

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

HISTOPATOLOGIA DA INTERAÇÃO *Triticum aestivum* x *Magnaporthe oryzae*

Marciele Barbieri
Engenheira Agrônoma / UFSM

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase Fitopatologia

Porto Alegre (RS), Brasil,
Abril de 2016.

CIP - Catalogação na Publicação

Barbieri, Marciele
HISTOPATOLOGIA DA INTERAÇÃO *Triticum aestivum* x
Magnaporthe oryzae / Marciele Barbieri. -- 2016.
69 f.

Orientador: José Antônio Martinelli.
Coorientadora: Márcia Soares Chaves.

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

1. Apressórios Melanizados. 2. Resistência. 3.
Magnaporthe oryzae. 4. Trigo. I. Martinelli, José
Antônio, orient. II. Soares Chaves, Márcia, coorient.
III. Título.

MARCIELE BARBIERI
Engenheira Agrônoma - UFSM

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: 29.04.2016
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 25.04.2017
Por

JOSÉ ANTÔNIO MARTINELLI
Orientador - PPG Fitotecnia

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

RENATA PEREIRA DA CRUZ
PPG Fitotecnia/UFRGS

EDSON BERTOLINI
PPG Fitotecnia/UFRGS

GISELE ABIGAIL MONTAN TORRES
EMBRAPA Trigo
Passo Fundo/RS

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de
Agronomia

Aos meus pais, Adelino e Lígia.
Ao meu namorado, Gabriel, por estar sempre ao meu lado.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, e ao corpo docente pelos ensinamentos transmitidos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Antônio Martinelli, pelo suporte, pelos ensinamentos, amizade, incentivos e orientação no decorrer de todo o mestrado.

À minha co-orientadora, Dra. Márcia Soares Chaves, pela amizade, ensinamentos, dedicação para a realização do projeto de pesquisa.

À pesquisadora da Embrapa Trigo, Dra. Gisele A. M. Torres, pela oportunidade de participar do projeto sob sua liderança, “Estratégias integradas de caracterização da resistência de trigo à brusone”, do qual este trabalho é parte integrante.

Ao professor Dr. Felipe A. S. Graichen, pela amizade, incentivos e ajuda no projeto de pesquisa.

Ao Dr. John H. McDonald pelo suporte nas análises estatísticas desse trabalho.

Aos meus pais Adelino e Lígia, pelos conselhos, estímulo e apoio durante todo esse período.

Aos meus irmãos, Fábio e Elizandra, e ao meu cunhado Marcos Uliana, por terem ajudado e realizado tarefas na nossa propriedade, onde, muitas vezes, seria minha função.

Ao meu namorado, Gabriel, por todo companheirismo, carinho, muito incentivo a minha profissão, ao mestrado, às palavras de conforto. E por toda sua dedicação em cuidar dos meus negócios familiares e pessoais.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Márcia Peripolli, Geísa Finger, Sara Hartke, Gerarda Pinto, Bruna Pozzebon, Priscila Pires, Priscila Saraiva, pelo companheirismo, amizade, pela força e incentivos durante todo esse tempo.

Aos amigos e todas aquelas pessoas que, mesmo não mencionadas, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos à Marciele Barbieri e também pelo apoio financeiro através dos projetos 479276/2012-9 MCT/CNPq - N ° 14/2012 – Universal

(Investigação histopatológica da interação *Triticum aestivum* x *Magnaporthe oryzae*), sob Coordenação do Prof. José Antônio Martinelli – UFRGS.

À Embrapa pelo apoio financeiro através do projeto 02.11.08.004.00.00 Wheat BGIN2 (Wheat Blast Genes Interaction-projeto 2; vigência abril/2012 a dezembro/2016 (Estratégias integradas de caracterização da resistência de trigo à brusone), sob Coordenação da Dra. Gisele Abigail Montan Torres – Embrapa Trigo.

Ao Laboratório de Cereais de Inverno do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo suporte na execução dos experimentos.

Muito obrigada

HISTOPATOLOGIA DA INTERAÇÃO *Triticum aestivum* x *Magnaporthe oryzae*¹

Autor: Marciele Barbieri

Orientador: José Antônio Martinelli

RESUMO

O trigo é o segundo cereal mais produzido no mundo, com significativo peso na economia agrícola global. No Brasil, o trigo é cultivado nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. A brusone, conhecida pelos danos causados à cultura do arroz, também denominada de branqueamento das espigas, consiste em uma das principais doenças fúngicas presentes em trigo no Brasil. A partir dessa problemática na cultura do trigo buscou-se investigar a interação entre *Triticum aestivum* e o patógeno *Magnaporthe oryzae* utilizando como principal ferramenta de estudo a histopatologia. Foram investigadas as quatro cultivares de trigo Anahuac, BR18, BRS229 e Ônix. As plantas de trigo foram inoculadas na sexta (6^a) folha com o isolado de *M. oryzae* Py 145, oriundo do arroz, ajustada a concentração de esporos para 1×10^5 esporos por ml. Após esse período, as plantas foram acondicionadas em uma câmara úmida, no escuro, por 24 horas. Amostras de segmentos de folhas de 2,5 cm cada foram imediatamente submetidas às reações de fixação e preparo para exame de microscopia de luz e fluorescência. Os parâmetros avaliados foram germinação de esporos, formação de apressórios, penetração, formação de colônias, morte celular e formação de papilas nos tempos de coleta 6, 12, 18, 24, 36, 48 e 72 horas após a inoculação (hai). A análise estatística foi feita pelo Teste Exato de Fisher, com correções de Bonferroni. A germinação de esporos nas cultivares manteve-se constante a partir de 12 hai. Quanto à formação de apressórios, todas as cultivares produziram apressórios melanizados. A partir de 36 hai obteve-se uma elevação na infecção das células. Em 48 hai observou-se uma maior invasão das hifas infectivas sobre diversas células do hospedeiro, destacando-se um percentual elevado de formação de colônias na cultivar suscetível Anahuac, com 71%. A cultivar BR18 apresentou morte celular crescente para todos os horários, diferindo em 48 hai das demais cultivares para esse parâmetro. A cultivar Ônix foi a única a desenvolver papilas como estruturas de resistência em 72 hai. Os resultados deste trabalho sugerem a existência de resistência em trigo ao brusone, possivelmente com distintos mecanismos.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (69f.) Abril, 2016.

HISTOPATHOLOGY OF THE *Triticum aestivum* x *Magnaporthe oryzae* INTERACTION¹

Author: Marciele Barbieri

Advisor: José Antônio Martinelli

ABSTRACT

Wheat is the second most produced cereal in the world, with significant importance in the global agricultural economy. In Brazil, wheat is grown in the South, Southeast and Midwest. The production receives systematic strengthening of government agencies, since weather conditions are unfavorable to the crop. Blast, known for damage to rice crops, also called bleaching of ears, consists of a major fungal disease found in wheat in Brazil. The objective of this work is to investigate the interaction between *Triticum aestivum* and the pathogen *Magnaporthe oryzae* at histopathological level. The four wheat cultivars Anahuac, BR18, BRS229 and Ônix were investigated. Wheat plants were inoculated on their sixth leaves with the isolate Py 145, from rice, with a spore concentration adjusted to 1×10^5 spores per ml. After inoculation the plants were placed in a wet, dark chamber for 24 hours. Samples of leaf segments of 2.5 cm each were cut and fixed and prepared for light and fluorescence microscopy examination. The parameters evaluated were germination of spores, appressoria formation, penetration, colony formation, cell death and papillae formation. Statistical analysis used Fisher's exact test with Bonferroni corrections. The germination of spores in cultivars remained constant from 12 hai. All cultivars produced melanized appressoria. 48 hai there was a greater invasion of infective hyphae of different host cells, especially a high percentage of colonies formation in the susceptible cultivar Anahuac, with 71%. BR18 showed increased cell death in all times measured. Ônix was the only variety to develop papillae as resistance structures at 72 hai. The results of this work suggest the existence of resistance amongst wheat varieties and that their mechanisms are different from each other.

¹ Master of Science Dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (69p.) Abril, 2016.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivo Geral	2
1.2 Objetivos Específicos	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Cultura do Trigo – <i>Triticum aestivum</i>	3
2.2 Origem da brusone e seus hospedeiros.....	3
2.3 Etiologia	4
2.4 Ciclo de vida.....	5
2.5 Sintomatologia.....	8
2.7 Histopatologia.....	10
2.8 Referências Bibliográficas.....	12
3 ARTIGO 1	16
RESUMO	16
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO.....	17
MATERIAL E MÉTODOS	18
Isolamento do fungo	19
Armazenagem dos isolados	19
Produção de inóculo	20
Plantio e condução das plantas a serem inoculadas.....	20
Fixação do material vegetal.....	21
Análise de morte celular	21
Visualização de papilas	22
RESULTADOS	26
Germinação de esporos.....	26
Formação de apressórios	26
Formação de colônias	28
Morte celular.....	29
Estruturas semelhantes a papilas	30
DISCUSSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	57

RELAÇÃO DE TABELAS

ARTIGO 1		Página
1	Comparações entre cultivares em cada horário avaliado para os parâmetros de germinação, formação de apressórios e penetração (Valor de P= 0.008).	26
2	Comparações entre os diferentes tempos de amostragens em cada cultivar para os parâmetros de germinação, formação de apressórios e penetração (Valor de P= 0.008).	27
3	Comparações realizadas para o parâmetro de morte celular, a exemplo o tempo de 24 hai em cada cultivar (Valor de P = 0.02).	27
4	Comparações nos diferentes tempos de amostragens para cada cultivar, como exemplo abaixo a cultivar BR 18 (Valor de P = 0.02).	28
5	Percentagem de germinação de esporos nos horários de amostragens para as quatro cultivares de trigo. BARBIERI, M. (2015).	29
6	Percentagem da formação de apressórios nos horários de amostragens para as quatro cultivares de trigo. BARBIERI, M. (2015).	30
7	Percentagem de penetração do fungo em células da epiderme a partir dos apressórios melanizados. BARBIERI, M. (2015).	31
8	Percentagem de formação de colônias 48 hai para as quatro cultivares de trigo BR 18, Ônix, BRS 229 e Anahuac. BARBIERI, M., 2015.	33
9	Percentagens de morte celular para cada cultivar estudada em diferentes horários avaliados. BARBIERI, M. (2015).	34

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

- 1 Ciclo de vida *M. oryzae* em arroz. O esporo se adere à superfície da folha e germina, produzindo um tubo germinativo o qual, posteriormente, forma o apressório. Debaixo dele, forma-se o ponto de penetração ou também chamado de “grampo de penetração”. O apressório torna-se melanizado e desenvolve pressão de turgor. A penetração no tecido da planta ocorre através de hifas bulbosas, que invadem a membrana plasmática de arroz. Subsequentemente, essas hifas invadem as células vizinhas através dos plasmodesmas, quando são chamadas de hifas invasivas. As lesões da doença ocorrem entre 72 e 96 horas após a infecção (hai). A esporulação ocorre sob condições de umidade. Os conidióforos com esporos são dispersos pelo ar e são transportados para novas plantas hospedeiras. Fonte: Richard A. Wilson e Nicholas J. Talbot, 2009.
..... 6
- 2 Formação do apressório e o início do processo de penetração. a e b) Esporo em processo de autólise e apressório, ilustração através de microscopia de varredura. c) Ponto de penetração, ilustração através de microscopia de luz. ES: Esporo; AP: Apressório; PP: Ponto de Penetração. Fonte: a e b, MELO, T. A. (2013); c: BARBIERI, M. (2015).
..... 7
- 3 Ilustra o processo de penetração pela presença de apressório, na cultivar Anahuac no tempo de 72 horas após a inoculação (hai) através das hifas infectivas e invasivas, indicados pelas setas. AP: Apressório; HIn: Hifas Infectivas; HI: Hifas Invasivas. BARBIERI, M. (2015).
..... 8
- 4 a) Sintomas de brusone em uma espiga de trigo. b) Lesões de brusone em folhas de trigo da cultivar Anahuac. Fonte: a) EMBRAPA, 2009. b) BARBIERI, M. (2015).
..... 9

ARTIGO 1

- 1 Desenvolvimento em meio ágar-aveia do isolado de *M. oryzae* em BOD à temperatura de 27,5 °C. a) Incubação do isolado Py 145 em placas de Petri viradas para baixo contendo meio aveia-ágar.

- b) Cinco colônias de Py 145, 15 dias após incubação. BARBIERI, M. (2015).
..... 23
- 2 Plantio de plantas de trigo para serem inoculadas, incubadas, acondicionadas em câmara úmida e para retirada de segmentos de folhas. a) Cultivares BR 18, Ônix, BRS 229 e Anahuac na 6ª folha expandida. b) Cortes dos segmentos de folhas nos horários de 6, 12, 18, 24, 36, 48 e 72 hai. BARBIERI, M. (2015).
..... 24
- 3 Ilustração interna de um apressório e esporos e apressórios melanizados na superfície foliar de trigo. a) Microscopia eletrônica representada por um corte transversal de um apressório produzido pelo fungo *M. oryzae* em contato com o substrato. As setas indicam a camada de melanina na parte interna da estrutura. Fonte: Howard e Valent, 1996. b) Formação de apressórios melanizados na superfície de folhas de trigo AP: Apressório; ES: Esporo de *M. oryzae*. BARBIERI, M. (2015). 30
- 4 Penetração de *M. oryzae* no tecido foliar, na cultivar BR18. A: Apressório melanizado. B: Penetração do apressório. C: formação de uma hifa infectiva fina. D: Desenvolvimento das hifas e invasão às células adjacentes. AP: Apressório; ES: Esporo; HI: Hifas Invasivas; HIn: Hifas Infectivas. As barras brancas correspondem 20 µm. BARBIERI, M. (2015).
..... 32
- 5 Penetração e formação de colônias na cultivar de trigo Anahuac 48 hai. Em 9a e 9b, formação de colônia. Em 9c e 9d, destaca-se o processo de penetração, desde a presença do apressório melanizado, que inicia a penetração e formação de hifas infectivas, ao desenvolvimento das hifas invasivas. AP: Apressório; HI: Hifas Invasivas; HIn: Hifas Infectivas. As barras brancas correspondem 20 µm. BARBIERI, M. (2015).
..... 33
- 6 Percentagens de morte celular centralizada e generalizada, para as cultivares BR 18, Ônix, BRS 229 e Anahuac, nos tempos de 24, 36, 48 e 72 hai. BARBIERI, M. (2015).
..... 35
- 7 Morte celular em Anahuac – 48 horas após a inoculação. a e b: Morte Celular Centralizada (MCC) na cultivar Anahuac – 48hai. c e d: Morte Celular Generalizada (MCG) na cultivar Anahuac – 48hai; AP: Apressório; HIn: Hifas Infectivas. Segmentos coloridos com solução de Tripán Blue. As barras brancas correspondem 20 µm. BARBIERI, M., (2015).
..... 36
- 8 Estruturas fluorescentes em células da epiderme da cultivar Ônix, infectadas por *M. oryzae*, 72 hai. a) Célula morta indicada pela seta com a presença do apressório (AP), com a célula adjacente apresentando fluorescência (FL). b) Destaque da parede da célula (PC) que divide a célula morta da célula fluorescente (CM) coloridas com solução de Ácido Pícrico. As barras brancas

	Página
correspondem 20 µm. BARBIERI, M. (2015).	37
9 Estruturas fluorescentes na cultivar Ônix (a – b – c – d) e não fluorescentes em Anahauc (e – f) no horário de 72 hai. GR:Granulometria; AP: Apressório; HIn: Hifas Infectivas; FL: Fluorescência. Segmentos de folha coloridos com solução de ácido pícrico. As barras brancas correspondem 20 µm. BARBIERI, M. (2015)	38

1 INTRODUÇÃO

O trigo é o segundo cereal mais produzido no mundo, com significativo peso na economia agrícola global. No Brasil, cultiva-se esse cereal nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) elevou sua estimativa de produção mundial de cereais em 2015/2016, para 2,54 bilhões de toneladas, 13,8 milhões acima da projeção de julho. No entanto, o número ainda é 21 milhões de toneladas inferior ao do recorde de 2014/15. Com foco nesse aumento de produtividade, vários fatores devem ser considerados, tais como aumento da fertilidade do solo, uso de cultivares mais adaptadas às regiões produtoras, zoneamento agrícola, rotação e sucessão de culturas e controle de plantas daninhas, pragas e doenças, dentre outros.

A brusone, conhecida pelos danos causados à cultura do arroz, também denominada de branqueamento das espigas, consiste em uma das principais doenças fúngicas detectada em trigo no Brasil. Tem por agente etiológico o fungo *Magnaporthe oryzae* Couch, forma teleomórfica de *Pyricularia oryzae* Cavara. No Brasil, desde o primeiro registro em 1985 no Paraná (Igarashi *et al.*, 1986), tem causado significativas perdas de produtividade quando incide sobre a cultura. Considerada a mais importante doença de alguns cereais, como o arroz e o trigo, também causa danos em azevém, centeio, cevada e aveia. Até 2016 a brusone do trigo havia sido observada apenas no Continente Americano, no entanto em fevereiro foi confirmada sua ocorrência dessa doença no trigo em Bangladesh, uma importante região tritícola do mundo (Hamel, 2016). Bangladesh está localizado no continente asiático, no delta dos rios Ganges e Brahmaputra, na região chamada de Subcontinente Indiano. O país faz fronteiras com a Índia, e um pequeno trecho com Mianmar. Esta primeira ocorrência fora das Américas configura uma ameaça à segurança alimentar mundial, que é fortemente baseada no trigo.

