

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

COMPONENTES EPIDEMIOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DA  
RESISTÊNCIA À FERRUGEM DA FOLHA EM GENÓTIPOS DE AVEIA

Felipe André Sganzerla Graichen  
Engenheiro Agrônomo/UFSM  
Mestre em Fitotecnia/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia  
Área de Concentração em Fitossanidade

Porto Alegre (RS), Brasil  
Outubro de 2009

## **FOLHA DE HOMOLOGAÇÃO**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador José Antônio Martinelli, pela amizade, confiança e em especial pela oportunidade de participar deste curso e realizar este trabalho.

À Dr. Márcia Soares Chaves, pelo auxílio, entusiasmo, sugestões e análise crítica.

Aos professores Marcelo T. Pacheco e Luis Carlos Federizzi pelos auxílios prestados e ensinamentos passados principalmente a campo.

Ao meu pai Wilson e à minha mãe Iraci (*in memoriam*) por terem me mostrado que o mundo poderia ser muito maior e me incentivado a estudar.

Às colegas de laboratório Caroline Wesp, Márcia Ruff e Viviane P. dos Santos pela amizade e ajuda.

Ao colega Clever Variani pelos auxílios na execução dos trabalhos.

A todos os colegas da Faculdade de Agronomia, em especial ao Adriano, Rodrigo, Adriana, Itamar, Alex, Cátia, Josiane, Franceli, Tanise, Giovana, Johannes e Leonardo pela convivência.

Aos amigos Adriana e Newton pela amizade e irmandade nos momentos compartilhados.

Ao meu irmão Daniel por me apoiar e me incentivar sempre, principalmente nas horas difíceis.

A minha esposa Luciane pela dedicação, amor e apoio principalmente nas horas mais difíceis.

À UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, a CAPES,  
e ao CNPq pela concessão de uma bolsa de estudo.

# COMPONENTES EPIDEMIOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DA RESISTÊNCIA À FERRUGEM DA FOLHA EM GENÓTIPOS DE AVEIA <sup>1</sup>

Autor: Felipe André Sganzerla Graichen

Orientador: José Antônio Martinelli

## RESUMO

A ferrugem da folha é a principal doença da cultura da aveia. Sua ocorrência anual associada à grande variabilidade do patógeno predispõe à epidemias severas e a rápida superação da resistência nas cultivares disponíveis. O objetivo deste trabalho foi identificar os mecanismos de resistência a esta doença em genótipos contrastantes. Para isso foram avaliados componentes epidemiológicos e histológicos da resistência à doença em plântulas de genótipos com resistência durável ou com potencial uso como novas fontes de resistência. Dentre os componentes avaliados, a eficiência de infecção apresentou efeito mais claro na resistência observada, enquanto que o período latente não mostrou ser um componente importante. Os processos de infecção e colonização ocorrem de forma semelhante tanto em genótipos suscetíveis quanto em resistentes, porém, após o estabelecimento das colônias, ocorrem eventos chaves que diferenciam os resistentes dos suscetíveis. A morte celular associada com o acúmulo de compostos autofluorescentes e fenólicos foi um evento comum dentre os genótipos resistentes. No entanto, a ocorrência destes eventos é temporalmente distinta. O genótipo Pc68/5\*Starter apresenta um mecanismo de hipersensibilidade com aborto precoce das colônias. Contrariamente, URS 21, 04B7113-1 e 04B7119-2 apresentam um mecanismo tardio de hipersensibilidade com aborto das colônias já estabelecidas, associado ao acúmulo de compostos autofluorescentes e fenólicos. Os demais genótipos apresentaram um desenvolvimento normal de colônias contendo tecido esporogênico cinco dias após a inoculação. Os dados obtidos sugerem que os mecanismos de resistência atuantes nos genótipos resistentes, particularmente morte celular e produção de compostos fenólicos, são semelhantes entre si, porém, diferencialmente expressos. A expressão temporal destes dois mecanismos reflete o nível de resistência que estes genótipos apresentam no campo.

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (117p.) Outubro, 2009.

# EPIDEMIOLOGICAL AND HISTOLOGICAL COMPONENTS OF RESISTANCE TO CROWN RUST ON OAT GENOTYPES <sup>1</sup>

Author: Felipe André Sganzerla Graichen  
Adviser: José Antônio Martinelli

## ABSTRACT

Crown rust is the main disease of oat crop. Its annual occurrence associated with the great variability of the pathogen predisposes severe epidemics and may quickly overcome the resistance in the available cultivars. The objective of this study was to identify the mechanisms of resistance to this disease in contrasting genotypes. For that it was evaluated some epidemiological and histological components of the disease in seedlings of genotypes with durable resistance or with potential use as new sources of resistance. Among the components evaluated, the efficiency of infection had a more clear effect in the resistance observed, while the latent period did not represent an important component. The processes of colonization and infection occur similarly on both genotypes resistant and susceptible, but after the establishment of the colonies, there are key events that differentiate resistant from susceptible. Host cell death associated with the accumulation of autofluorescent and phenolic compounds was a common event among the resistant genotypes. However, the occurrences of these events are temporally distinct. The genotype Pc68/5\* Starter shows a mechanism of hypersensitivity associated to early aborted colonies. In contrast, URS 21, 04B7113-1 and 04B7119-2 show a late mechanism of hypersensitivity with abortion of the colonies already established, associated with accumulation of phenolic compounds. The other genotypes showed a normal development of colonies containing sporogenic tissue five days after inoculation. The data suggest that the mechanisms of resistance acting on resistant genotypes, particularly hypersensitivity and production of phenolic compounds, are similar among themselves, but differentially expressed. The temporal expression of these two mechanisms reflects the level of resistance that these genotypes have on the field.

---

<sup>1</sup> Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (117p.) October, 2009.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Objetivos.....	2
1.1.1 Objetivo geral.....	2
1.1.2 Objetivos específicos .....	3
1.2 Hipóteses .....	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 A ferrugem da folha da aveia.....	4
2.2 Interação patógeno-hospedeiro no modelo ferrugem x cereal.....	7
2.2.1 Infecção e colonização dos cereais por fungos causadores de ferrugem.....	7
2.2.2 Componentes histopatológicos da resistência nos patossistemas ferrugem x cereais .....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	27
3.1 Avaliação da intensidade da doença em condições de campo.....	29
3.1.1 Material genético .....	29
3.1.2 Condução do experimento.....	30
3.1.3 Avaliação da doença.....	30
3.2 Determinação de componentes de resistência em plântulas.....	31
3.3 Quantificação dos componentes histológicos da resistência em plântulas de aveia .....	36
3.3.1 Material genético .....	36
3.3.2 Inoculação e inóculo .....	36

3.3.3	Amostragem .....	37
3.3.4	Coloração e exame microscópico .....	37
3.3.5	Análise dos dados.....	38
3.4	Análise histológica e histoquímica de colônias estabelecidas .....	39
3.4.1	Análise do desenvolvimento fúngico.....	40
3.4.2	Histolocalização de compostos fenólicos.....	41
3.4.3	Histolocalização de compostos autofluorescentes .....	42
3.4.4	Compostos semelhantes a ligninas .....	43
3.4.5	Análise dos dados.....	44
4	RESULTADOS .....	45
4.1	Dados de campo.....	45
4.2	Componentes da resistência em plântula.....	49
4.2.1	Período latente .....	49
4.2.2	Densidade de pústulas desenvolvidas.....	49
4.3	Componentes histológicos da resistência.....	53
4.4	Análise histológica e histoquímica de colônias estabelecidas .....	61
5	DISCUSSÃO .....	77
6	CONCLUSÕES .....	95
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97
8	APÊNDICES.....	112

## RELAÇÃO DE TABELAS

Página

1. Reação de 38 genótipos de aveia branca à ferrugem da folha em condições de campo. Eldorado do Sul, RS. ....48
2. Densidade de pústulas de ferrugem da folha em plântulas de diferentes genótipos de aveia. Porto Alegre, RS. 2009. ....51
3. Densidade de pontuações cloróticas em plântulas de diferentes genótipos de aveia. Porto Alegre, RS. 2009. ....52
4. Tipo de infecção de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*<sup>a</sup> produzido nas inoculações sobre os genótipos de aveia utilizados nas análises histológicas. Porto Alegre, RS. 2009. ....62
5. Quantificação do desenvolvimento de colônias de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* em diferentes genótipos de aveia 120 horas após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2009. ....63
6. Produção de compostos fenólicos em diferentes genótipos de aveia em resposta à infecção de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* medida através diferentes métodos. Porto Alegre, RS. 2009. ....67
7. Correlações entre componentes histológicos e epidemiológicos da ferrugem da folha avaliados sobre plântulas de genótipos de aveia com diferentes níveis de resistência. Porto Alegre, RS. 2009 .....76
8. Distinção entre as variáveis epidemiológicas e histológicas avaliadas neste trabalho quanto à capacidade em distinguir os genótipos resistentes dos suscetíveis. Porto Alegre, RS. 2009. ....92

## RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

1. Estruturas de infecção formadas durante os primeiros estádios do desenvolvimento uredial de *Puccinia graminis*. **ur**: uredósforo; **ap**: apressório, **pp**: grampo de penetração que passa pelo estômato entre as células guardas; **s**: estômato; **ssv**: vesícula subestomática; **ih**: hifa infectiva; **hmc**: célula mãe do haustório; **h**: haustório (Leonard & Szabo, 2005). ..... 8
2. Diferenciação do apressório de *Puccinia hordei* em resposta ao estímulo da superfície foliar. O tubo germinativo desenvolve-se em um quadrante aleatório do esporo e tem seu crescimento direcionado ao sentido transversal aos feixes vasculares da folha. A uma distância mínima do estômato (indicado pela seta vermelha) o tubo germinativo é estimulado por alterações físicas e químicas da superfície foliar desencadeando a diferenciação do apressório (Vaz Patto & Niks, 2001). ..... 12
3. Organograma dos das variáveis epidemiológicas e histológicas relacionadas com mecanismos de resistência avaliadas neste trabalho. Porto Alegre, RS. 2009. .... 28
4. Tipos de infecção de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* encontrados com maior frequência em plântulas de diferentes genótipos de aveia. O tipo de infecção (TI= 1) indica pústulas pequenas circundadas por halo clorótico, (TI= 2) indica pústulas de tamanho médio ou grande associada com halo clorótico, a indicação (TI= 2N) indica a presença intensa de necrose associada às pústulas, e TI= 3 indica a presença de pústulas de tamanho grande com esporulação intensa. Os tipos de infecção (1), (2) e (2N) indicam reações de resistência, enquanto o TI=3 indica reação de suscetibilidade. Porto Alegre, RS. 2009. .... 35
5. Período latente de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* em diferentes genótipos de aveia. As barras representam o erro padrão da média. Cv = 5,42% Porto Alegre, RS. 2009. .... 49
6. Progresso da germinação de uredósporos de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* sobre folhas de diferentes genótipos de aveia. Porto Alegre, RS. 2009. .... 53

7.	Diferenciação de apressórios de <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> sobre diferentes genótipos de aveia branca. Proporção em relação aos uredósporos germinados. Porto Alegre, RS. 2009,.....	54
8.	Diferenciação de apressório de <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> sobre estômato (e) em folha da cultivar de aveia URS Guapa em uma amostra coletada 30 hai. Apressório (ap) é corado em azul claro pelo corante <i>trypan blue</i> . Os uredósporos germinados (ur <sub>1</sub> ) ou não (ur <sub>2</sub> ) são visualizados acima do campo focal. A barra indica 20 µm. Porto Alegre, RS. 2009. ....	55
9.	Desenvolvimento de vesícula subestomatal (VSe) de <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> sobre diferentes genótipos de aveia. Proporção em relação aos uredósporos que desenvolveram apressório. hai – horas após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2009. ....	56
10.	Desenvolvimento de hifa infectiva (HI) de <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> sobre diferentes genótipos de aveia. Proporção em relação às vesículas subestomatais formadas. hai – horas após a inoculação; VSe – vesícula subestomatal. Porto Alegre, RS. 2009. ....	57
11.	Desenvolvimento de células mãe do haustório (CMH) de <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> sobre diferentes genótipos de aveia. Proporção em relação às vesículas subestomatais formadas. hai - horas após a inoculação; VSe - vesícula subestomatal. Porto Alegre, RS. 2009, .....	58
12.	Número médio de células mãe de haustório (CMH) desenvolvidas em cada vesícula subestomática (VSe) de <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> sobre diferentes genótipos de aveia. hai - horas após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2009,.....	59
13.	Diferenciação de Haustório (Ha) e célula mãe de haustório (CMH) de <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> desenvolvidas 30 hai no interior de células do mesófilo da cultivar de aveia URS 22. Amostras clareadas e coradas com <i>trypan blue</i> . A barra indica 10 µm. A região do pescoço do haustório é indicada pela letra n ( <i>neck</i> ) e hi indica as hifas do fungo. Porto Alegre, RS. 2000. ....	59
14.	Desenvolvimento de haustórios de <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> sobre diferentes genótipos de aveia. Proporção em relação às vesículas subestomatais formadas. hai - horas após a inoculação; VSe – vesícula subestomatal. Porto Alegre, RS. 2009. ....	60
15.	Número médio de haustório desenvolvidos em cada vesícula subestomática (VSe) de <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> sobre diferentes genótipos de aveia. hai - horas após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2009.....	61

16. Célula do mesófilo do genótipo Pc68/5\*Starter apresentando morte celular em resposta a infecção por *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. A) Seta indica intensa coloração azul caracterizando morte celular; e B) Seta em preto indica célula com morte celular com um haustório no centro. Seta vermelha indica hifa do fungo. Amostras coradas com *trypan blue* avaliadas sob microscopia com contraste de fase. Porto Alegre, RS. 2009. ....65
17. Localização de compostos fenólicos corados em azul com o-toluidina em células do mesófilo de aveia inoculados com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. A) Visualização da epiderme da folha do genótipo Pc68/5\*Starter 48 horas após a inoculação (hai) indicando células do mesófilo coradas em azul. Barra indica 40 µm; B) célula do mesófilo do genótipo Pc68/5\*Starter corada em azul avaliada em 120 hai. Barra indica 40 µm; C) Colônia na linhagem 04B7119-2 avaliada em 120 hai indicando vários pontos de acúmulo de compostos fenólicos em uma única colônia. Barra indica 200 µm; D) célula do mesófilo do genótipo 04B7119-2 avaliado em 120 hai com detalhe do acúmulo de composto fenólico na base de um haustório. Barra indica 10 µm; e E) célula do mesófilo do genótipo URS 21 avaliado em 120 hai com acúmulo de compostos fenólicos. Barra indica 20 µm. (h) indica haustório; e (b) indica bainha do feixe vascular. Porto Alegre, RS. 2009. ....68
18. Proporção de colônias de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* sobre diferentes genótipos de aveia associadas com a presença de compostos autofluorescentes em células do hospedeiro. Barras de erros indicam erro padrão da proporção. hai – horas após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2009.....70
19. Localização de compostos autofluorescentes em genótipos de aveia inoculados com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* 120 horas após a inoculação. A) Mesófilo da linhagem 04B7119-2 com células do mesófilo autofluorescentes (setas). Barra indica 200 µm; B) autofluorescência das células do mesófilo do genótipo Pc68/5\*Starter (setas). A letra e indica um estômato com autofluorescência por onde o patógeno penetrou para o interior da planta. Barra indica 40 µm; e C) autofluorescência de células do mesófilo do genótipo URS 21 indicado pelas setas. Barra indica 200 µm. Porto Alegre, RS. 2009. ....71
20. Proporção de colônias de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* sobre diferentes genótipos de aveia associadas com a presença de compostos autofluorescentes e produção de tecido esporogênico. TE = Tecido Esporogênico; CF= Colônias autofluorescentes; + e – significam respectivamente, presença ou ausência da característica. Porto Alegre, RS. 2009. ....72

21. Coloração de compostos semelhantes a ligninas em genótipos de aveia inoculados com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. Coloração vermelha dos feixes vasculares contendo lignina na linhagem 04B7113-1 (A) e URS 22 (B), os sítios de infecção não reagiram positivamente à lignina. Amostras coletadas 48 horas após a inoculação e corados com floroglucinol. Barras indicam 400 e 100 µm em A e B, respectivamente. Porto Alegre, RS. 2009. .... 73
22. Coloração de compostos semelhantes a ligninas em genótipos de aveia inoculados com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. Coloração vermelha dos feixes vasculares contendo lignina na linhagem 04B7119-2 (A), e URS Guapa (B) e 04B7113-1 (C). Os sítios de infecção (si) não reagiram positivamente à lignina. Amostras coletadas 120 horas após a inoculação e corados com floroglucinol. Barras indicam 200 µm. Porto Alegre, RS. 2009. .... 74
23. Coloração de compostos semelhantes a ligninas em genótipos de aveia inoculados com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. A) visualização de sitio de infecção no genótipo Pc68/5\*Starter com a presença de uredósporo (ur), apressório (ap) e estômatos (es); B) Visualização dos feixes vasculares do genótipo Pc68/5\*Starter com reação positiva a lignina exibindo coloração vermelha e marrom. Amostras coletadas 48 horas após a inoculação e corados com cloro-sulfito. Barras indicam 100 e 50 µm em A e B, respectivamente. Porto Alegre, RS. 2009. .... 74
24. Coloração de compostos semelhantes a ligninas em genótipos de aveia inoculados com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. A) Sítios de infecção (si) com o desenvolvimento de colônias na linhagem 04B7113-1 e feixes vasculares (b). B) detalhe de células colapsadas do mesofilo (seta) em resposta a infecção pelo fungo e feixes vasculares. Apenas os feixes vasculares reagem positivamente à lignina apresentando coloração vermelha e marrom. Amostras coletadas 120 horas após a inoculação e corados com cloro-sulfito. Barras indicam 400 e 20 µm em A e B, respectivamente. Porto Alegre, RS. 2009. .... 75

## 1 INTRODUÇÃO

A aveia (*Avena sativa*) é uma das principais culturas produtoras de grãos no Brasil, sendo cultivada atualmente cerca de 270.000 ha, concentrados quase que totalmente na região sul do país. A importância desta cultura é devida à sua versatilidade, pois pode inserir-se como uma alternativa para o sistema de rotação de culturas, à produção de forragem verde, feno, silagem ou grãos e cobertura verde ou morta do solo. A ascensão do sistema de plantio direto foi um dos grandes estímulos à cultura da aveia, e esta se estabeleceu como um dos principais cereais de inverno, garantindo a sustentabilidade deste sistema.

A grande área cultivada com aveia aumentou os riscos de ocorrência de epidemias, principalmente da ferrugem da folha (*Puccinia coronata* f. sp. *avenae*). Esta doença ocorre todos os anos com um alto poder destrutivo, cujos danos são suficientes para inviabilizar a cultura. O controle desta doença pode ser realizado quimicamente, no entanto, muitas vezes este procedimento é inviabilizado devido ao alto custo. A utilização de cultivares com resistência genética é atualmente a principal alternativa para o controle da doença, contudo, a durabilidade da resistência à doença tem sido curta. A baixa durabilidade da resistência das cultivares lançadas é atribuída à utilização de resistências conferidas por poucos genes com especificidade à

raça, ou com baixos níveis de resistência parcial. Associado à genética do hospedeiro, são relatadas altas taxas de mutação para o patógeno, de forma que as mutações possíveis em um único ano são suficientes pra superar vários genes de resistência.

Em resposta a este cenário, torna-se necessário a busca por fontes de resistência durável. No passado, a durabilidade da resistência sempre foi relacionada com sua herança. Primeiramente, as fontes de resistência que conferiam imunidade às doenças foram priorizadas, porém, após à elucidação da interação gene-a-gene, concluiu-se que a durabilidade da resistência estava relacionada com formas de herança mais complexas, provavelmente resistências parciais e com herança poligênica. Atualmente, este cenário foi alterado e a relação mais aceita é entre a durabilidade com o mecanismo de resistência. A identificação dos mecanismos de resistência pode auxiliar na escolha de genitores em programas de melhoramento de forma que diferentes mecanismos sejam combinados em uma variedade, com maior probabilidade de apresentar resistência durável.

Atualmente existe um grande número de cultivares e linhagens de aveia com altos níveis de resistência, porém pouco ainda é conhecido sobre seu mecanismo de resistência. Portanto, este trabalho teve como objetivos:

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo geral**

O trabalho teve como objetivo investigar diferentes mecanismos histológicos que atuam conferindo resistência em genótipos de aveia.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- a) Identificar genótipos de aveia com resistência à ferrugem da folha;
- b) Determinar os componentes epidemiológicos associados com a resistência á ferrugem da folha; e
- c) Determinar os mecanismos responsáveis pela resistência à ferrugem da folha.

