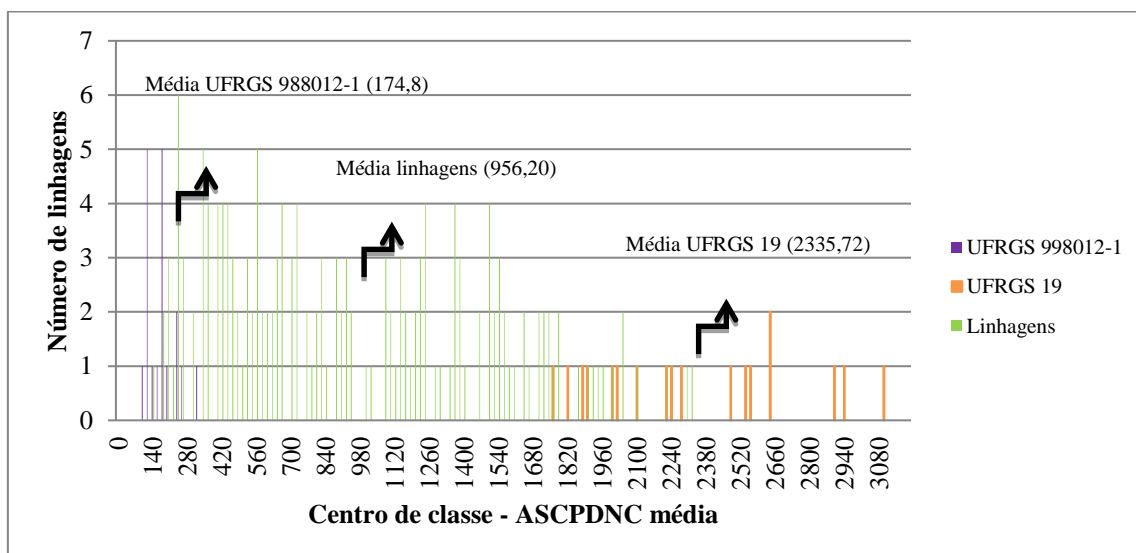


Figura 10. Distribuição das frequências da ASCPDNC média de ferrugem da folha da aveia, nos parentais UFRGS 988012-1 e UFRGS 19 e nas 167 linhagens recombinantes F_{6:11} no ano de 2015. Eldorado do Sul, 2015.

4.1.3. Estimativa do número de locos envolvidos com o caráter resistência parcial à ferrugem da folha na população recombinante obtida a partir do cruzamento entre UFRGS 988012-1 e UFRGS 19

Para estimar o número de locos envolvidos na expressão do caráter resistência parcial à ferrugem da folha tomaram-se por base as frequências genéticas esperadas e observadas para cada classe fenotípica estabelecida. Foram testados modelos com dois, três, quatro e cinco locos, e estes foram submetidos ao teste de aderência de χ^2 para cada

ano de realização do ensaio, com dois graus de liberdade. Os modelos consideraram a distribuição de frequências da ASCPDNC média.

Para a realização da estimativa do número de locos não foi considerada a severidade máxima, pois este parâmetro epidemiológico é representativo de um único momento da epidemia e, assim, não leva em consideração o comportamento, bem como o desenvolvimento e progresso da epidemia ao longo do ciclo.

Considerou-se a existência de dois locos de maior efeito sobre o fenótipo (locos “A” e “B”) e os demais locos apresentando menor efeito sobre a expressão do caráter resistência parcial à ferrugem da folha (Tabela 11). Além disso, baseado nas avaliações realizadas por Zambonato *et al.* (2012), considerou-se que o loco “A” (de maior efeito sobre o fenótipo) apresenta efetividade na expressão do caráter quando herdado na forma recessiva (aa) e independentemente da combinação dos demais locos, confere resistência parcial à ferrugem da folha. Assim, o fenótipo associado é o de um genótipo parcialmente resistente ou intermediário.

Quanto ao segundo loco de maior efeito, loco “B”, o mesmo contribui de forma efetiva para a expressão do caráter, porém em combinações específicas com os demais locos. De maneira semelhante, os locos aqui considerados de menor efeito sobre o fenótipo (“C”, “D” e “E”) apresentam contribuição para a expressão do caráter, porém apenas quando em combinações específicas com os dois locos de maior efeito. Isso significa que esses locos, de menor efeito sobre o fenótipo, na ausência de algum loco de maior efeito, não são capazes de conferir o caráter resistência parcial à ferrugem da folha.

No ano de 2013, o modelo genético que melhor ajuste apresentou foi o que compreendia quatro locos ($\chi^2 = 1,15$, $p=0,56$), sendo dois de maior efeito (“A” e “B”) e dois locos de menor efeito (gene-a-gene) sobre o fenótipo. Os possíveis genótipos considerados resistentes podem ser representados pela seguinte combinação genética: aaBBCCDD, aabbCCDD, aaBBccDD e aaBBCCdd.

Enquanto que, nos anos de 2014 e 2015, o modelo genético que melhor ajuste apresentou foi o composto por três locos ($\chi^2 = 2,29$, $p=0,31$ e $\chi^2 = 5,54$, $p=0,06$, respectivamente), sendo dois locos de maior efeito (“A” e “B”) sobre o fenótipo e um loco de menor efeito sobre o fenótipo (“C”). Assim, os possíveis genótipos considerados resistentes seriam representados de acordo com as seguintes combinações genéticas aaBBCC e aaBBcc.

Tabela 11. Estimativa do número de locos responsáveis por conferirem o caráter resistência parcial à ferrugem da folha em aveia na população de linhagens recombinantes obtidas a partir do cruzamento entre UFRGS 988012-1 e UFRGS 19. Foram testados modelos baseados em dois, três, quatro e cinco locos.

Modelo proposto	Classe	Genótipos possíveis	Ano					
			2013		2014		2015	
n.º de locos			FE	FO	FE	FO	FE	FO
2	Resistente	aaBB	41,75	36	41,75	50	41,75	31
	Intermediário	aabb AABB	83,5	121	83,5	99	83,5	119
	Suscetível	AAbb	41,75 $\chi^2 = 41,77$	10 $p=8,4.10^{-10}$	41,75 $\chi^2 = 18,01$	18 $p=0,0001$	41,75 $\chi^2 = 32,52$	17 $p=8,6.10^{-8}$
3	Resistente	aaBBCC aaBBcc	41,75	36	41,75	50	41,75	31
	Intermediário	aabbCC AABBCC AAbbCC aabbcc AABBcc	104,35	121	104,35	99	104,35	119
	Suscetível	AAbbcc	20,87 $\chi^2 = 9,11$	10 $p=0,01$	20,87 $\chi^2 = 2,29$	18 $p=0,31$	20,87 $\chi^2 = 5,54$	17 $p=0,06$

continuação. Tabela 11. Estimativa do número de locos responsáveis por conferirem o caráter resistência parcial à ferrugem da folha em aveia na população de linhagens recombinantes UFRGS 988012-1 x UFRGS 19. Foram testados modelos baseados em dois, três, quatro e cinco locos.

4	Resistente	aaBBCCDD aabbCCDD aaBBccDD aaBBCCdd	41,75	36	41,75	50	41,75	31
	Intermediário	AAbbCCDD AABBccDD AABBCCdd aabbccdd AABBCCDD aaBBccdd aabbccDD AAbbCCdd AAbbccDD aabbCCdd AABBccdd	114,73	121	114,73	99	114,73	119
	Suscetível	AAbbccdd	10,43 $\chi^2 = 1,15$	10 p=0,56	10,43 $\chi^2 = 9,28$	18 p=0,009	10,43 $\chi^2 = 7,06$	17 p=0,029
5	Resistente	aaBBCCDDEE aaBBccDDEE aaBBCCddEE aaBBCCDDee aaBBCCddee aaBBccDDee aaBBccdde aaBBccddEE	41,75	36	41,75	50	41,75	31

continuação. Tabela 11. Estimativa do número de locos responsáveis por conferirem o caráter resistência parcial à ferrugem da folha em aveia na população de linhagens recombinantes UFRGS 988012-1 x UFRGS 19. Foram testados modelos baseados em dois, três, quatro e cinco locos.

5	Intermediário	AABBccDDEE AABBCCddEE AABBCCDDee aabbccdee aabbccDDee aabbCCddee aabbccddEE aabbccDDEE aabbCCddEE aabbCCDDee AAbbccDDEE AABBccDDee AABBCCDDEE AABBCCddee AABBccddEE AABBccddee	83,5	121	83,5	99	83,5	119
	Suscetível	AAbbccddee AAbbCCddee AAbbccDDee AAbbccddEE AAbbCCDDEE AAbbCCDDee AAbbCCddEE AAbbccDDEE	41,75 $\chi^2 = 41,77$	10 $p=8,4 \cdot 10^{-10}$	41,75 $\chi^2 = 18,01$	18 $p=0,0001$	41,75 $\chi^2 = 32,53$	17 $p=8,6 \cdot 10^{-8}$

FE: Frequência esperada; FO: frequência observada; p: probabilidade. Eldorado do Sul, 2013 a 2015.

4.2. Avaliação do caráter resistência parcial em plântulas

Plântulas da cultivar UFRGS 19, durante os três ensaios realizados, apresentaram TI 3 e/ou 4, o que classifica essa cultivar como suscetível à mistura de isolados de *P. coronata* inoculados. Apenas três amostras de plântulas de UFRGS 19 apresentaram TI igual a 2. Em contraste, todas as plântulas da linhagem UFRGS 988012-1, avaliadas ao longo dos três anos, apresentaram TI variando de 0 a 2, o que salienta a resistência parcial apresentada por essa linhagem aos isolados coletados na região do Sul do Brasil. Esse resultado reforça o comportamento contrastante que ocorre entre os parentais da população segregante para o caráter resistência parcial à ferrugem da folha da aveia e corrobora com os resultados obtidos nos ensaios a campo.

As plântulas das linhagens recombinantes F_{6:9}, F_{6:10} e F_{6:11}, avaliadas ao longo de 2013, 2014 e 2015 respectivamente, apresentaram TI variando entre 0 e 4, sendo que a maioria das linhagens (117 de 167 linhagens recombinantes), na média dos três ensaios realizados, apresentaram TI inferior ou igual a 2. As demais linhagens (30%) apresentaram na média TI superior a 2.

A análise de variância identificou diferenças significativas entre as linhagens recombinantes (gen), entre os ensaios (ens), entre as repetições que compunham cada ensaio (rep(ens)), bem como, a ocorrência de interação entre as linhagens e o ensaio (ens*gen) (Tabela 12). O coeficiente de variação apresentou valor equivalente a 48,38%, resultado semelhante ao obtido para os ensaios realizados sob condições de campo.

Tabela 12. Análise de variância para o TI observado nas 167 linhagens recombinantes obtidas a partir do cruzamento entre UFRGS 988012-1 e UFRGS 19, avaliadas durante os três ensaios.

Fonte	GL	SQ	QM	F	P > F
ens	2	169,99	84,99	139,24	<0,0001
rep(ens)	8	18,79	2,34	3,85	0,0002
gen	166	1003,22	6,04	9,90	<0,0001
ens*gen	330	390,40	1,18	1,18	<0,0001

GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: teste F

4.3 Avaliação do QTL *QPc.crc-14D*

As reações por PCR convencional foram realizadas para verificar a presença dos marcadores SNPs GMI_ES14_c1439_83 e GMI_DS_LB_6480 nos genótipos UFRGS 19, URS 21, URS 22, UFRGS 988012-1 e URS F Galope.

O marcador GMI_ES14_c1439_83 não foi amplificado quando as reações foram realizadas com o iniciador ASP1 associado aos iniciadores CP1 ou CP2 respectivamente), nos genótipos UFRGS 19, URS 21, URS 22, UFRGS 988012-1. No entanto, o emprego do iniciador ASP2 em conjunto com CP1 permitiu amplificar um fragmento, cujo tamanho foi de 200 a 300 pb, para os quatro genótipos em questão (Figura 11). Indicando que não há diferença genética entre os genótipos brasileiros parcialmente resistentes e suscetíveis para esse marcador.

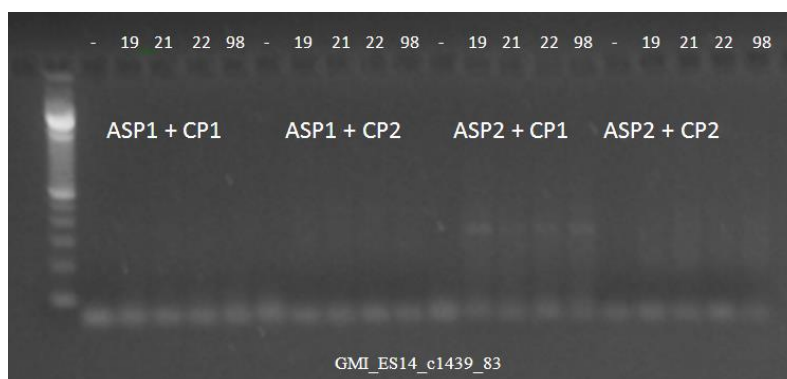


Figura 11. Produtos de amplificação gerados por PCR convencional, a partir do DNA genômico dos genótipos UFRGS 19, URS 21, URS 22 e UFRGS 988012-1 com iniciadores do marcador SNP GMI_ES14_c1439_83. No primeiro poço, a esquerda, marcador de peso molecular 100pb. Os símbolos “-”, “19”, “21”, “22” e “98” localizados acima dos poços representam o controle negativo da reação, UFRGS 19, URS 21, URS 22 e UFRGS 988012-1, respectivamente.

Para o marcador GMI_DS_LB_6480, após 38 ciclos de amplificação a partir do DNA genômico de UFRGS 19, URS 21, URS 22, UFRGS 988012-1, apenas quando o iniciador ASP1 e o iniciador CP2 foram utilizados em conjunto foi possível observar produtos de amplificação variando entre 200 e 300 pb, entre 300 e 400 pb, aproximadamente 500 pb e entre 500 e 600 pb para os quatro genótipos avaliados (Figura 12). Salienta-se que este elevado número de ciclos pode permitir a formação de produtos de amplificação inespecíficos, porém nenhum produto de amplificação foi observado quando utilizado menor número de ciclos. Novamente não foi observada diferença entre os genótipos brasileiros suscetíveis e parcialmente resistentes, sugerindo

que a fonte de resistência dos genótipos brasileiros não seja a mesma descrita na literatura para a linhagem MN 841801.



Figura 12. Produtos de amplificação gerados por PCR convencional, a partir do DNA genômico dos genótipos UFRGS 19, URS 21, URS 22, UFRGS 988012-1 com iniciadores do marcador SNP GMI_DS_LB_6480. No primeiro poço, a esquerda, marcador de peso molecular 100 pb. Os símbolos “CN”, “19”, “21”, “22” e “98” localizados acima dos poços representam o controle negativo da reação, UFRGS 19, URS 21, URS 22 e UFRGS 988012-1, respectivamente.

Na cultivar URS F Galope, a qual contém em sua genealogia Ac Medallion, parental de uma das populações utilizadas para a identificação do QTL *Qpc.crc-14D* (Lin *et al.*, 2014), não foi possível amplificar o marcador GMI_ES_c1439_83 utilizando até 28 ciclos de amplificação.

Para o marcador GMI_DS_LB_6480, apenas as reações realizadas com os iniciadores ASP1 e CP2, tanto em 28 quanto em 30 ciclos de amplificação, apresentaram quatro produtos de amplificação para o genótipo URS F Galope. Esses produtos apresentaram tamanho entre 300 e 400 pb, aproximadamente 500 pb e entre 500 e 600 pb (Figura 13), de maneira semelhante aos produtos obtidos quando da amplificação do DNA genômico de UFRGS 19, URS 21, URS 22 e UFRGS 988012-1 quando do emprego da mesma combinação de iniciadores para esse marcador.

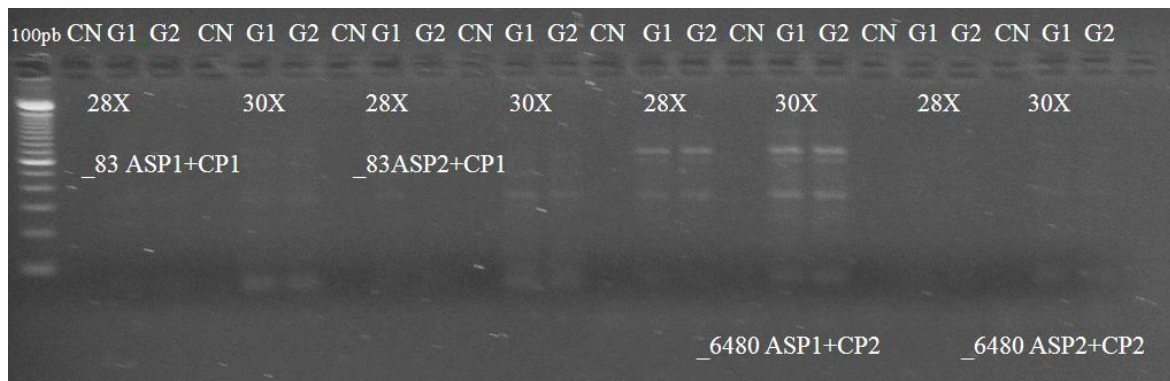


Figura 13. Produtos de amplificação gerados por PCR convencional, a partir do DNA genômico da cultivar de aveia branca URS F Galope com iniciadores dos marcadores GMI_ES14_c1439_83 e GMI_DS_LB_6480. No primeiro poço é apresentado o marcador de peso molecular 100 pb. Os símbolos “CN”, “G1” e “G2” localizados acima dos poços representam o controle negativo da reação e as duas reações com DNA da cultivar URS F Galope, respectivamente.

4.4 Avaliação da expressão de genes candidatos associados à resistência parcial à ferrugem da folha

Os perfis transcricionais de genes candidatos a conferirem o caráter resistência parcial à ferrugem da folha, após a inoculação de *P. coronata*, nos genótipos parcialmente resistentes UFRGS 988012-1 e URS 21, foram obtidos por RT-qPCR. Para as cultivares suscetíveis UFRGS 19 e URS 22 também avaliou-se o perfil transcricional desses genes. A expressão do gene 18S rRNA foi utilizada para normalizar os dados de todos os genes e zero hai foi utilizado como calibrador. Os dados são representados como médias de três replicatas técnicas e três repetições biológicas. Em nenhum genótipo ocorreu expressão das sequências avaliadas nos períodos de 96 e 120 hai.

As proteínas WRKY são uma superfamília de fatores de transcrição exclusivos de plantas, que apresentam mais de 100 membros em *Arabidopsis* e se encontram envolvidas na regulação de vários processos fisiológicos como, por exemplo, a defesa contra patógenos e o processo de senescência. Entre os membros da família WRKY, o fator de transcrição *WRKY76* quando superexpresso aumenta a suscetibilidade a *Magnaporthe oryzae* em arroz (Yokotani *et al.*, 2013). Sequência similar ao fator de transcrição *WRKY73* foi identificada em aveia via RNAseq em plântulas da cultivar URS 21 após inoculação com o agente causador da ferrugem da folha. Em planta adulta, esta sequência teve sua expressão reduzida a menos da metade nos genótipos parcialmente resistentes UFRGS 988012-1 e URS 21 após a inoculação com o patógeno

causador da ferrugem da folha em aveia, sendo esta redução significativa em 12 e 72 hai para UFRGS 988012-1, e em 24 e 48 hai para a cultivar URS 21, respectivamente (Figuras 14 e 15).