A brusone no trigo apresenta lesões elípticas de centro acinzentado em folhas e descoloração prematura da espiga acima do ponto de infecção do patógeno. Tais sintomas podem estar associados à presença de fitotoxinas no processo de desenvolvimento da doença. Além do aspecto bioquímico, a formação de apressórios melanizados e a pressão de turgor

exercida pelo grampo (*peg*) de penetração desta estrutura, são indispensáveis ao processo de pré-penetração e penetração no hospedeiro por *M. oryzae*. De acordo com o estudo de Melo (2013), a camada de melanina que recobre o apressório forma uma barreira efetiva ao transporte de solutos. Dessa forma, carboidratos e lipídios são mobilizados ao interior da estrutura e permanecem, originando um ambiente hipertônico que induz a entrada de água ao seu interior, ampliando a pressão de turgor do apressório e a força exercida através do grampo de penetração.

Há uma dificuldade de se controlar a brusone no trigo devido, principalmente, à ausência de resistência nos genótipos desse cereal. O controle químico possui baixa eficácia e, como consequência, resulta em elevados danos na produção final da cultura. A partir desse problema buscou-se investigar mais detalhadamente a interação entre *Triticum aestivum* e o patógeno *M. oryzae* utilizando como principal ferramenta de estudo a histopatologia, por ser adequada para conhecer os principais eventos citológicos e histoquímicos nessa interação.

1.1 Objetivo Geral

- Investigar os eventos histológicos na interação entre *Magnaporthe oryzae* x *Triticum aestivum*.

1.2 Objetivos Específicos

1. Observar a existência de variabilidade dentre alguns genótipos de trigo quanto à resistência a um isolado de *M. oryzae*.

Hipótese 1: Diferentes genótipos de trigo devem também diferir quanto as suas resistências ao fungo *M. oryzae*.

2. Identificar quais são os processos de resistência e/ou suscetibilidade no tempo e no espaço presentes na interação trigo x *M. oryzae*.

Hipótese 2: processos de resistência e suscetibilidade são diferenciados conforme o local infectado, a duração da infecção e o mecanismo de resposta da planta.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura do Trigo – *Triticum aestivum*

O trigo pertence à família Poaceae (gramínea), tribo *Triticeae*, subfilo *Triticum* e espécie *Triticum aestivum* L., sendo esta a mais cultivada em todo o mundo. É uma planta que possui ciclo anual, hermafrodita, autógama e é uma das mais abundantes fontes de carboidratos e proteínas, podendo ser consumida em diferentes formas como pães, massas, bolos e biscoitos.

O Brasil está entre as dez maiores economias mundiais, com um PIB de mais de US\$ 2 trilhões em 2013; e a demanda de trigo no Brasil é dominada pelo consumo que representa 95% do consumo total (FAO, 2015). A demanda alimentar de trigo deve totalizar 11 milhões de toneladas em 2024, quatro por cento maiores do que a base.

Conforme relatório da FAO 2015, a área cultivada deve declinar do início dessa análise e então aumentar devagar durante o restante do período da projeção, totalizando 2,6 milhões de hectares em 2024. A produção deve aumentar principalmente por meio do aumento do rendimento da área cultivada, com isso a produção média deve crescer cerca de 1% ao ano para quase três toneladas por hectare em 2024. Além disso, o crescimento no fornecimento interno será suficiente para acompanhar a demanda e as importações permanecerão relativamente fixas. O trigo constitui em um alimento importante na cesta básica brasileira, principalmente por ser fonte de carboidrato, proteína e glúten, podendo ser consumido em diversas formas como pães, massas, bolos, biscoitos, entre outros.

2.2 Origem da brusone e seus hospedeiros

O fungo *M. oryzae* possui vários hospedeiros, destacando-se o trigo, o arroz e a cevada. Diversas gramíneas cultivadas, nativas e invasoras podem ser hospedeiras desse patógeno. No Brasil, *M. oryzae* ocorre em Poáceas, normalmente encontradas em lavouras de arroz e trigo, como exemplo *Brachiaria plantaginea*, *Digitaria horizontalis*, *Lolium multiflorum*, entre outras. A ocorrência da brusone no trigo no Brasil foi observada pela

primeira vez por Igarashi *et al.* (1986), no estado do Paraná em 1985. Posteriormente, ocorreu a disseminação da doença nas regiões norte e oeste do Paraná, noroeste de São Paulo e sul do Mato Grosso do Sul. Logo após, passou a impor graves prejuízos para a cultura do trigo, com danos estimadas em 10% a 12% de redução na produtividade (Igarashi, 1988). Desde então, a busca por cultivares de trigo resistentes a essa doença tem sido intensa. A recente confirmação de sua ocorrência em Bangladesh, a primeira fora do Continente Americano, configura uma ameaça à segurança alimentar mundial, que é fortemente baseada no trigo (Hamel, 2016).

Todavia, a resistência de uma determinada cultivar, em uma região geográfica, nem sempre se confirma em outras regiões ou sob condições controladas de inoculação (Cruz *et al.*, 2010). De acordo com estes mesmos autores, os fungos filamentosos inclusive a *M. oryzae* demonstram mecanismos de variabilidade genética, a qual lhes confere melhor adaptação abiótica e diversos hospedeiros. Segundo a Embrapa (2011) a última epidemia de brusone no país foi registrada em 2012. Conforme Bacaltchuk (2014) produtores do norte do Paraná, do sul de São Paulo e do Mato Grosso do Sul e o Rio Grande do Sul tiveram perdas de aproximadamente 40% na produção desse cereal devido à brusone.

2.3 Etiologia

O agente causal da brusone é o fungo *Magnaporthe oryzae* B. C. Couch (anomórfico = *Pyricularia oryzae* Cavara). É um ascomiceto, o qual produz ascósporos hialinos, fusiformes, septados (três septos) em uma asca unitunicada (Herbet, 1971). Na parte apical e nas espiguetas de trigo estão os sintomas mais pronunciados, onde se tem a ocorrência de lesões cinzento-castanho, o que contribui para uma redução de rendimento devido à translocação reduzida de nutrientes para os grãos (Perez *et al.*, 2014). Lesões cinza-esverdeada embebida em água com verde escuro nas bordas são os sintomas que ocorrem nas folhas. A morte da ponta da espiga e manchas pretas brilhantes nas ráquis são outros sintomas comuns causados por *M. oryzae*.

O conídio geralmente germina a partir das células apical ou basal, sendo a germinação da célula central pouco frequente (Ou, 1972). A germinação dos conídios e a formação do apressório são controladas por estímulos ambientais não havendo, por exemplo, emissão do tubo germinativo enquanto os conídios são mantidos em suspensão aquosa, possivelmente evitando assim a germinação antecipada (Lee e Dean, 1993). A produção dos conídios é isolada nos conidióforos e esses são longos, delgados, livres e eretos, geralmente emergindo isolados ou em pequenos grupos através dos estômatos (Reis e Casa, 2005). As dimensões dos conídios variam bastante entre isolados quando submetidos a diferentes temperaturas bem como nos diferentes hospedeiros.

2.4 Ciclo de vida

O desenvolvimento do ciclo da brusone, desde a germinação dos conídios até o surgimento das primeiras lesões, depende de condições climáticas adequadas, principalmente umidade e temperatura, típica de regiões tropicais. A brusone caracteriza-se como doença policíclica em folhas de trigo, apresentando vários ciclos do patógeno em relação a um ciclo do hospedeiro (Pagani, 2011).

Durante o seu ciclo de vida (Figura 1), o fungo *M. oryzae* produz conidióforos aéreos e, na ponta destes se formam, em arranjo simpodial (crescimento lateral), os conídios, tri ou bicompartimentados (raramente), hialinos e de formato piriforme. Estes darão origem ao inóculo para os ciclos secundários de infecção (Ebbole, 2007). Os conídios, ao entrarem em contato com a superfície do hospedeiro, mediante contato com a água, liberam uma substância mucilaginosa em seu ápice, assim se aderindo à superfície do hospedeiro. Quando o esporo atinge a maturidade, a parede que envolve o septo apical (região mais afilada) do conídio se rompe e a mucilagem pode ser observada na estrutura ainda quando esta se encontra afixada no conidióforo (Howard e Valent, 1996), tendo como função a adesão à superfície do hospedeiro de forma não específica (Hamer *et al.*, 1988).

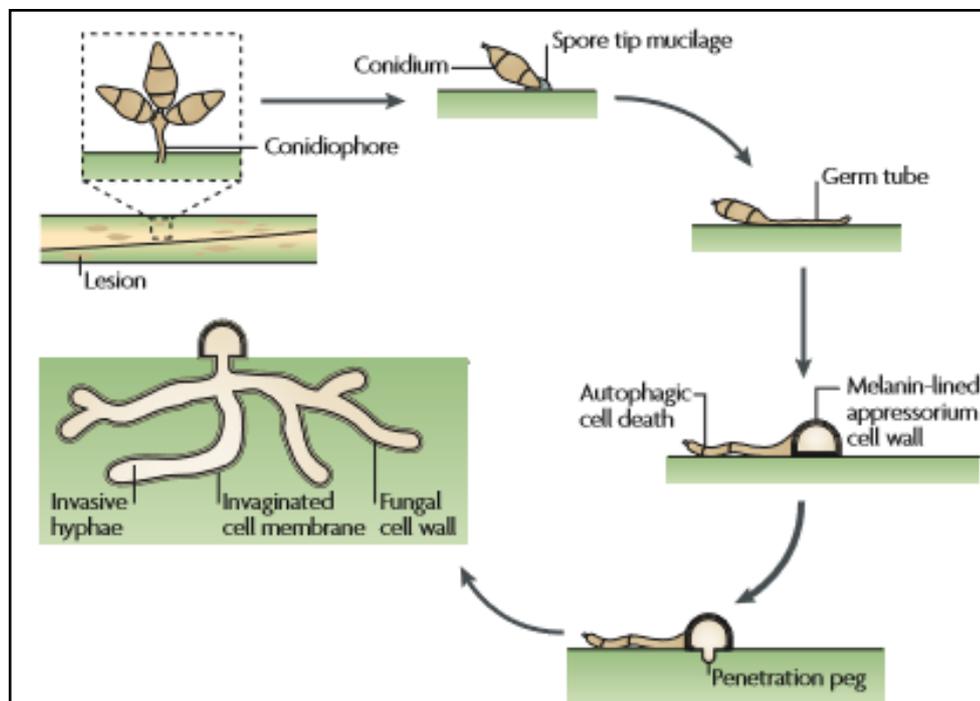


FIGURA 1. Ciclo de vida *M. oryzae* em arroz. O esporo se adere à superfície da folha e germina, produzindo um tubo germinativo o qual, posteriormente, forma o apressório. Debaixo dele, forma-se o ponto de penetração ou também chamado de “grampo de penetração”. O apressório torna-se melanizado e desenvolve pressão de turgor. A penetração no tecido da planta ocorre através de hifas bulbosas, que invadem a membrana plasmática de arroz. Subsequentemente,

essas hifas invadem as células vizinhas através dos plasmodesmas, quando são chamadas de hifas invasivas. As lesões da doença ocorrem entre 72 e 96 horas após a infecção (hai). A esporulação ocorre sob condições de umidade. Os conidióforos com esporos são dispersos pelo ar e são transportados para novas plantas hospedeiras. Fonte: Richard A. Wilson e Nicholas J. Talbot, 2009.

Após aderido ao substrato, o conídio germina formando um tubo germinativo, podendo ser produzido pela célula basal ou apical. Progressivamente, prende-se ao hospedeiro antes da diferenciação do apressório (Wilson e Talbot, 2009). Nesta fase inicia-se a degradação de carboidratos, principal fonte de energia dos conídios. O tubo germinativo posteriormente diferencia-se em um apressório. Esses mesmos autores descreveram que logo após o amadurecimento do apressório, o conídio entra em colapso e morre em um processo de autólise (Figura 2a).

Assim, o apressório torna-se melanizado e desenvolve pressão de turgor (Figuras 2b e 2c). Em seguida a essa enorme pressão exercida pela estrutura, forma-se um ponto de penetração na base do apressório e, auxiliado por enzimas extracelulares, penetra na cutícula do hospedeiro e invade a epiderme de plantas de trigo formando, posteriormente as hifas de infecção (Caracuel-Rios e Talbot, 2007), indicadas pelas setas na Figura 3.

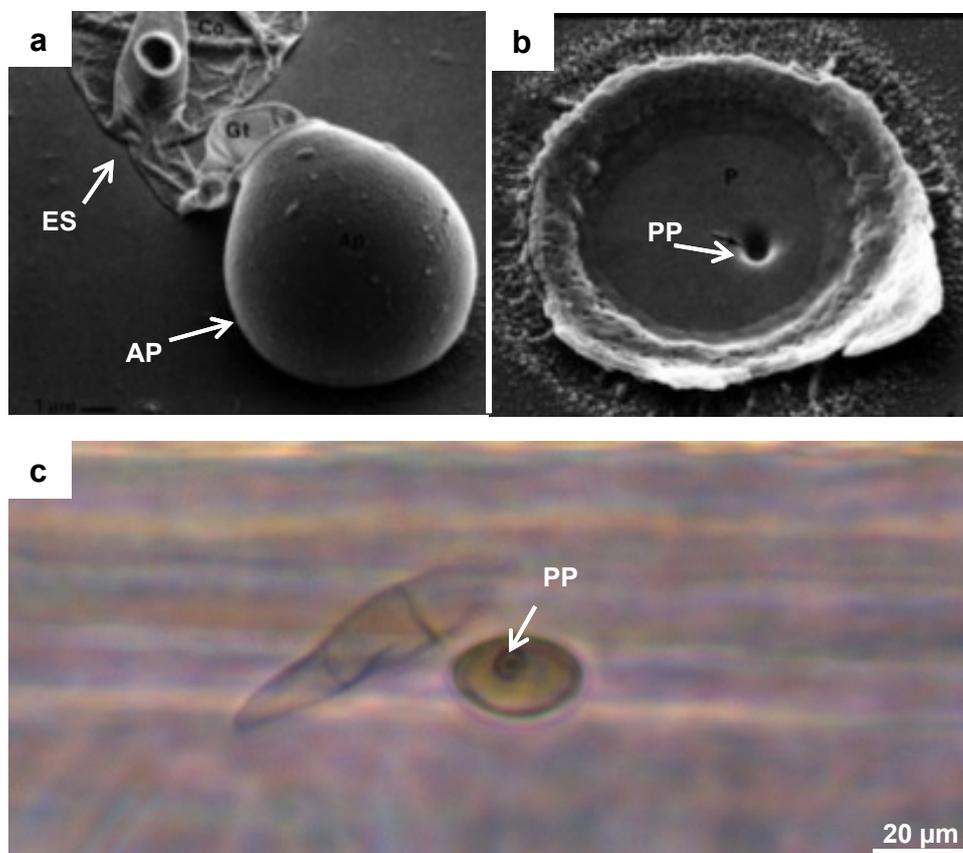


FIGURA 2. Formação do apressório e o início do processo de penetração. a e b) Esporo em processo de autólise e apressório, ilustração através de microscopia de varredura.

c) Ponto de penetração, ilustração através de microscopia de luz. ES: Esporo; AP: Apressório; PP: Ponto de Penetração. Fonte: a e b, MELO, T. A. (2013); c: BARBIERI, M. (2015).

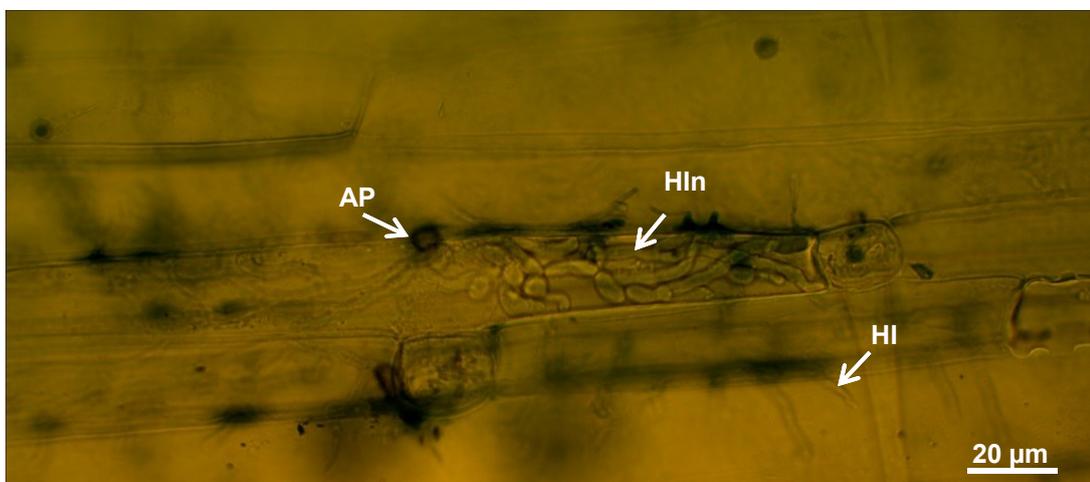


FIGURA 3. Ilustra o processo de penetração pela presença de apressório, na cultivar Anahuac no tempo de 72 horas após a inoculação (hai) através das hifas infectivas e invasivas, indicados pelas setas. AP: Apressório; HIn: Hifas Infectivas; HI: Hifas Invasivas. BARBIERI, M. (2015).