### 1.2 Hipóteses

- a) Há alta variabilidade fenotípica nas linhagens de aveia quanto a característica resistência à ferrugem da folha, refletindo genotipicamente nos mecanismos de resistência;
- b) A resistência à ferrugem da folha é conseqüência da redução ou da inibição dos processos infectivos ou de colonização pelo fungo, tendo como conseqüência a redução nos componentes epidemiológicos da doença; e
- c) A durabilidade da resistência apresentada por alguns genótipos pode ser atribuída a mecanismos diferentes daqueles descritos anteriormente para outras interações cereais x *Puccinia* spp.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A ferrugem da folha da aveia

A ferrugem da folha da aveia, causada pelo fungo *Puccinia coronata* f. sp. avenae P. Syd. & Syd., é a doença mais destrutiva e a de maior distribuição nas áreas de cultivo em todo o mundo (Simons, 1985; Martinelli, 2000; Martinelli, 2004). Esta doença é caracterizada pela formação de urédias ovais de coloração amarelo-laranja sobre as duas lâminas da folha e, em situações de epidemia severa, também podem estar presentes em outras partes verdes da planta como panículas, aristas e colmos (Simons, 1985; Martinelli, 2004).

Os danos causados pela ferrugem da folha são resultantes das modificações fisiológicas causadas pelo desenvolvimento do fungo. Em consequência disso, é observada uma correlação negativa entre o rendimento de linhagens de aveia (*Avena sativa* L.) e a severidade da ferrugem da folha (Martinelli *et al.*, 1994; Caierão *et al.*, 2001; Chaves *et al.*, 2004a). Martinelli *et al.* (1994) observaram em cultivares suscetíveis, sob infecção natural e em condições de campo, níveis de até 90% de severidade da doença com redução no rendimento entre 24% a 50%. Chaves *et al.* (2002) avaliaram cultivares elite de aveia e verificaram redução no

rendimento de 4 a 79,5% para as cultivares URS 21 e UFRGS 17, respectivamente. A maior redução do rendimento de grãos observado por Martinelli & Buss (1999) foi de 95% na cultivar UPF 16.

A resistência à ferrugem da folha tem sido uma das principais características almejadas por programas de melhoramento no mundo todo (Federizzi, 2000; Oates, 2000). Contudo, o sucesso de uma cultivar de aveia resistente a esta moléstia é logo seguido pelo fracasso da superação da resistência com o surgimento de novas raças virulentas de *P. coronata* f. sp. *avenae*. Isso ocorre de forma muito rápida, logo após o lançamento de variedades com genes maiores que conferem resistência do tipo raça específica (Federizzi, 2000; Martinelli, 2004).

Diversos genes de resistência à ferrugem da folha foram identificados em aveia. Neste grupo estão inseridos 97 genes com efeito maior denominados Pc (*Pc1* a *Pc96* e *PcX*) que conferem resistência à raças específicas de *P. coronata* f. sp. *avenae*. Além destes, outros genes também são descritos, porém ainda não completamente caracterizados nem denominados.

Apesar do grande número de genes para resistência específica à raça conhecidos poucos ainda possuem potencial para utilização em programas de melhoramento. Para todos os genes para resistência raça específica conhecidos já foram relatadas raças virulentas de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. No entanto, o fato que reduz a possibilidade de utilização de determinado gene em programas de melhoramento é a alta frequência de virulência para este gene na população do patógeno, ou estar fortemente ligado a um alelo que confira um fenótipo indesejado.

Dentre os genes maiores que ainda apresentam um bom potencial para utilização em programas de melhoramento, podem-se destacar os genes *Pc50*, *Pc91*, (Park, 1999), *Pc94* (Chong & Aung, 1999; van Niekerk *et al.*, 2001) e *Pc68* (Park, 1999; van Niekerk *et al.*, 2001; Leonard & Martinelli, 2005). Suas indicações como genes com potencial de uso não está relacionada a uma completa imunidade ao patógeno, mas sim a baixa frequência de virulência a estes genes na população de *P. coronata*.

A resistência específica à raça é bastante utilizada para o lançamento de novas cultivares de aveia (Vieira *et al.*, 2006b), no entanto estas cultivares geralmente apresentam pouca durabilidade. Em contraposição a este fato, percebe-se nos últimos anos uma tendência dos melhoristas em buscar cultivares com resistência durável (*sensu* Johnson, 1984). Muitas vezes esta característica é atribuída à resistência não específica à raça (Ribeiro do Vale *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2005). Contudo, acredita-se que a melhor relação deve ser feita não relacionando especificidade da resistência com durabilidade, mas sim o mecanismo de ação desencadeado pelos diferentes genes de resistência (incluindo os poligenes) com a durabilidade da resistência (Parlevliet, 1997). De maneira geral, a resistência conferida por mecanismos de hipersensibilidade apresenta-se efêmera no controle das ferrugens dos cereais, no entanto, é um mecanismo muito eficiente para o controle de doenças causadas por procariotos ou vírus (Niks & Rubiales, 2002). Da mesma forma, mecanismos de resistência pré-haustoriais são particularmente eficientes contra uma gama de patógenos biotróficos.

## **2.2 Interação patógeno-hospedeiro no modelo ferrugem x cereal**

### **2.2.1 Infecção e colonização dos cereais por fungos causadores de ferrugem**

Os aspectos que envolvem a infecção e colonização das plantas por fungos da ordem Uredinales são tema de pesquisa desde os primeiros relatos que comprovaram a etiologia das ferrugens e refutação da abiogênese, na primeira metade do século XIX. Desde então uma série de trabalhos envolvendo estas questões foi publicada, especialmente durante no intervalo entre 1910 e 1985. Estes trabalhos envolviam principalmente a ferrugem do colmo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Eriks E. Henn.) e estriada (*P. striiformis* Westend) do trigo, ferrugem da folha da cevada (*Puccinia hordei* Otth), e ferrugem feijoeiro (*Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger.) e da fava (*Uromyces viciae-fabae* (Pers.) J. Schröt.). A partir da segunda metade da década de 1980 estes trabalhos tornaram-se mais escassos e somente voltaram a ser freqüente a partir do ano 2000. Isso provavelmente se deve a mudanças no modelo de estudo da interação planta-patógeno, que anteriormente estava baseado em ferrugens e a partir deste período passou a ser o patossistema arabidopsis e alguns de seus patógenos. Uma das principais causas desta mudança foi à emergência das técnicas de biologia molecular e o uso de arabidopsis como planta modelo nesta área. Assim, os trabalhos que envolviam a fisiologia da interação patógeno - hospedeiro passam a ter um enfoque também molecular, porém, em um novo patossistema envolvendo não mais os cereais, mas sim arabidopsis.

O desenvolvimento de uma ferrugem sobre o hospedeiro ocorre

durante a fase uredial do fungo <sup>1</sup>. Após a deposição do uredósporo sobre hospedeiro há a germinação desse e a formação de uma série de estruturas que obrigatoriamente devem ser formadas para que o fungo consiga estabelecer o processo de patogênese. Após a germinação há a formação de um tubo germinativo, que quando reconhece o estômato diferencia uma estrutura chamada de apressório. No interior do tecido vegetal há a formação de uma vesícula subestomatal, hifas infectivas, células mãe do haustório e haustórios (Figura 1).

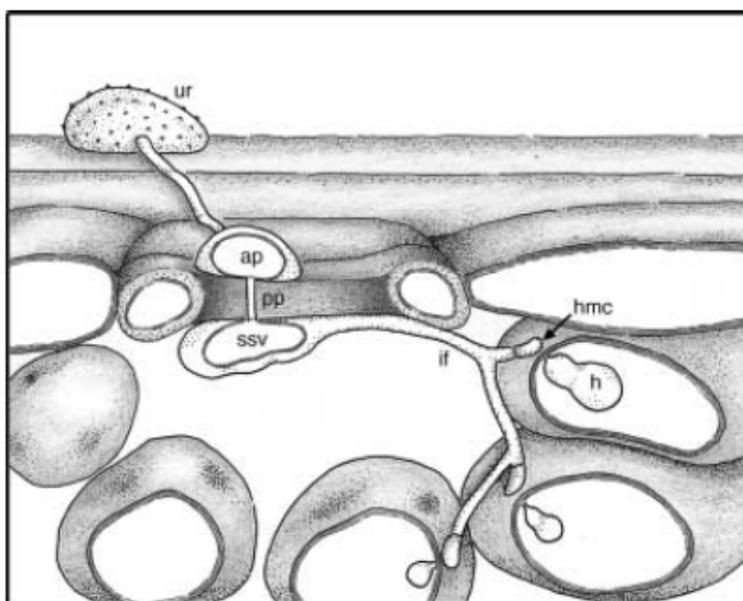


FIGURA 1. Estruturas de infecção formadas durante os primeiros estágios do desenvolvimento uredial de *Puccinia graminis*. **ur**: uredósporo; **ap**: apressório, **pp**: grampo de penetração que passa pelo estômato entre as células guardas; **s**: estômato; **ssv**: vesícula subestomática; **ih**: hifa infectiva; **hmc**: célula mãe do haustório; **h**: haustório (Leonard & Szabo, 2005).

<sup>1</sup> Ferrugem por definição é a doença caracterizada pela presença de pústulas resultantes do desenvolvimento uredial de fungos do Filo Basidiomicetes, ordem Uredinales (Agrios, 2005; Bedendo, 1995). Estes fungos podem apresentar até cinco fases em seu ciclo de vida, diferindo em número de ploidia, patogenicidade, virulência, estruturas e esporos formados. Cada um dos tipos de esporos formados pode penetrar em seu respectivo hospedeiro por diferentes formas. Uma abordagem do tema pode ser encontrada em Littlefield & Heath (1979), Heath (1997) e Staples (2000).

A presença de água livre sobre a planta é a principal condição que estimula o processo de germinação do esporo. Além disso, há indícios que a presença de alguns íons e mudanças no pH foliar também possam propiciar a germinação do esporo (Couey, 1961). Durante a germinação não ocorre aumentos substanciais do volume do citoplasma, assim o citoplasma presente no esporo migra através do tubo germinativo até o apressório e para as demais estruturas formadas. Esse movimento do citoplasma ocorre concomitantemente com o desenvolvimento do tubo germinativo. Após a passagem do citoplasma, uma série de vacúolos são formados nas regiões vazias das estruturas. Estes vacúolos são circundados por uma série de vesículas que provavelmente descarregam dentro dos vacúolos substâncias que aumentam a absorção de água pelo vacúolo, e conseqüentemente gera um aumento na pressão hidrostática, permitindo assim a germinação, penetração do apressório através do estômato fechado e a rápida expansão da vesícula subestomatal (Littlefield & Heath, 1979).

O tubo germinativo desenvolve-se sobre a superfície foliar até diferenciar outra estrutura denominada apressório. A diferenciação desta estrutura é induzida por sinais topográficos específico da superfície foliar hospedeiro (tigmotropismo), bem como pela emissão de compostos voláteis através do estômato (quimiotropismo). O mecanismo pelo qual estes sinais são percebidos pelo tubo germinativo ainda não é claro, mas existem evidências de que a inclinação em que o tubo germinativo cresce sobre as células, associado com distância em que ocorre este crescimento, seja crucial para a diferenciação do apressório. Esta hipótese explica em parte do

porquê o tubo germinativo crescer em diferentes tamanhos antes de diferenciar um apressório (Collins & Read, 1997). O requerimento espacial para indução do apressório varia enormemente entre as espécies. No entanto, elas geralmente correspondem às dimensões dos estômatos do hospedeiro (Staples, 2000). A maioria dos trabalhos que avaliaram tigmotropismo utilizou lâminas de poliestireno com diferentes microtopografias combinando ranhuras com diferentes profundidades e espaçamentos. Segundo Alen *et al.* (1991) a maioria das espécies diferencia o apressório em resposta a uma única ranhura. No entanto, um grupo formado por espécies com grande importância econômica como *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *P. graminis* f. sp. *avenae* e *P. coronata* não o fazem, necessitando de uma série de ranhuras para diferenciar o apressório. O modelo melhor caracterizado do tigmotropismo é *Uromyces appendiculatus*, que tem a maior diferenciação sobre réplicas com ranhuras de 0,5 µm de profundidade, o que está diretamente correlacionado com o tamanho da célula estomática do hospedeiro *Phaseolus vulgaris* (Hoch *et al.*, 1987). Para as ferrugens dos cereais, esta relação não é tão clara. Segundo Read *et al.* (1997) a combinação entre o pequeno espaçamento entre as células da epiderme e a célula guarda do estômato em forma de halter são os estímulos necessários para a formação do apressório. De acordo com isso, Collins & Read (1997) demonstraram que diferentes *formae specialis* de *Puccinia spp.* apresentam máxima diferenciação de apressórios sobre réplicas com diferentes espaçamentos entre as ranhuras. Isso provavelmente ocorra por existir uma adaptação do fungo à topografia da espécie hospedeira.

Em adição aos estímulos topográficos alguns estímulos químicos também induzem a diferenciação de estruturas de infecção das ferrugens. Alguns compostos volatilizados através dos estômatos ou presentes na camada epicuticular induzem a formação do apressório *in vitro* e, quando os estímulos topográficos e químicos são aplicados conjuntamente, os níveis de diferenciação de apressórios são muitos semelhantes àqueles observados sobre a planta viva (Collins *et al.*, 2000). Alguns compostos presentes na camada epicuticular também induzem a formação do apressório. No entanto, ainda não estão claro quais são estes compostos e de que forma podem agir. Além da diferenciação do apressório, estes compostos voláteis presentes na cutícula podem induzir diferenciação de vesículas subestomáticas e células mãe do haustório, mas nunca haustórios (Marte & Montalbini, 1999; Wiethölter, 1999; Reisinger *et al.*, 2006).

O desenvolvimento do tubo germinativo sempre ocorre no sentido perpendicular às nervuras da planta independente da espécie do fungo (Roderick & Thomas, 1997). Vaz Pato & Niks (2001) observaram que inicialmente o tubo germinativo cresce em uma direção aleatória e, após o contato com a junção entre as células da epiderme, há um direcionamento do crescimento perpendicular às nervuras da folha (Figura 2). Esta orientação do crescimento é mantida pelo crescimento de pequenas ramificações no tubo germinativo sobre as junções das células. Este padrão de crescimento reflete uma vantagem evolutiva, pois aumenta a probabilidade de encontrar algum estômato. Os autores também ressaltam que existe uma pequena distância para que fungo perceba o estômato e direcione o crescimento e a diferenciação do apressório.

A formação deste apressório sobre o estômato é uma fase crítica do processo infectivo, pois é através deste que a maioria dos fungos causadores de ferrugem penetra para o interior do tecido do hospedeiro. No entanto, há algumas exceções como *Phakopsora pachyrhizi* Sydow (Collins & Read, 1997; Staples, 2000) e *Puccinia psidii* Winter (Glen *et al.*, 2007) que podem penetrar diretamente pela epiderme e *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Westend., que penetra pelo estômato, porém não forma apressório (Moldenhauer *et al.*, 2006).

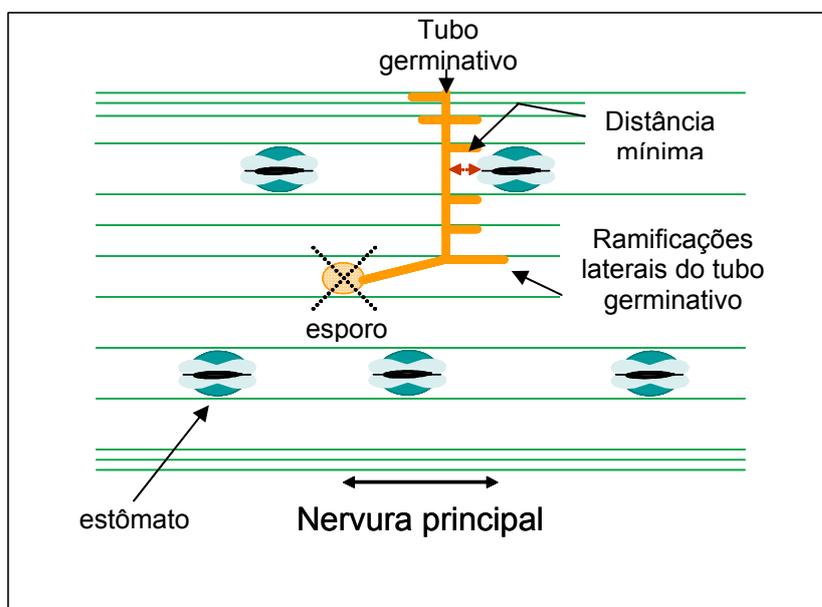


FIGURA 2. Diferenciação do apressório de *Puccinia hordei* em resposta ao estímulo da superfície foliar. O tubo germinativo desenvolve-se em um quadrante aleatório do esporo e tem seu crescimento direcionado ao sentido transversal aos feixes vasculares da folha. A uma distância mínima do estômato (indicado pela seta vermelha) o tubo germinativo é estimulado por alterações físicas e químicas da superfície foliar desencadeando a diferenciação do apressório (Vaz Patto & Niks, 2001).

A germinação do uredóspero e a formação do apressório ocorrem geralmente à noite na presença de um filme de água sobre a superfície foliar. O desenvolvimento em *Puccinia graminis* Pers.:Pers. paralisa após

formação do apressório sendo retomado ao amanhecer. Até o momento sabe-se que a luz é o único estímulo que atua na retomada do crescimento do fungo porque estimula diretamente o processo fotossintético e conseqüentemente reduz a concentração de CO<sub>2</sub> no interior do estômato, permitindo o desenvolvimento do apressório. A penetração do apressório de *P. graminis* não foi observada em plantas de trigo albinas (não fotossintetizantes) ou plantas estioladas submetidas a uma concentração ambiental de 1% de CO<sub>2</sub> (Yirgou & Caldwell, 1963; Leonard & Szabo, 2005). Em *Puccinia striiformis* (que não forma apressório), a maior intensidade luminosa em pré-inoculação aumenta a taxa de penetração do fungo. Contudo neste patossistema a penetração ocorre através do estômato fechado durante o período do escuro, sugerindo que outros fenômenos controlados pela luz estejam envolvidos (de Vallavieille-Pope *et al.*, 2002).

Após a penetração na câmara subestomática há a formação de uma vesícula subestomática (Figura 1), que origina as hifas infectivas. Estas hifas infectivas serão hábeis em diferenciar uma célula mãe do haustório quando em contato com uma célula do hospedeiro. A célula mãe do haustório forma um grampo estreito que penetra na parede celular, aparentemente por dissolução enzimática. Já dentro da parede celular, uma célula especializada expande-se no espaço periplasmático formando o haustório (Figura 1) (Heath, 1997; Leonard & Szabo, 2005).

Após a formação do primeiro haustório, a hifa infectiva pode continuar a crescer e desenvolver outras células mãe do haustório. O desenvolvimento de subseqüentes haustórios é limitado pela redução de nutrientes. A energia para produção do primeiro haustório é fornecida por reservas presentes no

uredósporos e o contínuo desenvolvimento de haustórios depende do estabelecimento de uma interação compatível de parasitismo (Szabo & Bushnell, 2001; Panstruga, 2003; Leonard & Szabo, 2005).

Os haustórios intrigaram os fitopatologistas desde sua descoberta no século XIX, principalmente no que diz respeito à sua função para o fungo. Por muito tempo se aceitou que esta estrutura era o ponto de absorção de nutrientes sem provas substanciais (Kneale & Farrar, 1985; Mendgen *et al.*, 2000; Szabo & Bushnell, 2001; Perfect & Green, 2001; Voegelé *et al.*, 2001; Panstruga, 2003; Leonard & Szabo, 2005). As hifas desenvolvidas nos espaços intercelulares podem absorver alguns aminoácidos, porém não absorvem carboidrato (Struck *et al.*, 2002). Voegelé *et al.* (2001) localizaram um transportador de hexoses em *Uromyces fabae* expresso somente no haustório. Este transportador possui homologia com transportadores encontrados em outros Basidiomycetes e Ascomycetes. Isso dá indícios que este transportador pode estar presente nas espécies do gênero *Puccinia* atuando de forma semelhante. Além das funções relacionadas com a absorção de nutrientes os haustórios também podem alterar o metabolismo e as defesas de respostas do hospedeiro (Heath 1997; Voegelé & Mendgen, 2003). Depois de formar o primeiro haustório, a hifa infectiva continua o seu desenvolvimento formando outras células mãe de haustório. O estabelecimento dos haustórios é essencial para que a colônia fúngica se estabeleça. A formação de haustórios subseqüentes é limitada pelo esgotamento de nutrientes e deste fato dependerá o estabelecimento da relação compatível, sem indução das respostas de defesa. A colonização pode ser facilitada pela produção de compostos semelhantes aos hormônios

vegetais pelo patógeno (Szabo & Bushnell 2001; Panstruga 2003; Leonard & Szabo 2005). Uma vez que uma relação de compatibilidade tenha sido estabelecida, o fluxo normal de transporte do floema é alterado para condução de nutrientes para as regiões de desenvolvimento fúngico. Essa mudança é caracterizada por uma intensa atividade respiratória nesta área, acúmulo de açúcar, e intensa atividade de invertases para prover hexoses utilizadas pelo fungo para o crescimento e esporulação (Leonard & Szabo, 2005).