Quanto a cultivar suscetível UFRGS 19 houve aumento da expressão deste fator de transcrição nas primeiras seis hai, seguido por uma redução da expressão, sendo esta redução significativa em 24 e 72 hai. O genótipo suscetível URS 22 não apresentou diferenças estatisticamente identificáveis de expressão (Figura 14 e 15, respectivamente).

Outra sequência similar a fatores de transcrição *WRKY* identificada via RNAseq foi avaliada. Esse segundo membro foi, neste trabalho, denominado apenas *WRKY*. Assim como para o membro *WRKY73*, o genótipo parcialmente resistente UFRGS 988012-1 reduziu a expressão de *WRKY* em 48 hai. No entanto, o perfil transcricional do gene *WRKY* para o genótipo parcialmente resistente URS 21 demonstrou tendência a aumento gradual na expressão de *WRKY* após o desafio com *P. coronata*, sendo este aumento significativo em 48 hai (Figuras 16 e 17). A cultivar suscetível UFRGS 19 apresentou tendência ao aumento da expressão de *WRKY* após o desafio com *P. coronata*. Esse aumento foi significativo em 24 hai (Figura 16). Já no genótipo suscetível URS 22, o fator de transcrição manteve sua expressão similar em todos os períodos avaliados (Figura 17).

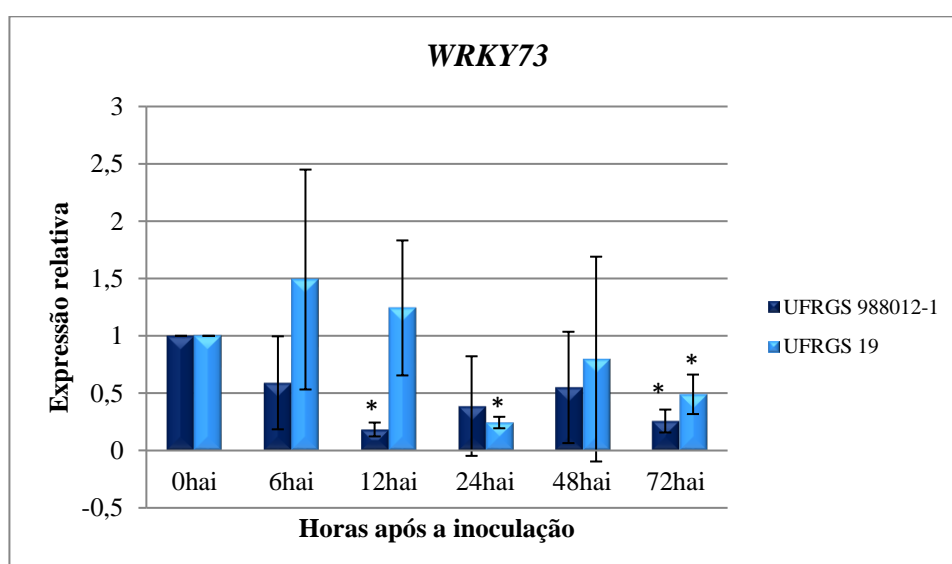


Figura 14. Perfil transcricional da sequência similar ao gene *WRKY73* em plantas adultas de aveia branca, genótipos UFRGS 988012-1 (parcialmente resistente) e UFRGS 19 (suscetível), após inoculação com *P. coronata* em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai. As colunas apresentam a média das replicatas biológicas e as barras o desvio padrão. O asterisco indica diferença

estatística pelo teste t a 5% em relação ao tempo zero em cada genótipo. (n=3).

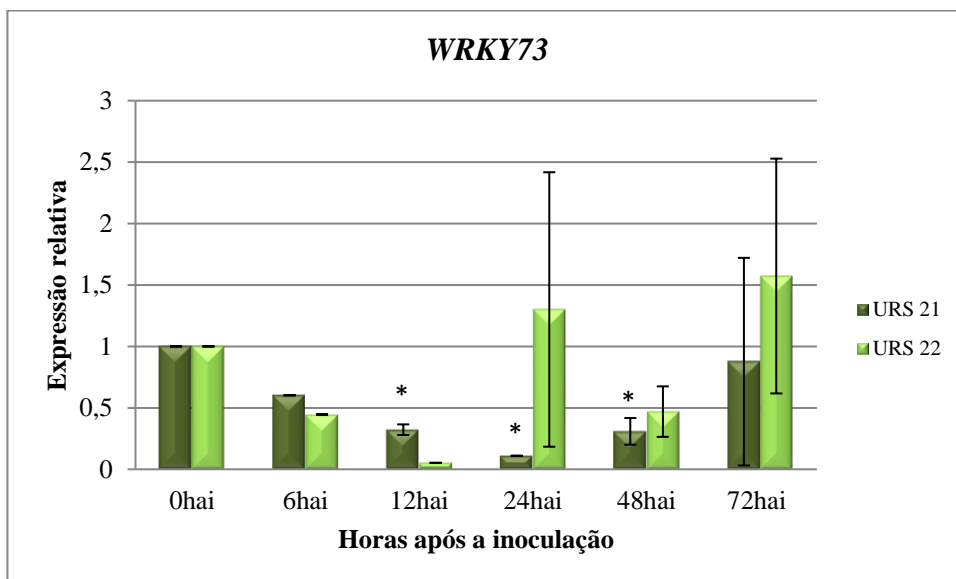


Figura 15. Perfil transcricional da sequência similar ao gene *WRKY73* em plantas adultas de aveia branca, genótipos URS 21 (parcialmente resistente) e URS 22 (suscetível), após inoculação com *P. coronata* em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai. As colunas apresentam a média das replicatas biológicas e as barras o desvio padrão. O asterisco indica diferença estatística pelo teste t a 5% em relação ao tempo zero em cada genótipo. (n=3).

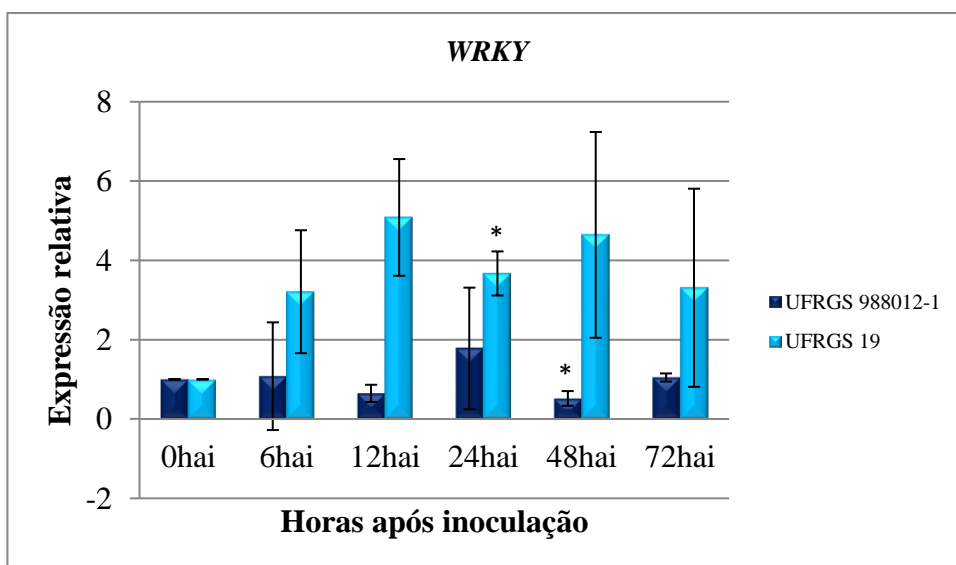


Figura 16. Perfil transcricional da sequência similar ao gene *WRKY* em plantas adultas de aveia branca, genótipos UFRGS 988012-1 (parcialmente resistente) e UFRGS 19 (suscetível), após inoculação com *P. coronata* em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai. As colunas apresentam a média das replicatas biológicas e as barras o desvio padrão. O asterisco indica diferença estatística pelo teste t a 5% em relação ao tempo zero em cada genótipo. (n=3).

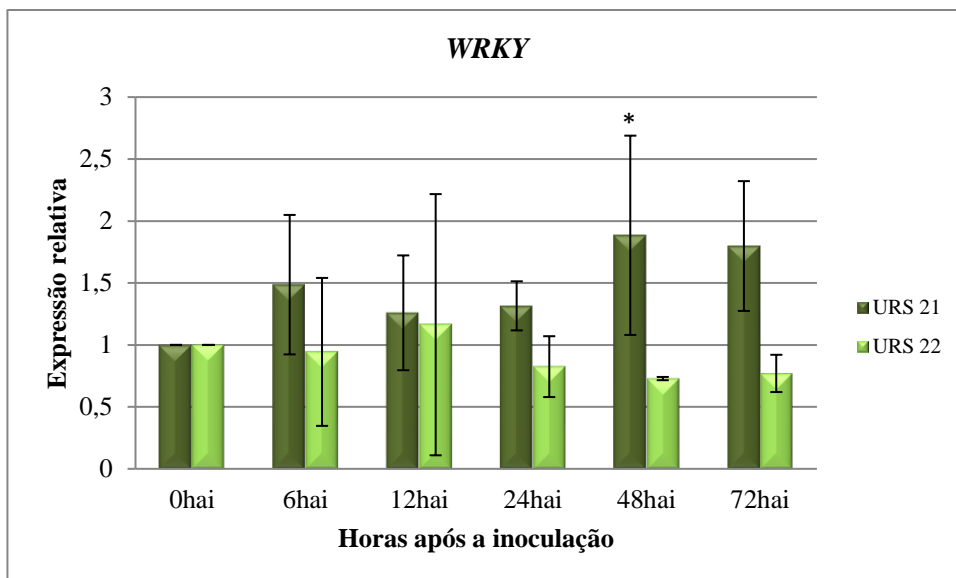


Figura 17. Perfil transcricional da sequência similar ao gene *WRKY* em plantas adultas de aveia branca, genótipos URS 22 (suscetível) e URS 21 (parcialmente resistente), após inoculação com *P. coronata* em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai. As colunas apresentam a média das replicatas biológicas e as barras o desvio padrão. O asterisco indica diferença estatística pelo teste t a 5% em relação ao tempo zero em cada genótipo. (n=3).

Peroxidases são uma classe de enzimas que atuam oxidando moléculas de natureza fenólica. A resistência parcial de URS 21 parece envolver a síntese e peroxidação de compostos fenólicos (Figueiró *et al.*, 2015), portanto uma sequência com elevada homologia a peroxidase e induzida na análise de RNAseq foi avaliada. No genótipo UFRGS 988012-1 não houve diferença significativa quanto à expressão desta. Diferentemente, para o genótipo suscetível UFRGS 19 ocorreu aumento na expressão desta sequência nas primeiras horas após inoculação, sendo este aumento estatisticamente significativo em 6 hai, seguido de retorno aos níveis de expressão originais entre 24 e 72 hai (Figura 18). Nos genótipos URS 21 e URS 22 (Figura 19) não se obtiveram diferenças estatísticas entre os tempos.

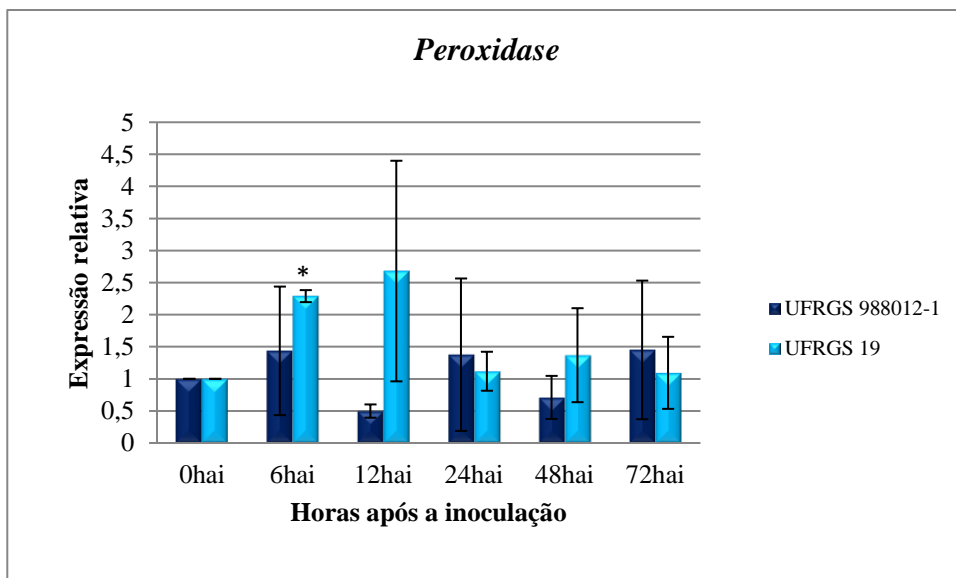


Figura 18. Perfil transcricional da sequência com homologia a peroxidase em plantas adultas de aveia branca, genótipos UFRGS 988012-1 (parcialmente resistente) e UFRGS 19 (suscetível), após inoculação com *P. coronata* em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai. As colunas apresentam a média das replicatas biológicas e as barras o desvio padrão. O asterisco indica diferença estatística pelo teste t a 5% em relação ao tempo zero em cada genótipo. (n=3).

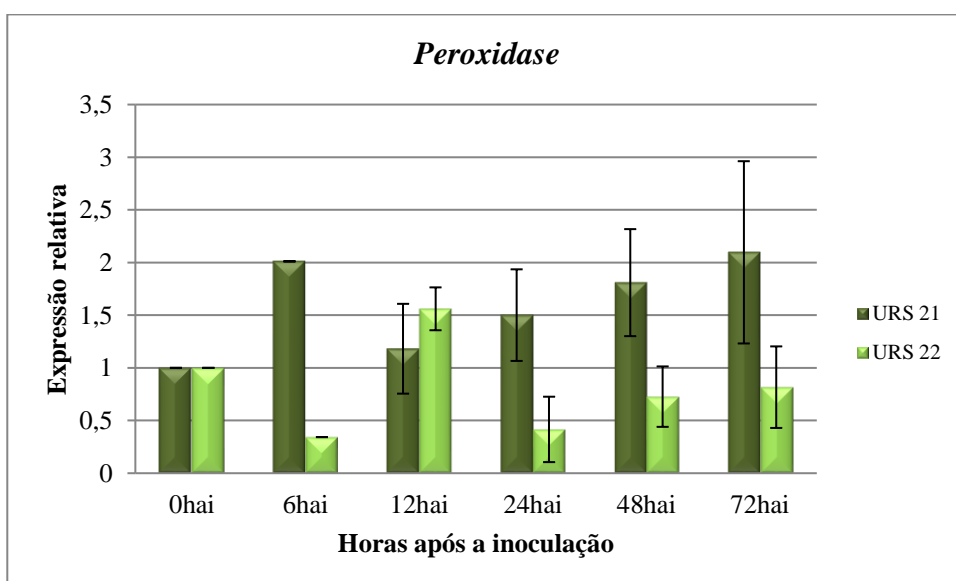


Figura 19. Perfil transcricional da sequência com homologia a peroxidase em plantas adultas de aveia branca, genótipos URS 21 (parcialmente resistente) e URS 22 (suscetível), após inoculação com *P. coronata* em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai. As colunas apresentam a média das replicatas biológicas e as barras o desvio padrão. (n=3).

A expressão de uma sequência similar ao gene de arroz que codifica fenilalanina amônia liase (PAL) também foi avaliada. Essa enzima está envolvida no metabolismo

da fenilalanina que, de acordo com evidências, é um dos aminoácidos que tem o seu metabolismo associado ao fortalecimento das paredes celulares pela produção de compostos fenólicos (Edwards *et al.*, 1985).

No genótipo parcialmente resistente UFRGS 988012-1 ocorreu um decréscimo contínuo da expressão de *PAL* após a inoculação com *P. coronata*, sendo essa redução significativa em 48 e 72 hai. O genótipo suscetível UFRGS 19 apresentou excessiva variação entre as repetições, o que não permitiu diferir significativamente a expressão, apesar de o aumento nominal ter sido superior a quatro vezes (Figura 20).

Ao avaliar essa mesma sequência nos genótipos URS 21 e URS 22, observou-se um comportamento diferente do apresentado pelos genótipos UFRGS 988012-1 e UFRGS 19 em relação à resposta de resistência. Os genótipos mantiveram a expressão constante em todos os períodos avaliados, a exceção de 24 hai, quando URS 22 reduziu a expressão pela metade, e essa redução apresentou diferença estatística (Figura 21). A redução da expressão observada em URS 22 no período entre 6 e 24 hai pode ser uma resposta induzida pelo patógeno para facilitar a penetração dos haustórios, isso porque para esse genótipo Graichen *et al* (2011) observaram o desenvolvimento de hifas inectivas 18 hai com *P. coronata* e, o estabelecimento do haustório foi observado em 24 hai com o patógeno.

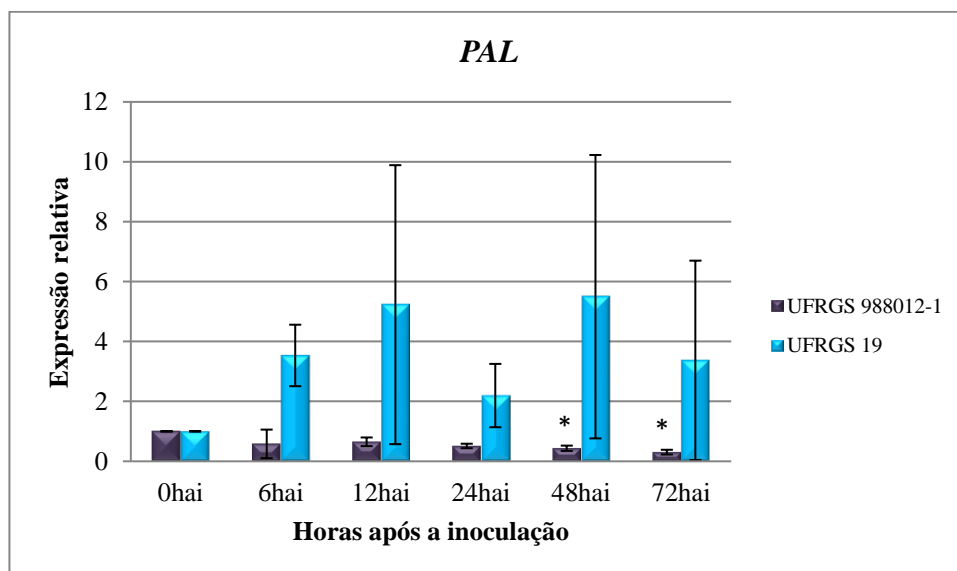


Figura 20. Perfil transcricional da sequência com homologia a fenilalanina amônia liase plantas adultas de aveia branca, genótipos UFRGS 988012-1 (parcialmente resistente) e UFRGS 19 (susceptível), após inoculação com *P. coronata* em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai. As colunas apresentam a média das replicatas biológicas e as barras o desvio padrão. O asterisco indica a diferença estatística pelo teste t a 5% em relação ao tempo zero em cada genótipo. (n=3).