A umidade tanto no estado líquido ou gasoso é o fator determinante e essencial à ocorrência das doenças, ao passo que a temperatura age como um catalisador, retardando ou acelerando o processo infeccioso e de reprodução do patógeno (Reis *et al.*, 2005). Conídios de *M. oryzae* requerem água livre na superfície do hospedeiro para a germinação. Nesse patossistema, a severidade da doença está diretamente relacionada à quantidade e à duração do período de orvalho, porquanto conídios não são formados quando a umidade relativa está abaixo de 93% (Bedendo, 1995).

Os conídios necessitam de período de molhamento foliar moderado para germinarem e penetrarem tanto em folhas de arroz como em folhas de trigo. Períodos longos, com presença de orvalho por 2 ou 3 dias consecutivos favorecem a doença (Picinini e Fernandes, 1995). A temperatura ótima para favorecer a conidiogênese está ao redor de 28°C e umidade relativa entre 95 a 100% (Alves e Fernandes, 2006). A brusone é uma doença policíclica, sendo que uma lesão é produzida em média 6 dias após a infecção e uma lesão típica é capaz de produzir 2.000 a 6.000 conídios por dia por aproximadamente 14 dias em condições controladas (Ou, 1985).

A liberação de conídios é influenciada pela temperatura e normalmente ocorre na faixa de 15 a 35°C. Em relação à germinação dos conídios, a temperatura deve ser entre 22 a 28°C (Toledo e Escobar, 2002). Segundo estudos de Prabhu e Filippi (2006) a luz também pode

influenciar o crescimento micelial e a produção dos conídios em isolados de arroz em meio de cultura. Em condições controladas, a alternância de luz tem um papel importante sobre a esporulação. E em condições de campo, quanto menor for o número de horas diárias de sol, maiores serão as probabilidades do ataque de *M. oryzae* (Prabhu e Filippi, 2006).

2.5 Sintomatologia

A brusone do trigo caracteriza-se por ser uma doença observada normalmente nas espigas (Igarashi, 1988). Os sintomas foliares são observados por lesões elípticas de coloração castanha acompanhando as nervuras da folha (Figura 4b). Conseqüentemente, os centros das lesões tornam-se esbranquiçadas e as bordas das mesmas apresentam características castanho-avermelhadas. Plantas severamente atacada têm sua área fotossintética reduzida e senescem precocemente.

Nas espigas tem-se o branqueamento parcial a partir do ponto de penetração do patógeno na ráquis (Figura 4a). Espigas severamente infectadas pelo fungo podem apresentar um escurecimento da base e de parte do pedúnculo (Lau *et al.*, 2011). Além disso, na ráquis são observadas lesões escurecidas, de coloração negra e de aspecto brilhante. No local de infecção ocorre o bloqueio da translocação de água e nutrientes para a espiga, impossibilitando o enchimento de grãos, tornando-os chochos e inviáveis para a comercialização e consumo humano.

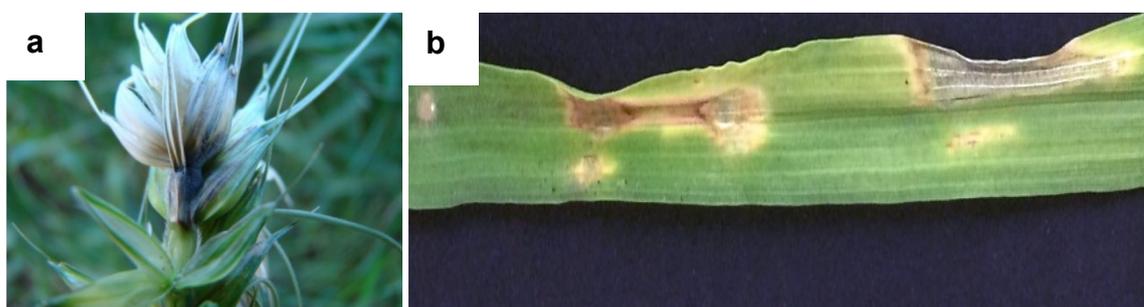


FIGURA 4. a) Sintomas de brusone em uma espiga de trigo. b) Lesões de brusone em folhas de trigo da cultivar Anahuac. Fonte: a) EMBRAPA, 2009. b) BARBIERI, M. (2015).

2.6 Interação Trigo – *M. oryzae*

O fungo hemibiotrófico *M. oryzae* invade células de plantas vivas utilizando as hifas invasoras intracelulares (HI), que crescem a partir de uma célula para a seguinte. Na cultura do arroz esta doença é devastadora e muito estudada. Porém, começou-se a investigar a interação da *M. oryzae* em trigo, no qual ainda não se tem muitos estudos científicos. Essa

interação é explicada pela teoria gene a gene (Flor, 1971; Silue *et. al.*, 1992). De acordo com essa teoria, a resistência é o resultado de uma interação incompatível entre o gene de avirulência do patógeno e o gene de resistência do hospedeiro. De acordo com Cruz *et al.* (2010), a busca por fontes de resistência à brusone tem sido apontada como prioritária em programas de melhoramento de trigo destinados a gerar cultivares para o cultivo em locais com histórico de ocorrência da doença no Brasil. Devido à baixa variabilidade genética dentro do gênero *Triticum aestivum*, algumas espécies geneticamente afins ao trigo cultivado aparecem como alternativa para exploração de genes de resistência à brusone.

De acordo com Trindade *et al.* (2006), no Brasil, tem sido identificados genótipos com resistência parcial à doença. Dessa forma, a avaliação criteriosa do nível de resistência parcial à brusone que os genótipos de trigo do Brasil apresentam consiste em uma condição indispensável para se avançar em qualquer programa de melhoramento de trigo que tenha como um dos seus objetivos a geração de cultivares menos suscetíveis à doença. A resistência incompleta ou parcial é definida como um tipo de resistência quantitativa, raça não-específica, na qual, embora o hospedeiro apresente reação de suscetibilidade, verifica-se baixa severidade da doença (Parlevliet, 1979; 1985).

O reconhecimento do patógeno pela planta ocorre, ao nível molecular, com várias reações de defesa do hospedeiro a fim de impedir que o patógeno se estabeleça. Portanto, a diferença entre resistência e/ suscetibilidade está na capacidade da planta reconhecer o patógeno invasor e ativar de maneira rápida seus mecanismos de defesa (Guzzo, 2004). Quando há o reconhecimento do patógeno pela planta, o resultado consiste na reação incompatível em que a infecção e a colonização do tecido do hospedeiro através do patógeno seriam limitadas, não ocorrendo o desenvolvimento da doença. Por outro lado, se o patógeno não possuir um alelo de avirulência, não será reconhecida pela molécula receptora da planta hospedeira, a qual não reconhecerá a infecção. Consequentemente, desencadeia uma reação compatível e o desenvolvimento da doença.

Uma fase inicial biotrófica, durante o qual o sistema imune do hospedeiro e morte celular são suprimidos ativamente. Desenvolvem, dessa forma, hifas invasoras que se espalham por todo o tecido da planta infectada. Logo após, segue-se uma fase necrotrófica, onde toxinas são secretadas pelo agente patogênico para induzir a morte das células no hospedeiro. A interface celular planta - biotrofismo é relativamente bem estudada para fungos tais como ferrugens que crescem intercelularmente e produzem estruturas de alimentação terminal chamado haustórios internamente às células. Em contraste com fungos biotróficos, espécies de *Colletotrichum* e de *M. oryzae*, que são hemibiotróficos, produzem hifas de infecção (HIn) biotróficas. Em contraste com hifas infectivas biotróficas, hifas necrotróficas

estão associadas com a morte de células de plantas à frente do crescimento fúngico e carecem de uma interface especializada na célula da planta. Isto é mais bem ilustrado pelos patógenos hemibiotróficos, que se submetem a ciclos de infecção de dois estágios que começam com hifas biotrófica intracelular e depois mudam para hifas necrotróficas (O'Connell *et al.*, 2004). Posterior às hifas necrotróficas visualiza-se a morte celular.

2.7 Histopatologia

A capacidade de observar o crescimento de estruturas fúngicas em tecidos do hospedeiro sob o microscópio é uma ferramenta importante no estudo da patogênese em plantas. Conforme Grupta *et al.* (2012) a utilização de determinadas técnicas de coloração pode facilitar observações microscópicas e a pesquisa experimental em patologia vegetal, permitindo que os tecidos vegetais e fungos possam ser diferenciados. Além disso, a coloração beneficia a análise de colonização, que envolve uma transição a partir de um biotrófico para a fase necrotrófica (Grupta *et al.*, 2012).

As colorações específicas de tecidos também simplificam a identificação de inóculos de fungos ou a presença de hifas no tecido da planta. A eficácia de uma determinada técnica de coloração pode variar grandemente, dependendo do fungo e a particularidade de cada planta. O corante Azul de Toluidina foi muito utilizado para identificar deposição de calose, produzida pela planta hospedeira em resposta à infecção intracelular por fungos nos tecidos vegetais (Grupta *et al.*, 2012). Logo, essa técnica de coloração aplicou-se na análise de infecção de estruturas de *Fusarium* em tecidos radiculares de goiabeira.

Poucos estudos têm sido desenvolvidos para o patossistema brusone x trigo por ser bastante recente, mas devido a sua grande importância econômica para a cultura, centros de pesquisa no Brasil, Europa e Estados Unidos investigam mais intensamente esta interação. A partir de dados obtidos com a pesquisa voltada para a cultura de arroz e o sequenciamento do genoma de *M. oryzae* (Dean *et al.*, 2005), foi observado que existe um alto grau de variabilidade genética no campo e que novas raças frequentemente surgem com a habilidade de superar cultivares resistentes.

Através de análises biomoleculares em arroz já foram descobertos diversos genes dominantes de resistência, fato que dá norte às pesquisas em outras espécies de hospedeiros (Valent e Chumley, 1991). É importante salientar ainda que este patossistema *M. oryzae* x arroz é considerado modelo para pesquisas, pois além de ter seu genoma totalmente sequenciado, existem métodos para cultivo e esporulação de *M. oryzae* em meios de cultura em laboratório. Dessa forma, análises genéticas da especificidade sobre seus hospedeiros são mais facilmente estudadas, a fim de observar e melhor compreender seus mecanismos de

patogenicidade, além de outros aspectos biológicos. Por possuir um ciclo sexual curto, ciclo da doença rápido e de fácil controle em condições controladas, este fungo oferece vantagens para estudos laboratoriais mais detalhados.

Para a cultura do trigo os estudos atuais estão mais voltados para pesquisa básica como biologia do patógeno, diferenciação de isolados (Bruno e Urashima, 2001), patogenicidade, adequação de meios de culturas para esporulação (Dias Neto *et al.*, 2010), medidas de controle (Silva *et al.*, 2009) e, em menor número, aplicados à investigação de fontes de resistência à doença, como identificação de genes e eventos citológicos associados. A associação de genes de resistência com eventos citológicos é de grande importância para a seleção de cultivares resistentes. Neste contexto, a histopatologia torna-se uma ferramenta de indispensável uso, pois através dela é possível a visualização rápida e precisa da interação planta x patógeno em tempo e espaço.

Com auxílio da histopatologia, estudos recentes (Graichen *et al.*, 2011) verificaram a reação de resistência de genótipos de aveia na interação *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* x *Avena sativa*. Os resultados evidenciaram que a morte celular associada à acumulação de autofluorescência e compostos fenólicos é comum nos genótipos resistentes e que genótipos com resistência específica à raça determinam uma morte celular rápida, impedindo o desenvolvimento das colônias do fungo. Ainda, o estudo elucidou que a resistência via hipersensibilidade e acúmulo de compostos que barram o desenvolvimento fúngico pode ser diferenciada entre os genótipos resistentes pelo padrão de resposta, antes e após o estabelecimento das colônias, e que genótipos suscetíveis não apresentam estes tipos de eventos. Além disto, eventos relacionados à resistência como a formação de papilas (aposições de calose) associadas à formação de halos, logo abaixo do local onde foram observados apressórios do fungo, também foram identificados via microscopia confocal. Em outro patossistema, Jagger *et al.* (2011) demonstraram que na interação celular da ferrugem estriada do trigo, cuja expressão de genes de resistência era previamente conhecida, estava ligada ao evento citológico de morte celular.

Normalmente a única reação visível em microscopia, sem técnicas de coloração, é a presença de deposições na parede celular do hospedeiro (papilas), que atuam como barreira à penetração do fungo. Estas papilas, no caso das ferrugens, formam-se entre a célula mãe de haustório e a célula hospedeira e estão associadas à paralisação da infecção (Anker e Niks, 2001). No caso de *M. oryzae* estas aposições ocorrem no local circundante do estabelecimento e desenvolvimento do apressório. Estudos recentes desenvolvidos com a utilização de técnicas de histopatologia na interação *Puccinia triticina* x Poaceae (Wesp, 2011), revelaram que diferentes mecanismos de resistência e em diferentes momentos durante a infecção podem ser

observados. Os resultados apontaram resistência pré-haustorial governada pela formação de papilas em aveia e em arroz pelo acúmulo de compostos autoflorescentes e H₂O₂.

Através da abordagem histopatológica deste projeto, busca-se identificar os mecanismos de resistência na etapa de infecção e suas fontes de resistência à *M. oryzae* em trigo. Neste sentido, a histopatologia representa uma ferramenta adequada para conhecer os principais eventos citológicos e histoquímicos desta interação, os quais contribuirão para a compreensão dos mecanismos, dos genes envolvidos e para a incorporação destes em novos e mais resistentes genótipos.

2.8 Referências Bibliográficas

ALVES, K.J.P.; FERNANDES, J.M.C. Influência da temperatura e da umidade relativa do ar na esporulação de *Magnaporthe grisea* em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n.6, p. 579-584, 2006.

ANKER, C.C.; NIKS, R.E. Prehaustorial resistance to the wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina* in *Triticum monococcum* (s.s.). **Euphytica**, Dordrecht, v. 117, p. 209-215, 2001.

BACALTCHUK, B. **O trigo misterioso da agricultura brasileira**. 2014. Disponível em: <<http://www.cultivares.com.br/noticias/index.php?c=6527>> Acesso em: 23 mar. 2016.

BEDENDO, I.P. Ambiente e doenças. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia. Princípios e conceitos**. São Paulo, SP: Agronômica Ceres. Ed. 3, v. 1, p.331-341, 1995.

BRUNO, A.C.; URASHIMA, A.S. Inter-relação sexual de *Magnaporthe grisea* do trigo e outros hospedeiros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 21-26, 2001.

CARACUEL-RIOS, Z.; TALBOT, N.J. Cellular differentiation and host invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 10, p. 339-345, 2007.

CRUZ, M.F.A. et al. Resistência parcial à brusone de genótipos de trigo comum e sintético nos estádios de planta jovem e de planta adulta. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, 024-031, 2010.

DEAN, R.A. et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Nature**, London, v. 434, n. 7036, p. 980-986, 2005.

DIAS NETO, J.J. et al. Influência do meio de cultura na esporulação de *Magnaporthe grisea* e da concentração de conídios na severidade da brusone do arroz. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 173-179, 2010.

EBBOLE, D.J. *Magnaporthe* as a model for understanding host-pathogen interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 437-456, 2007.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Comunicado Técnico: Doenças da espiga causam perda de rendimento em trigo nos estados do Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul, em 2009**. Passo Fundo, RS: Embrapa Trigo, 2009. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co255_fl.htm Acesso em: 07 de dezembro de 2015.

FAOSTAT. [Base de dados]. FAO, 2015. Disponível em: <https://www.fao.org.br/download/PA20142015CB.pdf> Acesso em: 27 de julho de 2016.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 9, p. 275-296, 1971.

GRAICHEN, F.A.S. et al. Epidemiological and histological components of oat crown rust resistance in oat genotypes. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 130, 497-510, 2011.

GRUPTA, V.K.; MISRA, A.K.; PANDEY, B.K. Histopathological changes during wilting in guava root. **Archives Phytopathology and Plant Protection**, Yverdon, v. 45, n 5, p. 570–573, 2012. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03235408.2011.588047> Acesso em: 23 mar. 2016.