Após o estabelecimento da relação compatível, os fungos desenvolvem colônias no interior do tecido do hospedeiro. Em interações compatíveis ocorre a formação de um tecido esporogênico<sup>1</sup>. Este tecido é composto por células vacuolizadas, ricas em lipídios com formas e tamanhos variados. A formação dos uredósporos ocorre pela germinação de uma gema na célula esporogênica. Esta gema alonga-se e forma-se um septo, separando a gema do esporo jovem. Cada gema produz um único esporo, e estes são produzidos sucessivamente em diferentes regiões da célula esporogênica. Os uredósporos jovens crescem rapidamente, seguidos pelo acúmulo de lipídios, espessamento e ornamentação da parede celular. Após ocorre a exposição e liberação dos uredósporos (Harder, 1976).

---

<sup>1</sup> Apesar de não ser reconhecida a diferenciação de tecidos em fungos, o termo tecido esporogênico tem sido utilizado para designar a região esporogênica descrita por Harder (1976) em *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e *P. graminis* f. sp. *avenae*.

## 2.2.2 Componentes histopatológicos da resistência nos patossistemas ferrugem x cereais

A resistência genética pode ser definida como a habilidade do hospedeiro em impedir o crescimento ou o desenvolvimento de um patógeno (Parlevliet, 1997). Neste contexto, a resistência é classificada em muitos tipos de acordo com sua herança (gene maior, gene menor, poligênica), expressão (parcial, de plântula, de planta adulta, total, residual), especificidade (específica ou não à raças do patógeno) (Parlevliet, 1995). Segundo o processo em que a resistência a uma determinada ferrugem é desencadeada, Heath (1981) classificou os mecanismos de resistência em: pré-haustoriais e pós-haustoriais.

Os mecanismos **pré-haustoriais** são aqueles desencadeados antes da formação do primeiro haustório, sendo tipicamente apresentados por reações de resistência de não hospedeiro. Em vários casos há uma tendência na redução da penetração do fungo no tecido hospedeiro. Essa redução na penetração é conseguida através da inviabilização de vários processos do desenvolvimento do patógeno. A germinação de uredósporos é alta até mesmo em superfícies de não-hospedeiros. No entanto há uma dificuldade do tubo germinativo em localizar e reconhecer o estômato (Heath, 1981). Em aveia há evidências de baixas taxas de tubos germinativos que encontram estômatos e de que também existam diferentes taxas para diferentes cultivares (Kochman & Brown, 1975). Nas interações cevada (*Hordeum vulgare* L.) x *Puccinia triticina* Eriks. e cevada x *P. hordei* Otth as diferenças entre taxas de penetração em estômatos são atribuídas a artefatos do método porém não são significativas (Niks & Rubiales, 2002).

Existem evidências de que em hospedeiros compatíveis o fungo produza elicitores que suprimam os mecanismos de defesa e, quando isso não ocorre, há o abortamento da tentativa de penetração mesmo antes da formação do haustório (Niks & Rubiales, 2002). De acordo com Heath (1981) e Niks & Rubiales (2002), a baixa taxa de produção de haustórios não indica necessariamente a falta de sinalizadores produzidos pela planta para estimular a formação de haustórios, mas sim resistência efetiva da planta a um organismo invasor não adaptado.

Na maioria dos casos a resistência pré-haustorial não está associada com eventos de necrose celular. A única reação visível em microscópio é uma deposição na parede celular denominada de papila. Esta papila pode desempenhar o papel de barreira à penetração, ou poder ser uma resposta de reparo à parede celular perfurada pela tentativa de invasão do fungo. Um dos genes de resistência pré-haustorial melhor estudado é o gene *mlo* (e seus homólogos) que confere resistência em cevada à *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (DC.) E. O. Speer. Este gene confere a formação rápida de uma papila evitando a penetração do fungo no tecido vegetal e, a exceção à regra, a reação de resistência desencadeada por este gene culmina com a presença de uma necrose intensa no sitio de infecção (Jørgensen, 1992).

A resistência **pós-haustorial** é desencadeada após a formação do primeiro haustório e envolve processos muito mais complexos. Segundo Heath (1981) os mecanismos desencadeados neste tipo de resistência são de difícil análise, já que estudos citológicos evidenciam muito mais uma ação fungistática da resistência, reduzindo o desenvolvimento do fungo, que propriamente fungitóxica, matando o fungo. Além de respostas bioquímicas

esta forma de resistência é acompanhada por respostas morfológicas e muitas pesquisas têm focado no aspecto citológico na esperança que estes possam estar diretamente relacionados com a restrição do desenvolvimento do fungo.

A resistência às ferrugens pode ser expressa morfológicamente em diversas maneiras. A morte celular do hospedeiro é a forma mais comum de resistência pós-haustorial. Este fenômeno não é uniforme e difere ultraestruturalmente (e provavelmente bioquimicamente) em cada interação patógeno x hospedeiro.

Outras respostas pós-haustoriais observadas são a ocorrência de aposição de material fibrilar na matrix extra-haustorial, redução da absorção de compostos no interior do hospedeiro através do haustório, mudanças na membrana extra-haustorial, o desenvolvimento de um colar de calose no colo do haustório e, o encapsulamento do haustório pela síntese contínua de calose. Todos estes eventos podem ocorrer simultaneamente em uma única interação patógeno hospedeiro (Heath, 1981; Marte & Montalbini, 1999).

O uso de resistência genética tem sido a principal forma de controle das ferrugens em muitas culturas. Em aveia, apesar de se conhecer mais de uma centena de genes maiores que conferem resistência específica-à-raça à ferrugem da folha, não se conhece o mecanismo de ação destes genes. Em outras interações patógeno-hospedeiro já são elucidados alguns mecanismos de resistência. Na interação aveia *P. graminis* f. sp. *avenae* foi observada a morte celular por hipersensibilidade cerca de 30h após a inoculação com uma raça do fungo incompatível. O crescimento de hifas do fungo foi reduzido próximo às células necróticas e o desenvolvimento de

colônias foi reduzido quando comparado com uma inoculação com uma raça compatível. No entanto, a reação de hipersensibilidade nem sempre é essencial para a resistência nesta interação (Lin *et al.*, 1998; Xin Yu *et al.*, 2001).

Em linhagens de trigo (*Triticum aestivum* L.) portadoras dos genes de resistência *Lr12* ou *Lr13* inoculadas com raças de *Puccinia triticina* foi observada a redução do desenvolvimento de colônias fúngicas. Este fato foi devido ao abortamento da penetração, através da formação de apressório não penetrante ou abortamento da vesícula subestomatal [a classificação dos estádios onde ocorre a paralisação do desenvolvimento do fungo, descrita por Niks & Kuiper (1983), está listada no Apêndice 2]. Isso indica a ativação de mecanismos de resistência antes da formação do haustório (Bender *et al.*, 2000). De outra forma, diferentes linhagens de trigo inoculadas com *P. striiformis* f. sp. *tritici* não apresentaram diferenças histológicas que pudessem garantir a resistência até o desenvolvimento do haustório, mas após a colonização do tecido hospedeiro, foi observada uma intensa lignificação das células circundantes às pústulas sobre as linhagens resistentes (Moldenhauer *et al.* 2006).

A reação de hipersensibilidade é definida como a morte rápida das células da planta associadas com a resistência à doença (Goodman & Novacky, 1994). A ocorrência da reação de hipersensibilidade está associada com uma gama variadas de processos bioquímicos que conduzem estas células à morte, porém as células adjacentes permanecem vivas, tornando o ambiente no interior da planta inóspito para o patógeno (Kombrink & Somssich, 1995). Embora a reação de hipersensibilidade seja

efetiva contra patógenos biotróficos, que dependem das células do hospedeiro vivas para sua sobrevivência (Heath 1997, Mansfield *et al.*, 1997; Richael & Gilchrist, 1999), é provável que esta não seja a única resposta da planta ao patógeno (Hammerschmidt & Nicholson, 1999). Como a reação de hipersensibilidade contribui para a resistência do hospedeiro e como ela está relacionada com demais respostas do hospedeiro ainda necessita ser mais bem elucidado. A oxidação de compostos fenólicos durante a reação de hipersensibilidade sugere que há um aumento em fenoloxidasas assim como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Goodman & Novacky, 1994; Bolwell, 1999; Hammerschmidt & Nicholson, 1999). Contudo, não é claro como a produção de EROs está ligada ao desenvolvimento da reação de hipersensibilidade (Heath 1998, 2000), atualmente tem sido sugerido que a produção de EROs podem atuar em rotas de sinalização de defesa conduzindo a diferentes respostas contra patógenos (Neill *et al.*, 2002; Laloi *et al.*, 2004), além disto, estas moléculas apresentam também um potencial de atuação como moléculas antimicrobianas (Baker & Orlandi, 1995).

De maneira geral, a reação de hipersensibilidade desencadeada por resistência específica à raça é pós-haustorial (Anker & Niks, 2001). Em aveia, a morte celular é um evento comum a uma série de patógenos como *P. coronata* f. sp. *avenae*, *Pseudomonas syringae* pv. *coronofaciens*, *Ryegrass mottle virus* (RGMV), e pode ocorrer até mesmo na ausência de um patógeno avirulento. No entanto, os eventos de morte celular são atrasados em interações compatíveis, permitindo que o fungo forme seu micélio no interior do tecido foliar (Yao *et al.*, 2002). A suscetibilidade não implica necessariamente na ausência de células necróticas no sítio de

infecção. De fato, algumas poucas células necróticas foram observadas no tecido colonizado e pode ser devido ao estresse generalizado ou à senescência (Niks & Kuiper, 1983; Bender *et al.*, 2000). A reação de hipersensibilidade em trigo (*Triticum aestivum*) e triticales (*x Triticosecale*) quando inoculados com *P. triticina* é variável. Esta pode ser pré ou pós-haustorial e estar associada com um tipo de infecção entre baixo a médio, inibindo a esporulação de pústulas de forma parcial ou até mesmo total (Niks & Dekens, 1987).

Outro evento inicial na interação entre o patógeno e a célula da planta é a expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na rota dos fenilpropanóides, como a fenilalanina amônia-liase (Carver *et al.*, 1994, 1996; Dorey *et al.*, 1997; Hammond-Kosack & Jones, 2000; Dixon *et al.*, 2002; Ishihara *et al.*, 2008). Esta enzima apresenta um papel importante na resistência, principalmente por seu envolvimento na rota de síntese de isoflavonóides e fenilpropanóides com atividade de fitoalexinas, e precursores de compostos semelhante a ligninas, suberinas e outros compostos fenólicos que são depositados nas paredes celulares e aparentemente bloqueiam o desenvolvimento das hifas (Hammerschmidt 1999; Dixon *et al.*, 2002; Caño-Delgado *et al.*, 2003).

As fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, de baixo peso molecular, produzidos pelas plantas em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos. São capazes de impedir ou reduzir a atividade de agentes patogênicos sendo a taxa de produção/acúmulo dependente dos genótipos do hospedeiro ou patógeno (Hammerschmidt, 1999). As fitoalexinas em aveia são um grupo de antranilatos *N*-hydroxycinnamoyl

substituídos, que comumente são referidos como avenantramidas (Mayama *et al.* 1981; Miyagawa *et al.* 1996). Atualmente já são identificadas mais de 25 variações estruturais em avenantramidas, contudo, as três formas mais abundantes em aveia são avenantramida A, B e C (Collins, 1989). O acúmulo de avenantramidas é estimulada pelo tratamento das folhas com vários elicitores, incluindo fragmentos de quitina, (Bordin *et al.*, 1991), victorinaC (Mayama *et al.*, 1986) e íons de metais pesados. (Fink *et al.*, 1990). Mayama *et al.* (1982) observaram uma relação direta entre o tipo de infecção produzido por *P. coronata* f. sp. *avenae* com a quantidade de avenantramida acumulada e com o tamanho da hifa infectiva desenvolvida. O acúmulo de avenantramidas ocorre em células do mesófilo nos locais de infecção, no entanto, altas concentrações destes compostos também são encontrados no fluído intercelular, sugerindo que as avenantramidas também podem ser secretadas no espaço intercelular em folhas infectadas.

A resistência genética à ferrugem da folha em aveia é conhecida à longa data. Segundo Simons (1985), relata que Silvers, em 1887, já havia selecionado algumas variedades mais resistentes à ferrugem da folha, mas somente em 1920 Packer's demonstrou que a resistência poderia ser transmitida à progênie do cruzamento entre uma linhagem suscetível e uma resistente. Desde então os programas de melhoramento deste cereal buscam cultivares com resistência durável. No entanto, na maioria dos casos a resistência conseguida é baseada em mecanismos de hipersensibilidade e, portanto, constituiu-se efêmera. A alternativa sugerida para prolongar a durabilidade da resistência é a utilização de cultivares com resistência parcial (*slow rust*) (Johson, 1984; Parlevliet, 1995; Federizzi, 2000; Martinelli,

2000; Chaves *et al.*, 2004a; Chaves & Martinelli, 2005). A avaliação dos componentes de resistência ferrugem da folha da aveia realizada por Chaves *et al.* (2004c) demonstrou que não há, aparentemente, um único componente responsável pela expressão da resistência quantitativa (eficiência de infecção, período de latência, tamanho de uredopústulas ou produção de uredósporos por pústulas). Assim, para os genótipos estudados a resistência parece envolver mais de um processo. Além disso, é possível que diferentes mecanismos estejam envolvidos em cada genótipo, de forma que o componente mais importante para um determinado seja diferente entre os genótipos. Os autores demonstraram haver uma grande variação no processo de eficiência de infecção, o que sugere mecanismos de resistência pré-haustoriais. Também foi observada uma redução do número de uredósporos produzidos por pústulas em outros genótipos, indicando que mecanismos pós-haustoriais também podem estar envolvidos.

Um das fontes de resistência à ferrugem da folha da aveia mais promissoras nos últimos anos tem sido o gene *Pc68*. Essa resistência mostrou-se durável por mais de 10 anos. Este gene foi identificado por Wong *et al.* (1983) em um acesso de *Avena sterilis*. As primeiras cultivares cultivadas com este gene foram lançadas no início da década de 1990 na América do Norte e, no final da mesma década, na Oceania (Park, 1999). Ao longo desta década, a frequência de raças de *P. coronata* f. sp. *avenae* virulentas ao *Pc68* manteve-se baixa (Park, 2000; Oates, 2000; van Niekerk *et al.*, 2001; Leonard, 2003; Sooväli & Koppel, 2003; Allagui & Chakroun, 2004; Leonard *et al.*, 2004; Leonard & Martinelli, 2005; Leonard *et al.*, 2005). Isso sugere que o mecanismo de resistência desencadeado por este gene

seja bastante eficiente, garantindo resistência mesmo na presença de raças virulentas. Este gene confere resistência específica à raça do patógeno, caracterizada por tipo de infecção (0) ou (0;) (Wong, 1983; Chong *et al.*, 2000; van Niekerk *et al.*, 2001). Apesar de não se conhecer o mecanismo de ação deste gene, sugere-se que seja tão eficiente que dificulte a adaptação de novas raças em parasitar genótipos *Pc68*, então sendo um gene forte, na definição de van der Plank (1963) (Leonard, 2005; Graichen, 2006; Vieira *et al.*, 2006a). Na América do Sul a frequência de raças virulentas aos genes *Pcs* foi estudada por Leonard & Martinelli (2005) e Martinelli (2000). Os autores encontraram raças virulentas ao gene *Pc68* em anos com severas epidemias de ferrugem da folha (anos de 1994 e 1995). Entretanto, nos demais anos, não foi detectada virulência a este gene. Isso provavelmente tenha ocorrido como consequência do baixo valor adaptativo das raças com virulência ao gene *Pc68*.

No ano de 2005 houve superação da resistência conferida pelo gene *Pc68* no Canadá (D. Stuthmann, 2005 comunicação pessoal) e novamente no Brasil (Graichen, 2006). À primeira vista, isso sugere que se abandone a expectativa de se utilizar este gene em cultivares comerciais. No entanto, em avaliações preliminares realizadas no ano de 2006, verificou-se apenas algumas pústulas no genótipo Starter/5\**Pc68* (Graichen, F.A.S. & Martinelli, J.A., dados não publicados). A baixa severidade da doença apresentada por este genótipo em anos com forte epidemia de ferrugem e a não fixação de raças virulentas sugerem que este gene realmente seja um gene forte. A dinâmica de frequência das raças de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e o conhecimento do mecanismo de ação desencadeado por este gene podem

servir de subsídios para o desenvolvimento de cultivares com resistência durável.

Em aveia são observadas outras reações de resistência diferentes da imunidade. Algumas linhagens desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento Genético de Aveia - UFRGS têm-se apresentado muito resistentes ao longo dos anos. Uma população selecionada do cruzamento entre as cultivares UFRGS 17 X UFRGS 952681 apresenta um tipo marcante de reação à *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. Sobre estas linhagens são observadas algumas pústulas, mas, no entanto, estas pústulas são abortadas antes de esporularem (L.C. Federizzi & M.T. Pacheco, comunicação pessoal). Este abortamento é ocasionado por uma intensa necrose ao redor da pústula. Até o presente momento, não se conhece qual o processo que desencadeia esta necrose nem o momento que a mesma é formada. Numa situação um pouco diferente, sobre algumas linhagens e cultivares, pequenas pústulas são observadas nas folhas mais basais da planta. Apesar de estas pústulas serem produzidas por raças virulentas do patógeno, as folhas superiores da planta não apresentam pústulas. Este é o caso da cultivar URS 21, que se mostra resistente há um longo período de tempo. Esta cultivar apresenta resistência específica à raça em plântulas (Vieira *et al.*, 2006b), mas, pela expressão de sua resistência nos estádios posteriores, também pode ser caracterizada como possuidora de resistência de planta adulta (J.A. Martinelli, 2006, comunicação pessoal).

Apesar da grande variabilidade da resistência à ferrugem encontrados em aveia muito pouco é conhecido sobre o mecanismo que desencadeia esta resistência. Por outro lado o mecanismo de resistência às ferrugens

principalmente nos patossistemas envolvendo trigo e cevada tem sido amplamente investigado. Estas interações apresentam muitas semelhanças com a interação *P. coronata* f. sp. *avenae* x aveia. No entanto, cada interação patógeno hospedeiro é particular, salientando que extrapolações para outros patossistemas podem não ser verdadeiras. Em aveia as informações disponíveis são limitadas aos tipos de infecções produzidas, as quais foram determinadas por Chong *et al.* (2000). Apesar de serem informativos, estes dados podem não refletir o mecanismo de ação desencadeado pelos genes de resistência. Desta forma este trabalho tem como objetivo determinar o mecanismo de resistência atuante em genótipos de aveia com diferentes níveis de resistência.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

A execução deste trabalho iniciou com a identificação, caracterização e seleção de genótipos de aveia com resistência à ferrugem da folha em condições de campo. Após a identificação de genótipos resistentes e suscetíveis as demais avaliações foram realizadas em plântulas sob condições controladas. A caracterização dos genótipos quanto à reação à ferrugem no estágio de plântula foi realizada através da avaliação de dois componentes epidemiológicos: período latente e densidade de pústulas desenvolvidas. A avaliação dos processos infectivos e da colonização do fungo foi realizada em genótipos resistentes e suscetíveis, sendo que as comparações foram realizadas entre estes dois grupos. Após a colonização da planta pelo fungo foram avaliadas a ocorrência de morte celular, aposição calose na parede celular, acúmulo de compostos fenólicos, autofluorescentes e semelhantes à ligninas, como apresentados na Figura 3. Os métodos utilizados neste trabalho estão descritos detalhadamente nos tópicos seguintes:

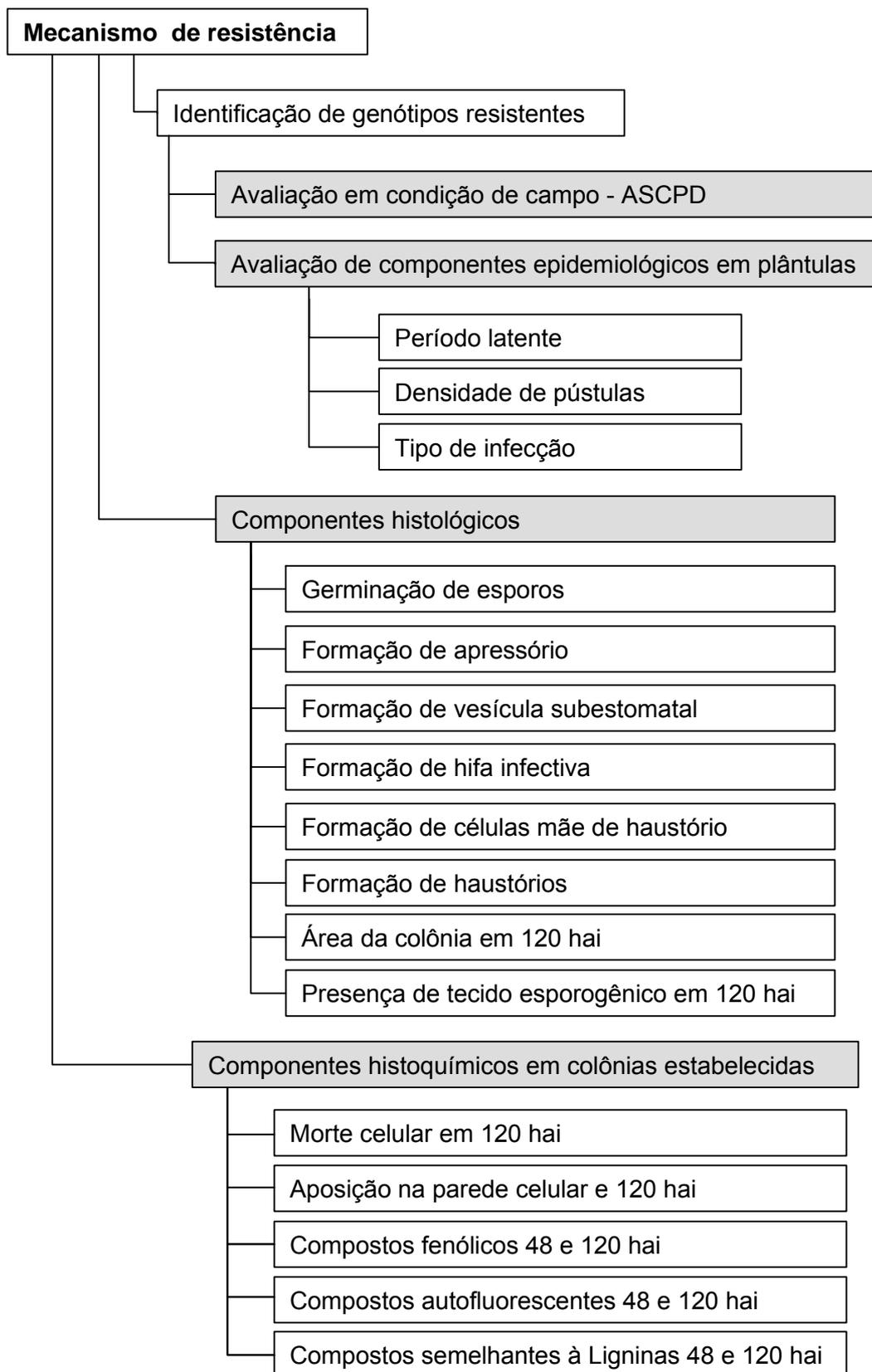


FIGURA 3. Organograma dos das variáveis epidemiológicas e histológicas relacionadas com mecanismos de resistência avaliadas neste trabalho. Porto Alegre, RS. 2009.