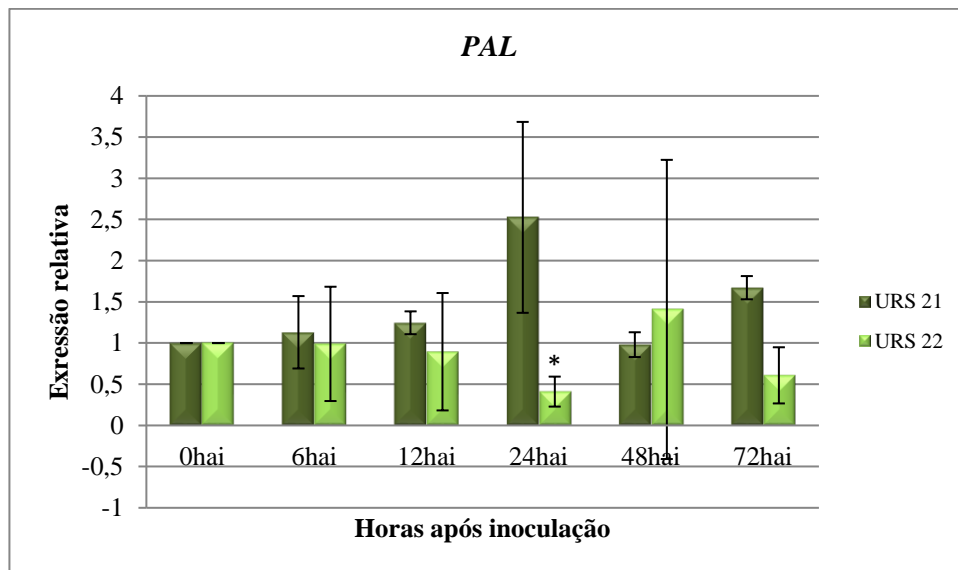


Figura 21. Perfil transcricional da sequência com homologia a fenilalanina amônia liase em plantas adultas de aveia branca, genótipos URS 21 (parcialmente resistente) e URS 22 (suscetível), após inoculação com *P. coronata* em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai. As colunas apresentam a média das replicatas biológicas e as barras o desvio padrão. O asterisco indica a diferença estatística pelo teste t a 5% em relação ao tempo zero em cada genótipo. (n=3).

Dado o possível envolvimento das proteínas MACPF com a produção de calose, bem como facilitando o transporte de metabólitos tóxicos, avaliou-se o perfil transcricional de uma sequência de URS 21 similar a um gene de arroz que codifica uma proteína MACPF.

No genótipo UFRGS 988012-1 observou-se uma redução estatisticamente significativa da expressão dessa sequência em 12 hai. Já na cultivar suscetível à ferrugem da folha UFRGS 19, comportamento contrastante foi observado, onde ocorreu um aumento estatisticamente significativo na expressão deste gene em 24 hai (Figura 22). Em URS 21, um padrão diferente ao apresentado pelo genótipo UFRGS 988012-1 foi obtido, com tendência a aumento da expressão do gene *MACPF* em todos os períodos avaliados, sendo esse aumento estatisticamente significativo em 48 hai. No genótipo suscetível URS 22 não houve diferença estatisticamente significativa da expressão após desafio com *P. coronata* (Figuras 23).

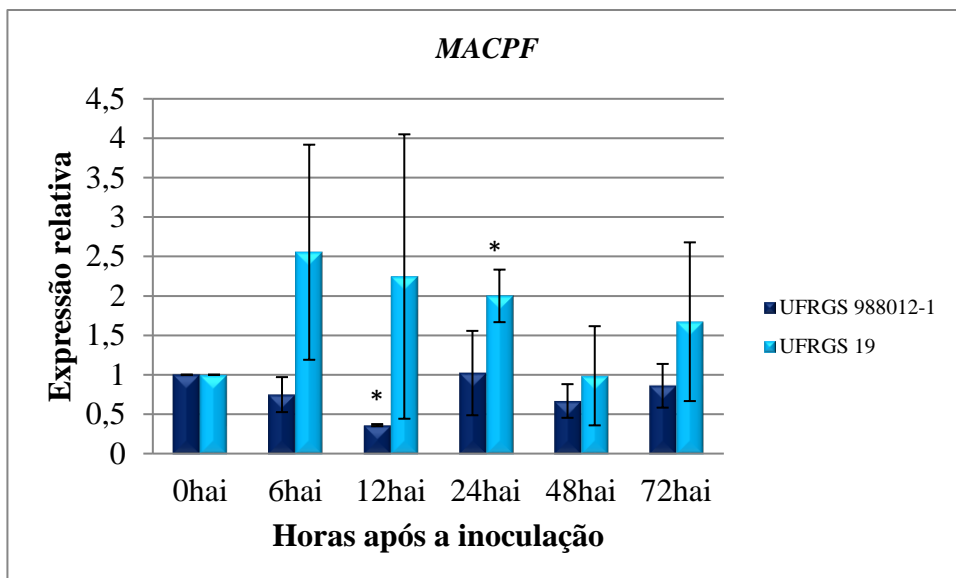


Figura 22. Perfil transcricional da sequência com homologia a uma proteína MACPF em plantas adultas de aveia branca, genótipos UFRGS 988012-1 (parcialmente resistente) e UFRGS 19 (suscetível), após inoculação com *P. coronata* em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai. As colunas apresentam a média das replicatas biológicas e as barras o desvio padrão. O asterisco indica a diferença estatística pelo teste t a 5% em relação ao tempo zero em cada genótipo. (n=3).

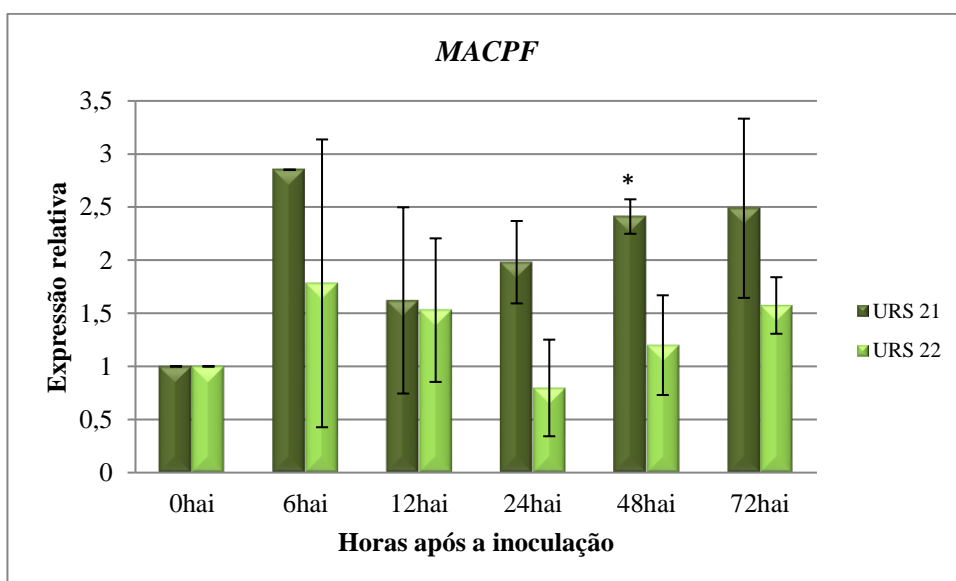


Figura 23. Perfil transcricional da sequência com homologia a uma proteína MACPF em plantas adultas de aveia branca, genótipos URS 21 (parcialmente resistente) e URS 22 (suscetível), após inoculação com *P. coronata* em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai. As colunas apresentam a média das replicatas biológicas e as barras o desvio padrão. O asterisco indica a diferença estatística pelo teste t a 5% em relação ao tempo zero em cada genótipo. (n=3).

Assim como PAL, a enzima chalcona sintase também se encontra envolvida na via de síntese de fenilalanina e, portanto, sequência de URS 21 com similaridade a um gene que codifica essa enzima em arroz foi avaliada. Os quatro genótipos avaliados apresentaram um perfil transcricional similar não havendo alteração significativa na expressão da sequência após o desafio com *P. coronata* (Figuras 24 e 25).

O gene de trigo *Lr34* codifica um transportador ABC (do inglês, *ATP binding cassette*) e confere resistência parcial à ferrugem da folha e à ferrugem estriada, bem como ao oídio (Krattinger *et al.*, 2009). A partir da sequência disponível deste gene (n.º de acesso: FJ436983), iniciadores específicos foram projetados para a avaliação do perfil transcricional deste gene nos genótipos de aveia aqui estudados.

Apesar da sequência original ser de trigo foi possível amplificar nos genótipos de aveia branca. Na linhagem UFRGS 988012-1 observou-se redução na expressão desta sequência, sendo esta redução estatisticamente significativa em 24 e 72 hai. Na cultivar UFRGS 19 apesar de tendência nominal a aumento da expressão deste gene após o desafio com o patógeno, em nenhum período avaliado houve diferença significativa (Figura 26). Houve tendência a aumento da expressão de *Lr34* em todos os horários avaliados para URS 21, sendo esse estatisticamente significativo em 6 e 12 hai. Já no caso do genótipo URS 22, houve uma redução significativa na expressão deste gene em 72 hai com *P. coronata* (Figura 27).

As plantas induzem diversos mecanismos químicos e físicos de defesa quando infectadas por patógenos. Um dos mecanismos físicos é o acúmulo de calose sob a parede celular na região de infecção durante os estágios iniciais de infecção pelo patógeno, objetivando a formação de barreiras impeditivas à infecção (Luna *et al.*, 2011). Plântulas da cultivar URS 21 quando desafiadas por *P. coronata* apresentaram indução de sequências com similaridade a enzima calose sintase em arroz. Uma dessas sequências foi selecionada para a avaliação do perfil transcricional em plantas adultas.

No genótipo parcialmente resistente, UFRGS 988012-1, após a inoculação com *P. coronata*, observou-se uma redução na expressão deste gene em todos os períodos avaliados, sendo esta redução estatisticamente significativa em 6 e 12 hai. A cultivar UFRGS 19, suscetível à ferrugem da folha, não apresentou diferença estatística na expressão desta sequência nos diferentes tempos avaliados (Figura 28).

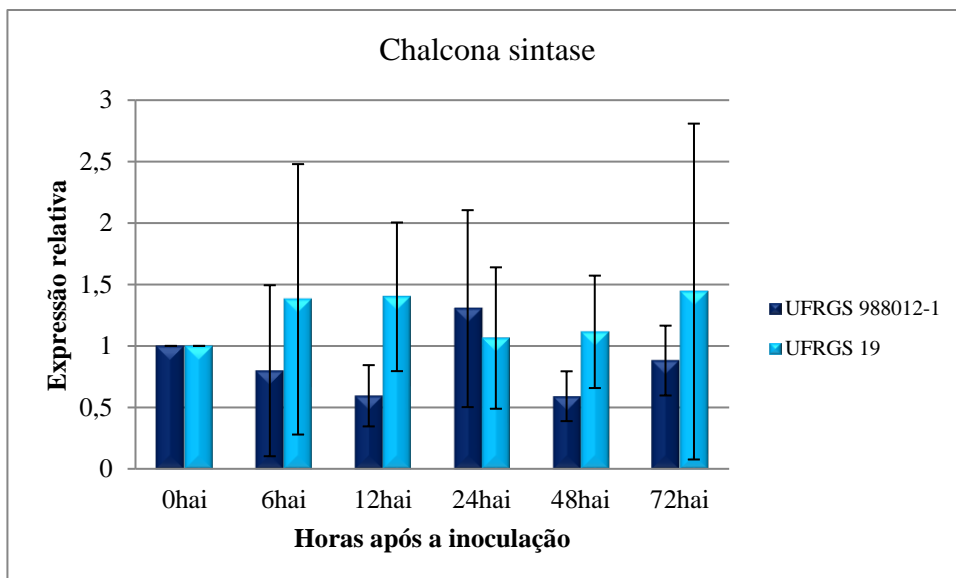


Figura 24. Perfil transcricional da sequência com homologia a enzima chalcona sintase em plantas adultas de aveia branca, genótipos UFRGS 988012-1 (parcialmente resistente) e UFRGS 19 (suscetível), após inoculação com *P. coronata* em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai. As colunas apresentam a média das replicatas biológicas e as barras o desvio padrão. (n=3).

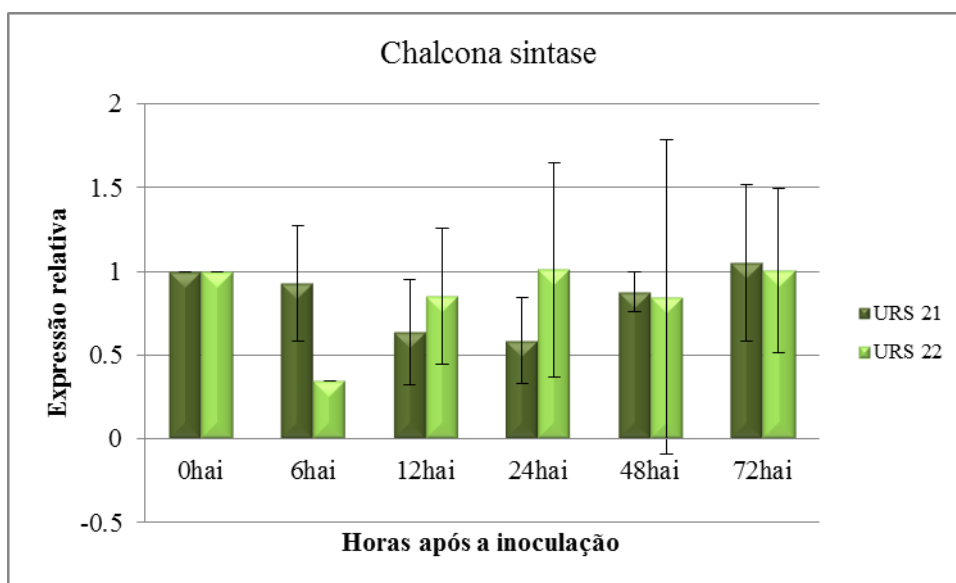


Figura 25. Perfil transcricional da sequência com homologia a enzima chalcona sintase em plantas adultas de aveia branca, genótipos URS 21 (parcialmente resistente) e URS 22 (suscetível), após inoculação com *P. coronata* em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai. As colunas apresentam a média das replicatas biológicas e as barras o desvio padrão. (n=3).

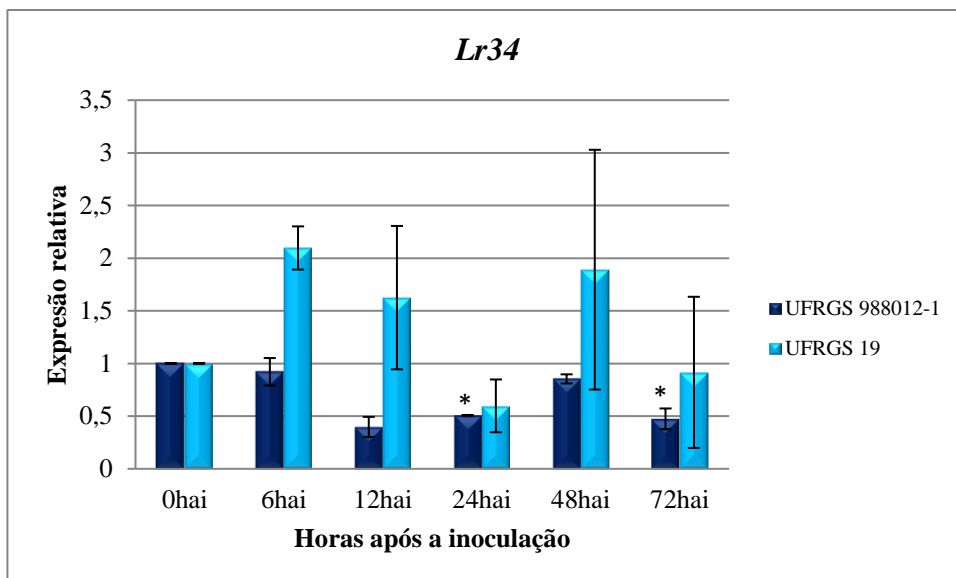


Figura 26. Perfil transcricional da sequência codificante do gene *Lr34* de trigo em plantas adultas de aveia branca, genótipos UFRGS 988012-1 (parcialmente resistente) e UFRGS 19 (suscetível), após inoculação com *P. coronata* em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai. As colunas apresentam a média das replicatas biológicas e as barras o desvio padrão. O asterisco indica a diferença estatística pelo teste t a 5% em relação ao tempo zero em cada genótipo. (n=3).

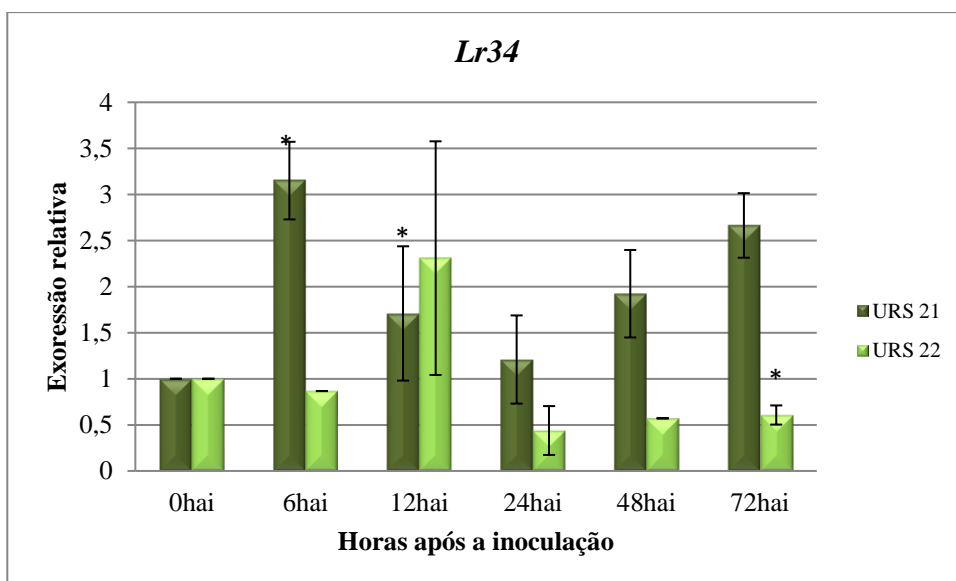


Figura 27: Perfil transcricional da sequência codificante do gene *Lr34* de trigo em plantas adultas de aveia branca, genótipos URS 21 (parcialmente resistente) e URS 22 (suscetível), após inoculação com *P. coronata* em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai. As colunas apresentam a média das replicatas biológicas e as barras o desvio padrão. O asterisco indica a diferença estatística pelo teste t a 5% em relação ao tempo zero em cada genótipo. (n=3).