GUZZO, S.D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2004. 236 p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba – SP, 2004.

HAMER, J.E. et al. A Mechanism for Surface Attachment in Spores of a Plant Pathogenic Fungus. **Science**, Washington, v. 239, n.4837, p. 288-290, 1988.

HAMEL, R. **Severe, Climate Change-driven Wheat Fungus Found in Bangladesh, Highlighting Need for Risk Management Programs**. 2016. Disponível em: <http://csis.org/publication/severe-climate-change-driven-wheat-fungus-found-bangladesh-highlighting-need-risk-manage>. Acesso em: 29 mar. 2016.

HOWARD, R.J.; VALENT, B. Breaking and entering: host penetration by fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 50, p. 491-512, 1996.

IGARASHI, S. et al. *Pyricularia* em trigo 1. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, 351-352, 1986.

IGARASHI, S. Ação de fungicidas em tratamento de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) no controle de *Pyricularia oryzae* Cav. e *Helminthosporium sativum*. In: REUNIÃO DA COMISSÃO CENTRO SUL BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 4., 1988, Campinas – SP. [Anais]. Campinas, 1988.

JAGGER, L.J. et al. Histopathology provides a phenotype by which to characterize stripe rust resistance genes in wheat. **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 1, p. 1-9, 2011.

LAU, D. et al. Doenças do Trigo. In: PIRES, J.L.F.; VARGAS, L.; CUNHA, G.R. (Ed.). **Trigo no Brasil: bases para produção competitiva e sustentável**. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 2011. p. 283-324

LEE, Y.H.; DEAN, R.A. cAMP regulates infection structure formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 693–700, 1993.

MELO T. A. **Mecanismos de patogenicidade do fungo *Magnaporthe oryzae*, agente causal da brusone em trigo: crescimento e esporulação, pressão de turgor apressorial,**

enzimas celulolíticas e produção de metabólitos tóxicos. 2013. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2013.

O’CONNELL, R.J. et al. A novel Arabidopsis - Colletotrichum pathosystem for the molecular dissection of plant fungal interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, p. 272–282, 2004.

OU, S.H. **Rice diseases**. London: Eastern Press, 1972.

OU, S.H. **Rice diseases**. Wallingford: CAB, 1985.

PAGANI, A.P.S. **Resistência do trigo à brusone, manejo químico e diversidade de Magnaporthe grisea**. 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

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.; LEIJN, M.; VAN OMMEREN, A. Accumulating polygenes for partial resistance in barley to barley leaf rust, Puccinia hordei. II. Field evaluation. **Euphytica**, Dordrecht, v. 34, p. 15-20, 1985.

PEREZ, C.E.A. et al. Leaf Gas Exchange and Chlorophyll a Fluorescence in Wheat Plants Supplied with Silicon and Infected with Pyricularia oryzae. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 104, p. 143-149, n.2, 2014.

PICININI, E.C.; FERNANDES, J.M.C. **Doenças em cereais de inverno: aspectos epidemiológicos e controle**. Passo Fundo: CNPT/EMBRAPA, p. 58, 1995.

PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C. **Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p. 388, 2006.

REIS, E.M.; CASA, R.T. Doenças do trigo. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 4.ed. São Paulo: Ceres, v.2, p. 631-638, 2005.

SILUÉ, D.; NOTTEGHEM, J.L.; THARREAU, D. Evidence for a gene-for-gene relationship in the Oryza sativa – Magnaporthe grisea pathosystem. **Phytopathology**, Saint Paul, n. 82, p. 577-580, 1992.

SILVA, C.P. et al. Eficiência de tratamentos alternativos no controle de Pyricularia grisea em sementes de trigo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 2, 2009.

TOLEDO, J.; ESCOBAR, R. Piricularia o bruzone del trigo. Santa Cruz: CIAT, p. 20, 2002.

TRINDADE, M.G. et al. **Danos causados por Magnaporthe grisea em trigo**. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo (Comunicado Técnico, 202), p. 9, 2006.

WESP, C. L. **Histopatologia das reações de resistência de hospedeiro e de não-hospedeiro em interações Puccinia triticina x Poaceae**. 2011. 156 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

WILSON, R. A.; TALBOT, N. J. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. **Nature Review Microbiology**, London, v. 7, p.185–195, 2009.

VALENT, B.; CHUMLEY, F.G. Molecular Genetic Analysis of the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 443-467, 1991.

3 ARTIGO 1

Processos infectivos iniciais de *Magnaporthe oryzae* em folhas de trigo*

Early infective processes of *Magnaporthe oryzae* in wheat leaves

Marciele Barbieri¹, José Antônio Martinelli², Márcia Soares Chaves³, Felipe André Sganzerla Graichen⁴, Gerarda Beatriz Pinto¹, e Gisele Abigail Montan Torres³.

RESUMO

A brusone é a doença mais recente e devastadora de trigo no Brasil, ameaçando sua produção em toda a América do Sul. Pouco se sabe sobre o processo infeccioso, bem como sobre as fontes de resistência e mecanismos no trigo com relação ao seu agente causal *Magnaporthe oryzae*. O objetivo deste trabalho foi determinar os eventos histológicos no trigo associados com a resistência da folha ao patógeno. Os experimentos foram realizados com o isolado de fungo Py 145, oriundo do arroz, que mostrou reações contrastantes com as cultivares de trigo BR 18, Ônix, BRS 229 e Anahuac. Amostras de tecidos foliares foram coletadas em 6, 12, 18, 24, 36, 48 e 72 horas após a inoculação (hai), preparadas e observadas ao microscópio, foram quantificados o número de esporos germinados, a formação de apressórios, a penetração do fungo no tecido foliar, a formação de colônias, a formação de papilas e a morte celular. A resistência no início do estágio infeccioso, ainda quando biotrófico, pode representar um mecanismo eficiente para barrar a doença.

Palavras - chave: Histopatologia, *Magnaporthe oryzae*, morte celular, papilas

*Artigo escrito nas normas da Revista Ciência Rural.

1. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia (ênfase em Fitopatologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil;

2. Departamento de Fitossanidade, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil;

3. Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, Rodovia BR 285, km 294, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS, Brasil.

4. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Rod. Aquidauana/CERA km 12, Cx. Postal 25, CEP 79200-000, Aquidauana, MS, Brasil;

Autor para correspondência: marcieleb.mb@gmail.com

1 ABSTRACT

2

3 Blast is the newest and most devastating wheat disease in Brazil threatening its
4 production in all South America. Little is known about the infectious process as well as on the
5 resistance sources and mechanisms in wheat to its causal agent *Magnaporthe oryzae*. The
6 objective of this work was to determine the wheat histological events associated with leaf
7 resistance to the fungus. The experiments were performed with the fungal rice isolate Py 145
8 which showed contrasting reactions with the wheat varieties Anahuac, BR 18, BRS 229 and
9 Ônix. Leaf tissue samples were collected at 6, 12, 18, 24, 36, 48 and 72 hours after
10 inoculation (hai), prepared and observed under optical microscope, being quantified the
11 number of spores germinated, appressoria formation, fungal penetration into leaf tissue,
12 colony formation, papillae formation and cell death. The resistance at the early, biotrophic
13 stage may represent an efficient mechanism to barrier the disease.

14

15 **Key - words:** Histopathology, *Magnaporthe oryzae*, cell death, papillae.

16

17 INTRODUÇÃO

18

19 Brusone é uma doença agressiva ao trigo no Brasil e representa uma grande ameaça
20 para o cultivo desse cereal no mundo. É causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae* Couch
21 (anamorfo = *Pyricularia oryzae* Cavara). Inicialmente a doença foi relatada em arroz em
22 1637, na China e no Japão (Bedendo e Prabhu, 2005). No trigo, a doença foi relatada pela
23 primeira vez em 1985 em áreas agrícolas no norte do estado do Paraná, Brasil (Igarashi *et al.*,
24 1986). A brusone, além de causar danos irreparáveis na cultura do trigo no Brasil, está
25 também presente em áreas do Paraguai, Argentina e Bolívia (Kohli *et al.*, 2009).

1 Os sintomas da doença no trigo são descritos como lesões elípticas com o centro cinza
2 e margens marrons nas folhas de trigo. Nas espigas há descoloração (branqueamento) na parte
3 de cima do ponto de infecção. Na ráquis as lesões são visualizadas com coloração claro-
4 escuro, restrita ao ponto de infecção (Lau *et al.*, 2011).

5 Essa doença causa também grande impacto na redução da produção por diminuir a
6 qualidade do grão, o que pode ser facilmente observado no campo, mesmo antes da colheita.
7 Conforme relatos (Goulart *et al.*, 2007), os danos causados pela doença no Brasil podem
8 chegar a mais de 30%. Recentemente, Hamel, R. (2016) confirmou a presença da brusone de
9 trigo no sul de Bangladesh, a sua primeira aparição no continente asiático. Naquele local, os
10 danos podem chegar a 90% em cultivares suscetíveis.

11 Cultivares de trigo atualmente cultivadas no Brasil não possuem um nível adequado
12 de resistência à doença. Como uma forma de controle, é utilizado o manejo da cultura e
13 fungicidas. O uso de cultivares resistentes é a opção mais desejada, embora a experiência
14 observada em arroz mostra que a resistência, particularmente a monogênica, foi facilmente
15 superada pelo patógeno, permitindo infectar cultivares até então consideradas resistentes
16 (Bonman *et al.*, 1992; Araújo *et al.*, 2000).

17 A deposição local de componentes da parede celular quimicamente modificados é
18 fundamental para a resistência à penetração (Zeyen *et al.*, 2002). Tais eventos químicos foram
19 investigados em vários outros estudos histopatológicos, como na aveia a *Puccinia coronata*
20 (Graichen *et al.*, 2011), em trigo a *Puccinia triticina* (Wesp-Gutierrez *et al.*, 2013), em tomate
21 a *Cladosporium fulvum* (Heath *et al.*, 1990), e em arroz a *M. oryzae* (Rodrigues *et al.*, 2005).
22 Até o momento, não há relatos sobre a interação ao nível histopatológico de trigo e *M. oryzae*.
23 A fim de investigar esse problema na cultura do trigo e os mecanismos de resistência, buscou-
24 se investigar a interação entre o *Triticum aestivum* e o patógeno *M. oryzae* utilizando como
25 principal ferramenta de estudo a histopatologia.

26

1 MATERIAL E MÉTODOS

2

3 Isolamento do fungo

4

5 O fungo fitopatogênico *M. oryzae* utilizado no experimento foi proveniente da coleção
6 de isolados do Laboratório de Cereais de Inverno do Departamento de Fitossanidade da
7 Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O isolado utilizado foi o 145, obtido da cultivar
8 de arroz SCS 114 ANDOSAN (EPAGRI), obtido de panículas de plantas de arroz oriundas de
9 lavoura da cidade Nova Veneza/Santa Catarina. Para fazer o isolamento do fungo *M. oryzae*
10 foram utilizados materiais vegetais contendo lesões foliares. Foram cortados pequenos
11 segmentos de folhas e desinfestados em etanol (EtOH) 70% por 1 min., hipoclorito de sódio a
12 1% por 1 min, e duas lavagens de 1 min. cada em água destilada e deionizada (ADE).
13 Posteriormente, esses segmentos foram secados sobre folhas de papel filtro esterilizado.
14 Colocou-se os segmentos sobre meio de cultura aveia-ágar 1,5%, incubados com a placa
15 virada.

16 Quando se visualizou o crescimento do fungo, fez-se a repicagem das pontas das hifas
17 para placas contendo meio de cultura aveia-ágar com antibiótico Estreptomicina (500 ppm).
18 Após, as placas foram incubadas nas mesmas condições descritas acima, sob temperatura de
19 25°C e com fotoperíodo de 12 h luz e 12 h escuro.

20 Armazenagem dos isolados

21

22 Espalhou-se quadrados de papel filtro (1 cm²) estéreis sobre meio de cultura
23 apropriado em placas de Petri. Após, discos de micélio das bordas de colônias puras foram
24 transferidos para três pontos da placa para cultivar o fungo. Posteriormente, essas placas
25 foram incubadas à temperatura ótima de crescimento (28 °C) até a colonização dos quadrados
26 de papel.

1 Quando houve a colonização, as tiras de papel foram removidas com o auxílio de uma
2 pinça e deixando-as secar nas mesmas condições de incubação por 8 a 10 dias em placas de
3 Petri estéreis. Quando secas, foram transferidas para envelopes estéreis, frascos do tipo
4 penicilina de boca larga, tubos do tipo Falcon ou para Eppendorfs e armazenadas a -20°C ou
5 no ultra freezer a -80°C. Sempre que necessário, recorreu-se às tiras de papel para repicar e
6 multiplicar o inóculo.

7 **Produção de inóculo**

8
9 Para obter esse meio de cultura necessitou-se de 40 g de flocos de aveia, 15 g de ágar,
10 15 g de dextrose, água destilada 1L e autoclavados durante 15 minutos. Após o resfriamento
11 para 50°C foram adicionados 500 ppm de streptomicina. O fungo de *M. oryzae* foi incubado
12 durante 15 dias à temperatura de 28°C (Figuras 1a e 1b). Após, as hifas aéreas das colônias
13 foram maceradas e removidas pela adição de água e com a ajuda da alça de *Drigalski*. As
14 colônias foram mantidas sob luz negra (near-UV light) durante três dias para indução da
15 esporulação. Os conídios foram colhidos através da lavagem das placas com uma solução
16 estéril de (0,25% (v:v) gelatina e 0,01% (v:v) Tween 20) e varredura com pincel macio. Os
17 conídios coletados foram filtrados em gases e a densidade da suspensão ajustada para $1,8 \times$
18 10^5 conídios/mL com a solução de inoculação.

19 **Plantio e condução das plantas a serem inoculadas**

20
21 Foram utilizadas no estudo as cultivares de trigo: BR 18, Ônix, BRS 229 e Anahuac,
22 as quais se semeou em dez vasos com quatro plantas cada (Figura 6a). Os vasos continham
23 substrato Blume Garden (Terra Preta) e foram colocados em câmara de crescimento a 26°C
24 em ciclo de 16:8 h luz–escuro. As sextas folhas totalmente expandidas de cada planta foram
25 inoculadas com uma suspensão de conídios. As plantas foram envoltas em sacos plásticos

1 para manter a umidade relativa a 100% e mantidas a 28 °C no escuro por 24 h após a
2 inoculação (hai) e depois removidas para câmara de vegetação (Figura 6b). As coletas dos
3 segmentos das folhas inoculadas foram feitas em 6, 12, 18, 24, 36, 48 e 72 hai para posterior
4 análise histopatológica. Foram totalizados no mínimo de 10 segmentos de duas ou mais folhas
5 inoculadas para cada horário.

6 **Fixação do material vegetal**

7

8 Utilizou-se 750 mL 100% PA etanol com 250 mL de clorofórmio PA e 0,15% de
9 ácido tricloroacético sobre o total do etanol + clorofórmio. As amostras (segmentos de folhas)
10 permaneceram por 24 horas na solução fixadora.

11 Após, armazenou-se em glicerol 50% (glicerol + água destilada e deionizada (ADE)),
12 e foram guardadas no escuro. Sobre as amostras fixadas foram analisadas a germinação de
13 conídios, formação de apressórios, a penetração, a formação de colônias, a morte celular, e a
14 formação de papilas, convertendo os seus valores em percentuais.

15 **Análise de morte celular**

16

17 Os segmentos das folhas foram retirados do glicerol e fervidos por 5 min em solução
18 de *Trypan Blue* 0,03% em lactofenol: etanol (1:2 v/v). Os segmentos foram então imersos em
19 solução saturada de cloral hidratado (5:2 p/v) por 24h, para a retirada do excesso de corante
20 dos cloroplastos, e armazenados em glicerol 50% com traços de lactofenol. Posteriormente, as
21 amostras foram montadas em uma lâmina com uma gota de glicerol 50% e observadas em
22 microscópio Olympus BX41 nos aumentos de 200 e 400x, com contrastes de fases. Fez-se a
23 procura por células mortas a partir da presença do apressório na superfície e não da presença
24 de micélio ramificado em muitas células, o que caracteriza uma colônia já formada.

25

1 **Visualização de papilas**

2

3 Os mesmos segmentos que foram utilizados para a análise com *Trypan Blue* foram
4 utilizados para a visualização das papilas. Para isso, puderam-se desmontar as lâminas
5 previamente adequadas ao evento anterior avaliado. Depois de desmontar as lâminas,
6 desidrataram-se os segmentos em série alcoólica (etanol PA): i) 50% durante 30 min; ii) 70%
7 por 30 min; iii) 80% por 30 min; iv) 90% por 30 min e; v) 100% por 30 min.

8 Imediatamente após a desidratação, os segmentos foram coloridos com uma solução
9 de ácido pícrico saturado em metil-salicilato (2,5 g de ácido pícrico em 100 ml de metil-
10 salicilato) por 5 minutos. As amostras, agora no interior de Eppendorfs, foram levemente
11 agitadas durante o tempo de cinco min de coloração.