### **3.1 Avaliação da intensidade da doença em condições de campo**

#### **3.1.1 Material genético**

A intensidade da ferrugem da folha foi avaliada sobre algumas variedades de aveia que apresentam distintas reações de resistência. Foram avaliadas as cultivares URS 21, URS 22, UFRGS 17, URS Guapa, algumas linhagens desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento Genético de Aveia da UFRGS e o genótipo Starter/5\*Pc68 (Tabela 1. As genealogias dos genótipos avaliados estão apresentadas no Apêndice 1). No ano de 2006 foram avaliados 36 genótipos. Este número foi reduzido para 24 no ano 2007 e a 12 no ano de 2008. As cultivares URS 21 e URS 22 foram utilizadas por serem variedades atualmente cultivadas e representarem respectivamente os padrões de resistência e suscetibilidade. A cultivar UFRGS 17 é uma variedade não mais recomendada para o cultivo. Porém foi utilizada por ser um dos genitores do grupo de linhagens utilizado, atualmente esta cultivar é considerada suscetível à doença. O genótipo Pc68/5\*Starter é uma linhagem quase isogênica “Starter” portadora do gene *Pc68*, apresentando-se altamente resistente em avaliações anteriores. Os demais genótipos foram selecionados por apresentarem uma baixa intensidade da doença associados com a presença de halos cloróticos ou necróticos e tamanho da pústula reduzido (M.T. Pacheco & L.C. Federizi, comunicação pessoal, 2006). A cultivar URS Guapa foi introduzida na avaliação de campo no ano 2008, sua utilização neste ano é justificada pela alta resistência apresentada em condições de cultivo em anos anteriores e pela expressiva área cultivada atualmente.

### 3.1.2 Condução do experimento

As parcelas foram semeadas a campo na Estação Experimental Agronômica (Eldorado do Sul – RS) e naturalmente inoculadas por esporos de *P. coronata* f. sp. *avenae* presentes no ambiente. As linhagens foram semeadas em parcelas experimentais com 3 m<sup>2</sup> (3 m x 1 m), distanciadas em 40 cm entre si, disposta no delineamento de blocos ao acaso com três repetições no ano 2006 e quatro repetições nos demais anos. Em cada parcela foram semeadas aproximadamente 950 sementes tratadas com Imidacloprido (36 g ia /100 kg de semente) e Triadimenol (37,5 g ia/ 100 kg de semente).

### 3.1.3 Avaliação da doença

A intensidade da ferrugem da folha foi avaliada através da estimativa da severidade da doença. Após a avaliação da doença em todo o período do ciclo da cultura, foi construída a curva de progresso da doença para cada linhagem, e calculada a Área Sob a Curva de Progresso da Doença Normalizada e corrigida (ASCPD\*c) com a seguinte fórmula:

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

Onde:

$y_i$  = % da área foliar afetada pela ferrugem da folha (severidade na  $i$ -ésima observação;

$t_i$  = tempo em DAS (dias após a semeadura) no momento da  $i$  – ésima observação;

$n$  = período de dias entre início da moléstia e a última avaliação da

doença (adaptado de Fry, 1978); e

c = maior período de epidemia dentre as linhagens avaliadas;

Os dados de ASCPD\*c obtidos nos anos de 2006 e 2007 foram submetidos à ANOVA e as médias foram discriminadas pelo teste de Duncan 5%. No ano de 2008 os dados de ASCPD\*c apresentaram variâncias heterogênicas, portanto foram submetidos à transformação  $y_{ij}^* = \log(y_{ij} + 10)$  e posteriormente seguiram os mesmos procedimentos de análise dos dados dos anos anterior.

### **3.2 Determinação de componentes de resistência em plântulas**

Dois componentes de resistência foram avaliados: período latente e número de pústulas formadas sobre plântulas dos genótipos URS 21, URS 22, UFRGS 17, UFRGS 7, URS Guapa, Starter/5\*Pc68 e 18 linhagens de aveia. Estes 18 genótipos foram selecionados com base na intensidade da doença no campo e os tipos de infecção produzidos. A cultivar UFRGS 7 foi inserida na análise dos componentes da resistência por ser altamente suscetível no estágio de plântula, sendo utilizada como padrão de suscetibilidade em trabalhos realizados anteriormente (Chaves *et al.*, 2004; Vieira *et al.* 2006a; 2006b; e Wesp *et al.* 2008). O período latente foi compreendido como o intervalo de tempo, em dias, entre a inoculação e o surgimento da primeira pústula esporulante (Chaves *et al.* 2004b e Wesp 2005). A densidade de pústulas foi compreendida como o número de pústulas desenvolvidas em uma área conhecida. O resultado foi expresso em pústulas/cm<sup>2</sup>.

Os genótipos foram semeados em linhas duplas de 10 células recortadas de bandejas de isopor para a produção de mudas de hortaliças, porém somente em uma das linhas de células foi preenchida com substrato e semeada. Em cada célula foram semeadas três sementes. Posteriormente realizou-se um desbaste de forma que restassem de uma a duas plântulas homogêneas por célula. Desta forma, no momento da inoculação haviam de nove a dez plântulas por genótipo. Junto com cada genótipo foi semeada a cultivar URS 22 como controle da inoculação. As plântulas foram mantidas sob condições de ambiente controlado com temperatura de  $22^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$  e fotoperíodo de 16h de luz e 8 horas de escuro. Quatro a seis dias após a semeadura as linhas de isopor foram giradas, de forma que as plântulas crescessem paralelas ao substrato e com a lâmina adaxial voltada para o lado oposto à superfície do substrato.

Para determinar a densidade de pústulas desenvolvidas, cada linha da bandeja foi dividida ao meio, de forma que dois genótipos pudessem ser semeados em cada linha. Junto com cada genótipo foi semeada a cultivar URS 22. Assim, cada linha de isopor continha duas células com esta cultivar. Os demais procedimentos de manuseio das plântulas foram os mesmos realizados no experimento para determinar o período latente. No entanto, foram obtidas quatro a cinco plântulas por genótipo.

A inoculação foi realizada de forma semelhante ao método descrito por Chaves *et al.* (2004b) e Wesp (2005). Quando as plântulas apresentaram a primeira folha completamente desenvolvida, as linhas de isopor foram agrupadas de duas a duas e dispostas no interior de uma torre de decantação de esporos, onde foram pulverizadas 0,025g de uredósporos.

Esta quantidade permitiu uma densidade de aproximadamente 500 uredósporos/cm<sup>2</sup>. Estes uredósporos foram coletados em *bulk* sobre diferentes linhagens de aveia no campo em 2006 e multiplicados em condições controladas sobre a cultivar URS 22. Antes da inoculação as plântulas foram aspergidas com uma solução de Tween 20<sup>®</sup> 0,01% e permaneceram no escuro por 14 h, em condição de câmara úmida a temperatura de 20°C.

A avaliação do período latente ocorreu diariamente com o auxílio de uma lupa manual até que todas as plântulas apresentassem sintomas.

Para determinar a densidade de pústulas desenvolvidas as plântulas foram coletadas 10 dias após a inoculação e acondicionadas entre folhas de papel toalha e mantidas em geladeira a 4°C. A contagem do número de pústulas foi realizada tão logo quanto possível sob um microscópio estereoscópico (Leica MZ 12) com aumento de 40x. Em cada folha foram avaliados cinco cm medianos, onde foram contados o número de pústulas esporulantes e o número de pontuações necróticas. Também foi calculada a área da folha avaliada. A densidade de pústulas foi obtida pela razão entre número total de pústulas e a área do segmento foliar analisado. Para evitar erros sistemáticos dentro da câmara de inoculação, foi calculado o número de pústulas em relação ao controle (R22). Cada conjunto de linhas utilizado no momento da inoculação era composto por quatro repetições do controle. Assim o número de pústulas/cm<sup>2</sup> foi dividido pela média dos controles em cada conjunto de inoculação.

Nas mesmas folhas onde foi avaliada a densidade de pústulas também foi avaliado o tipo de infecção produzido (TI). Para isso, foi empregada uma escala qualitativa composta de notas variando de 0 a 4, proposta por Chong *et al.* (2000), associada a alguns símbolos que complementam esta escala. Os valores da escala representam os seguintes tipos de infecção: (0) = ausência de urédia ou outros sinais macroscópicos de infecção, (;) = presença de pontuações necróticas ou cloróticas, (1) pequena urédia rodeada por clorose ou necrose, (2) urédia com tamanho variando de pequeno a médio rodeada por clorose, (3) = urédia com tamanho médio em área clorótica e (4) urédia grande sem clorose ou necrose. Os símbolos, ( - ) e ( + ) foram utilizados para indicar pústulas em tamanho menor ou maior que o usual, respectivamente para cada classe. As letras N e Cl indicam a presença marcante de necrose ou halo associados ao tipo de infecção indicado (Bonnett *et al.* 2002). As situações de heterogeneidade de TI foram indicadas pela combinação das classes de TI. Os TIs iguais ou superiores a 3 foram considerados como reação de suscetibilidade. Alguns dos TIs mais freqüentes são ilustrados na Figura 3.

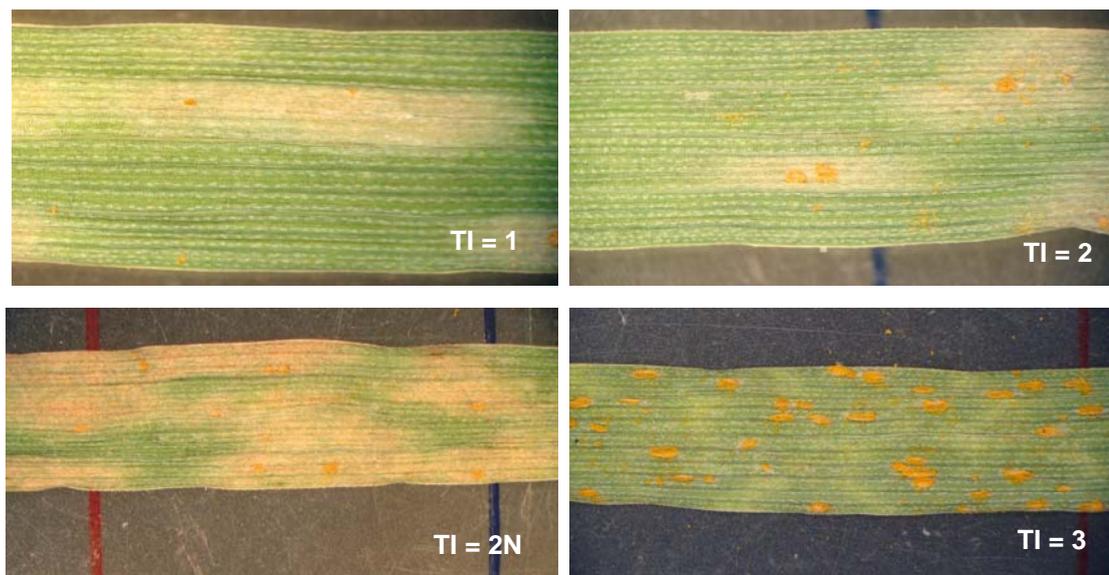


FIGURA 4. Tipos de infecção de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* encontrados com maior frequência em plântulas de diferentes genótipos de aveia. O tipo de infecção (TI= 1) indica pústulas pequenas circundadas por halo clorótico, (TI= 2) indica pústulas de tamanho médio ou grande associada com halo clorótico, a indicação (TI= 2N) indica a presença intensa de necrose associada às pústulas, e TI= 3 indica a presença de pústulas de tamanho grande com esporulação intensa. Os tipos de infecção (1), (2) e (2N) indicam reações de resistência, enquanto o TI=3 indica reação de suscetibilidade. Porto Alegre, RS. 2009.

Os dados de período latente foram submetidos à análise descritiva. Os dados de densidade de pústulas e R22 não apresentaram variâncias homogêneas, portanto sofreram transformação  $y^*_{ij} = \log(y_{ij})$  e  $y^*_{ij} = \log(y_{ij}+1)$ , respectivamente, e foram submetidos à ANOVA com o seguinte modelo matemático  $Y^*_{ij} = \text{Genótipo}_i + \text{Inoculação}_j$ . As médias foram discriminadas através do teste de Duncan 5%.

### **3.3 Quantificação dos componentes histológicos da resistência em plântulas de aveia**

#### **3.3.1 Material genético**

A avaliação dos componentes histológicos foi realizada sobre as cultivares UFRGS 17, URS 21, URS 22, URS Guapa, no genótipo Pc68/5\*Starter e nas linhagens 04B7107-2, 04B7113-1 e 04B7119-2.

As plântulas foram semeadas em linhas de células de isopor e manipuladas como descrito no procedimento para contagem do número de pústulas/cm<sup>2</sup>. No entanto, foram deixadas duas plântulas por célula após o desbaste.

#### **3.3.2 Inoculação e inóculo**

A inoculação foi realizada dez dias após a semeadura, quando as plântulas apresentavam a primeira folha completamente expandida. O inóculo utilizado foi multiplicado sobre a cultivar URS 22 e coletado dois dias antes da inoculação. A inoculação foi realizada com aproximadamente 200µL de uma suspensão de uredósporos em óleo mineral (Soltrol), na concentração de 10<sup>6</sup> uredósporos/ml, em cada conjunto de linhas. A densidade de uredósporos depositados foi avaliada sobre placas de *Petri* contendo meio água - água 3%. A inoculação com este volume possibilitou uma densidade de aproximadamente 200 uredósporos/cm<sup>2</sup>. Após a inoculação as plântulas foram aspergidas com uma solução de Tween 20<sup>®</sup> 0,01% e mantidas no escuro, em condição de câmara úmida por 15 h.

### 3.3.3 Amostragem

Em cada genótipo foram coletadas duas plântulas, destas foi coletado um segmento de aproximadamente 1,5 cm de comprimento na região mediana da folha. As coletas foram realizadas nos intervalos de 12h, 18h, 24h, 30h após a inoculação, semelhante ao método apresentado por Bender *et al.* (2000) e Anker & Niks (2001).

### 3.3.4 Coloração e exame microscópico

Os segmentos das folhas foram clareados e fixados por 24 horas em uma solução de etanol:clorofórmio (3:1, v:v) + ácido tricloro-acético 0,15%. Depois de transcorrido este período, os segmentos foram corados ou armazenados em uma solução de glicerol 50%. Os segmentos foram corados por aquecimento (90 a 100°C) em uma solução de *Trypan blue* 0,03% em lactofenol:etanol (1:2, v:v) durante 5 min. Após, as amostras foram imersas em solução saturada de cloral hidrato (5:2, p:v) para clareamento e armazenamento. Os segmentos foliares corados foram montados com a superfície adaxial voltada para cima em glicerol 50%, cobertos com uma lamínula e selados com uma camada de esmalte (Niks, 1986; Bender *et al.*, 2000).

A observação dos sítios de infecção em cada um dos segmentos das folhas selecionados foi realizada em um microscópio Olympus BX41 utilizando como sistemas de iluminação campo claro ou contraste de fase. Foram quantificadas todas as estruturas formadas pelos uredósporos depositados sobre o segmento. A visualização e contagem de uredósporos, tubos germinativos, apressórios, vesículas subestomáticas (VSe), hifas

infectivas (HI), células mãe do haustório (CMH) e haustórios foi realizada a um aumento de 200x. No entanto, as estruturas formadas no interior da planta foram confirmadas e melhor visualizadas a um aumento de 400x. As estruturas foram fotografadas com uma câmera DCM 300 ou Sony DSC-H9 diretamente na ocular e processadas com o software Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated).

### 3.3.5 Análise dos dados

As estruturas formadas pelo fungo foram contadas e as proporções dos estádios sucessivos do fungo foram calculadas da seguinte maneira em cada horário de coleta:

Proporção de uredósporos germinados =  $N_1 / (N_0 + N_1)$ ;

Proporção de uredósporos que diferenciam Apressórios =  $N_2 / N_1$ ;

Proporção de Apressórios com vesículas subestomáticas =  $N_3 / N_2$ ;

Proporção de VSe com hifas infectivas formadas =  $N_4 / N_3$ ;

Proporção de VSe com CMH =  $N_5 / N_3$ ;

Proporção de VSe com haustórios =  $N_6 / N_3$ ;

Número médio de CMH formada por VSe = (número total de CMH)/ $N_3$ ;

e

Número médio de Haustório formado por VSe = (número total de haustorios)/ $N_3$ ;

Onde:  $N_0$  = número de uredósporos não germinados;  $N_1$  = número de uredósporos germinados;  $N_2$  = número de uredósporos com apressórios formados;  $N_3$  = número de uredósporos com vesículas subestomáticas formadas;  $N_4$  = número de uredósporos com vesículas subestomáticas e hifa infectiva formada;  $N_5$  = número de uredósporos com células mãe do haustório;  $N_6$  = número de uredósporos com haustórios formados (adaptado

de Wyss & Müller-Schärer, 1999).

As variáveis descritas acima foram calculadas e foram construídos gráficos demonstrando o desenvolvimento seqüencial das estruturas do fungo. Em cada gráfico locou-se o tempo após a inoculação como abscissa (x) e a proporção das estruturas formadas pelo fungo em cada genótipo como variável dependente (y).

### **3.4 Análise histológica e histoquímica de colônias estabelecidas**

Para a análise de colônias estabelecidas foram utilizados os genótipos descritos no item 3.3.1, bem como o método semeadura e condução das plântulas. A inoculação foi realizada 10 dias após a semeadura com a utilização de uma câmara de decantação, onde foram pulverizados 0,010 g de uredósporos no experimento A e 0,030 g de uredósporos no experimento B, estas quantidades garantiam uma densidade aproximada de 100 e 500 uredósporos decantados/cm<sup>2</sup>, respectivamente. O inóculo utilizado foi obtido de um *bulk* de raças coletadas no campo no ano de 2006, multiplicado seqüencialmente nos seguintes genótipos: URS 22, AL 0421 e mantidas sobre plântulas de URS 22, UFRGS 17 e URS Guapa. Antes da inoculação as plantas foram aspergidas com uma solução de Tween 20<sup>®</sup> 0,01%, e após a inoculação as plantas permaneceram no escuro no interior da câmara de decantação, em condição de câmara úmida durante 15 horas a temperatura de 20°C. No interior da câmara de decantação foram dispostas placas de *Petri* contendo meio de cultura ágar-água (3%), onde posteriormente contaram-se os uredósporos depositados e aferiram-se as densidades de inoculação.