Quando da obtenção do perfil transcricional desse gene para os genótipos URS 21 e URS 22, apenas se obteve expressão no período de 0 hai (período utilizado como calibrador) para o genótipo URS 21, o que não permitiu a realização do cálculo da expressão gênica relativa para a cultivar URS 22. No entanto, para o genótipo parcialmente resistente, não houve alteração significativa da expressão desse gene (Figura 29) em todos os períodos avaliados após a inoculação com *P. coronata*.

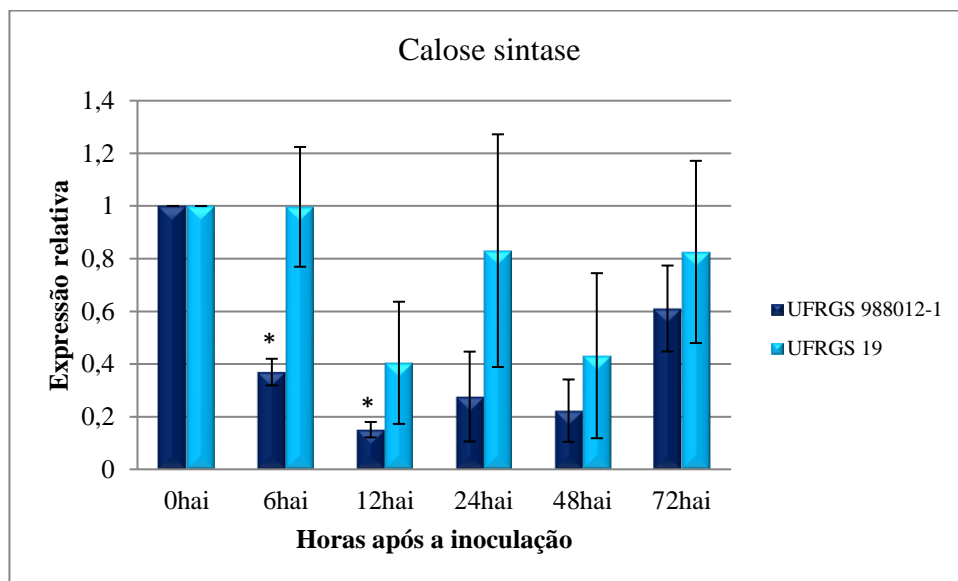


Figura 28. Perfil transcricional da sequência com homologia a enzima calose sintase em plantas adultas de aveia branca, genótipos UFRGS 988012-1 (parcialmente resistente) e UFRGS 19 (suscetível), após inoculação com *P. coronata* em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai. As colunas apresentam a média das replicatas biológicas e as barras o desvio padrão. O asterisco indica a diferença estatística pelo teste t a 5% em relação ao tempo zero em cada genótipo. (n=3).

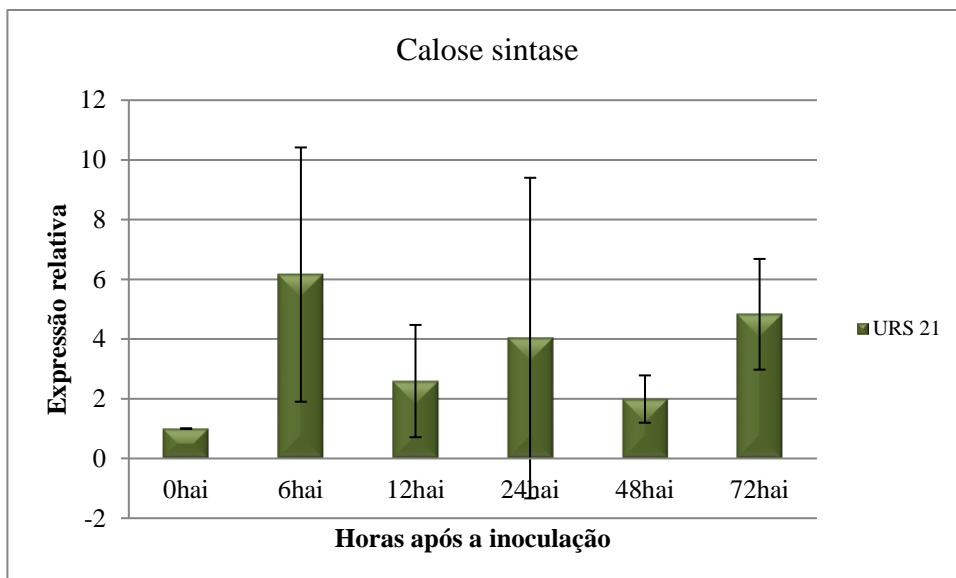


Figura 29. Perfil transcricional da sequência com homologia a enzima calose sintase em plantas adultas de aveia branca, genótipo URS 21 (parcialmente resistente), após inoculação com *P. coronata* em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai. As colunas apresentam a média das replicatas biológicas e as barras o desvio padrão. (n=3).

Os iniciadores projetados a partir da sequência com homologia a uma proteína PDR *like* ABC transportador e a partir da sequência depositada, no NCBI, referente ao gene *MLO* de trigo (n.º de acesso KM017011.1), através da análise da curva de dissociação, não foram específicos. Portanto, essas sequências foram descartadas da análise aqui realizada.

5 DISCUSSÃO

O programa de Melhoramento Genético de Aveia da UFRGS tem como objetivo desenvolver genótipos de aveia branca mais adaptados às condições do Sul do Brasil, bem como resistentes às principais doenças que acometem a cultura, como a ferrugem da folha. Exemplos de cultivares desenvolvidas pelo referido programa são UFRGS 19, URS 21 e URS 22, lançadas comercialmente em 1999, 2000 e 2001, respectivamente. Estas cultivares apresentavam resistência completa à ferrugem da folha quando lançadas, porém atualmente UFRGS 19 e URS 22 encontram-se totalmente suscetíveis e URS 21 parcialmente resistente ao patógeno. Estes genótipos e a linhagem UFRGS 988012-1, a qual ainda apresenta resistência parcial quando cultivada nas condições ambientais do sul do Brasil, foram empregados nesse estudo.

A linhagem UFRGS 988012-1 e a cultivar URS 21 são irmãs, uma vez que foram obtidas a partir do cruzamento entre UFRGS 10 e CTC84B993. Também são irmãs as cultivares UFRGS 19 e URS 22, tendo sido obtidas a partir do cruzamento entre as linhagens UFRGS 841110 e UFRGS 884021-1. A resistência parcial de URS 21 manteve-se no campo durante mais de uma década de cultivo. Levando-se em consideração o elevado grau de parentesco entre os genótipos parcialmente resistentes, considera-se a possibilidade da ocorrência de mecanismos similares que conferem o caráter resistência parcial à ferrugem da folha em UFRGS 988012-1 e URS 21.

A cultivar UFRGS 19 foi empregada como parental suscetível no cruzamento realizado com a linhagem parcialmente resistente UFRGS 988012-1 para a obtenção de população de 167 linhagens recombinantes. As cultivares URS 21 e URS 22, juntamente com UFRGS 988012-1 e UFRGS 19, no estágio de planta adulta, foram utilizadas para a obtenção do perfil transcricional de genes possivelmente associados a resistência parcial à ferrugem da folha da aveia.

A resistência parcial é um tipo de resistência incompleta que, no geral é condicionada por genes de menor efeito sobre o fenótipo. É um tipo de resistência na

qual o hospedeiro, mesmo sendo suscetível à infecção, apresenta baixa taxa de progresso da doença. Assim, a resistência parcial resulta em uma redução na taxa de desenvolvimento da epidemia e não em uma redução da quantidade de inóculo inicial ou no retardo do início do ciclo da doença (Simons, 1972). Essa redução na taxa de desenvolvimento da doença ocorre pela ação combinada dos componentes que condicionam a resistência quantitativa, como um maior período latente, um período infeccioso reduzido, uma menor eficiência de infecção, pústulas com áreas menores e uma redução da esporulação do patógeno (Parlevliet, 1979).

No entanto, para que a resistência parcial possa tanto ser identificada quanto caracterizada em um grupo de genótipos, como as linhagens recombinantes avaliadas neste estudo, é necessária a ocorrência de variabilidade para os componentes que a condicionam. No presente estudo, foi observada elevada variabilidade para o parâmetro epidemiológico ASCPD na população de linhagens recombinantes avaliada ao longo de 2013, 2014 e 2015.

De acordo com Shaner & Finney (1980) (citados por Parlevliet, 1985), o melhor critério que pode ser adotado para avaliar a resistência parcial é a ASCPD. Isso porque a representação gráfica da epidemia, através da curva de progresso da doença, expressa a plotagem da proporção de doença ao longo do tempo. A seleção de genótipos que apresentam resistência quantitativa em programas de melhoramento, embora bastante trabalhosa, deveria ser realizada com base no comportamento desses genótipos a campo pela quantificação da ASCPD, porque esse parâmetro epidemiológico permite posteriormente avaliar a taxa de progresso da doença, que no caso da resistência parcial é esperado ser lento (Wilcoxson, 1981; Parlevliet, 1985).

Analisando-se as ASCPDNC média das 167 linhagens recombinantes e dos parentais parcialmente resistente (UFRGS 988012-1) e suscetível (UFRGS 19), que serviram também como testemunhas para os ensaios, pode-se verificar que, nos anos de 2013 e 2014, a epidemia foi menos severa quando comparado a epidemia que aconteceu no ano de 2015, dado os elevados valores assumidos por essa variável no último ano.

Nos três anos de realização dos ensaios, a epidemia teve início durante o mês de agosto. Porém, em 2015, os sintomas da doença tornaram-se visíveis no início do mês, sendo considerado precoce em comparação com os demais anos, visto que em 2013 e 2014 a epidemia teve início no final de agosto. Tal fato está de acordo com a definição do conceito de resistência parcial, que considera que esta forma de resistência não atua retardando o início da epidemia.

Valores de ASCPDNC semelhantes ao dos parentais no ano de 2013 e 2014 já foram relatados na literatura por Martinelli *et al.* (2009) ao avaliar esse mesmo parâmetro epidemiológico em genótipos suscetíveis à ferrugem da folha UFRGS 14 e UPF 16 e nas linhagens parcialmente resistentes MN 841801, MN 841804 e MN841810 no mesmo ambiente da realização dos ensaios aqui referidos.

A análise comparativa dos gráficos da ASCPDNC para os três anos de avaliação (Figuras 8, 9 e 10) demonstrou que esta medida é extremamente variável entre os genótipos avaliados e essa variação não ocorre de forma linear. Além disso, os dados da ASCPDNC indicam que nos três anos de realização dos ensaios ocorreu uma distribuição contínua entre as linhagens recombinantes que compunham a população, porém tendenciosa para o extremo da resistência. A ASCPDNC média das 167 linhagens apresentou valor mais próximo ao apresentado pelo parental parcialmente resistente do que ao parental suscetível à ferrugem da folha da aveia. Porém, alguns genótipos apresentaram valores da ASCPDNC média superiores ao da cultivar UFRGS 19. Também foi possível identificar genótipos que apresentaram valores de ASCPDNC inferior ao apresentado pelo parental parcialmente resistente e a maioria dos genótipos apresentou um valor de ASCPDNC intermediário entre os parentais. Essa distribuição fenotípica contínua é esperada quando a característica avaliada é de natureza quantitativa (St. Clair, 2010).

Características quantitativas são geralmente controladas por vários genes, os quais podem interagir com o ambiente (St. Clair, 2010). A análise de variância para a ASCPDNC média das 167 linhagens recombinantes demonstrou interação entre o ambiente e os genótipos durante a realização dos ensaios, ou seja, o ambiente influenciou a ASCPDNC apresentada pelos genótipos nos diferentes anos de realização da avaliação. Também foram observadas variações desse parâmetro epidemiológico ao longo de um mesmo ensaio quando comparado a ASCPDNC apresentada por cada uma das três parcelas que compunham cada ensaio, ou seja, ocorreu interação entre o genótipo e o ambiente da parcela em que este genótipo estava localizado no campo.

Para o patossistema cevada x ferrugem da folha, a expressão do caráter resistência parcial parece ser independente do ambiente (Parlevliet & Van Ommeren, 1975). Entretanto, esse não parece ser o caso para o patossistema trigo x ferrugem da folha (Parlevliet, 1988), nem para a interação aveia x ferrugem da folha, como demonstrado aqui.

Fatores ambientais, como por exemplo, a baixa fertilidade do solo e, principalmente, elevadas temperaturas durante o inverno, estão correlacionados com uma maior incidência de ferrugem da folha da aveia (Simons, 1985). Deste modo, o início precoce da epidemia durante o inverno/primavera de 2015, associado às condições ambientais favoráveis, como a ocorrência de temperaturas amenas durante o inverno e os elevados níveis de precipitação registrados durante o ciclo, proporcionaram, além de uma temperatura adequada ao desenvolvimento do patógeno, um maior período de molhamento foliar, favorecendo a germinação dos esporos do patógeno e, por consequência, a ocorrência da doença. Condição ambiental semelhante a que ocorreu em 2015 já foi relatada favorecendo a ocorrência da doença por Chaves *et al.* (2004a) e por Zambonato (2011).

O favorecimento à ocorrência da ferrugem da folha no ano de 2015 pode ser observado pelo valor de ASCPDNC apresentado pelo parental UFRGS 988012-1 (cuja média apresentou valor equivalente a 174,8) valor considerado bastante superior aos valores obtidos para esse parâmetro epidemiológico nos dois anos anteriores (7,77 em 2013 e 4,51 em 2014). Outro parâmetro epidemiológico que pode fornecer evidência quanto ao favorecimento à ocorrência da doença nesse ano é a severidade média das linhagens consideradas resistentes, que atingiu aproximadamente 12% no final do ciclo, e nos anos anteriores esses valores médios não chegaram a 1% (Figuras 5, 6 e 7).

No entanto, mesmo apresentando uma severidade máxima superior em 2015, tanto o parental UFRGS 988012-1 quanto as linhagens classificadas como resistentes apresentaram um progresso lento da doença, quando comparado às linhagens suscetíveis e/ou ao parental suscetível UFRGS 19. Esse progresso lento da epidemia é característica da resistência parcial (Figura 7).

Nos anos de 2013 e 2014, também se observaram condições ambientais favoráveis à ocorrência da doença associadas a uma elevada pressão de inóculo, visto que a severidade média atingiu valores próximos a 100% da área foliar afetada com sintomas de ferrugem da folha em 2013 e cerca de 90% em 2014, tanto para as linhagens suscetíveis quanto para o parental UFRGS 19. Esses dados evidenciam o elevado nível de resistência apresentado pelo parental parcialmente resistente e pelas linhagens recombinantes classificadas como resistentes, as quais nesses anos apresentaram severidade final média próximo a 1%. Assim, sob tais condições, tornou-se possível identificar genótipos que apresentavam diferentes níveis de resistência. Elevado nível de resistência parcial observado nas condições do sul do Brasil foram

relatadas por Wesp *et al.* (2008) ao estudar a herança da resistência quantitativa à ferrugem da folha na linhagem de aveia branca UFRGS 910906.

A resistência parcial é, por alguns autores, utilizada como sinônimo de resistência de planta adulta. No entanto, a resistência de planta adulta é caracterizada por um tipo de reação suscetível (TI equivalente a 3 ou 4) quando plântulas são desafiadas com o patógeno (Parlevliet & Van Ommereen, 1975). Nas linhagens recombinantes obtidas do cruzamento entre UFRGS 988012-1 e UFRGS 19, a avaliação da resistência parcial à ferrugem da folha no estágio de plântula indicou que, aproximadamente, 70% das linhagens apresentaram TI considerado baixo, variando de 0 a 2, o que é indicativo da resistência do hospedeiro. No parental parcialmente resistente, todas as plântulas apresentaram baixo TI. Resultado semelhante foi obtido por Graichen *et al.* (2011) que, ao avaliarem o TI da cultivar URS 21 no estágio de plântula, observaram que esta cultivar apresentava baixo TI e, por consequência um fenótipo resistente.

A linhagem UFRGS 988012-1, portadora do caráter resistência parcial, apresentou resistência as raças de *P. coronata* presentes na região do sul do Brasil durante os três anos de avaliação a campo, apresentando apenas pequena severidade da doença. Essa linhagem também evidenciou resistência no estágio de plântula, o que indica que a resistência presente nesta linhagem é efetiva tanto no estágio de plântula quanto no estágio de planta adulta.

Pela análise dos dados obtidos do parâmetro ASCPDNC, observou-se claramente a estabilidade do caráter resistência parcial apresentada pela linhagem UFRGS 988012-1 e pelas linhagens consideradas resistentes ao longo dos três anos de realização dos ensaios (Tabela 10). Essa estabilidade facilita a seleção contra genótipos que apresentam elevados níveis de severidade a partir do primeiro ano de realização do ensaio. No entanto, também permite a seleção de genótipos que se destacam por apresentarem adequados níveis de resistência, mesmo em condições de ambiente e de pressão de inóculo altamente favoráveis à ocorrência de epidemias severas e com longa duração. Tal estabilidade também é salientada quando considerado o fato de que a linhagem UFRGS 988012-1 é cultivada sob as condições ambientais do sul do Brasil por mais de dez anos.

Com base nos histogramas de distribuição de frequências das 167 linhagens recombinantes e, pelo desenvolvimento de modelos genéticos realizou-se a estimativa do número de locos responsáveis por conferirem o caráter resistência parcial à ferrugem

da folha da aveia. Para o ano de 2013, o modelo genético que melhor ajuste apresentou foi o que compreendeu a presença de quatro locos, enquanto que para os anos de 2014 e 2015, o modelo com três locos foi o que melhor ajuste apresentou às frequências genéticas esperadas e observadas.

Os resultados obtidos demonstram que a resistência parcial à ferrugem da folha expressa pela progênie avaliada ao longo dos três anos é de natureza oligogênica, apresentando dois locos de maior efeito sobre o fenótipo (“A” e “B”). Modelo genético similar foi proposto por Zambonato *et al.* (2012), que investigando a herança da resistência parcial à ferrugem da folha em populações de aveia derivadas do cruzamento das cultivares URS 21 (parcialmente resistente e irmã de UFRGS 988012-1) e URS 22 (suscetível à ferrugem da folha e irmão de UFRGS 19) avaliaram, sob as condições do sul do Brasil seis gerações básicas, as quais eram compostas pelos parentais URS 21 e URS 22, F₁, F₂, cruzamento da F₁ com URS 21 (BC₁) e cruzamento da F₁ com URS 22 (BC₂). Após avaliação da severidade e determinação da ASCPDNC estimou-se que a herança da resistência parcial à ferrugem da folha apresentava natureza oligogênica, sendo conferida por cinco locos (A, B, C, D e E). Dois desses locos apresentavam maior efeito sobre o fenótipo, sendo um deles responsável por conferir a resistência quando na forma recessiva (aa) e o outro loco de maior efeito sobre o fenótipo, atuaria conferindo a resistência quando presente na forma dominante (BB).