12 Após a coloração, as amostras foram imersas em metil-salicilato puro para retirar o
13 excesso de ácido pícrico. Assim, montaram-se as lâminas com metil-salicilato puro. As folhas
14 ficaram com uma coloração esverdeada e as colônias de micélio, no tecido, tornaram-se
15 azuladas. Observaram-se as amostras no microscópio com um conjunto de filtros de excitação
16 *U-MWB2 GPF: 450 to 480 nm, dichroic beamsplitter, 500 nm, barrier filter BA515*. A
17 formação de papila foi observada como regiões extremamente brilhantes.

18

19 **Análise dos dados**

20

21 Foram realizadas coletas em sete horários após a inoculação (6, 12, 18, 24, 36, 48 e 72
22 hai) e em quatro cultivares de trigo (Anahuac, BRS229, BR18 e Ônix), com quatro repetições.
23 De cada horário avaliado coletou-se quatro folhas de trigo de cada cultivar, e realizado dez
24 amostragens de segmentos dessas folhas de 2,5 cm de comprimento. Os parâmetros avaliados
25 foram germinação de esporos, formação de apressórios, penetração, formação de colônias,

1 morte celular e de estruturas semelhantes a papilas. Os dados foram comparados pelo Teste
2 Exato de Fisher com correções pelo teste de Bonferroni (MacDonald e Gardner, 2000).

3 O Teste Exato de Fisher foi utilizado por constatar-se que os dados não atendiam a
4 todos os pressupostos necessários para uma análise de variância (ANOVA). O Teste Exato de
5 Fisher 2 X 2 para cada uma das seis comparações de pares com as respectivas correções de
6 Bonferroni (em 6 hai – BR18 vs Ônix, BR18 vs BRS229, BR18 vs Anahuac, etc.). Para as
7 seis comparações realizadas em cada horário entre as cultivares, o valor P deve ser inferior a
8 $0,05 / 6$, ou $0,008$, para ser significativa no nível $P < 0,05$, enquanto que para os dados de
9 morte celular dos diferentes intervalos de tempo em cada cultivar foram três comparações 2 X
10 2. Logo, o valor P deve ser inferior a $0,05 / 3$, ou $0,02$, para ser significativa no nível $P < 0,05$.

11 Nas tabelas apresentadas abaixo estão às comparações realizadas com o Teste Exato
12 de Fisher com as correções de Bonferroni que foram realizadas para cada horário entre as
13 cultivares e, posteriormente, os diferentes tempos para cada uma das cultivares. Nas mesmas,
14 está demonstrado como foram realizadas as comparações nos horários (6, 12, 18, 24, 36, 48 e
15 72 hai) em cada cultivar para os parâmetros de germinação, formação de apressórios,
16 penetração, formação de colônias e morte celular (*Valor de P* = 0.008). Para a avaliação de
17 formação de colônias realizaram-se somente as comparações no horário de 48 hai (*Valor de P*
18 = 0.008). Para a morte celular para os horários de 24, 36, 48 e 72 hai (*Valor de P* = 0.02).

19

20 Tabela 1. Comparações entre cultivares em cada horário avaliado para os parâmetros de
21 germinação, formação de apressórios e penetração (*Valor de P* = 0.008).

	% Germ.	% Form. Ap.	% Pen.
	<i>Valor de P = 0,008</i>	<i>Valor de P = 0,008</i>	<i>Valor de P =</i> 0,008
6H BR 18 X ONIX	0,06100	0,039764	1,00
6H BR 18 X BRS 229	0,07400	0,121299	1,00

6H BR 18 X ANAHUAC	1,10E-07*	0,562915	1,00
6H ONIX X BRS 229	0,53904	0,419012	1,00
6H ANAHUAC X BRS 229	0,00140*	0,276009	1,00
6H ONIX X ANAHUAC	0,17245	0,084780	1,00

1 Abaixo estão as comparações realizadas com o Teste Exato de Fisher com as
2 correções de Bonferroni para os diferentes tempos de amostragens em cada cultivar.

3

4 Tabela 2. Comparações entre os diferentes tempos de amostragens em cada cultivar para os
5 parâmetros de germinação, formação de apressórios e penetração (*Valor de P=*
6 *0.008*).

	%Germ.	%Form. Ap.	%Pen.
	<i>Valor de P = 0,008</i>	<i>Valor de P = 0,008</i>	<i>Valor de P = 0,008</i>
BR 18 6-12 hai	9,55E-28 *	1,412544E-16*	0,37
BR 18 12-18 hai	0,00032606*	3,785566E-15*	0,07
BR 18 18-24 hai	8,27E-10*	7,78211E-13*	1,88E-13*
BR 18 24-36 hai	4,52E-08*	7,68364E-108*	0,000010*
BR 18 36-48 hai	1	6,08514E-101*	0,28
BR 18 48-72 hai	1	9,45740E-16*	5,19E-18*

7

8

9

10

11

12

1 Tabela 3. Comparações realizadas para o parâmetro de morte celular, a exemplo o tempo de
 2 24 hai em cada cultivar (*Valor de P* = 0.02).

		% Morte Cel.
		<i>Valor de P = 0,02</i>
24 hai	BR 18 X ONIX	7,18E-53*
24 hai	BR 18 X BRS229	1,27E-63*
24 hai	BR 18 X ANAHUAC	1,46E-76*
24 hai	ONIX X BRS 229	0,1950
24 hai	ONIX X ANAHUAC	0,4752
24 hai	BRS 229 X ANAHUAC	0,4440

3

4 Posteriormente para esse mesmo parâmetro, realizaram-se as comparações para os
 5 diferentes tempos de amostragens em cada cultivar, como exemplo da cultivar BR18
 6 demonstrado abaixo. De acordo com o Teste Exato de Fisher com as correções de Bonferroni.

7

8 Tabela 4. Comparações nos diferentes tempos de amostragens para cada cultivar, como
 9 exemplo abaixo a cultivar BR 18 (*Valor de P* = 0.02).

		% Morte Cel.
		<i>Valor de P= 0,02</i>
BR 18	24-36 hai	1
BR 18	36-48 hai	0,0303
BR 18	48-72 hai	0,8656

10

11

12

13

14

1 **RESULTADOS**

2

3 **Germinação de esporos**

4 Na Tabela 5, estão representados os percentuais de esporos germinados. O efeito mais
5 marcante para a distinção das cultivares com relação à germinação de esporos para cada um
6 dos tempos se dá no período de seis horas após a inoculação (hai), destacando-se a cultivar
7 Anahuac por apresentar um percentual mais elevado do que as demais cultivares de trigo. Nos
8 demais tempos observados, de 12, 18, 24, 36, 48 e 72 horas após a inoculação (hai), todos os
9 percentuais de germinação de esporos foram bastante elevados e semelhantes entre as
10 cultivares, exceto para o tempo de 18 hai, onde os valores percentuais de germinação
11 diferiram estatisticamente entre si. No início do processo de germinação, em seis hai,
12 destacaram-se as cultivares Anahuac (84,49%) e Ônix (77,33%) com maiores percentuais de
13 germinação, embora os valores de BRS229 (72,95%) e BR18 (64,00%) não tenham diferido
14 de Ônix.

15 A germinação dos esporos ao longo dos diferentes tempos para cada uma das
16 cultivares revela uma tendência de aumento da germinação à medida que aumenta o tempo
17 após a inoculação. Esse efeito é mais marcante entre seis e 12 hai, estabilizando com valores
18 percentuais altos após. Destaca-se aqui a cultivar BR 18, com valor de germinação dos
19 esporos significativamente inferior em seis horas (64%), em comparação com o tempo
20 seguinte de 12 hai (97,78%).

21

22 **Formação de apressórios**

23 Na Tabela 6 encontram-se os valores percentuais para a formação dos apressórios do
24 fungo na superfície das folhas de trigo. No período de seis horas após a inoculação o
25 percentual de apressórios formados é bastante baixo, variando de 15 e 30 %, porém não
26 diferindo entre as cultivares. Com 12 hai a formação de apressórios aumenta

1 significativamente para as cultivares, exceto para BRS 229, a qual mantém um percentual
2 ainda baixo, de 17%, mantendo esta tendência até o próximo tempo de 18 hai, com valor de
3 38,17%, o menor entre todas as cultivares.

4 Em 36 hai há um destaque para as cultivares BR 18 e Ônix, por apresentarem valores
5 significativamente inferiores de apressórios formados em relação às cultivares Anahuac e
6 BRS 229. De um modo geral, a cultivar conhecida como suscetível Anahuac apresentou uma
7 formação de apressórios bastante elevada em todos os tempos amostrados. Individualmente,
8 as cultivares mostraram uma tendência de elevação na formação dos apressórios na medida
9 em que aumenta o tempo após a inoculação, chegando a um patamar máximo em 48 hai, com
10 valores entre 93 e 96%. Após esse tempo, em 72 hai, BR 18 e Ônix, tiveram a formação de
11 apressórios reduzida para valores de 79 e 86%, respectivamente.

12 Na Figura 7, ilustra-se a formação de apressórios no tempo de 36 hai na cultivar BRS
13 229. Em 7a, tem-se a ilustração de um apressório através de microscopia eletrônica
14 representada por um corte transversal de um apressório produzido pelo fungo *M. oryzae* em
15 contato com o substrato. Em 7b, visualizam-se os apressórios completamente formados e
16 melanizados na cultivar BRS 229 no tempo de 36 hai. Como demonstrado na Tabela 2, a partir
17 do tempo de 24 hai nota-se que as cultivares já possuem elevado número de apressórios
18 formados, todos melanizados.

19

20 **Penetração**

21 A Tabela 7 mostra os percentuais de penetração em células da epiderme de folhas de
22 trigo a partir de apressórios melanizados. Os dados deste parâmetro avaliado mostraram-se
23 muito variáveis e inconclusivos, com aumentos e diminuições do percentual de penetração na
24 medida em que aumentou o tempo de coleta das amostras após a inoculação.

25 Nas Figuras 8a, 8b, 8c e 8d, observa-se os processos de penetração no tecido da folha
26 de trigo. Entre 6 – 12 hai após a inoculação tem-se os esporos já germinados e a formação dos

1 apressórios, os quais, nesse caso, já estavam melanizados. Esta é uma característica muito
2 importante para o próximo passo, a penetração.

3 Conseqüentemente na Figura 8b, a partir de 18 hai observa-se o ponto de penetração, a
4 partir do qual entre 24 – 36 hai inicia-se o processo de penetração (Figura 8c), claramente
5 indicado pelas setas o esporo germinado e o apressório com as hifas infectivas. Na Figura 8d,
6 entre 48 – 72 hai, verifica-se que há um crescimento das hifas infectivas invasivas, invadindo
7 em seguida as células vizinhas àquela infectada.

8

9 **Formação de colônias**

10 A Tabela 8 mostra a formação de colônias de *M. oryzae*, o que se caracteriza pela
11 infecção e invasão das hifas para as várias células vizinhas, a partir do ponto de penetração
12 abaixo do apressório. Esse parâmetro foi analisado somente no horário de 48hai, por ter sido o
13 tempo que mais claramente pode-se observar esse evento. A cultivares conhecida como sendo
14 a mais suscetível Anahuac mostrou o maior percentual de formação de colônias, com 71%,
15 seguida de Ônix, com 43%. Os menores percentuais de formação de colônias foram obtidos
16 pelas cultivares BRS229 e BR18, com 18,97 e 2,63 %, respectivamente.

17 Na Figura 9, observa-se o processo de colonização por hifas invasivas para as células
18 vizinhas na cultivar Anahuac, em 48 hai após a inoculação. Na Figura 9a, tem-se o esporo
19 com o apressório em processo de penetração nas células. Posteriormente, na figura 9b e 9c,
20 constata-se a fase inicial da invasão a partir das hifas às demais células do tecido foliar. Na
21 Figura 9d, salienta-se o avanço da penetração nas células adjacentes e, conseqüentemente, a
22 constituição das colônias de hifas. Assim, à medida que as hifas infectivas e invasivas
23 penetram, as células do tecido foliar tornam-se ineficientes na sua funcionalidade e morrem.

24

25

1 **Morte celular**

2 Em todos os tempos avaliados os maiores percentuais de morte celular foram obtidos
3 pela cultivar BR 18 (Tabela 9). Esses percentuais mostrados pela BR 18 foram bastante altos,
4 em torno de 70% para os tempos 24 e 36 hai e acima de 90% em 48 e 72 hai. Todas as demais
5 cultivares mostraram valores de morte celular bastante inferiores a BR18 em qualquer dos
6 tempos avaliados.

7 Em 48 hai, no entanto, BRS229 mostrou um valor de morte celular estatisticamente
8 semelhante ao da cultivar BR18, com 84,5%. Nos primeiros momentos do processo infectivo,
9 de 24 e 36 hai, pode-se observar valores relativamente baixos de morte celular para as
10 cultivares Ônix, BRS229 e Anahuac, entre 3,6 e 11,6% somente. Os maiores valores médios
11 de morte celular foram obtidos em 48 hai, com uma tendência a diminuir em 72 hai
12 (Tabela 9).

13 Na Figura 10 estão demonstrados graficamente os percentuais de morte celular, os
14 quais, nesse trabalho, foram analisados em morte celular centralizada e morte celular
15 generalizada. A morte celular centralizada consiste em um colapso delimitado em uma célula,
16 enquanto que a morte celular generalizada consiste em morte celular que abrange várias
17 células adjacentes.

18 Para análise de morte celular contabilizou-se em cada horário o número total de morte
19 celular (morte celular centralizada – MCC e morte celular generalizada – MCG) a partir dos
20 apressórios melanizados, a fim de obter o percentual total de morte celular. Do número total
21 de morte celular, foi contabilizada MCC e a MCG, em percentuais relativos à morte celular
22 total, nos horários de avaliação de 24, 36, 48 e 72 hai.

23 A cultivar BR18 apresenta 64,68% MCC desde 24 hai. Às 48 hai houve elevados
24 percentuais de morte celular em todas as cultivares inoculadas com *M. oryzae*. Nesse horário
25 de observação, as cultivares BR18, Ônix e BRS229 apresentaram maiores percentuais de
26 51,01%, 46,61%, 53,96%, respectivamente, de MCC do que a cultivar Anahuac, com 14,38%.

1 Na Figura 11a e 11b, visualiza-se a morte celular generalizada na cultivar Anahuac em
2 48h. Já na Figura 11c e 11d, ilustra-se a morte celular centralizada, também para essa cultivar
3 e horários amostrado.

4

5 **Estruturas semelhantes a papilas**

6 A Figura 12 ilustra estruturas semelhantes a papilas que foram analisadas nos horários
7 de 24, 36, 48 e 72 hai em todas as cultivares. Todavia, somente na cultivar Ônix visualizaram-
8 se células com estruturas brilhantes semelhantes a papilas e unicamente em 72 hai. A Figura
9 12a mostra uma célula escura morta devido ao estágio avançado da infecção presente nesse
10 horário contendo um apressório.

11 A Figura 12b destaca a divisão desta mesma célula com a célula vizinha pela parede
12 celular, onde a célula da esquerda, não infectada, apresenta um aspecto brilhante pela sua
13 fluorescência, a qual destaca o seu processo de defesa na produção de estruturas semelhantes
14 a papilas. Acredita-se que esta fluorescência ocorra devido ao desenvolvimento de uma
15 parede celular mais espessa, com a deposição de compostos químicos que aumentam a
16 resistência dessas células e evitam o avanço do patógeno. Na Figura 13a e 13b, observam-se
17 estruturas fluorescentes. Ainda, quando há a penetração do apressório tem-se a formação de
18 granulometria no ponto de infecção, a qual mostrou estar associada à fluorescência nesse
19 local.

20 Da mesma forma, nota-se na Figura 13c uma célula que está sendo infectada a partir do
21 apressório em sua superfície, hifas infectivas no interior da célula e granulose. Essa mesma
22 célula possui autofluorescência (Figura 13 d), sugerindo a existência de papilas em suas
23 paredes. Em contrapartida, nas Figuras 13e e 13f, a cultivar Anahuac não apresenta a célula
24 com aspecto fluorescente abaixo do apressório e do ponto de penetração.

25

26 **DISCUSSÃO**

1 Os fungos fitopatogênicos desenvolveram estruturas e mecanismos de infecção que
2 atingem os tecidos internos da planta. Alguns fungos penetram através de ferimentos,
3 aberturas naturais, e inúmeros meios de penetração pela superfície foliar. A infecção foliar
4 começa quando os conídios se aderem à superfície foliar através da extrusão das células
5 apicais (Fernandez e Wilson, 2013). Os conídios de *M. oryzae* germinam na presença de água
6 originando o tubo germinativo após 30 minutos (Bourett e Howard, 1990). Os esporos de *M.*
7 *oryzae* germinam rapidamente, tão logo 2 horas após a inoculação. Posteriormente à
8 germinação do conídio e à formação dos apressórios na ponta do tubo germinativo (Fernandez
9 e Wilson, 2013) forma-se o grampo de penetração, o qual amadurece e torna-se melanizado
10 (Bourett e Howard, 1990). Observou-se que a germinação dos esporos para todas as cultivares
11 estudadas, BR18, Ônix, BRS229 e Anahuac, atinge uma constante a partir de 12 hai, como
12 relata o trabalho de Faivre-Rampant *et al.* (2008).