As amostras foram coletadas na região mediana das folhas (1,5 cm de comprimento) em 48 e 120 hai. As amostras coletadas no experimento A foram fixadas e seguiram o procedimento de coloração com *Trypan blue* descrito no item 3.3.4 ou foram armazenadas em glicerol 50%. As amostras do experimento B foram todas fixadas e posteriormente armazenadas em glicerol 50% até o momento da realização das demais análises.

#### **3.4.1 Análise do desenvolvimento fúngico**

As amostras coloridas com *Trypan blue* do experimento A coletadas em 120 hai foram submetidas à série de etanol 80% (30 min.), 90% (30 min.) e 100% (2 vezes 30 min.) para a desidratação e coloridas com uma solução saturada de ácido pícrico em metil salicilato durante 5 min., seguindo uma lavagem metil salicilato puro durante 15 min. (MacBryde, 1936). As amostras foram montadas em metil salicilato com a página adaxial voltada para cima e analisadas ao microscópio. Foram avaliadas três repetições de cada um dos oito genótipos, sendo que cada repetição era composta por 2 amostras coletadas de plantas diferentes. Nestas amostras foram avaliadas as seguintes variáveis:

- a) Presença de morte celular do hospedeiro: foram contadas as colônias de *Puccinia coronata* f.sp *avenae* associadas com células intensamente coradas com *trypan blue*. Este corante possui afinidade por tecidos vegetais mortos (van Wees, 2008). A proporção de colônias com morte celular foi obtida pela divisão do número de colônias com morte celular pelo número total de

- b) Aposição na parece celular (papilas) do hospedeiro. A presença de aposição na parede celular foi verificada pela presença de pontuações intensamente brilhantes na parede celular do hospedeiro quando em contato com hifas do fungo (Niks, 1986; Bender *et al.*, 2000);
- c) Área das colônias: o comprimento das colônias paralelamente as nervuras da folha e a largura das colônias perpendicularmente à direção da medida do comprimento foram medidos com o auxílio de uma ocular com um retículo micrométrico. Evitou-se medir colônias coalescidas bem como as localizadas nas margens das amostras. Para o cálculo da área da colônia assumiu-se que as colônias apresentavam forma elíptica, assim, a área foi calculada com a seguinte fórmula:  $\text{Área} = \pi (\text{comprimento} * \text{largura})/4$  (Bender *et al.*, 2000); e
- d) Presença de tecido esporogênico. A proporção de colônia com tecido esporogênico foi obtida pela divisão do número de colônias com a presença de células esporogênicas ou uredósporos pelo número total de colônias avaliadas.

### **3.4.2 Histolocalização de compostos fenólicos**

A presença de compostos fenólicos foi avaliada através da coloração com o - toluidina. As amostras coletadas de duas plantas no experimento B foram clareadas em cloral hidratado (5:2). Após, os segmentos foram incubados com uma em solução tampão de citrato 50 mM pH 3,5 durante 30

minutos (2x), seguindo uma coloração com o-toluidina a 0,05% em tampão citrato durante 20 min. Após, os segmentos foram lavados no mesmo tampão e montados em lâminas com uma solução de glicerol:tampão (1:1) (v:v), e observados sob microscópio (O'Brien *et al.*, 1964; Borden & Higgins, 2002 com pequenas alterações). Em cada lâmina observou-se a presença ou a ausência de colônias associadas com células coradas com o-toluidina. A proporção de colônias associadas a células coradas não foi realizada devido à dificuldade em se identificar a reação em algumas colônias.

### 3.4.3 Histolocalização de compostos autofluorescentes

Para a análise da presença de compostos autofluorescentes associados às colônias foram utilizadas três plantas de cada genótipo, coletadas no experimento B nos horários 48 e 120 hai. As amostras foram clareadas em cloral hidratado, montadas em glicerol 50% e avaliadas sob luz azul epifluorescente. Esta fluorescência foi conseguida pela utilização de um microscópio Olympus BX 41 (com um conjunto de filtros de excitação *U-MWB2 GPF: 450 to 480 nm, dichroic beamsplitter; 500 nm, barrier filter BA515*) (de Vleeschauwer *et al.*, 2008; de Vleeschauwer *et al.*, 2009). Em cada segmento de folha foram localizadas as colônias fúngicas contendo no mínimo apressório, vesícula subestomatal e hifas infectivas e avaliadas quando a presença ou ausência de células autofluorescentes do hospedeiro. As amostras coletadas 120 hai foram avaliadas também quanto à formação de tecido esporogênico.

#### 3.4.4 Compostos semelhantes a ligninas

Duas amostras de cada genótipo coletadas 48 e 120 hai do experimento A foram avaliados quando a presença de compostos semelhantes à ligninas através da reação de Weisner ou da reação de Cross-Bevan com os seguintes procedimentos:

a) Reação de Weisner: as amostras armazenadas em glicerol 50% foram lavadas em etanol 50% e incubadas durante 30-60 min. em uma solução etanólica de floroglucinol (2%):HCl 12 N (2:1, v:v). As amostras foram montadas em glicerol 50% e visualizadas sob microscópio (Deon, 1997, com pequenas modificações).

b) Reação de Cross-Bevan: As amostras armazenadas em glicerol 50% foram lavadas em etanol 50%, imersas em etanol 50% durante 1 min., após foram transferidas para uma solução aquosa de hipoclorito de sódio 1% durante 5 min. e incubadas durante 30 min. em uma solução de hipoclorito de sódio (5%) acidificada a pH 1 com HCl. Após, as amostras foram lavadas em água destilada deionizada e infiltradas sob vácuo com uma solução aquosa de NaSO<sub>4</sub> 2% (p:v) a 4°C durante 10-15 min. As amostras foram montadas em NaSO<sub>4</sub> 20% (p:v) e observadas ao microscópio (Deon, 1997 com pequenas modificações).

Antes das avaliações de compostos semelhantes a ligninas, as amostras foram avaliadas sob microscópio para detectar a presença de células escurecidas (*browning*). Após a coloração as colônias foram

identificadas e observou-se a reação com os diferentes corantes.

O tipo de infecção produzido também foi avaliado 13 a 15 dias após a inoculação em todos os experimentos. Para tanto foi utilizada a escala proposta por Chong *et al.* (2000) com as anotações de intensidade proposta por Bonnett *et al.* (2002), como descrito anteriormente no item 3.2.

### **3.4.5 Análise dos dados**

Os dados obtidos de tamanho das colônias foram submetidos à análise de variância em um delineamento inteiramente casualizado com três repetições. O tamanho das colônias em cada repetição foi obtido pela avaliação de duas plantas em cada genótipo. A discriminação das médias foi realizada através do teste de Duncan 5%.

Os dados de proporções de colônias com morte celular, tecido esporogênico e compostos fenólicos foram analisados segundo o teste de  $\chi^2$  em tabela de contingência 2x8. A discriminação entre proporções foi realizada segundo o procedimento semelhante ao teste de Tukey 5% apresentado por Zar (2009).

A associação entre a densidade, área das pústulas, proporção de colônias com morte celular, tecido esporogênico e produção de compostos autofluorescentes em 48 e 120 hai foram analisadas através do cálculo dos coeficientes de correlação de Spearman ( $r_s$ ). Foram considerados significativos os coeficientes que apresentaram  $P \leq 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa SAS 8.0 (SAS Institute, Inc., 2000).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Dados de campo

A análise da variância da área sob a curva de progresso da doença normalizada e corrigida (ASCPD\*c) revelou diferenças estatísticas significativas entre os genótipos nos três anos de avaliações ( $P < 0,001$ ). A utilização do delineamento de blocos ao acaso não foi eficiente, pois não houve efeito de blocos ( $P > 0,38$  em todos os anos).

No ano de 2006 foram realizadas 10 avaliações da doença durante 59 dias de epidemia (entre 22 de agosto e 20 de outubro). As cultivares URS 22 e UFRGS 17 foram as mais suscetíveis dentre as avaliadas por apresentarem elevada ASCPD\*c (Tabela 1) e diferiram significativamente entre si e dos demais genótipos. A cultivar URS 21 apresentou ASCPD\*c intermediária, mas foi considerada resistente. A ASCPD\*c não permitiu diferenciar as linhagens avaliadas. No entanto, em algumas linhagens como 04B7111-1 houve grande variação na severidade da doença. Uma das repetições desta linhagem apresentou na última avaliação 5% de severidade no ano de 2006, destacando-a dentre as linhagens resistentes.

No ano de 2007 foram realizadas cinco avaliações da doença durante uma epidemia com 50 dias de duração (entre 5 de setembro e 25 de outubro). Os genótipos URS 22 e UFRGS 17 foram os mais suscetíveis à

doença apresentando as maiores ASCPD\*c (Tabela 1). O genótipo URS 21 apresentou ASCPD\*c intermediária, sendo diferente estatisticamente dos demais genótipos avaliados. As linhagens 04B7107-2, 04B7108-2, 04B7109-2 e 04B7117-2 apresentaram ASCPD\*c acima de 10, porém não diferiram estatisticamente das demais linhagens.

Em 2008 o número de genótipos avaliados foi reduzido para 12 com base nas avaliações realizadas nos anos anteriores. Neste ano foram realizadas sete avaliações da doença entre os dias 15 de setembro e 21 de outubro, totalizando uma epidemia com 67 dias. A cultivar URS 22 apresentou a maior ASCPD\*c sem diferir estatisticamente da cultivar UFRGS 17 (Tabela 1). A cultivar URS Guapa apresentou ASCPD\*c elevada podendo, portanto, ser considerada com suscetível. Os demais genótipos foram considerados resistentes apresentando valores de ASCPD\*c abaixo de 100. As linhagens 04B7110-1, 04B7107-2 apresentaram valores de ASCPD\*c superiores a cultivar URS 21, porém não houve diferença estatística entre estes três genótipos. Os demais genótipos foram altamente resistentes apresentando valores de ASCPD\*c inferiores a 10, não diferindo estatisticamente entre si.

Em alguns genótipos observou-se uma grande variação nas leituras de severidade da doença, sendo que algumas vezes essa variação foi superior à 100% na última leitura, sobretudo no ano de 2007 com as linhagens 04B7107-1, 04B7107-2, 04B7108-2 e 04B7109-2 (dados não apresentados). Como consequência disto, o coeficiente de variação da análise estatística realizada os anos de 2007 apresentou-se elevado, de forma mais intensa no ano de 2008 ocasionou variâncias heterogênicas

entre os tratamentos, prescindindo da utilização da transformação dos dados.

Todos os genótipos avaliados apresentaram tipo de infecção característico de linhagens suscetíveis (tipo de infecção 3 ou superior). Em alguns genótipos pôde-se observar com freqüência a presença de rupturas da epiderme características da formação de uma pústula. No entanto, estas pústulas não apresentavam uredósporos. A cultivar suscetível UFRGS 17 também apresentou pústulas com estas características, mas não se pode relacionar a presença destas pústulas com o nível de resistência das cultivares (Tabela 1). Além dos sintomas descritos na Tabela 1 (presença de halo e pústulas abortadas), também foi freqüente a observação de pontuações necróticas sobre as folhas dos genótipos.

TABELA 1. Reação de 38 genótipos de aveia branca à ferrugem da folha em condições de campo. Eldorado do Sul, RS.

Genótipo	2006			2007	2008
	ASCPD*c	Pústula abortada	Presença de halo	ASCPD*c	ASCPD*c <sup>e</sup>
URS 22	907 a <sup>a</sup>	- <sup>b</sup>	+	826 a <sup>a</sup>	1561 a <sup>ad</sup>
UFRGS 17	265 b	+	-	259 b	1089 a
URS Guapa	---			---	470 b
URS 21	43 c	-	-	112 c	46 c
04B7111-1	9 d	-	++++	25 d	---
04B7113-1	7 d	+	++++	5 d	7 d
04B7110-3	7 d	-	++++	--- <sup>c</sup>	---
Pc68/5*Starter	6 d	-	-	4 d	4 d
04B7110-1	5 d	-	+++	3 d	88 c
04B7110-2	5 d	++	+++++	4 d	---
04B7109-1	5 d	+++	+++	1 d	---
04B7107-2	5 d	-	+++	35 d	69 c
04B7114-3	4 d	++	+++	2 d	---
04B7117-3	4 d	+	+++	---	---
04B7112-1	4 d	++	++	---	---
04B7109-4	4 d	-	+++	---	---
04B7106-1	4 d	-	++++	---	---
04B7115-1	4 d	-	++++	---	---
04B7108-2	4 d	++	++	23 d	---
04B7107-1	4 d	-	++	7 d	---
04B7117-2	4 d	+	+++++	11 d	---
04B7119-2	4 d	-	+	---	5 d
04B7114-1	4 d	++	++	1 d	8 d
04B7109-3	4 d	+	+++	3 d	---
04B7106-2	4 d	-	+++	---	---
04B7114-2	4 d	-	-	---	---
04B7108-3	3 d	-	++	---	---
04B7116-2	3 d	-	+++	---	---
04B7111-2	3 d	++	++	3 d	---
04B7119-1	3 d	-	++	---	---
04B7112-4	3 d	+	+	4 d	9 d
04B7109-2	3 d	-	+++++	14 d	---
04B7117-1	3 d	-	++++	---	---
04B7112-2	3 d	+	++++	---	---
04B7108-1	3 d	+	+++	2 d	---
04B7116-1	3 d	+	+++	---	---
04B7118-2	3 d	+	++	---	---
04B7118-1	3 d	-	-	4 d	4 d
04B7112-3	2 d	-	++++	4 d	---
CV=	10,73%			43,14%	9,11%

<sup>a</sup>. Médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste de Duncan 5%;

<sup>b</sup>. + e - indicam respectivamente presença e ausência da variável descrita. A adição de sinais "+" indica a intensidade com que a característica foi encontrada;

<sup>c</sup>. Genótipos não avaliados; e

<sup>d</sup>. Os dados fora submetidos à transformação  $y_{ij}^* = \log(y_{ij} + 10)$ .

## 4.2 Componentes da resistência em plântula

### 4.2.1 Período latente

O período latente variou de seis a nove dias nas plântulas avaliadas. Todas as plântulas utilizadas como controle suscetível apresentaram sintomas da doença simultaneamente a partir do sexto dia. O genótipo URS 21 apresentou na média o maior período latente. As cultivares URS 22, URS Guapa e UFRGS 7 apresentaram os menores valores de período latente juntamente com a linhagem 04B7112-4 (Figura 4). Não foram observadas pústulas em nenhuma plântula do genótipo Pc68/5\*Starter.

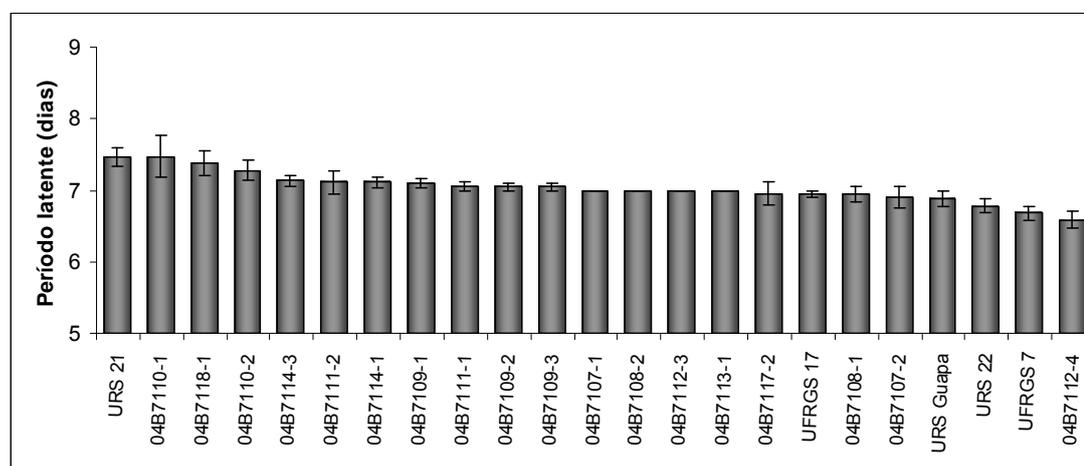


FIGURA 5. Período latente de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* em diferentes genótipos de aveia. As barras representam o erro padrão da média. Cv = 5,42% Porto Alegre, RS. 2009.

### 4.2.2 Densidade de pústulas desenvolvidas

A análise da variância mostrou efeitos significativos para genótipos ( $P < 0,0001$ ) e entre inoculações ( $P < 0,0001$ ). A densidade de pústulas variou de 136 a 13 pústulas/cm<sup>2</sup> nas cultivares UFRGS 17 e URS 21, respectivamente (Tabela 2 e Apêndice 3). Os genótipos URS 22, URS Guapa, UFRGS 7 e UFRGS 17 apresentaram as maiores densidade sem haver diferença significativas entre elas. Não houve diferença estatística

entre a maior parte das linhagens avaliadas e apenas um grupo de linhagens diferiu da linhagem 04B7107-2. A cultivar URS 21 apresentou a menor densidade de pústulas diferindo dos demais genótipos avaliados. O genótipo Pc68/5\*Starter não apresentou nenhuma pústula, mas somente algumas pontuações cloróticas (flecks). Por este motivo este genótipo não foi incluído na análise estatística (Tabela 3 e Apêndice 4).

A análise estatística dos valores da densidade de pústulas relativa à URS 22 (R22) apresentou efeito significativo para o efeito de genótipos ( $P < 0,0001$ ) e inoculação ( $P = 0,0002$ ). A cultivar URS 22 apresentou R22 de 1, indicando que a utilização dos controles em cada bandeja foi eficiente. As cultivares UFRGS 17, URS Guapa e UFRGS 7 não diferiram significativamente entre si, porém diferindo das demais linhagens. A exceção foi a linhagem 04B71107-2 que não diferiu de UFRGS 7 (Tabela 2). A cultivar URS 21 apresentou menor R22 não diferindo apenas das linhagens 04B7114-1 e 04B7110-1.

TABELA 2. Densidade de pústulas de ferrugem da folha em plântulas de diferentes genótipos de aveia. Porto Alegre, RS. 2009.

Genótipo	Densidade (Pust./cm <sup>2</sup> )	Densidade relativa aos controles (R22) <sup>b</sup>
UFRGS 17	135,3 a <sup>a</sup>	1,22 a <sup>a</sup>
URS 22	115,7 a b	1,00 a
URS Guapa	94,2 a b c	1,08 a
04B7107-2	83,2 a b c d	0,63 b c
UFRGS 7	80,0 a b c d e	0,90 a b
04B7107-1	67,4 a b c d e	0,66 b c
04B7109-3	66,0 a b c d e	0,53 c d
04B7112-3	60,2 a b c d e	0,52 c d
04B7118-1	59,7 a b c d e	0,61 b c
04B7114-3	57,4 b c d e	0,51 c d
04B7117-2	56,2 b c d e	0,57 b c d
04B7110-2	56,2 b c d e	0,59 b c d
04B7108-1	56,0 b c d e	0,45 c d
04B7109-2	55,0 b c d e	0,47 c d
04B7108-2	53,6 c d e	0,41 c d
04B7112-4	47,5 c d e	0,42 c d
04B7111-2	47,3 c d e	0,44 c d
04B7111-1	46,3 d e	0,47 c d
04B7109-1	43,8 e	0,52 c d
04B7110-1	42,1 e	0,35 c d e
04B7113-1	36,5 e	0,43 c d
04B7114-1	34,0 e	0,29 d e
URS 21	13,3 f	0,15 e
Pc68/5*Starter	--- <sup>c</sup>	---
<b>CV =</b>	<b>12,2%</b>	<b>24,1 %</b>

<sup>a</sup>. Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan 5%; Dados transformados [ $y^*_{ij} = \log(y_{ij})$ ] e [ $y^*_{ij} = \log(y_{ij}+1)$ ] para densidade de pústulas e densidade relativa, respectivamente;

<sup>b</sup>. Densidade de pústulas em relação à cultivar URS 22 semeada como controle em cada unidade experimental; e

<sup>c</sup>. Este genótipo não foi incluído na análise estatística, pois não foi observada a formação de pústulas.

Alguns genótipos apresentaram algumas pontuações cloróticas, que não progrediram para o desenvolvimento de pústulas. A análise estatística não mostrou diferença significativa entre os genótipos avaliados ( $P= 0,79$ ), porém houve efeito significativo das inoculações ( $P= 0,0095$ ). As cultivares URS 22, UFRGS 17, UFRGS 7 e URS Guapa não apresentaram pontuações necróticas e não foram incluídas na análise, da mesma forma que as linhagens 04B7107-2, 04B7109-2, 04B7109-3 e 04B7113-1.