Em consequência do parentesco apresentado entre os parentais da população avaliada por Zambonato *et al.* (2012) e os parentais da população aqui avaliada, supõe-se que, assim como para o modelo genético proposto por Zambonato *et al.* (2012), para a população de linhagens recombinantes aqui referida um dos locos de maior efeito sobre o fenótipo encontra-se em caráter recessivo (aa) e os demais locos tornam-se efetivos quando na forma dominante e em combinações específicas. Ainda com base nos resultados obtidos por Zambonato *et al.* (2012), esse loco recessivo é capaz, independentemente da presença e combinação dos demais locos, de conferir o fenótipo de resistência parcial.

No patossistema cevada-ferrugem da folha, o período latente é o componente que mais contribui para a resistência parcial. Ao investigar a herança deste componente, Parlevliet & Van Ommeren (1976) demonstraram que esta é uma característica poligênica, controlada por um gene de maior efeito sobre o fenótipo, o qual quando presente na forma recessiva confere um maior período latente e por mais cinco ou seis genes de menor efeito sobre o fenótipo, porém com herança aditiva.

Tomando por base o citado acima, o loco “A” possivelmente quando presente na forma dominante atue como um regulador negativo da resposta de defesa, ou seja, como um fator de suscetibilidade, e a resistência encontra-se associada com a forma recessiva, ou é conferida por uma mutação com perda de função do mesmo (Eckardt, 2002). Um exemplo bem caracterizado da supressão da resposta de defesa é a proteína transmembrana MLO em cevada, que quando ausente gera resposta de resistência, sendo observada pela rápida formação de aposições sobre a parede celular, que atuam contendo a penetração do fungo no sítio de infecção (Jorgensen, 1992).

No entanto, Graichen *et al.* (2011) ao avaliarem a taxa de infecção de *P. coronata* sobre os genótipos URS 21 e URS 22 não observaram diferenças na área das colônias individuais formadas pelo patógeno, o que indica que o mecanismo que confere resistência ao genótipo URS 21 não previne o desenvolvimento da colônia, porém atua posteriormente, prevenindo ou limitando o desenvolvimento das pústulas e, por consequência, gerando menor densidade de pústulas nesse genótipo.

Assim, o loco “A” poderia atuar de maneira semelhante ao gene *PMR6* de *Arabidopsis*, que codifica uma enzima que atua degradando pectina. A mutação *pmr6* gera ausência da atividade desta enzima e há aumento de pectina nas células da epiderme, o que poderia levar a uma alteração da função do haustório e atuar como um processo de defesa da planta (Vogel *et al.*, 2002).

A diferença observada quanto à inferência do número de locos responsáveis por conferirem o caráter entre 2013 e os demais anos (2014 e 2015) pode ser explicada pela dificuldade encontrada no estabelecimento dos limites entre genótipos parcialmente resistentes e os genótipos considerados intermediários, bem como, entre os genótipos intermediários e os genótipos suscetíveis durante a caracterização fenotípica destes.

Outro fator que pode ter contribuído para aumentar a dificuldade durante a classificação fenotípica foi a ocorrência de outras epidemias, como por exemplo, a presença de *Pyrenophora chaetomioides* Speg, responsável por causar a mancha negra na cultura da aveia.

Contudo, não se pode descartar a hipótese da superação de um dos locos de menor efeito sobre o fenótipo, dado as condições ambientais favoráveis à ocorrência da ferrugem da folha associadas à elevada complexidade das raças de *P. coronata* predominantes na região do sul do Brasil. Estas raças, em média, apresentam 17 genes de virulência por isolado o que resulta numa grande variabilidade de raças, bem como em um elevado número de super raças (Vieira *et al.*, 2007).

Embora a resistência quantitativa não apresente o ciclo de “altos e baixos”, que é característico da resistência qualitativa, a mesma é sensível às condições ambientais, o que dificulta determinar se as raças do patógeno diferem quanto ao grau de virulência para uma mesma cultivar cuja resistência seja quantitativa. Porém, a população patogênica, mesmo submetida a uma menor pressão de seleção diante da resistência parcial evolui objetivando superar a resistência quantitativa (McDonald & Linde, 2002).

A natureza das forças evolutivas que atuam sobre a resistência quantitativa difere das forças que dirigem a resistência qualitativa. A erosão da resistência quantitativa é mais difícil de ser observada, em função da população do patógeno apresentar uma distribuição da patogenicidade que pode variar consideravelmente de ano a ano, em consequência da interação genótipo ambiente (McDonald & Linde, 2002), como ocorreu ao longo da realização deste trabalho. Portanto, a mudança na população patogênica irá ocorrer ano após ano, de maneira gradual, o que não permite a fácil detecção. Entretanto, após inúmeros ciclos de reprodução do patógeno e seleção, o nível de virulência da população irá aumentar e a resistência quantitativa será parcialmente superada.

A análise da genealogia dos genótipos irmãos URS 21 e UFRGS 988012-1, resultantes do cruzamento entre UFRGS 10 e CTC 84B993 demonstra que a resistência parcial apresentada por esses genótipos é proveniente da cultivar UFRGS 10. A cultivar UFRGS 10 é resultado do cruzamento C1217 e Coronado – BCRA. Coronado – BCRA contém em sua genealogia os genitores Black Mesdag e Aberdeen 101 (entre outros). As linhagens de aveia do programa de melhoramento de Minnesota (MN 841801 e MN 841810) quando avaliadas por Martinelli *et al.* (2009), nas condições ambientais do sul do Brasil, apresentaram um padrão estável de resistência à ferrugem da folha e, os resultados da avaliação sugeriram que dois genes estariam conferindo o caráter resistência parcial à linhagem MN 841801. Porém, as linhagens MN também possuem em sua genealogia os genitores Black Mesdag e Aberdeen 101, os quais são considerados possíveis doadores da resistência (Zambonato, 2011), o que induz a pensar se a resistência parcial apresentada pelos genótipos UFRGS 988012-1 e URS 21 é a mesma das linhagens MN 841801 e MN 841810.

Um total de oito QTLs associados à resistência parcial da linhagem MN 841801-1 foram identificados (Acevedo *et al.*, 2010). No entanto, a resistência parcial à ferrugem da folha da linhagem MN 841801-1 parece ser controlada principalmente por quatro QTLs (*Prq1a*, *Prq2*, *Prq7*, e *Prq8*), os quais foram detectados em diferentes

experimentos e através de diferentes formas de avaliação da doença. Esses resultados confirmam a natureza complexa da resistência parcial à ferrugem da folha em genótipos de aveia em função da interação e efeito aditivo de múltiplos QTLs controlando a característica no hospedeiro (Acevedo *et al.*, 2010).

Quando os potenciais marcadores SNPs para diagnosticar a presença do QTL *Pc.crc-14D* foram testados nos genótipos URS 21, URS 22, UFRGS 19, UFRGS 988012-1 e URS F Galope não houve diferença entre esses genótipos, independentemente destes serem imunes, parcialmente resistentes ou suscetíveis à ferrugem da folha, o que indica que esses marcadores SNPs (GMI_DS_LB_6480 e GMI_ES14_c1439_83) não se encontram associados à resistência parcial observada nos genótipos brasileiros aqui avaliados. Assim, possivelmente o QTL identificado por Lin *et al.* (2014) não é o mesmo loco de maior efeito sobre o fenótipo que confere o caráter nas condições do sul do Brasil.

As plantas apresentam uma variedade de mecanismos de defesa e os empregam objetivando proteção contra a infecção por patógenos. Uma característica comum, observada quando da transdução de sinal para a resposta imune vegetal, é a ativação transcricional de um expressivo número de genes após o tecido vegetal ser desafiado com o patógeno (Dong *et al.*, 2003). Atributo observado por Figueiró (2012) ao inocular plântulas da cultivar de aveia URS 21 com o agente casual da ferrugem da folha, *P. coronata*.

Alguns patógenos podem induzir a expressão de genes que codificam proteínas que apresentam função regulatória em vias de transdução de sinal nas respostas de defesa. Os fatores de transcrição pertencentes à família WRKY são considerados os principais reguladores transcricionais relacionados com a expressão de genes associados à defesa. Estudos demonstram que, quando da ocorrência do processo de infecção por um patógeno, tratamento com moléculas elicitoras ou AS, há uma rápida indução à expressão desses fatores de transcrição (Dong *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2015). Outro fator que salienta a importância dessas proteínas na resposta de defesa é o fato destas apresentarem um domínio de 60 aminoácidos altamente conservado, denominado domínio WRKY, o qual liga a região *W-box* ((T)(TGACC/T) à região promotora de genes relacionados à defesa, como os genes PR (Dong *et al.*, 2003). No entanto, devido a redundância funcional, a contribuição individual dos membros individuais dessa família de fatores de transcrição à imunidade é sutil (Bhattarai *et al.*, 2010).

As duas sequências de aveia obtidas por RNAseq em plântulas da cultivar URS 21, anotadas no genoma do arroz como homólogas a fatores de transcrição WRKY, demonstraram resposta diversa. A sequência referida como *WRKY73*, em ambos os genótipos parcialmente resistentes, reduziu sua expressão logo nas primeiras seis horas após o desafio com o patógeno. Comportamento contrário foi observado para os genótipos suscetíveis à ferrugem da folha, sendo que UFRGS 19 apresentou indução nas primeiras seis horas após o desafio com o patógeno, seguida de redução significativa da expressão em 24 hai, enquanto que URS 22 apresentou redução na expressão deste fator de transcrição nas primeiras 12 hai.

A segunda sequência avaliada, denominada apenas *WRKY*, em UFRGS 988012-1 e UFRGS 19 manteve exatamente o comportamento apresentado quando da obtenção do perfil transcricional para a sequência relacionada à *WRKY73*, porém a cultivar URS 21 apresentou aumento da expressão em todos os períodos avaliados, o que confirma a indução da expressão desse gene quando da inoculação com *P. coronata* obtida por Figueiró (2012) em plântulas do mesmo genótipo.

Dado o comportamento da linhagem UFRGS 988012-1 e da cultivar URS 21 ser contrastante se comparado com o das cultivares suscetíveis URS 22 e UFRGS 19 com relação à sequência com homologia à *WRKY73*, sugere-se que para o patossistema aveia x ferrugem da folha esse fator de transcrição possa atuar como um regulador negativo da resposta de resistência, assim como observado para *OsWRKY76* na interação arroz x bruzone (*M. oryzae*). Assim, o aumento da expressão dessa sequência observado nos genótipos suscetíveis pode ser induzido pela ação do patógeno (Yokotani *et al.*, 2013).

Essa diferença observada no padrão de indução desses membros da família de fatores de transcrição WRKY indica que diferentes subconjuntos de membros da família WRKY são regulados por diferentes vias de sinalização durante a ativação das vias de defesa. Ao avaliar a expressão de genes *WRKY*, Dong *et al.* (2003) observaram que alguns membros dessa família foram altamente induzidos quando plantas de *Arabidopsis* foram desafiadas com *Pseudomonas syringae*, enquanto outros membros da família quase não foram detectados. Além disso, outros membros desta família de fatores de transcrição não foram expressos ou não apresentaram alteração na expressão diante do patógeno. Isso possivelmente indica que alguns membros dessa família de fatores de transcrição possam estar envolvidos em processos biológicos outros além da resposta de defesa ou na regulação de genes similares que são expressos em tecidos específicos ou em um estágio de desenvolvimento particular. O envolvimento de

membros da família WRKY na resposta a estresses abióticos tem sido relatado por Ramamoorthy *et al.* (2008), bem como em processos relacionados à senescência foliar, ao desenvolvimento da semente e à quebra de dormência de sementes (Rushton *et al.*, 2010).

Também deve ser considerado o fato que por serem fatores de transcrição, essas proteínas podem atuar como ativadores ou repressores da expressão. Dessa forma, quando observado um aumento da expressão desses fatores de transcrição não necessariamente ocorrerá um aumento linear na expressão dos genes relacionados à defesa (Dupont *et al.*, 2015). E, tanto fatores de transcrição atuando como ativadores quanto como repressores poderão ser requeridos para a formação de uma rede regulatória por *feedback* durante os vários estágios da montagem da resposta de defesa (Dong *et al.*, 2003).

Plantas vasculares normalmente apresentam compostos fenólicos nos vacúolos e no apoplasto. Esses compostos são sintetizados principalmente através do aminoácido fenilalanina pela via do chiquimato e suas concentrações nas células das plantas variam de acordo com as condições fisiológicas e ambientais. Por consequência, a localização destes compostos é restrita a um tipo celular, ou um órgão ou mesmo a uma área particular de um órgão. Assim, esses compostos apresentam várias funções e estas são dependentes de sua localização (Takahama, 2004).

Ao avaliar a produção de compostos fenólicos totais em plântulas de aveia, a cultivar URS 21, quando inoculadas com *P. coronata* no período correspondente as primeiras 24 hai, Figueiró (2012) observou intensa produção destes compostos na epiderme e, se estes compostos fossem do tipo estrutural como as ligninas poderiam atuar dificultando a penetração do fungo.

As plantas apresentam um número grande de isoenzimas peroxidases. Essas enzimas se encontram presentes em folhas, colmos e raízes, e podem ser divididas em duas classes. As pertencentes à classe I localizam-se preferencialmente nos cloroplastos, citosol e peroxissomos, e utilizam o ácido ascórbico como doador de elétrons. A principal função destas enzimas é a detoxificação do H₂O₂ formado nessas organelas (Takahama, 2004).

Ao quantificar os níveis de H₂O₂ na cultivar URS 21 após inoculação com o agente causador da ferrugem da folha, Figueiró *et al.* (2015) observaram uma redução nos níveis de H₂O₂, sugerindo que este poderia ser consumido na peroxidação de compostos fenólicos. Assim, após a inoculação com *P. coronata*, espera-se um aumento

da expressão de peroxidases, o que de fato foi observado quando avaliada a expressão gênica relativa deste gene nos genótipos parcialmente resistentes UFRGS 988012-1 e URS 21, sendo que, no primeiro genótipo o aumento da expressão ficou restrito às primeiras 6 horas após o desafio com o patógeno e um novo aumento foi observado em 24 e 48 hai. Já em URS 21, a indução à expressão deste gene foi observada ao longo de todo o período de avaliação (Figuras 18 e 19).

Indução de 41 sequências com homologia à peroxidases de arroz foram observadas por Figueiró (2012) quando plântulas da cultivar URS 21 foram desafiadas com o agente casual da ferrugem da folha no período de 12 hai. Assim, sugere-se que a ação dessa classe de isoenzimas possa estar envolvida com o mecanismo de resistência parcial à ferrugem da folha, tanto em plântulas quanto em plantas adultas da cultivar URS 21, e em plantas adultas da linhagem UFRGS 988012-1, irmã de URS 21. Dessa forma, sugere-se que a ação de peroxidases, consumindo o H₂O₂ produzido na peroxidação de compostos fenólicos (Figueiró *et al.*, 2015) possa ser uma resposta em comum de URS 21 e UFRGS 988012-1 contra a infecção por *P. coronata*.

O aumento da expressão de peroxidases observado na cultivar UFRGS 19, principalmente nas primeiras 12 hai, pode estar relacionado com o processo de infecção pelo patógeno, e não com a resposta de defesa propriamente dita, visto que para a cultivar URS 22, igualmente suscetível, também se observa um aumento em 12 hai.

Uma das mais bem estudadas respostas de defesa das plantas à infecção por patógenos é o acúmulo de compostos antimicrobianos, de baixo peso molecular, pertencentes ao metabolismo secundário, denominadas fitoalexinas (Hammerschmidt, 1999). Nas plantas, os aminoácidos fenilalanina e triptofano são precursores de um grande número de metabólitos secundários, tais como os alcaloides, flavonoides, fenilpropanoides, polímeros fenólicos, lignina entre outros (Wasaka & Ishihara, 2009). Tanto o triptofano quanto a fenilalanina são sintetizados a partir da via do chiquimato e corismato e a expressão dos genes envolvidos na biossíntese desses aminoácidos é afetada tanto pelo ataque do patógeno quanto pela elicitação ou ferimento mecânico (Mobley *et al.*, 1999).

Folhas de aveia em resposta à infecção por *P. coronata* produzem avenantramidas, as quais são uma série de amidas identificadas como fitoalexinas. As avenantramidas são compostos fenólicos formados tanto pela via da fenilalanina quanto do triptofano (Jones, 1984).

Em plantas, a fenilalanina leva a produção de flavonoides e isoflavonoides, os quais estão associados com as respostas de defesa desencadeadas (Dao *et al.*, 2011). As enzimas fenilalanina amônia liase (PAL; EC 4.3.1.5) e chalcona sintase (CHS; EC 2.3.1.74) são duas enzimas chaves envolvidas na biossíntese de fenilpropanoides, flavonoides e isoflavonoides (Smith & Banks, 1986). A primeira reação dessa via é a desaminação da fenilalanina. A enzima PAL (EC 4.3.1.5) é a enzima que catalisa a conversão de L-fenilalanina a ácido trans-cinâmico, sendo assim considerada chave para a biossíntese de compostos fenólicos (Edwards *et al.*, 1985).

A próxima reação nessa via metabólica é a condensação de uma molécula de ácido cinâmico (ou derivados como o ácido coumárico ou ferúlico) e três moléculas de malonil-CoA, produzindo assim a “naringenin” chalcona pela enzima CHS (EC 2.3.1.74) (Dao *et al.*, 2011). Este passo de condensação é considerado o principal ramo na via de produção dos flavonoides (Campos, 2003).

A expressão de ambas as enzimas, bem como suas atividades, é induzida diante do ataque de patógenos. A atividade de PAL (EC 4.3.1.5) induz à síntese de compostos como a lignina e a ligação de materiais fenólicos à parede celular (Edwards *et al.*, 1985). Enquanto que a enzima CHS (EC 2.3.1.74) auxilia na produção de uma maior quantidade de flavonoides e isoflavonoides com ação de fitoalexinas objetivando a proteção contra patógenos (Dao *et al.*, 2010).

Ao desafiar plântulas de aveia da cultivar URS 21 com *P. coronata* e avaliar o transcriptoma dessas, Figueiró (2012) identificou sequências de aveia com homologia à CHS e sequências com homologia à PAL. Ao avaliar o perfil transcricional de uma sequência de cada uma das enzimas acima mencionadas identificadas por Figueiró (2012), em plantas adultas de aveia branca, observou-se que a expressão de PAL (EC 4.3.1.5) e CHS (EC 2.3.1.74) no genótipo parcialmente resistente URS 21, não apresentou alteração significativa na expressão após o desafio com o patógeno durante as primeiras 72 hai. O padrão de expressão apresentado pelo genótipo, também parcialmente resistente à ferrugem da folha UFRGS 988012-1, foi similar, com tendência a redução na expressão relativa para ambos os genes (PAL e CHS), sendo essa redução significativa para PAL (EC 4.3.1.5) em 48 e 72 hai.

Essa diferença observada quanto ao comportamento de plântulas e plantas adultas para PAL (EC 4.3.1.5) e CHS (EC 2.3.1.74) pode ser devido ao fato de que, em plântulas, ocorre uma preferência pela via da fenilalanina nas primeiras horas após a inoculação com *P. coronata*, levando à biossíntese de flavonoides. Ao passo que plantas

adultas talvez possam empregar a via do triptofano, antranilato ou mesmo a via da fenilalanina para a síntese de avenantramidas ou fenilpropanoides com ação de fitoalexinas.