13 De acordo com os dados desse trabalho, todos os apressórios formados e de todas as
14 cultivares estudadas eram melanizados. Além do aspecto bioquímico, a formação de
15 apressórios melanizados e a pressão de turgor exercida pelo grampo de penetração desta
16 estrutura, parecem ser indispensáveis ao processo de pré-penetração e penetração do
17 hospedeiro em relação a *M. oryzae*. De acordo com o estudo de Wilson e Talbot (2009), e
18 visualizado na Figura 7a e 7b, a maturação dos apressórios de *M. oryzae* envolve a deposição
19 de melanina e quitina internamente a parede celular. A camada de melanina é depositada entre
20 a membrana plasmática e a parede celular do apressório e proporciona uma barreira
21 semipermeável para a geração de turgescência osmótica, o que impede o efluxo de solutos
22 (Fernandez e Wilson, 2013). Origina-se, dessa forma, um ambiente hipertônico que induz a
23 entrada de água ao seu interior, ampliando a pressão de turgor do apressório e a força exercida
24 através do grampo de penetração (Wilson e Talbot, 2009). Fernandez e Wilson (2013)
25 também destacam que a acumulação de glicerol e a geração de enorme turgescência

1 hidrostática no apressórios são fatores que influenciam na próxima fase de desenvolvimento
2 apressorial.

3 Da mesma maneira foi descrito por Talbot (2003) que a melanina presente no
4 apressório de *Magnaporthe* sp. é essencial para que a infecção ocorra, porque isto permite que
5 o interior de turgescência do apressório aumente, produzindo uma força mecânica necessária
6 para a penetração (Talbot, 2003). E de acordo com os dados desse trabalho, a proporção de
7 apressórios nas primeiras horas de avaliação, ou seja, no período de seis horas após a
8 inoculação foi baixa, o que variou de 15 e 30 %. Em 12 hai, a formação de apressórios
9 aumenta significativamente para as cultivares, exceto para BRS 229, a qual mantém um
10 percentual ainda baixo, de 17%, mantendo esta tendência até o próximo tempo de 18 hai, com
11 valor de 38,17%, o menor entre todas as cultivares. Em 36 hai há um destaque para as
12 cultivares BR 18 e Ônix, por apresentarem valores significativamente inferiores de
13 apressórios formados em relação às cultivares Anahuac e BRS 229. De um modo geral, a
14 cultivar conhecida como suscetível Anahuac apresentou uma formação de apressórios
15 bastante elevada em todos os tempos amostrados. Individualmente, as cultivares mostraram
16 uma tendência de elevação na formação dos apressórios na medida em que aumenta o tempo
17 após a inoculação, chegando a um patamar máximo em 48 hai, com valores entre 93 e 96%.
18 Após esse tempo, em 72 hai, BR 18 e Ônix, tiveram a formação de apressórios reduzida para
19 valores de 79 e 86%, respectivamente.

20 Os dados dos percentuais de penetração em células da epiderme de folhas de trigo a
21 partir de apressórios melanizados mostraram-se muito variáveis e inconclusivos, com
22 aumentos e diminuições do percentual de penetração na medida em que aumentou o tempo de
23 coleta das amostras após a inoculação. De acordo com Fernandez e Wilson (2013), após a
24 penetração bem sucedida na cutícula da folha de arroz por um apressório, ocorre uma
25 profunda mudança na morfologia fúngica e exigências metabólicas. O grampo de penetração
26 do apressório primeiro se diferencia em hifa tubular primária no espaço apoplástico antes de

1 invadir a membrana plasmática da folha, o qual é formado a partir de 18 hai, como ilustrado
2 na Figura 8b, onde se observa o grampo de penetração. Posteriormente a esse horário, inicia-
3 se o processo invasão dos tecidos no intervalo de 24 – 36 hai, como indicado pelo esporo
4 germinado, o apressório e as hifas infectivas (Figura 8c).

5 Fernandez e Wilson (2013) destacam que a acumulação de glicerol e a geração de
6 enorme turgescência hidrostática no apressórios são fatores que influenciam na próxima fase
7 de desenvolvimento apressorial. Esses eventos também foram relatados por Faivre-Rampant
8 *et al.* (2008), em que a penetração do fungo é devido ao rompimento da cutícula da folha e da
9 epiderme através da pressão de turgor ocasionada pelo apressório melanizado. Como
10 consequência, há a formação de hifas infectivas. Na Figura 8d, entre os tempos de 48 – 72 hai,
11 verifica-se uma transformação das hifas infectivas às hifas invasivas, as quais invadem as
12 células vizinhas àquela infectada.

13 A partir de 36 hai obteve-se uma elevação na infecção das células. Estendendo-se até
14 48 hai (Figuras 8a, 8b e 8c), o fungo desenvolve hifas finas que se deslocam para as células
15 vizinhas via plasmodesmata, onde se diferenciam em hifas invasivas (HI) bulbosas (Giraldo *et*
16 *al.*, 2013). A colonização sucessiva das células pelas hifas invasivas ocorre durante a fase
17 biotrófica até a fase necrotrófica inicial (Fernandez e Wilson, 2013), como visualizado na
18 Figura 8 entre os períodos de 24 – 36 hai e 48 – 72 hai. De fato, as comparações entre as
19 percentagens de penetração e os horários para cada cultivar resultaram, assim, que a BR18
20 difere estatisticamente entre 18 – 24 hai, 24 – 36 hai, e 48 – 72 hai. Na cultivar Ônix, em
21 contrapartida, entre 48 – 72 hai, não há diferença significativa.

22 Esses dados sugerem que sua fase necrotrófica está em torno das 48 hai.
23 Posteriormente a esse período, a penetração já não é tão evidente quando se compara com a
24 cultivar suscetível Anahuac, a qual distinguiu estatisticamente entre 24 – 36 hai, e 48 – 72 hai.
25 É possível que, para essa cultivar, a fase necrotrófica possa ocorrer antes de 48 hai. Conforme

1 Yi e Valent (2013). Durante a fase biotrófica da infecção, muitas proteínas são
2 secretadas pelo fungo *M. oryzae* dentro das células de arroz.

3 Na Figura 8d, é ilustrado este aspecto da biologia de *M. oryzae*, que é facilitada por
4 uma estrutura conhecida como Complexo Interfacial Biotrófica (CIB), a qual se forma em
5 hifas primárias à medida que entram em cada célula (Valent *et al.*, 2010). Às em 48 hai,
6 ocorre a fase de maior invasão das hifas invasivas sobre diversas células do hospedeiro,
7 tendo-se, assim, a formação elevada de colônias na cultivar suscetível Anahuac, com um valor
8 de 71%. A cultivar BR18 apresentou morte celular elevada para todos os horários de
9 observação considerados, diferindo das demais cultivares analisadas, nos tempos de avaliação
10 de 24, 36 e 72 hai. Às 48 hai, as percentagens de morte celular de BR18 e BRS229 não
11 diferem entre si, mas diferem quanto à Ônix e à Anahuac. Estas duas últimas cultivares
12 diferem ente si, com 61,65% e 39,92%, respectivamente, de morte celular.

13 A Figura 11c e 11d, ilustra a morte celular centralizada, quando somente uma célula
14 morreu e a generalizada, com a morte de mais de uma célula, ou seja, quando atingiu o
15 mesófilo e espalhou-se pelas células vizinhas. Com isso, verifica-se que as cultivares Anahuac
16 e BR18 apresentaram maior evidências de morte celular em 48 hai, quando comparadas com
17 as cultivares Ônix e BRS229 diferindo das demais cultivares analisadas, nos tempos de
18 avaliação de 24, 36 e 72 hai.

19 A penetração na parede celular geralmente não é uma barreira para patógenos
20 adaptados. Segundo Wesp (2011), a formação de haustórios pode ser prevenida pela formação
21 de papilas nas células do mesófilo. Estas atuam como barreira física e química à penetração e
22 possuem uma matriz de calose, contendo vários constituintes orgânicos e inorgânicos,
23 incluindo proteínas antimicrobianas e compostos fenólicos autofluorescentes.

24 A autofluorescência em células do mesófilo pode estar associada com a morte
25 celular, com a lignificação e com a formação de papilas (Bozkurt *et al.*, 2010). Podem ser
26 distinguidos dois padrões de produção de compostos autofluorescentes relacionados com o

1 acúmulo de compostos fenólicos: somente nas paredes das células ou, em toda a célula. Este
2 último estaria relacionado com a morte celular (Stadnik e Buchenauer, 1999). A cultivar Ônix
3 desenvolveu estruturas de aspecto brilhante, que se assemelham a papilas. Esse fato observou-
4 se somente no horário de 72h. Na Figura 12a e 12b, observam-se essas estruturas, as quais
5 possuem aspecto autofluorescente. Porém, na célula que apresenta aspecto escurecido houve a
6 penetração do apressório, e quando este tenta penetrar na célula adjacente, esta reage
7 produzindo uma fluorescência ou formando um composto autofluorescente. Todavia, a
8 formação de estruturas semelhantes a papilas em Ônix pode estar relacionada com a produção
9 de compostos autofluorescentes pelas células. Kruger *et al.* (2002) descrevem evidências da
10 importância de compostos fenólicos e produtos da biossíntese de ligninas ou da síntese de
11 intermediários de fenilpropanóides na formação de papilas. Nas interações envolvendo oídios
12 dos cereais, a intensidade de autofluorescência pela presença de compostos fenólicos nas
13 células da epiderme esteve correlacionada com a formação de papilas nas mesmas (Rojas-
14 Molina *et al.*, 2007). Niks (1986) considerou a formação de papilas como presença de
15 pontuações altamente fluorescentes e brilhantes nas paredes celulares em contato com o fungo
16 *Puccinia hordei* em cevada, e Bender *et al.* (2000) visualizou essas estruturas e aspectos
17 brilhantes em trigo com *P. recondita* f. sp. *tritici*. Ao contrário, os resultados desse trabalho
18 sugerem que a fluorescência formada, principalmente na cultivar Ônix, consiste em toda ou
19 praticamente toda a célula. Isso pode estar relacionado com a morte celular ocasionada por
20 hipersensibilidade.

21 A natureza desta fluorescência pode ser atribuída à presença de compostos fenólicos.
22 Estes compostos associados à defesa podem levar à lignificação das paredes celulares e até a
23 morte celular por hipersensibilidade (Rojas-Molina *et al.*, 2007). Essa reação de
24 hipersensibilidade devido à morte celular pode ser observada mais acentuadamente na cultivar
25 BR18, pois apresentou percentual elevado e contínuo de células mortas durante todos os
26 tempos de amostragem, se comparado às demais cultivares. Contudo a diferença da cultivar

1 Ônix consiste no aspecto brilhante, e para essa cultivar a morte celular somente foi elevada no
2 tempo de 48 hai (61,65%) e decresceu para 23,32% em 72 hai. Logo, pode se dizer que a
3 morte celular, em BR18, está relacionada com a reação de hipersensibilidade, pois seu
4 percentual manteve-se elevado durante todos os horários. De forma análoga, relatos da morte
5 celular por hipersensibilidade foram descritos por Wesp (2011) para a ferrugem da folha do
6 trigo, em que essa reação foi caracterizada como resistência total, que consiste na morte
7 celular no local da infecção, após a percepção da violação da parede celular e tentativa de
8 formação de haustórios.

9 Além disso, na Figura 13a e 13b, pode-se observar uma granulometria citosólica no
10 local de penetração, onde há fluorescência. Esse aspecto também foi visualizado por
11 Rodrigues *et al.* (2005) em arroz a partir da infecção do *M. oryzae*, sendo chamada de “papila-
12 like” pelos autores. Tufan *et al.* (2009) descreveram reações citoplasmáticas semelhantes
13 causadas por *M. oryzae* em trigo, no entanto os isolados que induziram a reação eram
14 oriundos de *Digitaria sanguinalis*, sendo considerados pelos autores como “patógenos não-
15 adaptados”. Além disso a reação observada não foi tão intensa quanto àquelas registradas no
16 presente trabalho para a cultivar Ônix. A formação de estruturas “papila-like” observadas na
17 cultivar Ônix em 72 hai consiste no primeiro relato desse tipo de resistência em trigo ao fungo
18 *M. oryzae*. A granulação citoplasmática da primeira célula epidérmica invadida tem sido
19 associada com a resistência específica para isolados adaptados de *Magnaporthe* do arroz
20 (Tomita e Yamanaka, 1983).

21 A formação de papilas, desse modo, é uma das primeiras respostas de defesa
22 observada em plantas, que tem sido analisada em um nível celular durante mais de 150 anos
23 (Voigt, 2014). de Bary (1863) descobriu papilas em locais de penetração de fungos e Mangin
24 (1895), relata que calose comumente ocorre em papilas. As análises químicas, desde então,
25 identificaram componentes químicos adicionais, que compreendem compostos fenólicos e
26 lignina, espécies reativas de oxigênio (ROS), proteínas da parede celular, como as peroxidases

1 e as tioninas antimicrobianas (Voigt, 2014). Como o papel de calose em papilas consiste em
2 uma função na defesa poderia ser atribuída à maior parte dos outros componentes (Brown *et*
3 *al.*, 1998). A formação de papilas é uma resposta de defesa precoce e pode contribuir para a
4 imunidade inata da planta (Schwessinger e Ronald, 2012).

5

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 ARAÚJO, L.G.; PRABHU, A.S.; BARROS FREIRE, A. Development of blast-resistant
8 somaclones of the upland rice cultivar Araguaia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**,
9 Brasília, v.35, p.357-367, 2000.

10 BEDENDO, I.P.; PRABHU, A.S. Doenças do arroz (*Oryza sativa*). In: KIMATI H. et al.
11 (Ed.) **Manual de Fitopatologia Doenças de Plantas Cultivadas**. 4 ed. São Paulo, SP:
12 Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p.79 – 90.

13 BENDER, C.M. et al. Histopathology of leaf rust infection and development in wheat
14 genotypes containing Lr12 and Lr13. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, p. 65 – 76,
15 2000.

16 BONMAN, J.M.; KHUSH, G.S.; NELSON, R. Breeding rice for resistance to pests. **Annual**
17 **Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.30, p.78-94, 1992.

18 BOURETT, T.M.; HOWARD, R.J. In vitro development of penetration structures in rice blast
19 fungus *Magnaporthe grisea*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 68, p. 329-342, 1990.

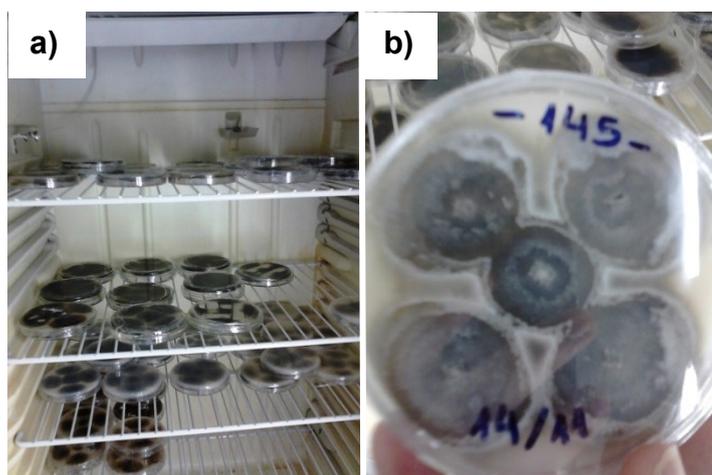
20 BOZKURT, T.O et al. Cellular and transcriptional responses of wheat during compatible and
21 incompatible race-specific interactions with *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*. **Molecular**
22 **Plant Pathology**, Bristol, v. 11, p. 625 – 640, 2010.