TABELA 3. Densidade de pontuações cloróticas em plântulas de diferentes genótipos de aveia. Porto Alegre, RS. 2009.

<b>Genótipo</b>	<b>Densidade (pontuações cloróticas/cm<sup>2</sup>)</b>
04B7112-4	6,50 <sup>a</sup>
04B7107-1	4,37
04B7111-1	4,04
04B7108-1	3,66
04B7114-3	3,63
04B7109-1	3,06
URS 21	3,06
04B7111-2	3,00
Pc68/5*Starter	2,82
04B7118-1	2,73
04B7114-1	2,70
04B7117-2	2,45
04B7108-2	2,35
04B7112-3	2,22
04B7110-2	2,14
04B7110-1	1,74
04B7107-2	--- <sup>b</sup>
04B7109-2	--- <sup>b</sup>
04B7109-3	--- <sup>b</sup>
04B7113-1	--- <sup>b</sup>
URS Guapa	--- <sup>b</sup>
UFRGS 17	--- <sup>b</sup>
UFRGS 7	--- <sup>b</sup>
URS 22	--- <sup>b</sup>
<b>CV =</b>	<b>38,4 %</b>

<sup>a</sup>. Diferenças não significativas P= 0,77;

<sup>b</sup>. Dados não inseridos na análise estatística;

As cultivares UFRGS 7, UFRGS 17, URS 22 e URS Guapa apresentaram tipo de infecção de (3) a (3+), com o desenvolvimento de pústulas com grande produção de uredósporos e em algumas vezes presença de halos. A cultivar URS 21 apresentou TI (2CI) a (3-), ou seja, pústulas pequenas e em algumas situações halos cloróticos. O genótipo Pc68/5\*Starter apresentou TI (0) e (;). As demais linhagens apresentaram um tipo infecção com pústulas pequenas a médias associadas halos cloróticos ou necróticos classificados com (2CI), (2N) ou (3-).

### 4.3 Componentes histológicos da resistência

A taxa de germinação dos uredósporos foi maior que 70%. De modo geral, houve maior homogeneidade da germinação dos uredósporos entre os diferentes genótipos em 12 e 24 hai (Figura 5). A totalidade dos uredósporos estavam germinados em amostras coletadas no genótipo 04B7119-2 em 18 hai e URS 21 em 30 hai, no entanto estes máximos não foram mantidos nas avaliações posteriores, para os demais genótipos a máxima germinação foi de cerca de 90% dos uredósporos presentes na amostra. A proporção de uredósporos germinados não permitiu separar os genótipos resistentes em uma classe distinta dos suscetíveis. A alta taxa de germinação apresentada nestas avaliações podem ser atribuídas a artefatos do método, uma vez que os esporos germinados aderem-se mais fortemente à superfície da folha, os demais esporos podem ter sido removidos pelas soluções fixadora, corante ou clarificante utilizadas, superestimando a proporção de esporos germinados.

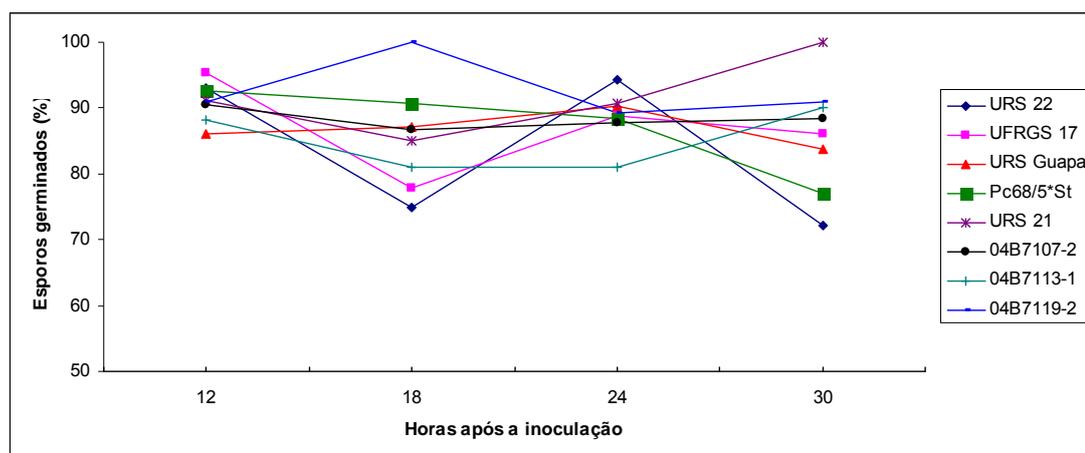


FIGURA 6. Progresso da germinação de uredósporos de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* sobre folhas de diferentes genótipos de aveia. Porto Alegre, RS. 2009.

Os apressórios já puderam ser observados sobre os estômatos tão cedo quanto 12 hai (Figura 7 e Figura 8). O genótipo UFRGS 17 apresentou um aumento gradativo do número de apressórios formados no decorrer do tempo, enquanto que os demais genótipos não apresentaram este padrão. A tendência foi um pequeno aumento no número de apressórios formados, apesar da variação entre os diferentes horários de avaliação. A menor proporção de uredósporos germinados com a diferenciação de uredósporos foi de 14% apresentada pelo genótipo 04B7107-2 em 18 hai, sendo inferior aos demais genótipos. Nas coletas em horários posteriores (24 e 30 hai) este genótipo apresentou proporções semelhantes aos demais genótipos. Os genótipos URS 22, Pc68/5\*Starter e 04B7119-2 apresentaram as menores proporções de uredósporos germinados com apressório em 30 hai. A máxima diferenciação de haustórios foi observada no genótipo UFRGS 17 em 30 hai onde todos os uredósporos germinados diferenciaram um apressório. Os genótipos resistentes e suscetíveis não formaram classes distintas quanto à percentagem de uredósporos germinados contendo apressório.

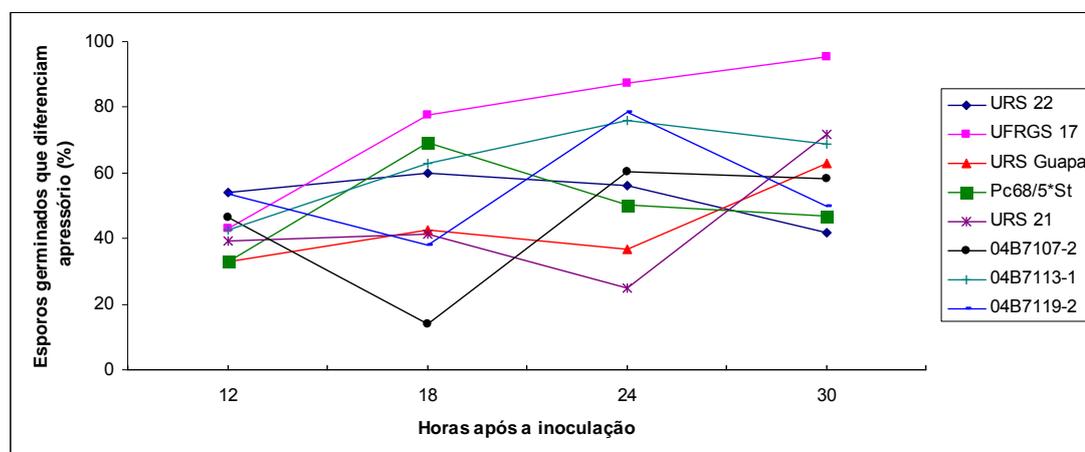


FIGURA 7. Diferenciação de apressórios de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* sobre diferentes genótipos de aveia branca. Proporção em relação aos uredósporos germinados. Porto Alegre, RS, 2009,

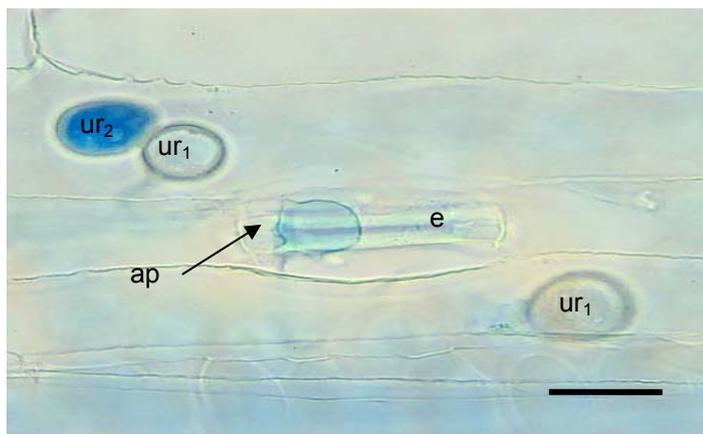


FIGURA 8. Diferenciação de apressório de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* sobre estômato (e) em folha da cultivar de aveia URS Guapa em uma amostra coletada 30 hai. Apressório (ap) é corado em azul claro pelo corante *trypan blue*. Os uredósporos germinados ( $ur_1$ ) ou não ( $ur_2$ ) são visualizados acima do campo focal. A barra indica 20  $\mu$ m. Porto Alegre, RS. 2009.

As primeiras vesículas subestomatais foram formadas apenas 12 horas após a inoculação (Figura 9). Houve um aumento da proporção de formação de VSe com o avanço do tempo. Nas coletas realizadas em 30 hai, mais de 60% dos apressórios formados apresentavam VSe na maior parte dos genótipos. No entanto, o genótipo URS 22 apresentou uma redução na proporção de VSe formadas, onde cerca de 50% dos apressórios diferenciaram VSe em 30 hai. O genótipo UFRGS 17 apresentou uma percentagem de 95% de apressórios com VSe na avaliação realizada em 12 hai, esta proporção manteve-se elevada nos avaliações posteriores, com uma pequena redução para 90% em 30 hai. A porcentagem de apressórios com VSe na linhagem 04B7113-1 foi de 13% em 18 hai, nas avaliações seguintes esta porcentagem foi gradativamente sendo elevada atingindo 95% em 30 hai, sendo semelhante aos genótipos URS 21 com (100%) e

UFRGS 17. Os genótipos 04B7119-2, URS Guapa, 04B7107-2 e Pc68/5\*Starter apresentaram proporções similares de apressórios com VSe na avaliação realizada em 30 hai. Os genótipos resistentes e suscetíveis não puderam ser agrupados em classes distintas quanto a percentagem de apressórios com a diferenciação de VSe.

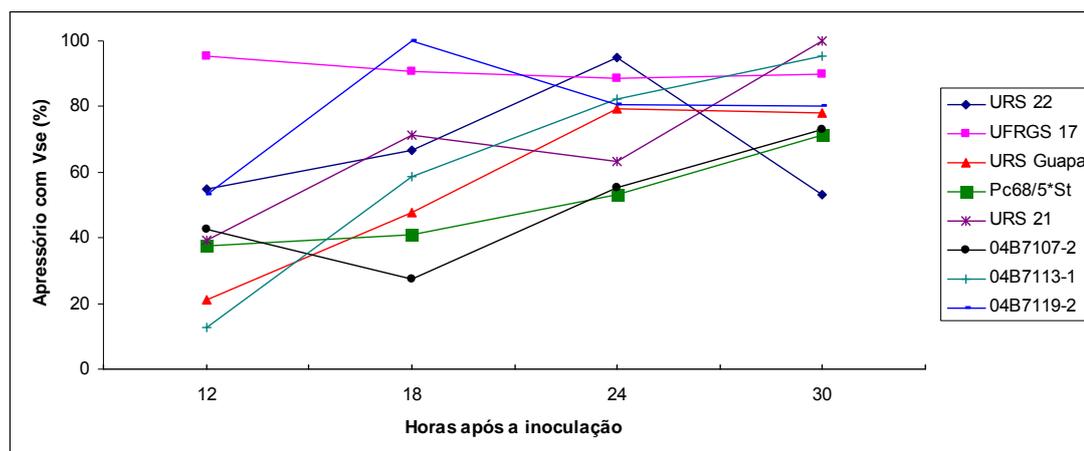


FIGURA 9. Desenvolvimento de vesícula subestomatal (VSe) de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* sobre diferentes genótipos de aveia. Proporção em relação aos uredósporos que desenvolveram apressório. hai – horas após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2009.

O desenvolvimento de hifas infectivas foi observado 18 hai na maioria dos genótipos (Figura 10). *P. coronata* f. sp. *avenae* apresentou VSe com desenvolvimento bipolar de HI, ou seja, duas HI foram desenvolvidas por VSe, porém houve VSe com uma única HI, mas em frequência muito baixa. Assim, mais 70% das VSe desenvolvidas apresentavam HI decorridas 30 hai. A presença de HI foram detectadas mais tardiamente nas cultivares URS 21 e URS Guapa (em 24 hai), porém nesta avaliação as proporções de VSE com HI já era superior a 80% nestas cultivares. Os genótipos UFRGS 17, 04B7119-2, 04B7113-1 e URS 22 apresentaram uma proporção superior

a 95% de apressórios com HI em 30 hai, formando um grupo separado dos demais genótipos cujas porcentagens variaram entre 74 e 80% no mesmo horário de coleta. Apesar de ocorrer a formação destes dois grupos quanto a formação de HI, estes eram formados tanto por genótipos resistentes quanto suscetíveis, não formando permitindo a diferenciação das classes resistentes e suscetíveis.

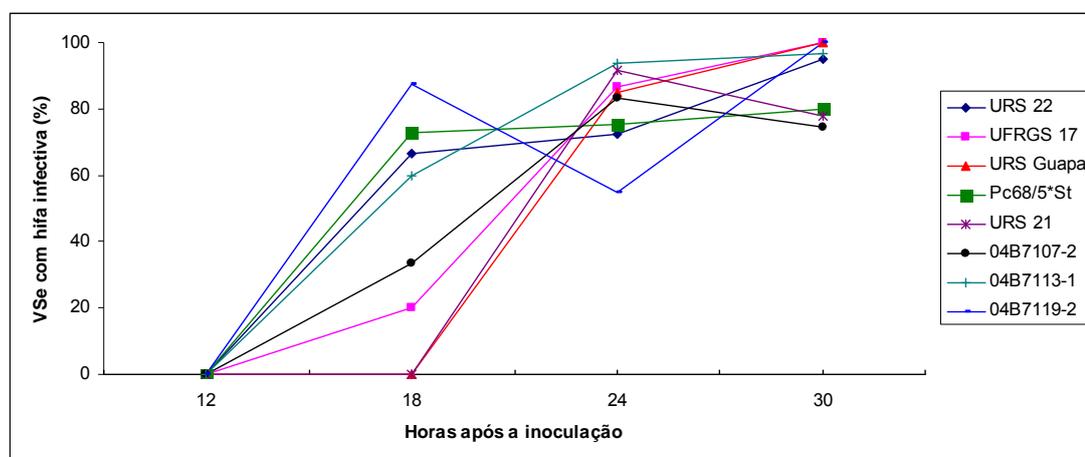


FIGURA 10. Desenvolvimento de hifa infectiva (HI) de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* sobre diferentes genótipos de aveia. Proporção em relação às vesículas subestomatais formadas. hai – horas após a inoculação; VSe – vesícula subestomatal. Porto Alegre, RS. 2009.

Os genótipos 04B7119-2 e 04B7113-1 apresentaram uma pequena proporção de VSe com célula mãe do haustório em 18 hai. Os demais genótipos somente as apresentaram na avaliação em 24 hai. As 30 hai os genótipos URS 21, Pc68/5\*Starter e 04B7113-1 apresentaram cerca de 70% das VSe formadas com CMH, enquanto que os demais genótipos apresentavam uma proporção superior a 90% (Figura 11). Cada VSe produzidas apresentou na média uma CMH em 24 hai (Figura 12 e 13). Na avaliação realizada em 30 hai foram formados três grupos de genótipos

quanto ao número de CMH desenvolvidas. O primeiro grupo foi formado pelos genótipos UFRGS 17 e 04B7113-1 com mais quatro CMH em cada VSe desenvolvida, seguidos pelo genótipo URS Guapa e URS 21, com mais de três CMH desenvolvidas. O terceiro grupo formado apresentou aproximadamente duas CMH desenvolvidas em cada VSe diferenciada, este grupo foi formado pelos genótipos Pc68/5\*Starter, 04B7113-2, 04B7119-2 e URS 22. Apesar de serem formados grupos de genótipos com porcentagens de VSe com CMH ou quanto o número de CMH desenvolvida, em um mesmo grupo foram inseridos tanto genótipos resistentes quanto suscetíveis, de forma que estas características não diferenciaram os genótipos resistentes dos suscetíveis.

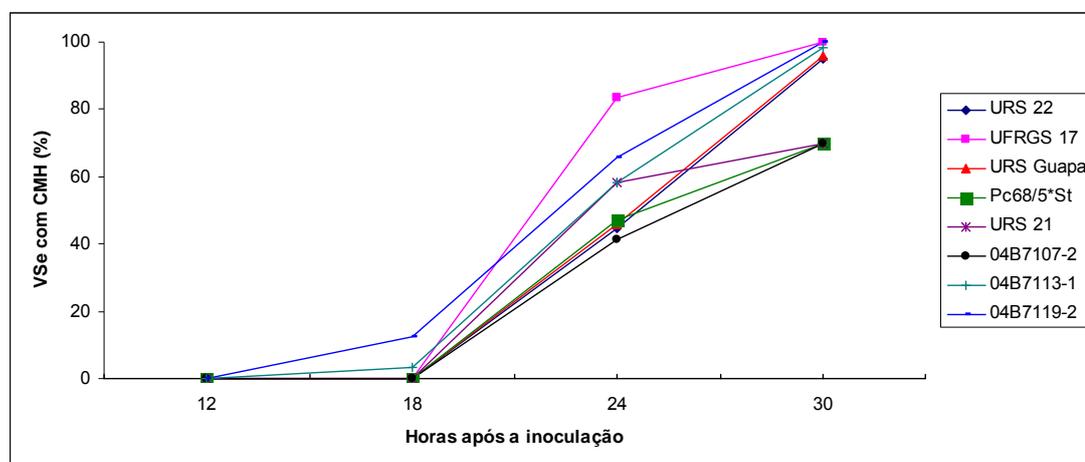


FIGURA 11. Desenvolvimento de células mãe do haustório (CMH) de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* sobre diferentes genótipos de aveia. Proporção em relação às vesículas subestomatais formadas. hai - horas após a inoculação; VSe - vesícula subestomatal. Porto Alegre, RS. 2009.

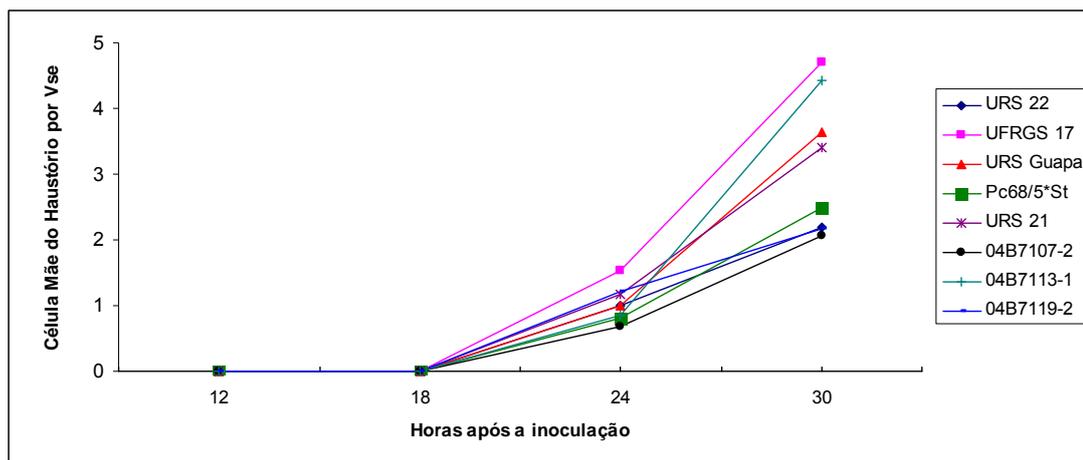


FIGURA 12. Número médio de células mãe de haustório (CMH) desenvolvidas em cada vesícula subestomática (VSe) de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* sobre diferentes genótipos de aveia. hai - horas após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2009,

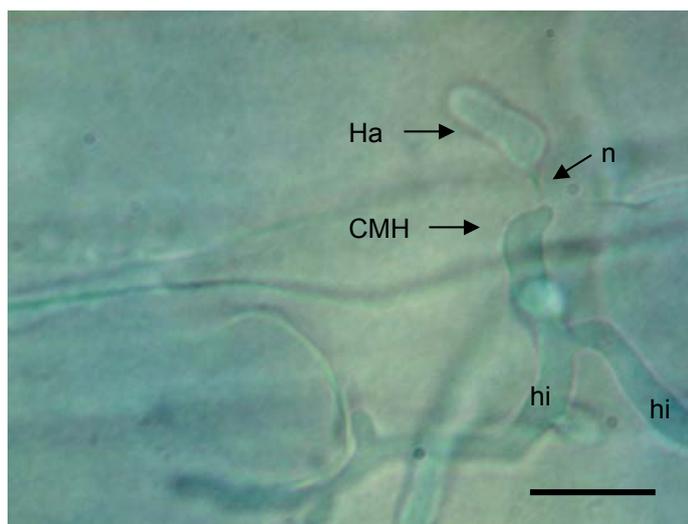


FIGURA 13. Diferenciação de Haustório (Ha) e célula mãe de haustório (CMH) de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* desenvolvidas 30 hai no interior de células do mesófilo da cultivar de aveia URS 22. Amostras clareadas e coradas com *trypan blue*. A barra indica 10  $\mu$ m. A região do pescoço do haustório é indicada pela letra n (*neck*) e hi indica as hifas do fungo. Porto Alegre, RS. 2000.