Ao realizar análise do conteúdo de avenantramidas em plântulas e plantas adultas das cultivares URS 21 e URS 22, Figueiró (2012) sugeriu que a síntese de avenantramidas pode ser peça fundamental para a expressão do caráter resistência parcial em plantas adultas de URS 21. Porém esses compostos não explicam a expressão do caráter no estágio de plântula.

Ao avaliar os componentes histológicos da resistência parcial em plântulas de genótipos de aveia brasileiros, URS 21, UFRGS 04B7113-1 e UFRGS 04B7119-2, Graichen *et al.* (2011) observaram elevada correlação entre a ocorrência da morte das células do hospedeiro e o acúmulo de compostos autofluorescentes e fenólicos. Para a cultivar URS 21, a presença desses compostos fluorescentes não permitiu o desenvolvimento de tecido esporogênico. Resultado similar foi observado para plântulas da cultivar URS 21 no período de 48 hai com *P. coronata* em células da epiderme. Houve acúmulo de compostos fenólicos em plantas adultas de aveia no período entre 24 e 72 hai com *P. coronata* (Figueiró *et al.*, 2015).

Também se deve considerar o fato de que a análise baseada em RT-qPCR foram realizadas em plantas adultas, enquanto que a avaliação do transcriptoma foi realizada no estágio de plântulas. A ocorrência de resultados diferentes para os estádios reforça os indícios de que os mecanismos que conferem a resistência parcial apresentada pela cultivar URS 21 diferem de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta, conforme sugerido por Graichen *et al.* (2011).

As saponinas pertencem a uma grande família de metabólitos secundários que ocorrem em uma ampla gama de espécies de plantas. Essas moléculas são sintetizadas a partir do ácido mevalônico pela via dos isoterpenoides e são derivadas a partir da ciclização de triterpenoides ou esteroides, produtos do 2,3-oxidoesqualeno. São caracterizadas pela sua propriedade surfactante (Osbourn, 2002). Estruturalmente, essas moléculas apresentam grande diversidade e são quimicamente referidas como triterpenos e glicosídeos esteroidais. Apresentam diversas funções as quais variam desde a conferência de propriedades associadas à palatabilidade, como o doce e o amargo, a formação de espumas e emulsificantes, propriedades farmacêuticas e medicinais bem como ação antimicrobiana e inseticida (Vincken *et al.*, 2006).

No geral, os cereais e demais gramíneas apresentam baixos níveis desse metabólito secundário, com exceção da aveia. Isso porque essa espécie sintetiza duas famílias diferentes de saponinas, as avenacosides esteroidais, presentes nas folhas, e as avenacinas triterpenoides localizadas nas raízes (Osbourn, 2002).

Quando da análise do transcriptoma da cultivar URS 21 após desafio com *P. coronata*, se observou a indução de sequências com homologia a cicloartenol sintase, enzima que atua no primeiro passo para a biossíntese de fitosterol, utilizando o óxido esqualeno como substrato (Gas-Pascual *et al.*, 2015), assim indicando a produção de saponinas esteroidais. Ao avaliar a produção de saponinas esteroidais em plantas adultas de URS 21 observou-se elevados níveis dessas moléculas no período de até 72 hai, o que sugere que a biossíntese dessas moléculas também faça parte do mecanismo que confere resistência parcial tanto em plântulas quanto em plantas adultas da cultivar URS 21 (Figueiró, 2012).

Entretanto, se o mecanismo de resistência apresentado por plântulas de URS 21 for o mesmo mecanismo que confere esse caráter em plantas adultas, uma possibilidade é que as sequências de fenilalanina amônia liase e chalcona sintase, selecionadas a partir de plântulas e avaliadas em um estágio de desenvolvimento posterior (após o florescimento da planta), sejam diferentes das sequências induzidas e responsáveis por atuarem na rota da fenilalanina.

Proteínas MACPF são importantes efetores no sistema imune e seus efeitos foram observados primeiramente através de interações com a membrana e com a formação de poros transmembrana. Essas proteínas auxiliam na remoção de células ou microrganismos indesejáveis do organismo através da formação de poros transmembrana na superfície da membrana celular ou via ação de endossomos (Anderluh *et al.*, 2014). Em *Arabidopsis*, através de estudos empregando mutantes *cad1*, que constitutivamente ativam a morte celular e, cujo fenótipo mimetiza as lesões apresentadas pela RH, demonstrou-se que a proteína CAD1 apresenta um papel na reposta de defesa induzida pelo patógeno, atuando no controle da morte celular programada mediada pelo AS. Assim, CAD1 é possivelmente um regulador negativo da imunidade vegetal. A proteína codificada por *CAD1* apresenta um domínio MACPF (Morita-Yamamuro *et al.*, 2005).

Um segundo mutante, novamente isolado de *Arabidopsis*, que também mimetiza lesões necróticas em rosetas e folhas caulinares, *nsl1* (do inglês, *necrotic spotted lesions 1*) e, cujo fenótipo está associado a um retardo no crescimento, também

constitutivamente expressa a resposta de defesa (Noutoshi *et al.*, 2006). Esse mutante acumula elevados níveis de calose e compostos fenólicos autofluorescentes junto às lesões necróticas. O gene *NSLI* codifica uma proteína com 612 aminoácidos que contém o domínio MACPF, e assim como *CADI*, atua como um regulador negativo da morte celular e resposta de defesa (Morita-Yamamuro *et al.*, 2005; Noutoshi *et al.*, 2006).

Para o genótipo URS 21, Figueiró *et al.* (2015) observaram que a morte celular é um importante mecanismo que atua conferindo a reação de resistência parcial a *P. coronata* e, de acordo com Graichen (2009), a morte celular apresentada por esse genótipo está associada ao acúmulo de compostos auto fluorescentes, possivelmente de natureza fenólica. As proteínas MACPF podem estar localizadas na membrana celular ou nas organelas e, pela formação de poros facilitam o transporte dos compostos metabólicos (Noutoshi *et al.*, 2006). Se essas proteínas mediam o transporte dos compostos fenólicos para o local de infecção como sugerido por Figueiró (2012), então o aumento de expressão apresentado pelo gene que codifica uma proteína MACPF observado na cultivar URS 21 é condizente com a possível função dessas proteínas (Figura 23), sendo essas proteínas parte do mecanismo que confere o caráter resistência parcial nesta cultivar. Maior concentração de compostos fenólicos em plantas adultas foi obtida para o período de 48 hai (Figueiró, 2012), o que coincide com o aumento significativo da expressão de MACPF aqui observado, reforçando assim o papel dessas proteínas na resistência parcial apresentada pela cultivar URS 21.

Entretanto, na linhagem UFRGS 988012-1 um padrão de expressão oposto foi observado, o que sugere que possivelmente essas proteínas não estejam associadas a expressão do caráter resistência parcial nessa linhagem. Esse fato pressupõe a ocorrência de mecanismos parcialmente distintos conferindo a resistência parcial nos genótipos URS 21 e UFRGS 988012-1.

A resistência baseada em genes que conferem o caráter de progresso lento da doença tem provado ser uma estratégia usual e promissora para o desenvolvimento de variedades de trigo com resistência durável às ferrugens que atacam essa cultura (Rosewarne *et al.*, 2006). O gene *Lr34* é responsável por conferir resistência em planta adulta à ferrugem da folha, à ferrugem estriada e ao oídio e vem sendo efetivo e empregado em variedades para o controle destas doenças há mais de cem anos (Krattinger *et al.*, 2009; Chauhan *et al.*, 2015). A proteína codificada por *Lr34* é similar a classes de transportadores ABC, subtipo ABCG (Krattinger *et al.*, 2009).

Recentemente, foi demonstrado que quando esse gene é transferido para cevada, o mesmo é capaz de conferir resistência à ferrugem da folha (*P. hordei*) e ao oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*), tanto no estágio de plântula quanto para planta adulta. Da mesma forma que para trigo, o fenótipo de necrose na ponta da folha (LTN, do inglês *leaf tip necrosis*) também foi observado para cevada (Risk *et al.*, 2013; Chauhan *et al.*, 2015). No entanto, o mecanismo molecular pelo qual o gene *Lr34* confere o caráter resistência durável e a múltiplos patógenos, bem como o fenótipo de necrose da ponta ainda são desconhecidos (Chauhan *et al.*, 2015).

Ao avaliar o perfil de expressão relativa do gene *Lr34* (n.º de acesso: FJ436983, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/224365600/>) observou-se um aumento significativo da expressão deste gene para a cultivar URS 21 nas primeiras 12 e 24 hai. Isso levanta a possibilidade de que o mecanismo de resistência parcial conferido por esse gene à planta adulta em trigo (Krattinger *et al.*, 2009) e, sob condições apropriadas, também em plântulas (Dyck & Samborski, 1982), bem como em ambos estádios de desenvolvimento em cevada (Chauhan *et al.*, 2015), possa ser semelhante ao mecanismo que confere a resistência parcial apresentada pela cultivar URS 21, visto que a resistência parcial apresentada por essa cultivar também é observada sendo expressa no estágio de plântula (Graichen, 2011). Comportamento oposto para a expressão relativa dessa sequência ocorreu na linhagem UFRGS 988012-1, dada a redução gradual da expressão deste gene ao longo do período avaliado, indicando que possivelmente este gene não esteja relacionado com a resistência parcial nessa linhagem.

Calose é sintetizada por uma classe de enzimas denominada calose sintase a partir de resíduos de β -1,3 glicose (Chen & Kim, 2009). Ao avaliar o transcriptoma de plântulas da cultivar URS 21 desafiadas com *P. coronata*, Figueiró (2012) observou a indução de sequências com homologia à enzima calose sintase. Esse homopolímero é sintetizado pelas plantas em diversos locais ao longo do desenvolvimento e em resposta a estresses abióticos e bióticos (Verma & Hong, 2001). Em cevada, o gene *Mlo*, quando na forma recessiva, confere resistência pré-haustorial a oídio e o mecanismo histopatológico associado a esse gene é a rápida formação de papila, a qual contém principalmente calose (Jorgensen, 1992).

Ao avaliar a expressão de uma das sequências de calose sintase identificadas por Figueiró (2012), observou-se redução na expressão relativa dessa sequência para a linhagem UFRGS 988012-1 em todos os tempos avaliados se comparado com 0 hai. Comportamento semelhante foi observado para a cultivar UFRGS 19. Na cultivar URS

21, houve aumento na expressão deste gene para todos os tempos de avaliação, porém não foram detectadas diferenças estatísticas. Para o genótipo URS 22 não foi obtido o perfil transcricional para essa sequência.

Em *Arabidopsis thaliana*, doze genes que possivelmente atuam codificando a enzima calose sintase foram identificados. Duas nomenclaturas têm sido adotadas para esses genes, de acordo com cada grupo de pesquisa. O grupo de Verma e colaboradores emprega o sistema de nomenclatura *CalS* (do inglês, *Callose synthase*), sendo os genes denominados *AtCalS1* a *AtCalS12*. O grupo de Somerville e colaboradores se refere aos doze possíveis genes identificados pela sigla *GSL* (do inglês, *Glucan Synthase – like*) e os representam por *AtGSL1* a *AtGSL12* (Chen & Kim, 2009).

Estudos reportaram que *GSL5/PMR4/CaLS12* é responsável pela síntese de calose no tecido esporofítico em resposta ao ataque de patógeno ou a ferimento (Jacobs *et al.*, 2003). Mutantes com perda de função de *GSL5/PMR4/CaLS12* não são capazes de sintetizar calose para a formação da papila e essa depleção de calose nos mutantes *gsl5* conferiu um fenótipo mais resistente ao ataque de patógenos. Esses resultados indicam que a síntese de calose exerce um efeito negativo sobre o sistema de defesa vegetal. Isso porque o acúmulo de calose poderia atuar impedindo a transdução de sinal para desencadear o processo de defesa contra o patógeno. Além disso, a indução à síntese de calose desencadeada pelo patógeno poderia atuar regulando de maneira negativa a via de sinalização dependente do AS (Chen & Kim, 2009).

Diante desses resultados, sugere-se que essa sequência não esteja associada a resistência parcial apresentada pelos genótipos UFRGS 988012-1 e URS 21, e nem à suscetibilidade em UFRGS 19, dado a dupla função que a síntese de calose pode apresentar diante do ataque de patógenos.

Esses resultados em conjunto, demonstram que múltiplos e diferentes mecanismos encontram-se envolvidos com a transdução de sinal e resposta de resistência parcial a *P. coronata* nos genótipos de aveia URS 21 e UFRGS 988012-1 e a durabilidade da resistência parcial apresentada por esses genótipos encontra-se associada a esses múltiplos mecanismos, o que contrasta com a resistência conferida por genes de maior efeito sobre o fenótipo e específicos a uma determinada raça do patógeno.

Além disso, pela obtenção dos perfis transcricionais, sugere-se que os mecanismos responsáveis por conferirem o caráter resistência parcial para o genótipo UFRGS 988012-1 sejam parcialmente diferentes dos mecanismos que conferem esse

caráter para a cultivar URS 21, mesmo quando considerado o elevado grau de parentesco entre esses genótipos. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que mesmo quando cultivadas em um mesmo campo experimental e, por consequência, submetidas à mesma pressão de inóculo e raças de *P. coronata*, a linhagem UFRGS 988012-1 apresenta um maior nível de resistência parcial que a cultivar URS 21, quando comparado a severidade final e/ou a ASCPDNC apresentados pela cultivar URS 21 (dados não apresentados). Ainda, quando da ocorrência de mecanismos em comum para esses genótipos, deve-se levar em consideração a possibilidade do emprego de isoformas distintas de enzimas consideradas chaves para a regulação do processo de defesa.

Com relação à diferença observada entre as respostas apresentadas por plântulas e por plantas adultas, deve-se considerar a possibilidade dos mecanismos que conferem o caráter resistência parcial serem, ou não, os mesmos no dois estádios de desenvolvimento da planta. Também deve-se considerar o fato desses mecanismos serem desencadeados pela ação de isoformas de enzimas distintas ou ainda serem induzidos por rotas distintas de biossíntese compostos associados à resistência.

A via do AS, de maneira geral, encontra-se associada com a regulação das respostas de defesa contra patógenos biotróficos. Enquanto que a via do AJ apresenta um papel na regulação das respostas de defesa contra herbívoros, insetos e patógenos necrotróficos (Pieterse *et al.*, 2014). Entretanto, o AJ está envolvido na sinalização de diversos outros processos, incluindo a resposta a estresses abióticos, e nas vias de reação que balancem a alocação de recursos entre o crescimento e as respostas de defesa (Leone *et al.*, 2014).

A via de sinalização do AJ atua numa rede complexa de vias reguladas pela sinalização hormonal, as quais variam de acordo com as condições ambientais ou com o estágio de desenvolvimento das plantas (Pieterse *et al.*, 2012). As vias de sinalização do AS e do AJ atuam de maneira antagônica uma em relação a outra, e permitem a planta realizar um ajuste fino em resposta à defesa de acordo com o estilo de vida do patógeno e a utilizar os recursos disponíveis de maneira eficiente (Pieterse *et al.*, 2012; Pieterse *et al.*, 2014).

Diante de determinadas situações ambientais, e no processo de balanço entre o crescimento e a resposta de defesa, as giberelinas (GA) regulam diferentes aspectos do crescimento pela ação dos repressores transcricionais DELLAs, que atuam bloqueando a atividade de reguladores transcricionais responsivos a GA, por se ligarem fisicamente

a esses. De maneira similar aos repressores JAZ, proteínas DELLAs são degradadas diante da percepção de GA, o que permite desencadear a resposta a GA. Por ocorrer uma interação física entre DELLAs e JAZs há uma limitação mútua quanto a capacidade desses repressores para se ligarem aos seus respectivos fatores de transcrição (Yang *et al.*, 2012). Assim, por exemplo, quando as plantas encontram-se em competição pela elevada densidade no dossel, a razão vermelho : vermelho extremo é reduzida, as plantas aumentam a dominância apical e investem seus recursos para o crescimento, enquanto se tornam mais suscetíveis ao ataque de patógenos necrotróficos (Leone *et al.*, 2014).

Todavia, quando as plantas não estão submetidas a condições de competição, as proteínas DELLAs atuam promovendo a resistência a patógenos necrotróficos por se ligarem fisicamente a JAZ e assim permitirem que a via de sinalização do AJ, bem como os genes responsivos a esse sejam transcritos (Pieterse *et al.*, 2014). Porém quando do aumento das concentrações de GA, há degradação das proteínas DELLAs, e a ação desse fitohormônio altera o balanço AS/AJ auxiliando na promoção da resposta de defesa a patógenos biotróficos (Navarro *et al.*, 2008).

Isso salienta a importância dos efeitos ambientais sobre a resposta apresentada pelas plantas, bem como o ajuste fino que as plantas realizam, modelando as cascatas de transdução de sinal e a expressão dos genes relacionados a essas. Para a interação ferrugem da folha x aveia, nesse trabalho foi observada a ocorrência de interação entre os genótipos avaliados e o ambiente, tanto nos ensaios realizados a campo quanto em condições controladas, o que ressalta ainda mais a importância do fator ambiente para a expressão do caráter resistência parcial à ferrugem da folha da aveia, um caráter de natureza oligogênica.

Durante a ocorrência de interações biotróficas entre o hospedeiro e o patógeno, a célula vegetal não só serve como hospedeira, mas também como fonte de carbono e outros nutrientes ao patógeno. Assim, a demanda por carbono nos tecidos infectados requer uma compensação através da alocação de carbono dos tecidos fotossintetizantes não infectados. Ou seja, os tecidos infectados apresentam uma elevada força de dreno, o que acarreta em mudanças fisiológicas durante o processo de infecção. Exemplos de alterações são aumento na expressão de transportadores de açúcares da classe SWEET e invertases localizadas nas paredes celulares e vacúolos, os quais facilitarão o descarregamento do floema e o fluxo de açúcar para a região infectada (Lapin & Ackerveken, 2013).

As diferenças observadas quando da análise da expressão das sequências obtidas de plântulas em plantas adultas podem, em parte, ser justificadas pelas alterações que naturalmente ocorrem ao longo do crescimento e desenvolvimento da planta. Isso porque quando plântula os recursos produzidos pela planta são consumidos principalmente objetivando o crescimento, enquanto que no estágio adulto os recursos produzidos e armazenados ao longo do ciclo são destinados ao processo de enchimento de grãos. Assim, quando após o florescimento o processo de competição entre o patógeno e os tecidos drenos é ainda mais salientado, podendo ocasionar alterações não só sobre as rotas do metabolismo primário, mas também sobre as rotas relacionadas com o metabolismo secundário e, assim, interferir com a resposta de defesa apresentada pelas plantas diante do ataque do patógeno.