- 1 BROWN, I. et al. Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins
2 and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic
3 strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. **The Plant Journal**,
4 Oxford, v. 15, p. 333–343, 1998.
- 5 DE BARY, A. Recherches sur le développement de quelques champignons parasites. **Annales**
6 **des Sciences Naturelle. Botanique et Biologie Végétale**, Paris, v. 20, p. 5–148, 1863.
- 7 FAIVRE-RAMPANT, O. et al. Characterization of the model system Rice – Magnaporthe for
8 the study of nonhost resistance in cereals. **New Phytologist**, London, v. 180, 899-910, 2008.
- 9
- 10 FERNADEZ, J.; WILSON, R.A. Cells in cells: morphogenetic and metabolic strategies
11 conditioning rice infection by the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Protoplasma – Review**
12 **Article**, Wien, v. 251, p.37–47, 2013.
- 13 GIRALDO, M.C. et al. Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice
14 blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Nature Communications**, London, p. 1 – 12, 2013. (DOI:
15 10.1038/ncomms2996)
- 16 GOULART, A.C.P.; SOUSA, P.G.; URASHIMA, A.S. Danos em trigo causados pela
17 infecção de *Pyricularia grisea*. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 33, p.358-363, 2007.
- 18 GRAICHEN, F.A.S. et al. Epidemiological and histological components of oat crown rust
19 resistance in oat genotypes. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 130, 497-
20 510, 2011.
- 21
- 22 HAMEL, R. **Severe, Climate Change-driven Wheat Fungus Found in Bangladesh,**
23 **Highlighting Need for Risk Management Programs.** 2016. Disponível em:

- 1 <[http://csis.org/publication/severe-climate-change-driven-wheat-fungus-found-bangladesh-](http://csis.org/publication/severe-climate-change-driven-wheat-fungus-found-bangladesh-highlighting-need-risk-manage)
2 [highlighting-need-risk-manage](http://csis.org/publication/severe-climate-change-driven-wheat-fungus-found-bangladesh-highlighting-need-risk-manage). Acesso em: 29 mar. 2016.
3
- 4 HEATH, M. C. et al. Interactions of two strains of *Magnaporthe grisea* with rice, goosegrass,
5 and weeping lovegrass. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 68, p.1627–1637, 1990.
- 6 HOWARD, R.J.; VALENT, B. Breaking and entering: host penetration by fungal rice blast
7 pathogen *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 50, p. 491-
8 512, 1996.
- 9 IGARASHI, S. et al. *Pyricularia* em trigo 1. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do
10 Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, 351-352, 1986.
- 11 KRUGER, W.M.; CARVER, T.L.W.; ZEYEN, R.J.; Effects of inhibiting phenolic
12 biosynthesis on penetration resistance of barley isolines containing seven powdery mildew
13 resistance genes or alleles. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 61, p.
14 41 – 51, 2002.
- 15 LAU, D. et al. Doenças do Trigo. In: PIRES, J.L.F.; VARGAS, L.; CUNHA, G.R. (Ed.).
16 **Trigo no Brasil: bases para produção competitiva e sustentável**. Passo Fundo: EMBRAPA
17 Trigo, 2011. p. 283-324
- 18 MacDONALD, P.L.; GARDNER, R.C. Type I error rate comparisons of post hoc procedures
19 for I×J chi-square tables. **Educational and Psychological Measurement**, Thousand Oaks, v.
20 60, p. 735-754, 2000.
- 21 MANGIN, L. Recherches sur les Péronosporées. **Bulletin / Société d’Histoire Naturelle**
22 **d’Autun**, Autun, v. 8, p. 55–108, 1895.

- 1 NIKS, R.E. Failure of haustorial development as a factor in slow growth and development of
2 *Puccinia hordei* in partially resistant barley seedlings. **Physiological and Molecular Plant**
3 **Pathology**, London, v. 28, p. 309 – 322, 1986.
- 4 RODRIGUES, F.A. et al. Silicon influences cytological and molecular events in compatible
5 and incompatible rice-Magnaporthe grisea interactions. **Physiological and Molecular Plant**
6 **Pathology**, London, v. 66, p. 144–159, 2005.
- 7 ROJAS-MOLINAS, M.D.M. et al. Effects of phenylpropanoid and energetic metabolism
8 inhibition on faba bean resistance mechanisms to rust. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, p.
9 60 – 65, 2007.
- 10 SCHWESSINGER, B.; RONALD, P.C. Plant innate immunity: perception of conserved
11 microbial signatures. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p.451–482, 2012.
- 12 STADNIK, M.J.; BUCHENAUER, H. Accumulation of autofluorogenic compounds at the
13 penetration site of *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici* is associated with both benzothiadiazole
14 induced and quantitative resistance of wheat. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, p.
15 615-622, 1999.
- 16 TALBOT, N.J. On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea*.
17 **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.57, p.177-202, 2003.
- 18 TOMITA H.; YAMANAKA, S. Studies on the resistance reaction in the rice blast disease
19 caused by *Pyricularia oryzae* Cavara I. The pathological changes in the early infection stage
20 of the inner epidermal cells of leaf sheath. **Annals of the Phytopathological Society Japan**,
21 Tokyo, v. 49, p. 514–521, 1983.

- 1 TUFAN, H. A. et al. Wheat blast: histopathology and transcriptome reprogramming in
2 response to adapted and nonadapted Magnaporthe isolates. **New Phytologist**, London, v. 184,
3 p. 473–484, 2009.
- 4 WESP, C. L. **Histopatologia das reações de resistência de hospedeiro e de não-**
5 **hospedeiro em interações Puccinia triticina x Poaceae**. 2011. 156 f. Tese (Doutorado) –
6 Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Faculdade de Agronomia, Universidade
7 Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- 8 WESP-GUTERRES, C. et al. Histopathology of durable adult plant resistance to leaf rust in
9 the Brazilian wheat variety Toropi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.
10 137, p.181–196, 2013.
- 11 WILSON, R. A.; TALBOT, N. J. Under pressure: investigating the biology of plant infection
12 by Magnaporthe oryzae. **Nature Review Microbiology**, London, v. 7, p.185–195, 2009.
- 13 VALENT, B.; KHANG, C. H. Recent advances in rice blast effector research. **Current**
14 **Opinion in Plant Biology**, London, v. 13, p. 434–441, 2010.
- 15 VOIGT, C.A. Callose – mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense – related
16 papillae. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, Article 168, april 2014.
- 17 ZEYEN, R.J.; CARVER, T.L.W.; LYNGKJAER, M.F. Epidermal cell papillae. In: THE
18 POWDERY Mildews: a comprehensive treatise. St. Paul, MN: **American Phytopathological**
19 **Society**, 2002. p. 107-124
- 20 YI, M.; VALENT, B. Communication between filamentous pathogens and plants at the
21 biotrophic interface. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 51, p.587– 611, 2013.
- 22
23
24
25



1
2

3 FIGURA 1. Desenvolvimento em meio ágar-aveia do isolado de *M. oryzae* em BOD à
4 temperatura de 27,5 °C. a) Incubação do isolado Py 145 em placas de Petri
5 viradas para baixo contendo meio aveia-ágar. b) Cinco colônias de Py 145, 15
6 dias após incubação. BARBIERI, M. (2015).

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

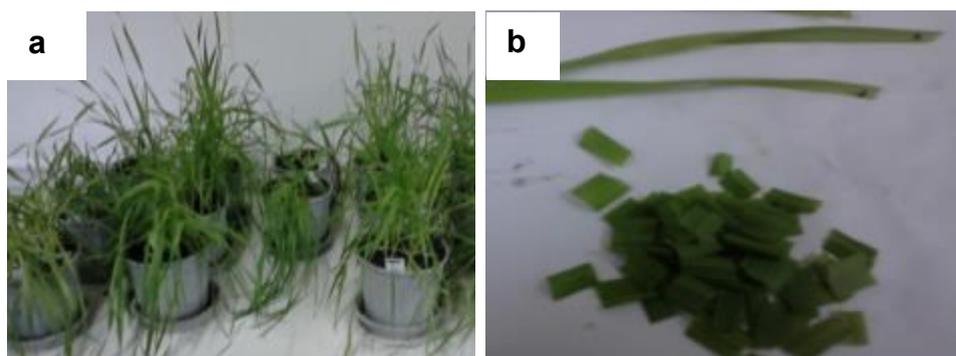
17

18

19

20

1



2

3 FIGURA 2. Plantio de plantas de trigo para serem inoculadas, incubadas, acondicionadas em
4 câmara úmida e para retirada de segmentos de folhas. a) Cultivares BR 18,
5 Ônix, BRS 229 e Anahuac na 6ª folha expandida. b) Cortes dos segmentos de
6 folhas nos horários de 6, 12, 18, 24, 36, 48 e 72 hai. BARBIERI, M. (2015).

7

8

9

10

11

12

13

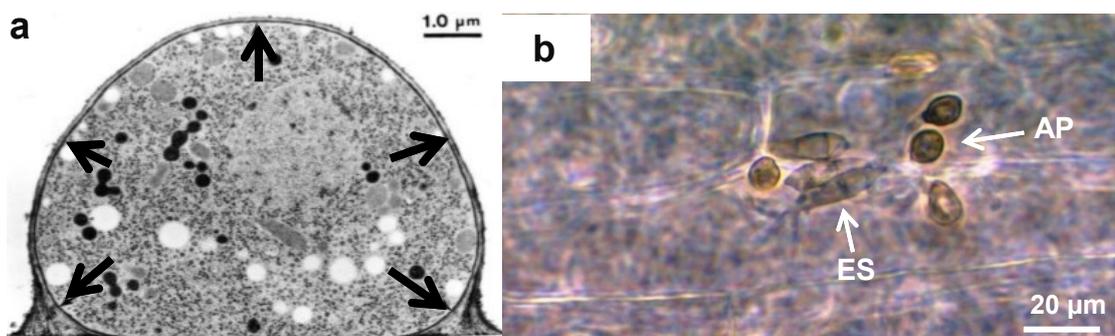
14

15

16

17

18



1
2 FIGURA 3. Ilustração interna de um apressório e esporos e apressórios melanizados na
3 superfície foliar de trigo. a: Microscopia eletrônica representada por um
4 corte transversal de um apressório produzido pelo fungo *M. oryzae* em
5 contato com o substrato. As setas indicam a camada de melanina na parte
6 interna da estrutura. Fonte: Howard e Valent, 1996. b: Formação de
7 apressórios melanizados na superfície de folhas de trigo AP: Apressório;
8 ES: Esporo de *M. oryzae*. BARBIERI, M. (2015).

9
10
11
12
13
14

1

2

3

4

5 FIGURA 4. Penetração de *M. oryzae* no tecido foliar, na cultivar BR18. A: Apressório
6 melanizado. B: Penetração do apressório. C: formação de uma hifa infectiva fina.
7 D: Desenvolvimento das hifas e invasão às células adjacentes. AP: Apressório;
8 ES: Esporo; HI: Hifas Invasivas; HIn: Hifas Infectivas. As barras brancas
9 correspondem 20 μ m. BARBIERI, M. (2015).

10

11

12

13

14

15

16

17

18

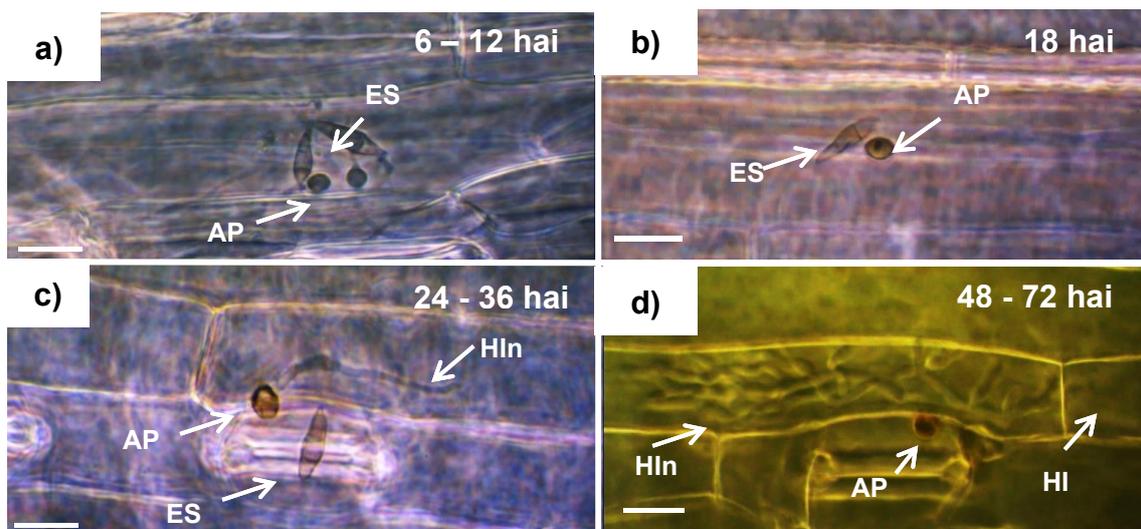
19

20

21

22

23



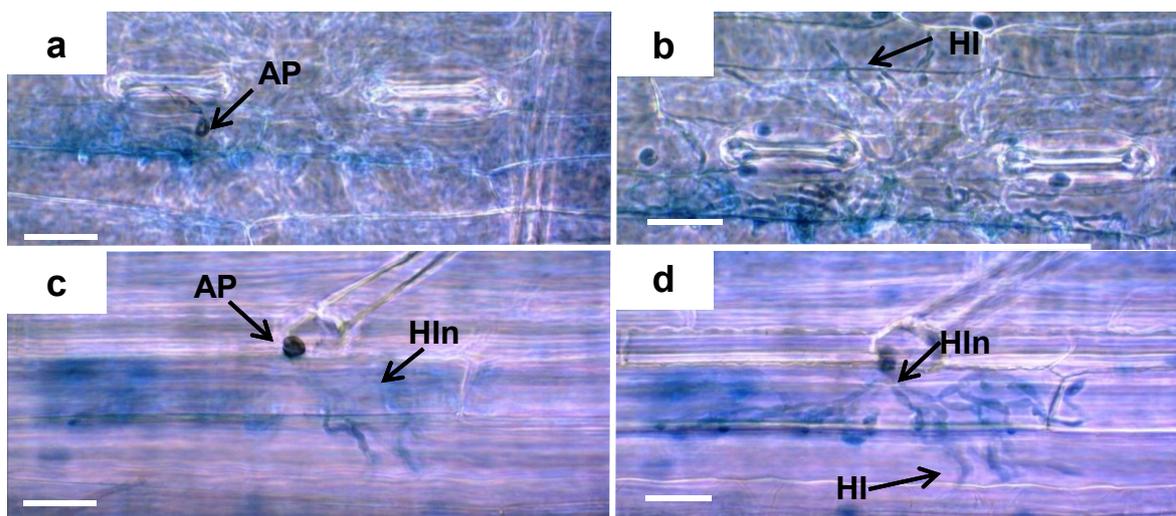


FIGURA 5. Penetração e formação de colônias na cultivar de trigo Anahuac 48 hai. Em 9a e 9b, formação de colônia. Em 9c e 9d, destaca-se o processo de penetração, desde a presença do apressório melanizado, que inicia a penetração e formação de hifas infectivas, ao desenvolvimento das hifas invasivas. AP: Apressório; HI: Hifas Invasivas; HIn: Hifas Infectivas. As barras brancas correspondem 20 μ m. BARBIERI, M. (2015).

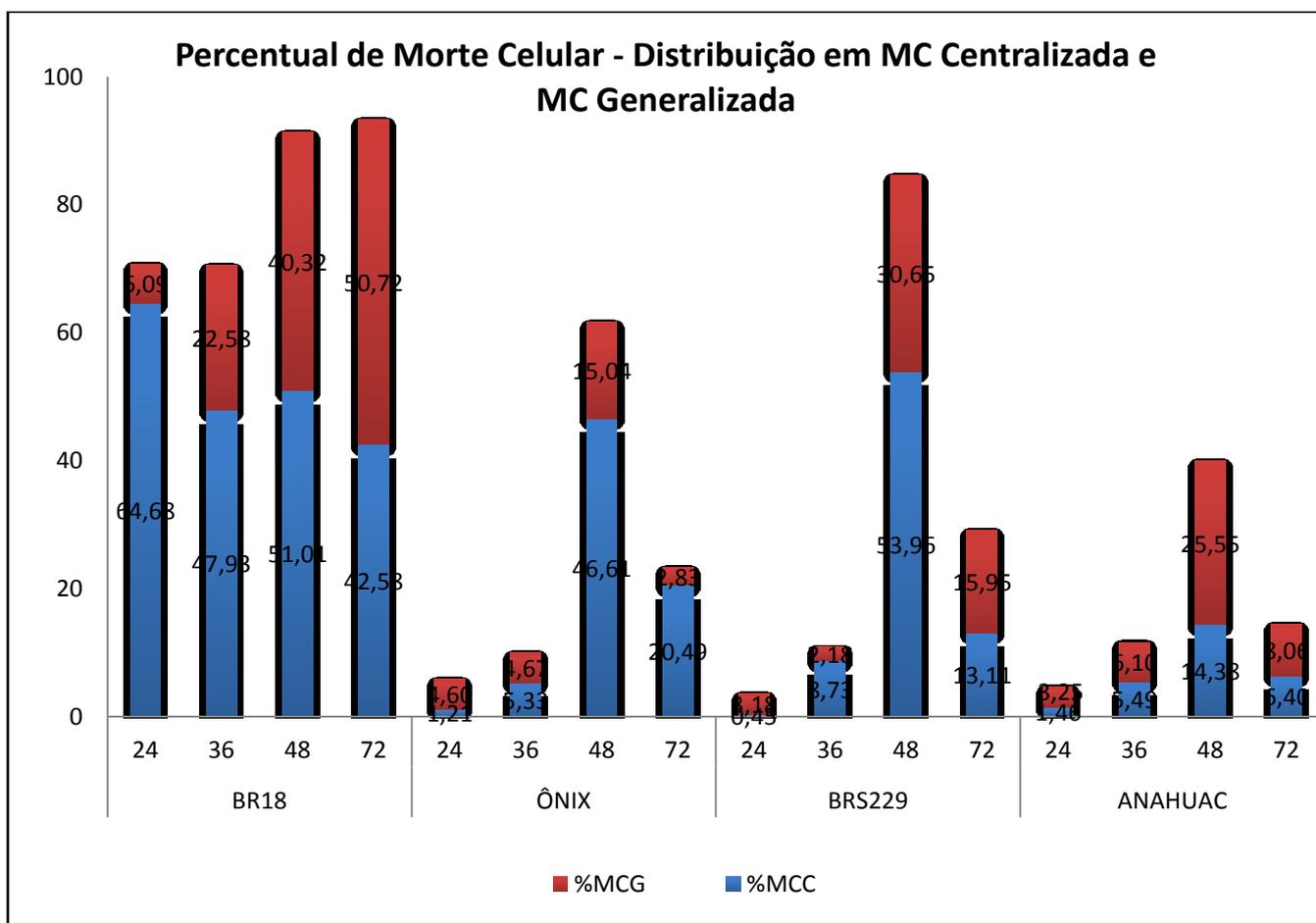


FIGURA 6. Percentagens de morte celular centralizada e generalizada, para as cultivares BR 18, Ônix, BRS 229 e Anahuac, nos tempos de 24, 36, 48 e 72 hai. BARBIERI, M. (2015).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