Vinte e quatro horas após a inoculação foram observados haustórios em todos os genótipos inoculados. Os genótipos UFRGS 17 e URS 22 apresentaram aproximadamente 40% de VSe com haustórios na avaliação

realizada em 24 hai, na avaliação realizada em 30 hai. A proporção de VSe com haustórios nos genótipos Guapa, 04B7113-1, Pc68/5\*Starter e 04B7107-2 foi de aproximadamente 10% na avaliação realizada em 18 hai, na avaliação posterior estes genótipos foram agrupados em diferentes grupos. As menores percentagens de VSe com haustórios foram apresentadas pelos genótipos URS 21 e 04B7107-2 (Figura 14). O genótipo UFRGS 17 apresentou pelo menos um haustório em 93% das VSe, com um número médio de dois haustório por VSe (Figura 15). Os genótipos URS 21 e 04B7107-2 apresentaram os menores números de VSe com haustórios (57% e 49%, respectivamente), assim como os menores números de haustórios por VSe (1 e 1,3 haustório por VSe, respectivamente) juntamente com o genótipo Pc68/5\*Starter (1,1 haustório por vesícula). A utilização do número de haustórios desenvolvidos e a proporção de VSe com haustórios não permitiu diferenciar os genótipos resistentes dos suscetíveis.

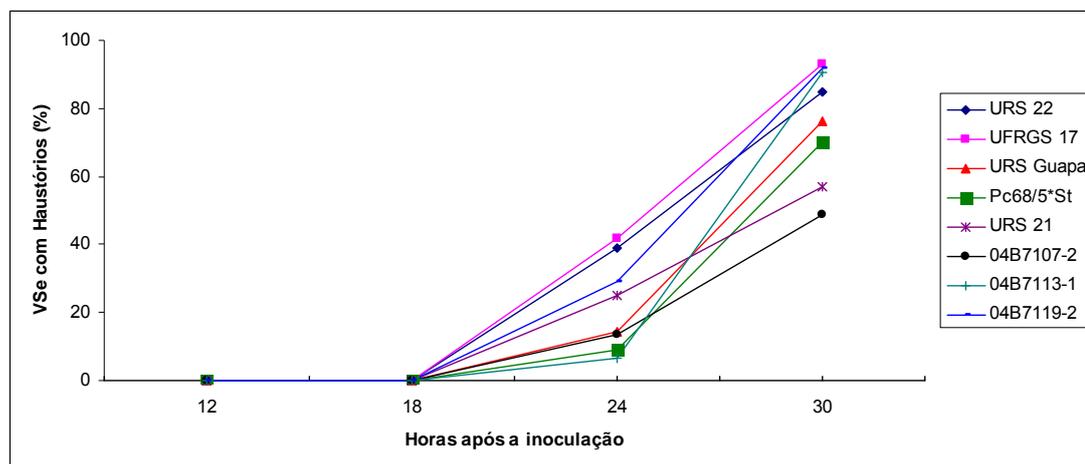


FIGURA 14. Desenvolvimento de haustórios de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* sobre diferentes genótipos de aveia. Proporção em relação às vesículas subestomatais formadas. hai - horas após a inoculação; VSe – vesícula subestomatal. Porto Alegre, RS. 2009.

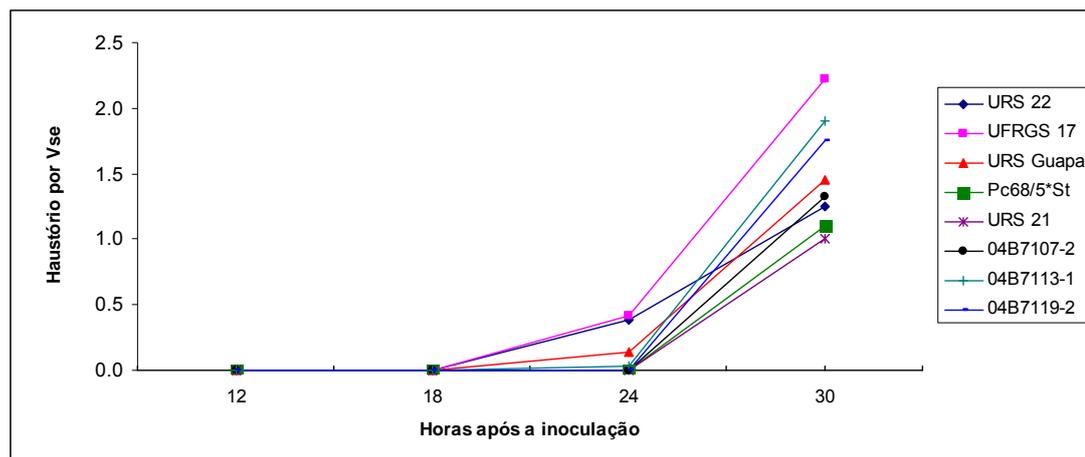


FIGURA 15. Número médio de haustório desenvolvidos em cada vesícula subestomática (VSe) de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* sobre diferentes genótipos de aveia. hai - horas após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2009.

#### 4.4 Análise histológica e histoquímica de colônias estabelecidas

O tipo de infecção produzido sobre os genótipos URS 22, UFRGS 17 e URS Guapa foi (3) ou (3+) (Tabela 4) indicando que esses são suscetíveis ao conjunto de raças utilizadas. Os demais genótipos apresentaram tipo de infecção característico de resistência  $TI < (3)$ . As linhagens 04B7107-2, 04B113-1 e 04B7119-2 apresentaram pústulas de tamanho pequeno a grande, freqüentemente circundadas por halos necróticos ou cloróticos. No entanto, a linhagem 04B7107-2 apresentou uma menor quantidade de pústulas com estas características. A cultivar URS 21 apresentou pústulas predominantemente pequenas associadas com halos cloróticos e algumas vezes necróticos. O genótipo Pc68/5\*Starter não apresentou pústulas e raramente foram observadas pontuações necróticas [flecks,  $TI = (;$ )]. Estas pontuações também foram observadas sobre os genótipos URS 21, 04B7119-2 e mais raramente em 04B7113-1. Existiram pequenas variações

entre os tipos de infecção entre as inoculações, principalmente na linhagem 04B7113-1, onde na terceira inoculação o TI foi (3), indicando suscetibilidade. Nos demais genótipos essas variações não descaracterizaram o fenótipo (Tabela 4).

TABELA 4. Tipo de infecção de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*<sup>a</sup> produzido nas inoculações sobre os genótipos de aveia utilizados nas análises histológicas. Porto Alegre, RS. 2009.

Genótipo	Tipo de infecção			Fenótipo
	Inoculação 1	Inoculação 2	Inoculação 3	
URS 22	3 3+ <sup>b</sup>	3 3+	3 3+	Suscetível
UFRGS 17	3 3+	3 3+	3 3+	Suscetível
URS Guapa	3 3+	3 3+	3 3+	Suscetível
04B7107-2	3- 3	3 3-	3 3-	Intermediário
04B7113-1	2N 2+ 3	2N 2+ 3	3- 3	Resistente
04B7119-2	2+N 3-	2+N 1 ;	2N 1 3-	Resistente
URS 21	2 3- ;	1 ;	2 1 ;	Resistente
Pc68/5*Starter	0	0	0 (;)	Resistente

<sup>a</sup>. Inóculo constituiu-se de uma mistura de raças virulentas à cultivar URS 22 e multiplicadas sobre a cultivar URS 22 no experimento 1 e sobre as cultivares URS 22, URS Guapa e UFRGS 17 nos demais experimentos;

<sup>b</sup>. Tipo de infecção segundo Chong *et al.* (2000) e Bonnett *et al.* (2002).

A análise do desenvolvimento das colônias após seu estabelecimento foi realizada através da mensuração da área média das colônias em cada genótipo. As colônias observadas 120 hai apresentavam um desenvolvimento intenso de micélio intercelular, células mãe de haustório e haustórios. O maior comprimento das colônias se deu no sentido paralelo aos feixes vasculares das folhas e, em muitos casos, houve o desenvolvimento lateral das colônias, o qual foi delimitado pela presença destes feixes. O comprimento médio das colônias variou de 0,27 a 1,71 mm para os genótipos Pc68/5\*Starter e 04B7107-2, respectivamente, e a largura

0,12 a 0,81 mm respectivamente para os mesmos genótipos (dados não apresentados). A área média das colônias variou entre 0,280 a 1,124 mm<sup>2</sup> entre os genótipos, com média geral de aproximadamente 0,900 mm<sup>2</sup>. A análise da variância não indicou efeito de repetições (P= 0,3885) e houve diferenças entre genótipos (P= 0,0001). Porém, quando as médias foram comparadas entre si pelo teste de Duncan 5%, somente o genótipo Pc68/5\*Starter diferiu significativamente dos demais (Tabela 5).

TABELA 5. Quantificação do desenvolvimento de colônias de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* em diferentes genótipos de aveia 120 horas após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2009.

Genótipo	Área da colônia (mm <sup>2</sup> )	Morte celular (%) <sup>b</sup>	Tecido Esporogênico (%) <sup>b</sup>
<b>04B7107-2</b>	1,124 a <sup>a</sup>	13,6 c <sup>c</sup>	74,2 a <sup>c</sup>
<b>04B7113-1</b>	0,940 a	67,9 b	25,0 def
<b>UFRGS 17</b>	0,930 a	6,5 c	64,6 ab
<b>04B7119-2</b>	0,912 a	63,0 b	31,6 cde
<b>URS 22</b>	0,901 a	2,2 c	54,6 abc
<b>URS 21</b>	0,857 a	60,5 b	7,9 ef
<b>URS Guapa</b>	0,823 a	10,4 c	45,4 bcd
<b>Pc68/5*Starter</b>	0,027 b	100,0 a	0,0 g
<b>CV=</b>	21,73%	---	---

<sup>a</sup>. Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan 5%;

<sup>b</sup>. Proporção das colônias com morte celular do hospedeiro ou presença de tecido esporogênico; Morte celular:  $\chi^2= 175,29$  (P< 0,0001), e presença de tecido esporogênico:  $\chi^2= 94,67$  (P< 0,0001); e

<sup>c</sup>. Proporções seguidas por mesma letra não diferem significativamente entre si, comparadas por teste semelhante ao de Tukey 5% (Zar, 2009);

A coloração conjunta de *Trypan blue* com ácido pícrico permitiu identificar claramente as colônias que apresentavam morte celular. Estas colônias apresentavam células intensamente coradas de azul, em contraste com as demais células do hospedeiro que eram levemente azuis (Figura 16). Os genótipos avaliados apresentaram diferentes proporções de colônias associadas à morte celular (Tabela 5 e Apêndice 5). A comparação entre proporções realizada dividiu os genótipos em três grupos distintos. O primeiro grupo foi formado unicamente pelo genótipo Pc68/5\*Starter com a maior proporção de colônias com morte celular. Um segundo grupo foi formado pelos genótipos 04B7113-1, 04B7119-2 e URS 21 com uma proporção de colônias com morte celular superior a 60%. E o terceiro grupo foi formado pelos demais genótipos com menos de 15% das colônias associadas com morte celular.

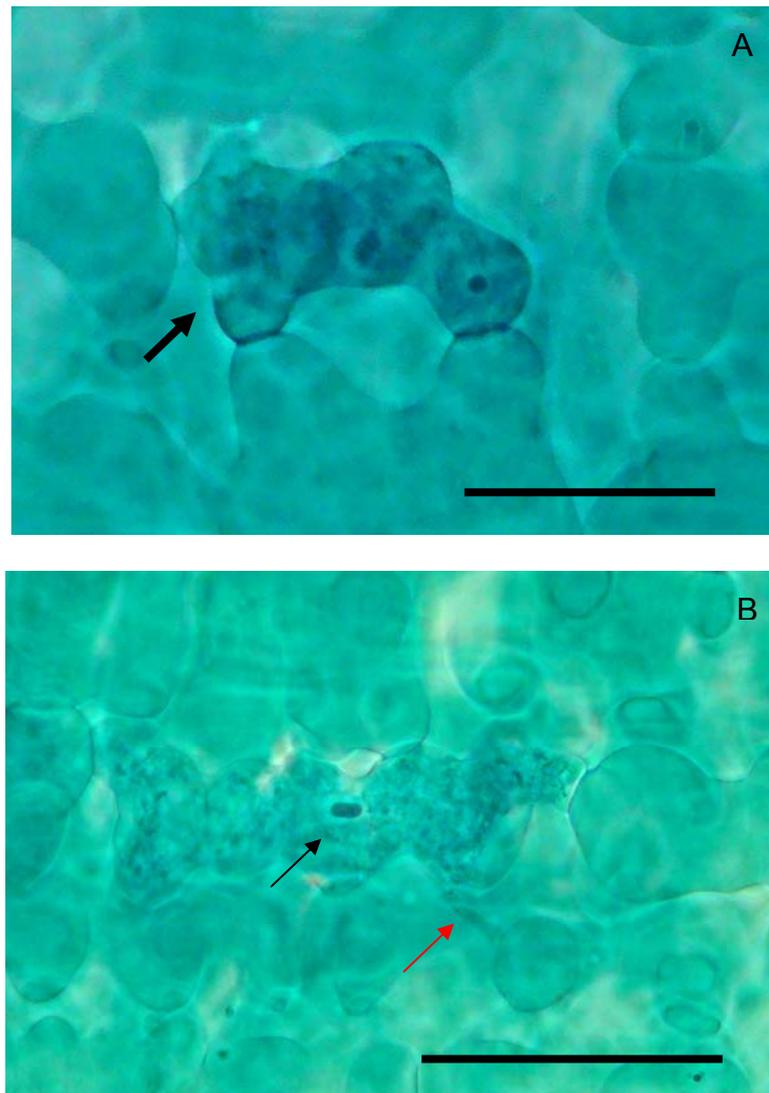


FIGURA 16. Célula do mesófilo do genótipo Pc68/5\*Starter apresentando morte celular em resposta a infecção por *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. A) Seta indica intensa coloração azul caracterizando morte celular; e B) Seta em preto indica célula com morte celular com um haustório no centro. Seta vermelha indica hifa do fungo. Amostras coradas com *trypan blue* avaliadas sob microscopia com contraste de fase. Barras indicam 50  $\mu$ m. Porto Alegre, RS. 2009.

A formação de tecido esporogênico foi observada pela formação de um adensamento do micélio e a identificação de células esporogênicas, uredósporos imaturos ou maduros. Todas estas estruturas foram formadas

no interior do hospedeiro, não ocorrendo a ruptura da epiderme com a exposição dos uredósporos. Os genótipos avaliados apresentaram diferentes proporções de formação de tecido esporogênico, somente o genótipo Pc68/5\*Starter não diferenciou este tipo de tecido (Tabela 5 e Apêndice 6). A comparação entre as proporções de colônias com tecido esporogênico indica que o genótipo 04B7107-2 apresenta a maior proporção de colônias com tecido esporogênico não diferindo estatisticamente de “UFRGS 17” e “URS 22”, por outro lado os genótipos URS 21, 04B7113-1 e 04B7119-2 apresentaram as menores proporções de colônias com tecido esporogênico, não diferindo entre si. A formação do tecido esporogênico também foi avaliada em outro experimento apresentando dados similares nos dois experimentos (Apêndice 11).

#### **4.5 Histolocalização de compostos fenólicos**

A produção de compostos fenólicos foi visualizada pela coloração azul-turquesa das células do mesófilo do hospedeiro em contato com hifas do patógeno, associada ou não com a desestruturação celular (Figura 17). Não foi observada a coloração em células da epiderme, com exceção das células-guarda dos estômatos. Estas, quando penetradas pelo patógeno, apresentavam coloração mais intensa que as demais. As estruturas do fungo não foram coradas por este corante, com exceção dos uredósporos que apresentaram cor azul. Todos os genótipos apresentaram algum grau de produção de compostos fenólicos em 48 e em 120 hai (Tabela 6). No entanto, os genótipos URS 21, 04B7119-2 e Pc68/5\*Starter apresentavam um maior número de colônias com a produção de compostos fenólicos.

TABELA 6. Produção de compostos fenólicos em diferentes genótipos de aveia em resposta à infecção de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* medida através diferentes métodos. Porto Alegre, RS. 2009.

Genótipo		o-toluidina	Weisner <sup>a</sup>	Maüle <sup>b</sup>
<b>URS 22</b>	48 hai	--+ <sup>c</sup>	-	-
	120 hai	--+	-	-
<b>URS 21</b>	48 hai	--+	-	-
	120 hai	+	-	-
<b>UFRGS 17</b>	48 hai	--+	-	-
	120 hai	--+	-	-
<b>URS Guapa</b>	48 hai	--+	-	-
	120 hai	--+	-	-
<b>Pc68/5*Starter</b>	48 hai	+	-	-
	120 hai	+	-	-
<b>04B7107-2</b>	48 hai	--+	-	-
	120 hai	--+	-	-
<b>04B7113-1</b>	48 hai	--+	-	-
	120 hai	--+	-	-
<b>04B7119-2</b>	48 hai	--+	-	-
	120 hai	+	-	-

<sup>a</sup>. Coloração com floroglucinol;

<sup>b</sup>. Coloração com cloro-sulfito; e

<sup>c</sup>. + e - indicam reação positiva ou negativa, respectivamente, -+ indica reação fraca, ou pouco freqüente.

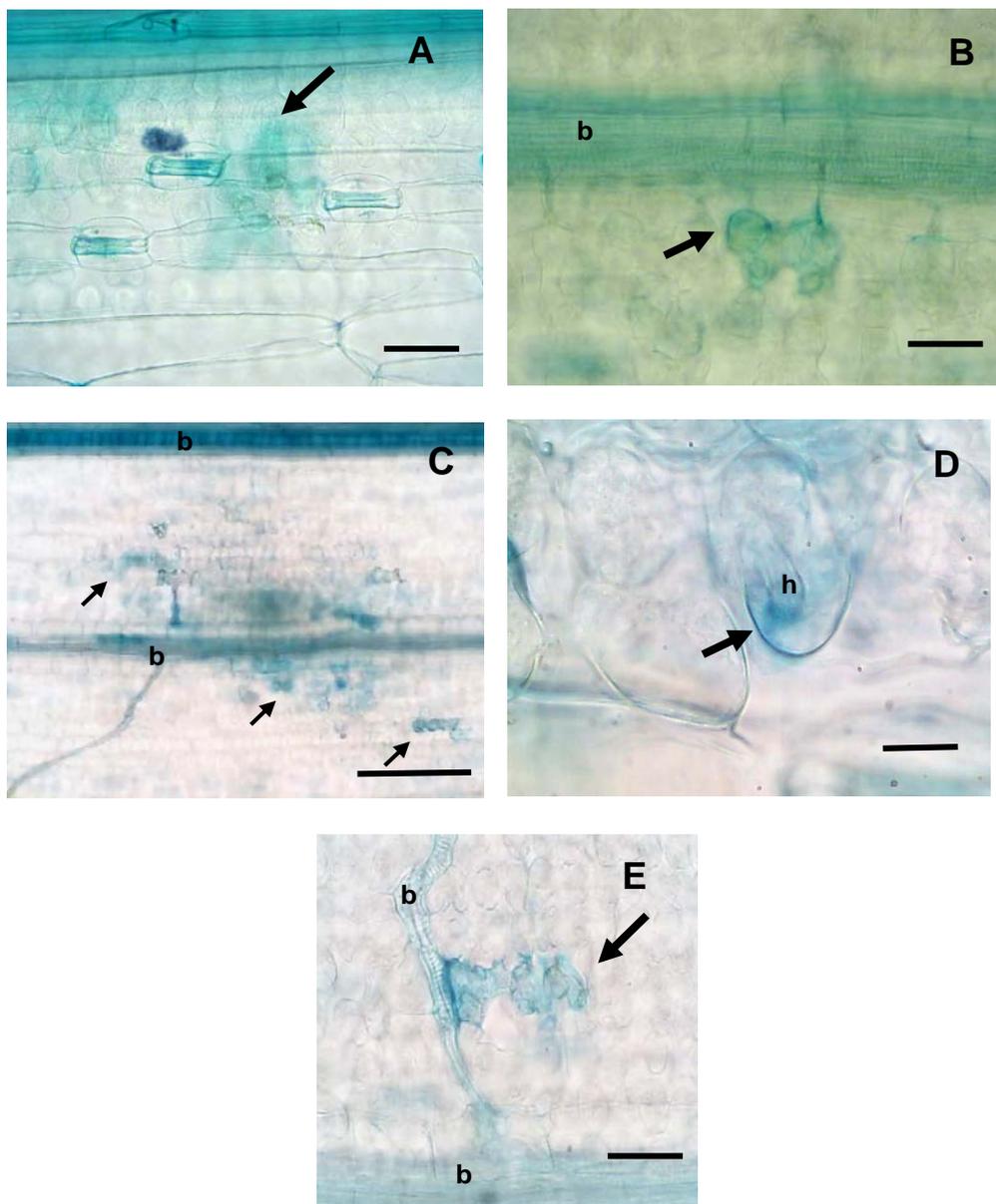


FIGURA 17. Localização de compostos fenólicos corados em azul com o-toluidina em células do mesófilo de aveia inoculados com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. A) Visualização da epiderme da folha do genótipo Pc68/5\*Starter 48 horas após a inoculação (hai) indicando células do mesófilo coradas em azul. Barra indica 40  $\mu\text{m}$ ; B) célula do mesófilo do genótipo Pc68/5\*Starter corada em azul avaliada em 120 hai. Barra indica 40  $\mu\text{m}$ ; C) Colônia na linhagem 04B7119-2 avaliada em 120 hai indicando vários pontos de acúmulo de compostos fenólicos em uma única colônia. Barra indica 200  $\mu\text{m}$ ; D) célula do mesofilo do genótipo 04B7119-2 avaliado em 120 hai com detalhe do acúmulo de composto fenólico na base de um haustório. Barra indica 10  $\mu\text{m}$ ; e E) célula do mesófilo do genótipo URS 21 avaliado em 120 hai com acúmulo de compostos fenólicos. Barra indica 20  $\mu\text{m}$ . (h) indica haustório; e (b) indica bainha do feixe vascular. Porto Alegre, RS. 2009.