6 CONCLUSÕES

1. A resistência parcial expressa pela progênie, avaliada nos anos de 2013 a 2015, é de natureza oligogênica, apresentando dois locos de maior efeito sobre o fenótipo, estando um, possivelmente, em caráter recessivo. A diferença de quatro locos inferidos em 2014 para três locos nos demais anos pode ser indicativo da superação de um loco, de menor efeito sobre o fenótipo, pela população do patógeno;
2. O caráter resistência parcial à ferrugem da folha apresentado pela progênie obtida do cruzamento entre UFRGS 988012-1 e UFRGS 19 é expressa tanto em planta adulta quanto no estágio de plântula;
3. A região gênica responsável pela resistência parcial à ferrugem da folha apresentada pela linhagem MN 841801 não é a mesma responsável pela resistência parcial presente nos genótipos brasileiros;
4. A diferença observada entre plântulas e plantas adultas quanto à expressão de genes relacionados ao metabolismo secundário, nas primeiras horas após o desafio com *P. coronata*, sugere que no estágio de plântula ocorre uma preferência pela via da fenilalanina levando à biossíntese de flavonoides, enquanto que, no estágio de planta adulta talvez a preferência seja pela via do triptofano, antranilato, ou mesmo, a via da fenilalanina induzindo a síntese de avenantramidas ou fenilpropanoides com ação de fitoalexinas;
5. O comportamento contrastante apresentado pelos genótipos irmãos URS 21 e UFRGS 988012-1 indica que possivelmente o mecanismo que confere a

resistência parcial possa ser compartilhado parcialmente entre esses genótipos, ou ocorre uma diferença quanto a composição genética destes genótipos;

6. O nível de resistência parcial apresentado pela linhagem UFRGS 988012-1 ao longo do desenvolvimento deste trabalho foi elevado, e se destaca a estabilidade desta característica, a qual se expressa mesmo em anos de severas epidemias, salientando a efetividade dessa forma de resistência.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, M. *et al.* Identification and validation of quantitative trait loci for partial resistance to crown rust in oat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 5, p. 511-521, 2010.
- AGENBAG, G. M. *et al.* Identification of adult plant resistance to stripe rust in the wheat cultivar Cappelle-Desprez. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 125, n. 1, p. 109-120, 2012.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. In: Plant diseases caused by fungi. 5. ed. San Diego: Elsevier, 2005. Cap. 11.
- AHUJA, I.; KISSEM, R.; BONES, A. Phytoalexins in defence against pathogens. **Trends in plant science**, Kidlington, v. 17, n. 2, p. 73-90, 2012.
- ANDERLUH, G. *et al.* In: ANDERLUH, G.; GILBERT, R. (Ed.). **Distribution of MACPF/CDC Proteins**. Dordrecht: Springer Science & Business Media, 2014.
- AUNG, T.; CHONG, J.; LEGGET, M. The transfer of crown rust resistance gene *Pc94* from a wild diploid to cultivated hexaploid oat. In: EUROPEAN AND MEDITERRANEAN CEREAL RUSTS AND POWDERY MILDEWS CONFERENCE, 9., 1996. Netherlands. **Proceedings...** Netherlands: [s.n], 1996. Pp. 167-171.
- BARBOSA, M. M. **Genética e mapeamento molecular da resistência parcial da ferrugem da folha da aveia (*Avena sativa* L.)**. 2002. 113 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós – Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2002.
- BARBOSA, M. M. *et al.* Molecular mapping and identification of QTL's associated to oat crown rust partial resistance. **Euphytica**, Washington, v. 150, n. 1, p. 257-269, 2006.
- BARILLI, E., *et al.* Differential response of pea (*Pisum sativum*) to rusts incited by *Uromyces viciae-fabae* and *U. pisi*. **Crop Protection**, Willoughby, v. 28, n. 11, p. 980–986, 2009.

- BHATTARAI, K. K. *et al.* WRKY72-type transcription factors contribute to basal immunity in tomato and *Arabidopsis* as well as gene-for-gene resistance mediated by the tomato R gene Mi-1. **The Plant Journal**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 229–240, 2010.
- BELKHADIR, Y.; SUBRAMANIAM, R.; DANGL, J. L. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, n. 4, p. 391-399, 2004.
- BELLIN, D. *et al.* Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine ‘Bianca’ is controlled by a major dominant gene causing localized necrosis at the infection site. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 120, n. 1, p. 163-176, 2009.
- BERGAMASCHI, H. *et al.* **Clima da estação experimental da UFRGS e região de abrangência**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. 78 p.
- BERNOUX M.; ELLIS J. G.; DODDS P. N. New insights in plant immunity signaling activation. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 14, n. 5, p. 512–518, 2011.
- BOGDANOVIC, M. *et al.* Reverse transcription of 18S rRNA with poly(dT)18 and other homopolymers. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 31, n. 1, p. 55-63, 2013.
- BOYD, L. A. *et al.* Plant – pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. **Trends in Plant Science - Cell Press**, Cambridge, v. 29, n. 4, p. 233–240, 2013.
- BRAKE, V. M.; IRWIN, J. A. G. Partial resistance of oats to *P. coronata* f. sp. *avenae*. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 43, n. 5, p. 1217-1227, 1992.
- BROWSE J. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 60, p. 183–205, 2009.
- CABRAL, A. L.; PARK, R. F. Seedling resistance to *Puccinia coronata* f. sp. *Avenae* in *Avena strigosa*, *A. barbata* e *A. sativa*. **Euphytica**, Washington, v. 196, n. 3, p. 385-395, 2014.
- CAIERÃO, E. *et al.* Efeito de níveis de severidade e incidência da ferrugem da folha e ferrugem do colmo no rendimento de linhagens de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 43-53, 2001.
- CAMPOS, A. D. *et al.* Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 15, n. 3, p. 129-134, 2003.
- CARSON, M.L.; STUTHMAN, D.D. Does partial resistance exert selection on oat crown rust populations? In: INTERNATIONAL OAT CONFERENCE, 7., 2004, Helsinki. **Proceedings...** Helsinki: Agrifood Researchs, 2004. p. 179.
- CASTRO, G. S. A.; COSTA, C. H. M. da; NETO, J. F. Ecofisiologia da aveia branca. **Scientia Agraria Paranaensis**, Acrelândia, v. 11, n. 3, p. 1-15, 2012.

- CHAVES, M. S. *et al.* Efeito da ferrugem da folha sobre o rendimento e qualidade de grãos em genótipos elite de aveia. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 22., 2002, Passo Fundo. **Resultados Experimentais...** Passo Fundo: [s.n.], 2002. p. 463-470.
- CHAVES, M. S.; MARTINELLI, J. A.; FEDERIZZI, L. C. Resistência quantitativa à ferrugem da folha em genótipos de aveia branca: I – caracterização da resistência em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 39-46, 2004 (a).
- CHAVES, M. S.; MARTINELLI, J. A.; FEDERIZZI, L. C. Resistência quantitativa à ferrugem da folha em genótipos de aveia branca: II – correlação de componentes de resistência entre si e com a intensidade de doença no campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 197-200, 2004(b).
- CHAVES, M. S.; MARTINELLI, J. A.; FEDERIZZI, L. C. Resistência quantitativa à ferrugem da folha em genótipos de aveia branca: III – avaliação de componentes de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 47-55, 2004(c).
- CHAVES, M. S.; MARTINELLI, J. A. Ferrugem da folha da aveia: aspectos epidemiológicos e perspectivas de controle através da resistência genética na região do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 4, p. 397-403, 2005.
- CHAVES, M. S. *et al.* The cereal rusts: an overview. **Pest Technology**, Takamatsu, v. 2, n. 2, p. 38-55, 2008.
- CHAUHAN, H. *et al.* The wheat resistance gene Lr34 results in the constitutive induction of multiple defense pathways in transgenic barley. **The Plant Journal**, Oxford, v. 84, n. 1, p. 202–215, 2015.
- CHEN, G. *et al.* OATS 2000. In: INTERNATIONAL OAT CONFERENCE, 6., 2000, Canterbury, New Zeland. **Proceedings...** Canterbury: Lincoln University, 2000. p. 128-131. 1 CD-ROM.
- CHEN, X. Y.; KIM, J. Y. Callose synthesis in higher plants. **Plant Signaling & Behavior**, Philadelphia, v. 4, n. 6, p. 489-492, 2009.
- CHONG, J.; LEONARD, K. J.; SALMERON, J. J. A North American system of nomenclature for *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 580-585, 2000.
- CHONG, J. *et al.* Virulence of *Puccinia coronata* sp. *avenae* in the eastern Prairie region of Canada during 2007-2009. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 33, n. 1, p. 77-87, 2011.
- CHOI, C. *et al.* Molecular characterization of *Oryza sativa* WRKY6, which binds to W-box-like element 1 of the *Oryza sativa* pathogenesisrelated (PR) 10a promoter and confers reduced susceptibility to pathogens. **New Phytologist**, Londres, v. 208, n. 3, p. 846-859, 2015.

COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA. **Indicações técnicas para a cultura da aveia:** grãos e forrageira. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2006. 82 p.

CONAB. **Safras – grãos:** acompanhamento da safra brasileira. Brasília: Conab, 2013. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_12_14_17_16_boletim_graos_janeiro_2016.pdf>. Acesso em: 20 jan. 16.

DAO, T. T. H.; LINTHORST, H. J. M.; VERPOORTE, L. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. **Phytochemical Review**, Dordrecht. v. 10, n. 3, p. 397-412, 2011.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, London, v. 411, n. 6839, p. 826–833, 2001.

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

DESPRÉS, C. The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 2, p. 279–290, 2000.

DÍEZ-NAVAJAS, A.M. *et al.* Nonhost versus host resistance to the grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*, studied at the tissue level. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 7, p. 776-780, 2008.

DONG, J. *et al.* Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 51, n. 1, p. 21–37, 2003.

DONG, X. NPR1, all things considered. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, n. 5, p. 547–552, 2004.

DRY, I. B. *et al.* Molecular strategies to enhance the genetic resistance of grapevines to powdery mildew. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 16, n. 1, p. 94-105, 2010.

DUPONT, P. Y. *et al.* Fungal endophyte infection of ryegrass reprograms host metabolism and alters development. **New Phytologist**, London, v. 208, n. 4, p. 1227-1240, 2015.

DURRANT W. E.; DONG X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 185-209, 2004.

DURRANT, W. E.; WANG, S.; DONG, X. *Arabidopsis* SNI1 and RAD51D regulate both gene transcription and DNA recombination during the defense response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 6, p. 4223–4227, 2007.

DYCK, P. L.; SAMBORSKI, D. J. The inheritance of resistance to *Puccinia recondita* in a group of common wheat cultivars. **Canadian Journal Genetics Cytological**, Ottawa, v. 24, n. 3, p. 273–283, 1982.

ECKARDT, N. A. Plant disease susceptibility genes? **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 9, p. 1983-1986, 2002.

EDWARDS, K. *et al.* Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington. v. 82, n. 20, p. 6731-6735, 1985.

EULGEM, T. The WRKY superfamily of plant transcription factors. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, n. 5, p. 199-206, 2000.

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 21 jan. 2016.

FEDERIZZI, L. C.; MUNDSTOCK, C. M. Fodder oats: an overview for South America. In: SUTTIE, J. M.; REYNOLDS, S. G. (Ed.). **Fodder oats: a world review**. Roma: FAO, 2004. p. 37-51.

FEDERIZZI, L. C. *et al.* Melhoramento de aveia. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. p. 141-166.

FEDERIZZI, L. C.; PACHECO, M. T. Programa de melhoramento genético de aveia da UFRGS: 35 anos de história. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 29., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009. p. 202-205.

FEDERIZZI, L. C. *et al.* URS Brava – a new oat cultivar with partial resistance to crown rust. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 15, n. 3, p. 197-202. 2015.

FIGUEIRÓ, A. A. **Aspectos moleculares e bioquímicos associados à resistência parcial à ferrugem da folha em *Avena sativa* L.** 2012. 188 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós – Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

FIGUEIRÓ, A. A. *et al.* Reactive Oxygen Species are not Increased in Resistant Oat Genotypes Challenged by Crown Rust Isolates. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 163, n. 10, p. 795-806, 2015.

FLOR, H. H. The complementary genetic system in flax and flax rust. **Advances Genetics**, San Diego, v. 8, p. 29-54, 1956

FLOSS, E. L. Pesquisa de aveia: do acadêmico ao desenvolvimento. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 22., 2002, Passo Fundo.

Resultados Experimentais... Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2002. p. 27-38.

FONTANELI, R. S., *et al.* Gramíneas forrageiras anuais de inverno. In: **Forrageiras para integração Lavoura - Pecuária - Floresta na região Sul Brasileira**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2012.

FORCELINI, C. A. Moléstias de aveia e seu controle. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 22., 2002, Passo Fundo. **Resultados Experimentais...** Passo Fundo: [s.n.], 2002. 742 p.

FORCELINI, C. A.; REIS, E. M. Doenças da aveia. In: KIMATI, H. *et al.* (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agrônoma Ceres, 1997. p. 105-111.

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

GAS-PASCUAL, E. *et al.* Inhibition of Cycloartenol Synthase (CAS) Function in Tobacco BY-2 Cells. **Lipids**, Berlin, v. 50, n. 8, p. 761-772, 2015.

GEIGER, H. H.; HEUN, M. Genetics of quantitative resistance to fungal diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 27, p. 317-341, 1989.

GNANESH, B. N. *et al.* Chromosome location and allele-specific PCR markers for marker-assisted selection of the oat crown rust resistance gene Pc91. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 32, n. 3, p. 679-686, 2013.

GNANESH, B. N. *et al.* Genetic analysis and molecular mapping of a seedling crown rust resistance gene in oat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 128, n. 2, p. 247-258, 2015.

GRAICHEN, F. A. S. **Herança e caracterização da resistência à ferrugem da folha conferida pelo gene Pc 68 em linhagens recombinantes de aveia**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós – Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

GRAICHEN, F. A. S. **Componentes epidemiológicos e histológicos da resistência à ferrugem da folha em genótipos de aveia**. 2009. 130 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós – Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

GRAICHEN, F. A. S. *et al.* Epidemiological and histological components of crown rust resistance in oats genotypes. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 131, n. 3, p. 497-510, 2011.

GREENBERG, J. T.; VINATZER, B. A. Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. **Current Opinion Microbiology**, London, v. 6, n. 1, p. 20-28, 2003.

- GREENBERG, J. T.; YAO, N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 201-211, 2004.
- HAMMERSCHMIDT, R. Phytoalexins: What have we learned after 60 years? **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 285-306, 1999.
- HARDER, D. E.; HABER, S. Oat diseases and pathologic techniques. In: MARSHALL, H. G.; SORRELS, M. E. (Ed.). **Oat science and technology**. Madison: Crop Science Society of American, 1992. p. 307-326
- HARDER, D. E.; HABER, S. Oat diseases and pathologic techniques. In: WELCH, W. R. **The oat crop**. Northern Ireland: Chapman & Hall, 1995. 584 p.
- HEATH, M. C. Resistance of plants to rust infection. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, p. 971-974, 1981.
- HEATH, M. C. Signalling between pathogenic rust fungi and resistance or susceptible host plants. **Annals of Botany**, Ottawa, v. 80, n. 6, p. 713-720, 1997.
- HEATH, M. C. Hypersensitive response – related death. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 44, n. 3, p. 321-334, 2000.
- HEATH, M. C. Cellular interactions between biotrophic fungal pathogens and host or nonhost plants. **Canadian Journal Plant Pathology**, Ontario, v. 24, n. 3, p. 259-264, 2002.
- HEIL, M.; TON, J. Long-distance signaling in plant defence. **Trends in Plant Science - Cell Press**, Cambridge, v. 13, n. 264-273, 2008.
- HERRERA-FOESSEL, S. A. *et al.* *Lr67/Yr46* confers adult plant resistance to stem rust and powdery mildew in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 127, n. 4, p. 781-789, 2014.
- HOLDEN, J. H. W. Oats. *Avena spp* (Gramineae – Aveneae). In: SIMMONDS, N. W. **Evolution of crop plants**. Nova York: Longman, 1979. 339 p.
- HOLLAND, J. B.; MUNKVOLD, G. P. Genetic relationships of crown rust resistance, grain yield, test weight, and seed weight in oat. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 4, p. 1041 – 1050, 2001.
- HU, G. RIJKEDABERG, F. H. J. Scanning electron microscopy of early infection structure formation by *Puccinia recondite* f. sp. *Tritici* on and in susceptible and resistance wheat lines. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, p. 391-399, 1998.
- HUCKELHOVEN, R. *et al.* Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. **Plant Physiology**, Menneapolis, v. 119, n. 4, p. 1251-1260, 1999.

HUMPHRY, M.; CONSONNI, C.; PANSTRUGA, R. *mlo* –based powdery mildew immunity: silver bullet or simply non-host resistance? **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 605-610, 2006.

IAKIMOVA, E.; ATANASSOV, A.; WOLTERING, E. Chemical and pathogen induced programmed cell death in plants. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Abingdon, v. 19, p. 124-138, 2005.

JACOBI, U. S; FLECK, N. G. Avaliação do potencial alelopático de genótipos de aveia no início do ciclo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 11-19, 2000.

JACOBS, A. K. *et al.* An arabidopsis callose synthase, *GSL5*, is required for wound and papillary callose formation. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 11, p. 2503-2513, 2003.

JORGENSEN, J. H. Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley. **Euphytica**, Washington, v. 63, n. 1, p. 141-152, 1992.

JOHNSON, R. A critical analysis of durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 22, p. 309-330, 1984.

JONES, D. H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction and its role in plant development. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 23, n. 7, p. 1349-1359, 1984.

JONES, D. A.; TAKEMOTO, D. Plant innate immunity – direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 16, n. 1, p. 48-62, 2004.

JONES, J D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature Publishing Group**, London, v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006.

KRATTINGER, S. G. *et al.* A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. **Science**, New York, v. 323, p. 1360-1363, 2009.

LADIZINSKI, G. **Studies in oat evolution: A man's life with Avena**. New York: Springer, 2012. 96 p.

LAGUDAH, E. S. *et al.* Molecular genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 114, n. 1, p. 21-30, 2006.

LAGUDAH, E. S. Molecular genetics of race non-specific rust resistance in wheat. **Euphytica**, Washington, v. 179, n. 1, p. 81-91, 2011.

LAPIN, D.; ACKERVEKEN, V. D. Susceptibility to plant disease: more than a failure of host immunity. **Trends in Plant Science - Cell Press**, Cambridge, v. 18, n. 10, p. 546-554, 2013.