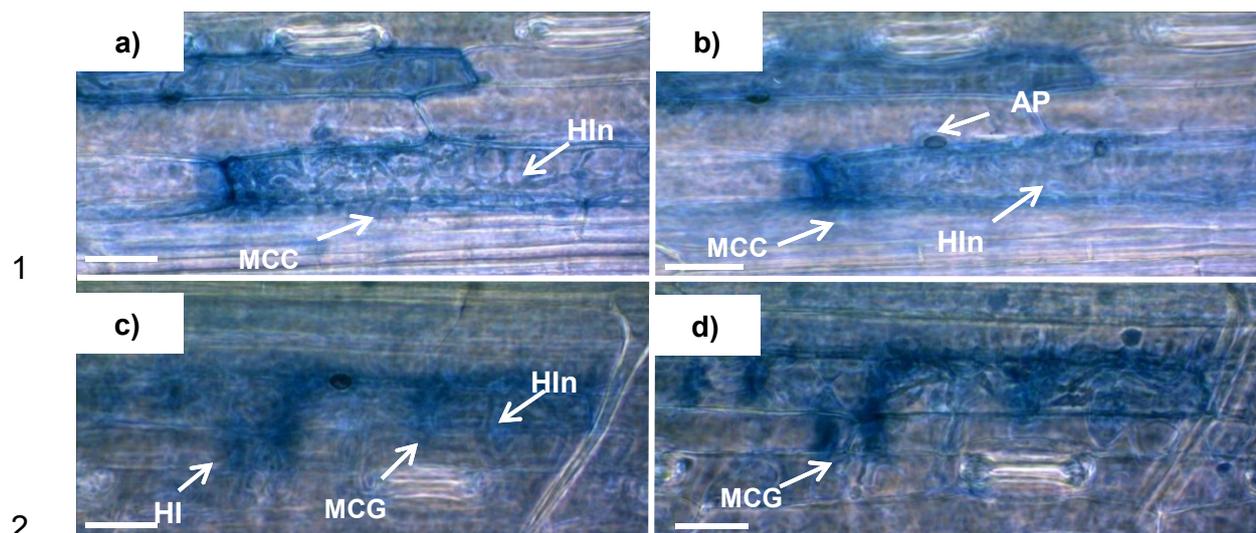
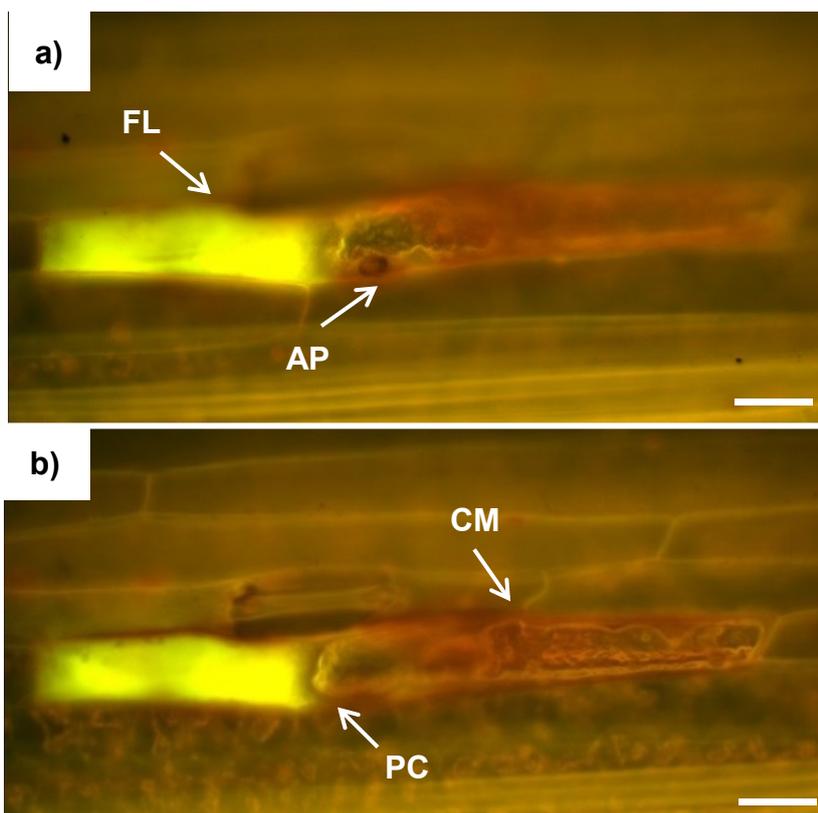


FIGURA 7. Morte celular em Anahuac – 48 horas após a inoculação. a e b: Morte Celular Centralizada (MCC) na cultivar Anahuac – 48hai. c e d: Morte Celular Generalizada (MCG) na cultivar Anahuac – 48hai; AP: Apressório; HIn: Hifas Infectivas. Segmentos coloridos com solução de *Tripan Blue*. As barras brancas correspondem 20 μm . BARBIERI, M. (2015).



1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

FIGURA 8. Estruturas fluorescentes em células da epiderme da cultivar Ônix, infectadas por *M. oryzae*, 72 hai. a) Célula morta indicada pela seta com a presença do apressório (AP), com a célula adjacente apresentando fluorescência (FL). b) Destaque da parede da célula (PC) que divide a célula morta da célula fluorescente (CM) coloridas com solução de Ácido Pírico. As barras brancas correspondem 20 μm . BARBIERI, M. (2015).

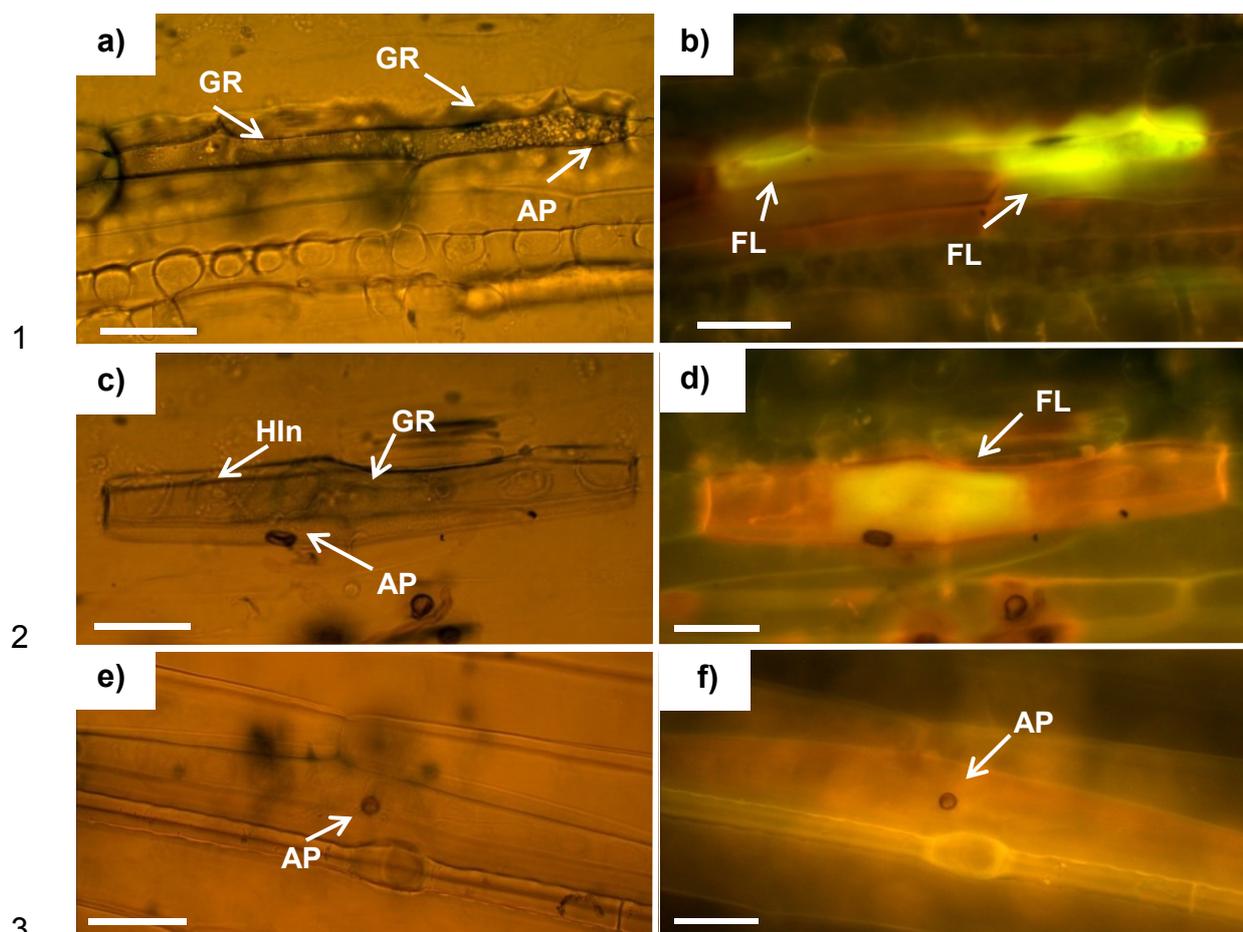


FIGURA 9. Estruturas fluorescentes na cultivar Ônix (a – b – c – d) e não fluorescentes em Anahauc (e – f) no horário de 72 hai. GR: Granulometria; AP: Apressório; HIn: Hifas Infectivas; FL: Fluorescência. Segmentos de folha coloridos com solução de ácido pícrico. As barras brancas correspondem 20 μ m. BARBIERI, M. (2015).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

Tabela 5. Percentagem de germinação de esporos nos horários de amostragens para as quatro cultivares de trigo. BARBIERI, M. (2015).

Cultivares	Tempo em horas após a inoculação e germinação de esporos*						
	6	12	18	24	36	48	72
BR 18	64,0 bC	97,78 aB	100 aA	95,47 Cb	100 aA	100 aA	100 aA
ÔNIX	77,33 abB	98,4 aA	99,35 abA	99,25 abA	100 aA	100 aA	100 aA
BRS229	72,95 bB	94,95 aA	96,55 cA	98,28 bA	99,7 aA	100 aA	100 aA
ANAHUAC	84,49 aC	95,98 aB	99,79 abA	99,85 aA	100 aA	100 aA	100 aA

*Valores percentuais seguidos por letras distintas diferem entre si pelo Teste Exato de Fisher. Valor de P bicaudal crítico com correção de Bonferroni para múltiplos testes = 0.008. Letras minúsculas = comparação entre cultivares. Letras maiúsculas = comparação entre horários.

1 Tabela 6. Percentagem da formação de apressórios nos horários de amostragens para as quatro
 2 cultivares de trigo. BARBIERI, M. (2015).

3

Cultivares	Tempo em horas após a inoculação e formação de apressórios*						
	6	12	18	24	36	48	72
BR 18	15,96 aG	64,44 bE	87,5 aC	92,96 bB	45,02 cF	96 aA	79,5 bD
ÔNIX	30,67 aE	87,37 aB	80,91 bC	77,2 cC	57,25 bD	93 bA	86 bB
BRS229	24,15 aD	17,17 cE	38,17 cC	75,47 cB	82,09 aB	96 aA	95,6 aA
ANAHUAC	23,44 aC	82,49 aB	88 aB	92,19 aA	83,96 aB	94 abA	94,4 aA

4 *Valores percentuais seguidos por letras distintas diferem entre si pelo Teste Exato de Fisher. Valor de P
 5 bicaudal crítico com correção de Bonferroni para múltiplos testes = 0.008. Letras minúsculas = comparação
 6 entre cultivares. Letras maiúsculas = comparação entre horários.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

1 Tabela 7. Percentagem de penetração do fungo em células da epiderme a partir dos
 2 apressórios melanizados. BARBIERI, M. (2015).

3

Cultivares	Tempo em horas após a inoculação e penetração*						
	6	12	18	24	36	48	72
BR 18	0 aC	4,74 bC	2,23 aC	13,13 bB	3,23 bC	5,1 bC	27,8 aA
ÔNIX	0 aB	25,87 aA	3,75 aB	27,36 aA	9,33 bB	27 aA	26,2 aA
BRS229	0 aB	2,94 bB	1,33 aB	20,5 dB	6,91 bA	8,4 bA	12,5 bA
ANAHUAC	0 aB	1,71 bB	3,73 aB	5,84 cB	30,49 aA	28 aA	6,4 cB

4 *Valores percentuais seguidos por letras distintas diferem entre si pelo Teste Exato de Fisher. Valor de P
 5 bicaudal crítico com correção de Bonferroni para múltiplos testes = 0.008. Letras minúsculas = comparação
 6 entre cultivares. Letras maiúsculas = comparação entre horários.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

1 Tabela 8. Percentagem de formação de colônias 48 hai para as quatro cultivares de trigo BR
2 18, Ônix, BRS 229 e Anahuac. BARBIERI, M. (2015).

3

Cultivares	Formação de colônias 48hai
BR 18	2,63 c
ÔNIX	43,55 b
BRS229	18,97 c
ANAHUAC	71,04 a*

4 *Valores percentuais seguidos por letras distintas diferem entre si pelo Teste Exato de Fisher. Valor de P
5 bicaudal crítico com correção de Bonferroni para múltiplos testes = 0.008. Letras minúsculas = comparação
6 entre cultivares.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

1 Tabela 9. Percentagens de morte celular para cada cultivar estudada em diferentes horários
 2 avaliados. BARBIERI, M. (2015).

Cultivares	Tempo em horas após a inoculação e morte celular*			
	24	36	48	72
BR 18	70,77 aA	70,51 Aa	91,34 aA	93,30 aA
ÔNIX	5,31 bC	9,33 bC	61,65 bA	23,32 bB
BRS229	3,64 bD	10,91 bC	84,5 aA	29,06 bB
ANAHUAC	4,71 bC	11,59 bB	39,92 cA	14,45 cB

3 *Valores percentuais seguidos por letras distintas diferem entre si pelo Teste Exato de Fisher. Valor de P
 4 bicaudal crítico com correção de Bonferroni para múltiplos testes = 0.002. Letras minúsculas = comparação
 5 entre cultivares. Letras maiúsculas = comparação entre horários

6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados dessa pesquisa, identificou-se que as cultivares BR18 e Ônix desenvolveram reação de resistência à brusone (*M. oryzae*) com alguns aspectos comuns observados no processo infeccioso, mas com mecanismos aparentemente diversos.

O principal mecanismo envolvido na resistência apresentada pelas cultivares de trigo Ônix e BR18 é posterior à formação do apressório quando se tem o início da penetração. Este mecanismo envolve a produção de compostos autofluorescentes e reações de hipersensibilidade. Juntamente ao acúmulo desses compostos tem-se a ocorrência de morte celular em alguns locais onde a infecção teve sucesso.

Para a cultivar BR18, a ocorrência de resistência por hipersensibilidade ocorreu pela morte celular, que se manteve elevada em todos os tempos de avaliação. Essa morte celular esteve em torno de 80%. Desse percentual cerca de 50% consistiu em morte celular centralizada. O que se pode inferir que a função do fungo de penetrar e atingir as células adjacentes foi restringida pela morte celular local.

A diferença entre essas duas cultivares consiste em que a Ônix produziu compostos autofluorescentes, o que pode estar relacionado com reação de hipersensibilidade. Todavia, necessitaria de análises bioquímicas mais aprofundadas para se saber exatamente a composição desses compostos autofluorescentes. Pois poderia se dizer que essas células brilhantes consistem em um tipo semelhante a papilas. De acordo com os estudos realizados por outros pesquisadores, há formação de papilas somente no local onde a tentativa de penetração não é bem-sucedida. Os dados deste trabalho sugerem que existe resistência à brusone e que a mesma poderá ser explorada em programas de melhoramento.