- LEFORT F. DOUGLAS G. C. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus*, and *Quercus*. **Annals of Forest Science**, Paris, v. 56, n. 3, p. 259-263, 1999.
- LEONARD, K.J. Oat lines with effective adult plant resistance to crown rust. **Plant Disease**, Saint. Paul, v. 86, n. 6, p. 593-598, 2002.
- LEONARD, K. J.; ANISKSTER, Y.; MANISTERSKI, J. Patterns of virulence in natural populations of *Puccinia coronate* on wild oat in Israel and agricultural populations on cultivated oat in the United States. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, p. 505-514, 2004.
- LEONARD, K. J.; MARTINELLI, J. A. Virulence of oat crown rust in Brazil and Uruguay. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, n. 8, p. 941-948, 2005.
- LEONARD, K. J.; SZABO, L. J. Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 99-111, 2005.
- LEONE, M *et al.* To grow or defend? Low red: far - red ratios reduce jasmonate sensitivity in Arabidopsis seedlings by promoting DELLA degradation and increasing JAZ10 stability. **New Phytologist**, London, v. 204, n. 2, p. 355-367, 2014.
- LIN, Y. *et al.* A major quantitative trait locus conferring adult plant partial resistance to crown rust in oat. **BioMed Central Plant Biology**. London, v. 14, p. 1-11, 2014
- LINARES, C.; FERRER, E. e FOMINAYA, A. Discrimination of the closely related A and D genomes of the hexaploid oat *Avena sativa* L.. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 21, p. 12450-12455, 1998.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, San Francisco. v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LODHI *et al.* A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. **Plant Molecular Biology Reporter**, Nova York, v. 12, n. 1, p. 6-13, 1994.
- LONG, J. *et al.* Responses to selection for partial resistance to crown rust in oat. **Crop Science**, Madison, v. 46, n. 3, p. 1260 -1265, 2006.
- LOSKUTOV, I. G. On evolutionary pathways of *Avena* species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 55, n. 2, p. 211-220, 2008.
- LOSKUTVOV, I. G.; RINES, H. W. Avena. In: KOLE, C. (Ed.). **Wild crop relatives: genomic and breeding resources: Cereals**. New York: Springer, 2011. p. 109-183.
- LOVE, A. J.; MILNER, J. J.; SADANANDOM, A. Timing is everything: regulatory overlap in plant cell death. **Cell Press**, Cambridge, v. 13, n. 11, p. 589-595, 2008.

- LUNA E. *et al.* Callose deposition: a multifaceted plant defense response. **Molecular plant-microbe interaction**, Saint Paul, v. 24, n. 2, p. 183-193, 2011.
- MAKI, K. C. *et al.* Effects of consuming foods containing B-glucan on blood pressure, carbohydrate metabolism and biomarkers of oxidative stress in men and women with elevated blood pressure. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 61, n. 6, p. 786–795, 2007.
- MARSHALL, H. G.; SHANER, G. E. Genetics and inheritance in oat. In: MARSHALL, H. G.; SORRELS, M. E. (Ed.). **Oat science and technology**. Madison: Crop Science Society of America, 1992. p. 756-775.
- MARTINELLI, J. A. *et al.* Redução do rendimento de grão de aveia em função da severidade da ferrugem da folha. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 20, p.110-113, 1994.
- MARTINELLI, J. A. Análise da virulência de alguns isolados de *Puccinia coronata avenae* no Sul do Brasil. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 18., 1998, Londrina. **Resultados experimentais...** Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 1998. p. 17-19.
- MARTINELLI, J. A. Oat diseases and their control. In: SUTTIE, J. M.; REYNOLDS, S. G. (Ed.). **Fodder oats: a world review**. Roma: FAO, 2004. p. 197-214.
- MARTINELLI, J. A. *et al.* Expressão da resistência parcial à ferrugem da folha da aveia presente na linhagem MN841801, no ambiente do Sul do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1335-1342, 2009.
- MATZEMBACHER, R. G. (Coord.). **A cultura da aveia no sistema de plantio direto**. Cruz Alta: FUNDACEP/FECOTRIGO, 1999. 20 p.
- McCARTNEY, C. A. *et al.* Mapping of the oat crown rust resistance gene *Pc91*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 122, n. 2, p. 317–325, 2011.
- McDONALD, B. C.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 349-379, 2002.
- MESTRE, P.; BAULCOMBE, D. C. Elicitor-mediated oligomerization of the tobacco N disease resistance protein. **Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 2, p. 401-501, 2006.
- MISHINA, T. E.; ZEIER, J. Pathogen - associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 50, n. 3, p. 500-513, 2007.
- MOBLEY, E.; KUNKEL, B.; KEITH, B. Identification, characterization and comparative analysis of a novel chorismate mutase gene in *Arabidopsis thaliana*. **Gene**, Amsterdam, v. 240, n. 1, p. 115–123, 1999.

MOHAMED, A. *et al.* Oats protein isolate: thermal, rheological, surface and functional properties. **Food Research International**, Toronto, v. 42, n. 1, p. 107-114, 2009.

MOORE, J. W.; LOAKE, G. J.; SPOEL, S. H. Transcription dynamics in plant immunity. **Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 8, p. 2809–2820, 2011.

MORI, C. *et al.* **Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da aveia**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2012. (Documentos, 136). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do136_1.htm>. Acesso em: Jun.14.

Obs: acrescentar da data de acesso. Ex.: 10 jul. 2016

MORITA-YAMAMURO, C. *et al.* The Arabidopsis Gene CAD1 Controls Programmed Cell Death in the Plant Immune System and Encodes a Protein Containing a MACPF Domain. **Plant & Cell Physiology**, Tokyo, v. 46, n. 6, p. 902–912, 2005.

MURPHY, H. C. Physiologic specialization in *Puccinia coronata avenae*. **Technical Bulletin – USDA**, Iowa, v. 433, 1935.

NAVA, I. C. *et al.* Tagging and mapping candidate loci for vernalization and flower initiation in hexaploid oat. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 30, n. 3, p. 1295-1312, 2012.

NAVARRO, L. *et al.* DELLAs Control Plant Immune Responses by Modulating the Balance of Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling. **Current Biology**, Amsterdam, v. 18, n. 9, p. 650–655, 2008.

NIE, L. *et al.* Avenanthramide, a polyphenol from oats, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and enhances nitric oxide production. **Atherosclerosis**, Zürich, v. 186, n. 2, p. 260-266, 2006.

NIKS, R. E. Haustorium formation by *Puccinia hordei* in levae of hypersensitivity, partially resistant, and nonhost plant genotypes. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 73, p. 64-66, 1983.

NIKS, R. E.; RUBIALES, D. Potentially durable resistance mechanisms in plant to specialised fungal pathogens. **Euphytica**, Washington, v. 124, n. 2, p. 201-216, 2002.

NIMCHUK, Z. *et al.* Recognition and response in the plant immune system. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 37, p. 579-609, 2003.

NISHIMURA, M. T. *et al.* Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. **Science**, Nova York, v. 301, n. 5635, p. 969-972, 2003.

NOUTOSHI, Y. *et al.* Loss of NECROTIC SPOTTED LESIONS 1 associates with cell death and defense responses in Arabidopsis thaliana. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 62, n. 1-2, p. 29–42, 2006.

NÜRNBERGER, T. *et al.* Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. **Immunological review**, Nova York, v. 198, p. 249-266, 2004.

OLIVER, R. E. *et al.* SNP Discovery and Chromosome Anchoring Provide the First Physically-Anchored Hexaploid Oat Map and Reveal Synteny with Model Species. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 3, 2013.

OSBOURN, A. E. Saponins in cereals. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 1–4, 2002.

PAVAN, S. *et al.* Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 25, n. 1, p. 1-12, 2010.

PAJEROWSKA-MUKHTAR, K.; EMERINE, D. K.; MUKHTAR, M. S. Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. **Trends in Plant Science - Cell Press**, Cambridge, v. 18, n. 7, p. 402-411, 2013.

PARLEVLIET, J. E.; VAN OMMEREN, A. Partial resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. II. Relationship between field trials, micro plot tests and latent period. **Euphytica**, Washington, v. 24, n. 2, p. 293-303, 1975

PARLEVLIET, J. E.; VAN OMMEREN, A. Partial resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. III. The inheritance of the host plant effect on latent period in four cultivars. **Euphytica**, Washington, v. 25, n. 1, p. 241-248, 1976.

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

PARLEVLIET, J. E. Race-non-specific disease resistance. In: **Strategies for the control of cereal disease**. Oxford: Blackwell, 1981. p. 47-54.

PARLEVLIET, J. E. Resistance of the non-race specific type. In: BUSHNELL, W.R.; ROELFS, A.P. (Ed.). **The cereal rust**. vol II: Diseases, distribution, epidemiology and control. Orlando: Academic Press, 1985. p. 131-172.

PARLEVLIET, J. E. Strategies for the utilization of partial resistance for the control of cereal rusts. In: SIMMONDS, N. W.; RAJARAM, S. (Ed.). **Breeding strategies for resistance to the rusts of wheat**. México: CIMMYT, 1988, p. 48-62.

PARLEVLIET, J. E. Identification and evaluation of quantitative resistance. In: LEONARD, K. J.; FRY, W. E. (Ed.). **Plant Disease Epidemiology**. Kluwer: Academic Publishers, 1989. p. 215-248.

PARLEVLIET, J. E. Genetic and breeding aspects of durable resistance of crops to pathogens. **African Crop Science Journal**, Kampala, v. 3, n. 1, p. 1.-13, 1995.

PARLEVLIET, J. E. Present concepts in breeding for disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, suplemento, p. 7-15, 1997.

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

PETERSON, D. M. Oat: a multifuncional grain. In: **Agrifod Research Reports**. 2004. 239 p. Disponível em: <<http://jukuri.mtt.fi/bitstream/handle/10024/456663/met51.pdf?sequence=1#page=22>>. Acesso em: jun. 14.
Obs: acrescentar o dia de acesso.

PIETERSE, C. M. J. *et al.* Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell Development Biology**, Palo Alto, v. 28, p. 489-521, 2013.

PIETERSE, C. M. J. *et al.* Different shades of JAZ during plant growth and defense. **The New Phytologist**, Oxford, v. 204, n. 2, p. 261-264, 2014.

PINK, D. A. C. Strategies using genes for non-durable disease resistance. **Euphytica**, Washington, v. 124, n. 2, p. 227-236, 2002.

PINTO, K. M. S. *et al.* Efficiency of resistance elicitors in the management of grapevine downy mildew *Plasmopara viticola*: epidemiological, biochemical and economic aspects. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 134, n. 4, p. 745-754, 2012.

PIRSELOVÁ, B.; MATUSIKOVA, I. Callose: the plant cell wall polysaccharide with multiple biological functions. **Acta physiologiae plantarum**, Warszawa, v. 35, n. 3, p. 635-644, 2013.

PRETORIUS, Z. A. *et al.* Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr31* in *Puccinia graminis* f. sp. *Tritici* in Uganda. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 2, p. 203, 2000.

RAMAMOORTHY, R. *et al.* A Comprehensive Transcriptional Profiling of the WRKY Gene Family in Rice Under Various Abiotic and Phytohormone Treatments. **Plant & Cell Physiology**, Tokyo, v. 49, n. 6, p. 865-879, 2008.

RISK, J.M. *et al.* The wheat *Lr34* gene provides resistance against multiple fungal pathogens in barley. **Plant Biotechnology**, New Jersey, v. 11, n. 7, p. 847-854, 2012.

ROELFS, A. P. Epidemiology in North America. In: ROELFS A.P.; BUSHNELL W.R. (Ed.). **The cereal rusts**. Volume II: Diseases, distribution epidemiology and control. Orlando: Academic Press, 1985. p. 403-434.

ROSEWARNE, G. M. *et al.* Leaf tip necrosis, molecular markers and β 1-proteasome subunits associated with the slow rusting resistance genes *Lr46/Yr29*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 3, p. 500-508, 2006.

RUSHTON, P. J. *et al.* WRKY transcription factors. **Trends in plant science**, Kidlington, v. 15, n. 5, p. 247-258, 2010.

SANTOS, R. S. **Herança da resistência parcial à ferrugem da folha em seis populações de aveia (*Avena sativa* L.)**. 2009. 154 f. Dissertação (Mestrado) – Programa Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SANTNER, A.; ESTELLE, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. **Nature**, Londres, v. 459, n. 7250, p. 1071–1078, 2009.

SANZ, M. J. *et al.* Identification of RFLP and NBS/PK profiling markers for disease resistance loci in genetic maps of oats. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 126, n. 1, p. 203–218, 2013.

SATHEESKUMAR, S. *et al.* Genetic association of crown rust resistance gene *Pc68*, storage protein loci, and resistance gene analogues in oats. **Genome**, Ottawa, v. 54, n. 6, p. 484-497, 2011.

SCHOLES, J. D.; ROLFE, S. A. Photosynthesis in localized regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. **Planta**, Berlin, v. 199, n. 4, p. 573-582, 1996.

SIMONS, M. D. Polygenic resistance to plant disease and its use in breeding resistance cultivars. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 1, n. 3, p. 232-240, 1972.

SIMONS, M. D. Crown rust. In: BUSHNELL, W.R.; ROELFS, A.P. (Ed.). **The cereal rust**. vol II: Diseases, distribution, epidemiology and control. Orlando: Academic Press, 1985. p. 131-172.

SINGH, R. P.; HUERTA-ESPINO, J.; RAJARAM, S. Achieving near-immunity to leaf and stripe rusts in wheat by combining slow rusting resistance genes. **Acta phytopathologica et entomologica Hungarica**, Budapeste, v. 35, n. 1, p. 133-139, 2000.

SMITH D. A.; BANKS, S. W. Biosynthesis, elicitation and biological activity of isoflavonoid phytoalexins. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 25, n. 5, p. 979-995, 1986.

SONG, J. DNA repair proteins are directly involved in regulation of gene expression during plant immune response. **Cell Host Microbe**, Cambridge, v. 9, n. 2, p. 115–124, 2011

SPOEL S. H. Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. **Cell**, Cambridge, v. 137, n. 5, p. 860–872, 2009.

St.CLAIR, D. A. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 247-268, 2010.

STRECK, E. V. *et al.* **Solos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: EMATER-RS, 2008. 222 p.

SZABO, L. J.; BUSHNELL, W. R. Hidden robbers: The role of fungal haustoria in parasitism of plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington D. C., v. 98, n. 14, p. 7654–7655, 2001.

- TAKAHAMA, U. Oxidation of vacuolar and apoplástico phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reaction. **Phytochemistry Reviews**, London, v. 3, p. 207-219, 2004.
- TAKKEN, F. L. W.; ALBRECHT, M.; TAMELING, W. I. L. Resistance proteins: molecular switches of plant defence. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, n. 4, p. 383-390, 2006.
- TAVARES, M. J. C. M. S. *et al.* Origem e evolução do gênero *Avena*: suas implicações no melhoramento genético. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 499-507, 1993.
- TORMELIN, J. R.; HOWELL, T. A. DISTRAIN: a computer program for raining people to estimate severity on cereal leaves. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 72, p. 455-459, 1998.
- THOMAS, C. A.; BLOUNT, V. L. Race D of *Phytophthora phaseoli*. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v. 60, p. 308, 1976.
- THOMAS, H. Cytogenetics of avena. In: MARCHALL, H. G.; SORRELS, M. E. (Ed.). **Oat Science and technology**. Madison: Crop Science of America, 1992. p. 473-507.
- THOMÉ, G. C. H.; MILACH, S. C. K.; FEDERIZZI, L. C. Resistência parcial à ferrugem da folha em genótipos de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 393-398, 2001.
- VALE, F. X. R.; PARLEVLIET, J. E.; ZAMBOLIM, L. Concepts in plant disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 577-589, 2001.
- VERMA, D. P. S.; HONG, Z. Plant callose synthase complexes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, n. 6, p. 693-701, 2000.
- VIEIRA, E. A. *et al.* Virulence variability of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* isolates collected in three counties from Rio Grande do Sul State, Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, n. 1, p. 66-7-, 2007.
- VINCKEN, J. P. *et al.* Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 68, n. 3, p. 275-297, 2006.
- VOGEL, J. *et al.* *PMR6*, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 9, p. 2095-2106, 2002.
- VOEGELE, R. T. V.; MENDGEN, K. Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. **New Phytologist**, Cambridge, v. 159, n. 1, p. 93-100, 2003.
- YANG, Q. *et al.* Analysis of the Involvement of Hydroxyanthranilate Hydroxycinnamoyltransferase and Caffeoyl-CoA 3-O-Methyltransferase in Phytoalexin Biosynthesis in Oat. **Molecular plant-microbe interactions**, Saint Paul, v. 17, n. 1, p. 81-89, 2004.

- YANG, D. L. *et al.* Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Boston, v. 109, n. 19, p. E1192-E1200, 2012.
- YAO, N. *et al.* Apoptotic cell death is a common response to pathogen attack in oats. **Molecular Plant - Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 10, p. 1000-1007, 2002.
- YIRGOU, D.; CALDWELL, R. M. Stomatal penetration of wheat seedlings by stem and leaf rust – effect of light and carbon dioxide. **Science**, New York, v. 141, n. 3577, p. 272-273, 1963.
- YOKOTANI, N. *et al.* WRKY76 is a rice transcriptional repressor playing opposite roles in blast disease resistance and cold stress tolerance. **Journal of Experimental Botany Advance Access**, Oxford, v. 64, n. 16, p. 1-13, 2013.
- YU, G; BRAUN, E.; WISE, R. P. *Rds* and *Rih* mediated hypersensitive cell death independent of gene-for-gene resistance to the oat crown rust pathogen *Puccinia coronata* f. sp. *Avenae*. **Molecular Plant - Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, n. 12, p. 1376-1383, 2001.
- WANG P. *et al.* Isolation of resistance gene analogs from grapevine resistant to downy mildew. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 150, p. 326-333, 2013.
- WASAKA, K.; ISHIHARA, A. Metabolic engineering of the tryptophan and phenylalanine biosynthetic pathways in rice. **Plant Biotechnology**, New Jersey, v. 26, n. 5, p. 523–533, 2009
- WESP, C. L. *et al.* Herança da resistência quantitativa à ferrugem da folha em linhagens recombinantes de aveia branca. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 138-147, 2008.
- WILCOXSON, R. D. Genetics of slow rusting in cereals. **The American Phytopathological Society**, Saint Paul, v. 71, n. 9, p. 989-993, 1981.
- WISE, M. L. Effect of chemical systemic acquired resistance elicitors on avenanthramide biosynthesis in oat (*Avena sativa*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 13, p. 7028-7038, 2011.
- WOLDEAB, G. *et al.* Variation in partial resistance to barley leaf rust (*Puccinia hordei*) and agronomic characters of Ethiopian landrace Lines. **Euphytica**, Washington, v. 158, n. 1, p. 139-151, 2007.
- ZAMBONATO, F. **Caracterização fenotípica e genética da resistência parcial à ferrugem da folha em aveia (*Avena sativa* L.)**. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Programa Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

ZAMBONATO, F. *et al.* Phenotypic and genetic characterization of partial resistance to crown rust in *Avena sativa* L. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 12, n. 4, 2012.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, New York, v. 23, n. 4, p. 283-333, 2005.

ZIPFEL, C.; FELIX, G. Plants and animals: a different taste for microbes? **Opinions in Plant Biology**, Bélgica, v. 8, n. 4, p. 353-360, 2005.

8 VITA

Andriele Wairich é filha de Bernardete Araldi e Altair Wairich. Nasceu em Bento Gonçalves-RS em 13 de janeiro de 1989.

Cursou o primeiro e segundo grau no Colégio Cenecista São Roque, em Bento Gonçalves. Em 2009, ingressou no curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Campus em Bento Gonçalves. Em 2012, iniciou como bolsista de iniciação científica no Laboratório de Genética Molecular Vegetal, na Embrapa Uva e Vinho, sob orientação do pesquisador Luís Fernando Revers.

Graduou-se em fevereiro de 2014 e, no mesmo mês, ingressou no curso de Mestrado em Fitotecnia, com ênfase em Melhoramento Vegetal e Biotecnologia do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre-RS, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).