A avaliação dos autofluorescentes apresentou resultados similares à coloração com o-toluidina para compostos fenólicos. Quando a avaliação foi realizada em 48 hai, somente um pequeno número de colônias apresentava células autofluorescentes, com exceção ao genótipo Pc68/5\*Starter onde cerca de 80% das colônias apresentavam esta característica (Figura 18, Apêndices 7, 8 e 10). A avaliação em 120 hai indicou que não houve acréscimo na proporção de colônias associadas com o acúmulo de compostos fenólicos nos genótipos URS 22 e 04B7113-1. Houve um pequeno acréscimo para os genótipos URS Guapa, UFRGS 17 e 04B7107-2 e um elevado aumento para os demais genótipos.

As células autofluorescentes foram visualizadas pela na cor amarelo-limão (Figura 19) independentemente de apresentarem desestruturação. De forma semelhante os feixes vasculares, tricomas e células-guarda apresentaram autofluorescência na mesma cor das células autofluorescentes do mesófilo. Os uredósporos de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* depositados sobre as folhas ou produzidos no interior do hospedeiro apresentaram-se autofluorescentes, porém com menor intensidade que as células do hospedeiro. Os tubos germinativos e apressórios foram fracamente fluorescentes.

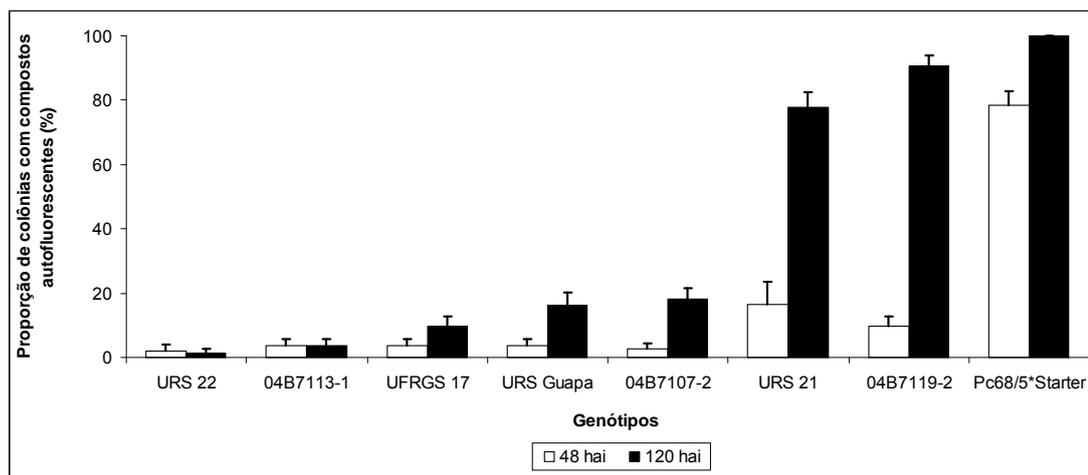


FIGURA 18. Proporção de colônias de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* sobre diferentes genótipos de aveia associadas com a presença de compostos autofluorescentes em células do hospedeiro. Barras de erros indicam erro padrão da proporção. hai – horas após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2009.

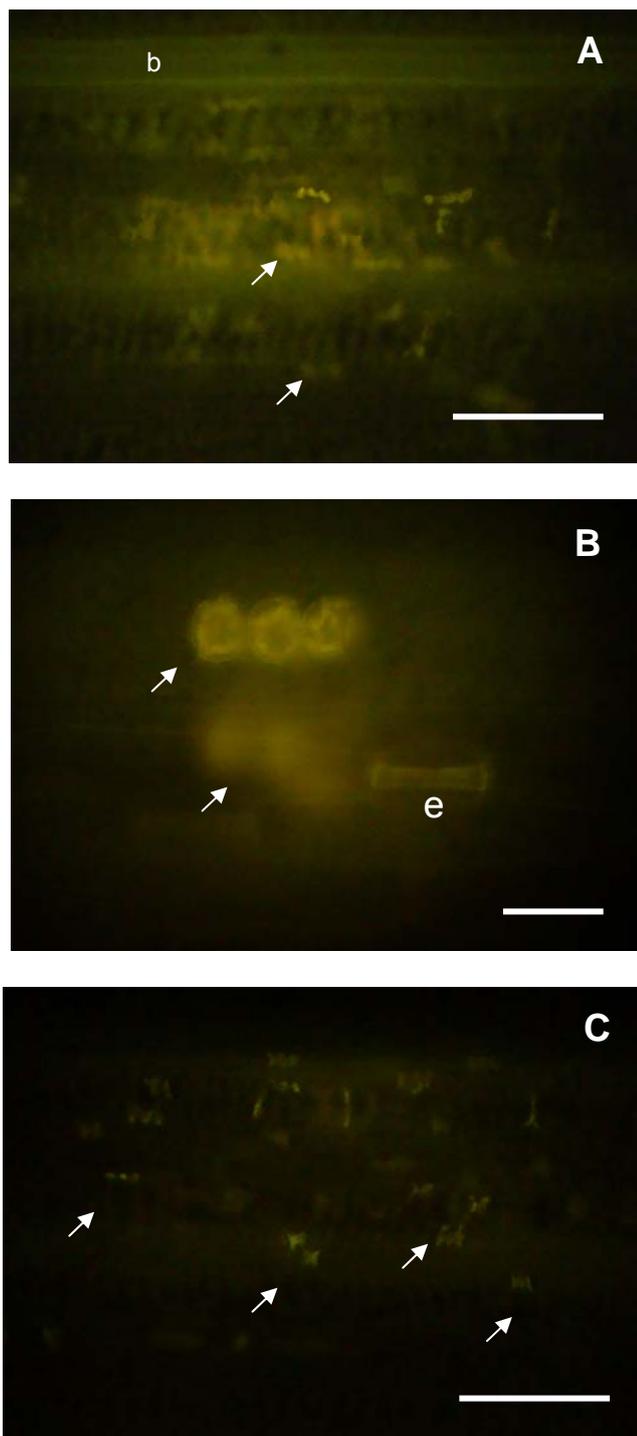


FIGURA 19. Localização de compostos autofluorescentes em genótipos de aveia inoculados com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* 120 horas após a inoculação. A) Mesófilo da linhagem 04B7119-2 com células do mesófilo autofluorescentes (setas). Barra indica 200  $\mu$ m; B) autofluorescência das células do mesófilo do genótipo Pc68/5\*Starter (setas). A letra e indica um estômato com autofluorescência por onde o patógeno penetrou para o interior da planta. Barra indica 40  $\mu$ m; e C) autofluorescência de células do mesófilo do genótipo URS 21 indicado pelas setas. Barra indica 200  $\mu$ m. Porto Alegre, RS. 2009.

A maior parte das colônias dos genótipos URS 21 e Pc68/5\*Starter não desenvolveram tecido esporogênico e acumularam compostos autofluorescentes (Figura 20). O acúmulo de compostos autofluorescentes nas colônias em 04B7110-2 ocorreu em colônias com ou sem tecido esporogênico, no entanto, um número maior de colônias desenvolveu tecido esporogênico associado ao acúmulo destes compostos. As colônias com tecido esporogênico nos genótipos URS Guapa, 04B7113-1 04B7107-2 UFRGS 17 e URS 22 não apresentavam o acúmulo de compostos autofluorescentes. Uma pequena proporção das colônias destes genótipos não apresentava tecido esporogênico, mas apresentava o acúmulo de compostos autofluorescentes. Cerca de um quarto das colônias do genótipo URS 22 não apresentou nem tecido esporogênico nem compostos autofluorescentes.

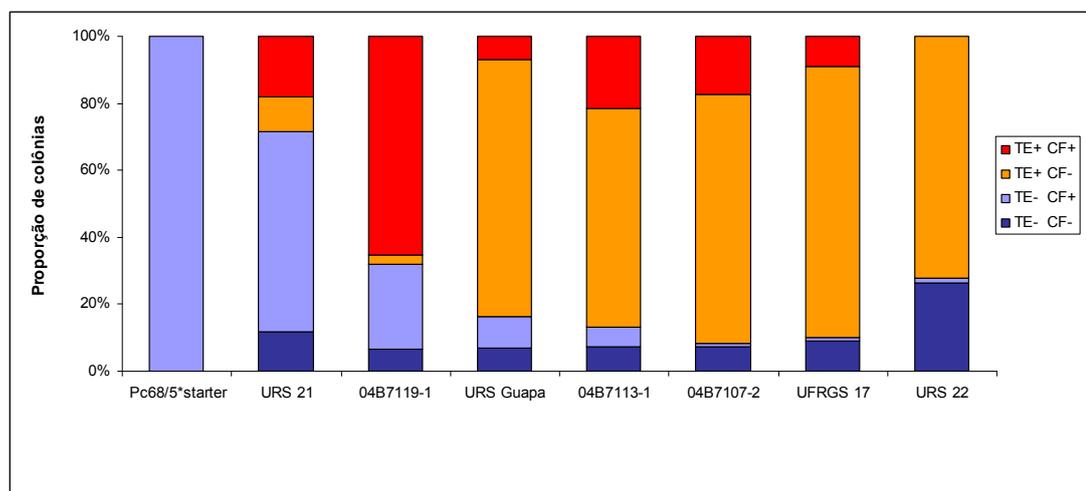


FIGURA 20. Proporção de colônias de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* sobre diferentes genótipos de aveia associadas com a presença de compostos autofluorescentes e produção de tecido esporogênico. TE = Tecido Esporogênico; CF= Colônias autofluorescentes; + e – significam respectivamente, presença ou ausência da característica. Porto Alegre, RS. 2009.

As amostras coradas através da reação de Weisner reagiram positivamente apresentando feixes vasculares corados intensamente de vermelho, porém as células-guarda e tricomas não apresentaram reação positiva com este reagente (Figuras 21 e 22). A reação de Maüle positiva foi visualizada pela coloração vermelha dos feixes vasculares, células-guarda dos estômatos e tricomas (Figuras 23 e 24). Estes dois métodos não identificaram a presença de compostos semelhantes à lignina nos sítios de infecção (Tabela 6). A avaliação das amostras antes de submissão aos corantes identificou células colapsadas sem a presença de tecido escurecido. As colônias dos genótipos URS 21, Pc68/5\*Starter 04B7113-1 e 04B7119-2 apresentaram células colapsadas com coloração amarela em ambas avaliações realizadas nas amostras coletadas 120 hai (Figuras 22 e 24), este tipo de reação não foi observado nos demais genótipos.

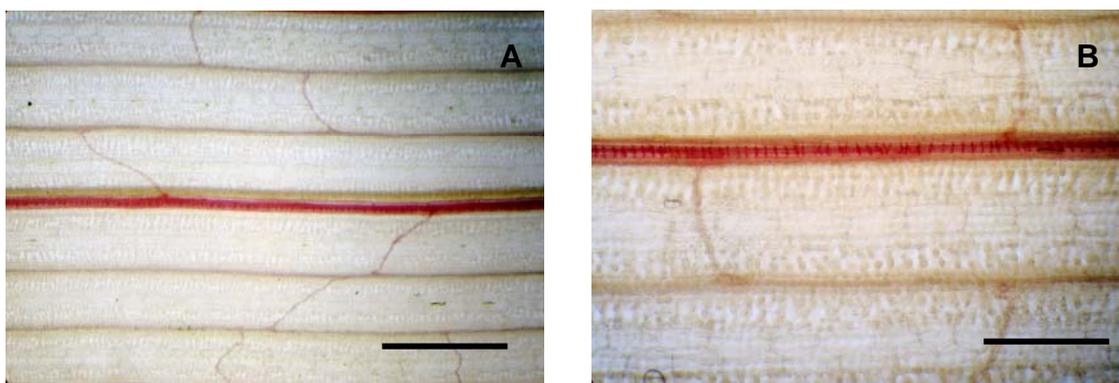


FIGURA 21. Coloração de compostos semelhantes a ligninas em genótipos de aveia inoculados com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. Coloração vermelha dos feixes vasculares contendo lignina na linhagem 04B7113-1 (A) e URS 22 (B), os sítios de infecção não reagiram positivamente à lignina. Amostras coletadas 48 horas após a inoculação e corados com floroglucinol. Barras indicam 400 e 100  $\mu$ m em A e B, respectivamente. Porto Alegre, RS. 2009.

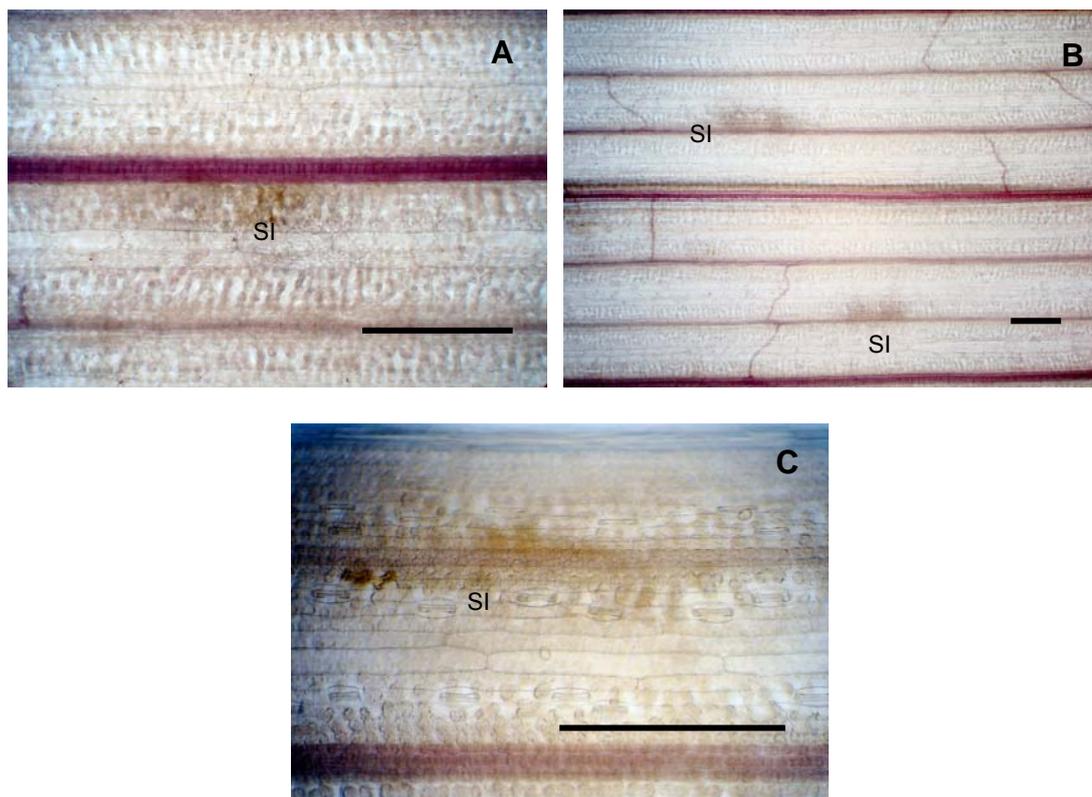


FIGURA 22. Coloração de compostos semelhantes a ligninas em genótipos de aveia inoculados com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. Coloração vermelha dos feixes vasculares contendo lignina na linhagem 04B7119-2 (A), e URS Guapa (B) e 04B7113-1 (C). Os sítios de infecção (si) não reagiram positivamente à lignina. Amostras coletadas 120 horas após a inoculação e corados com floroglucinol. Barras indicam 200 µm. Porto Alegre, RS. 2009.

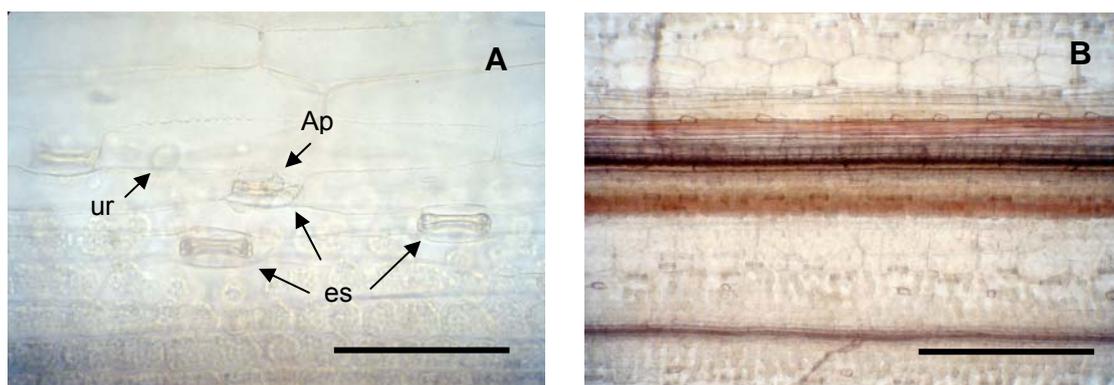


FIGURA 23. Coloração de compostos semelhantes a ligninas em genótipos de aveia inoculados com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. A) visualização de sitio de infecção no genótipo Pc68/5\*Starter com a presença de uredósporo (ur), apressório (ap) e estômatos (es); B) Visualização dos feixes vasculares do genótipo Pc68/5\*Starter com reação positiva a lignina exibindo coloração vermelha e marrom. Amostras coletadas 48 horas após a inoculação e corados com cloro-sulfito. Barras indicam 100 e 50 µm em A e B, respectivamente. Porto Alegre, RS. 2009.

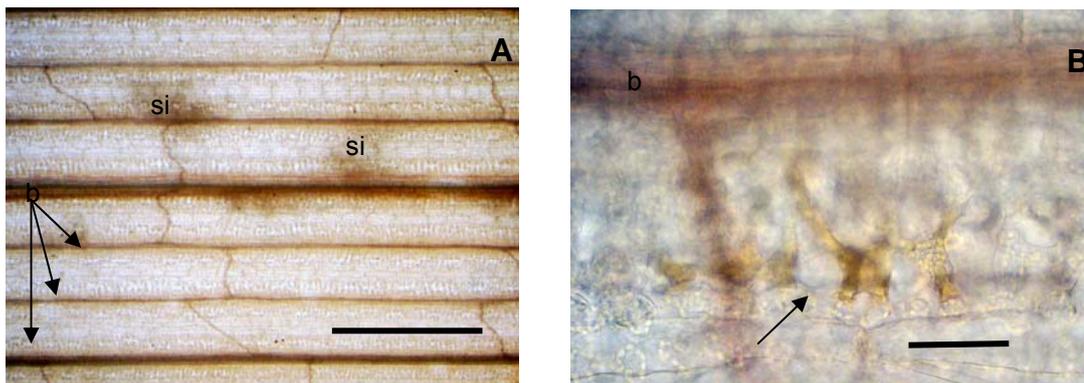


FIGURA 24. Coloração de compostos semelhantes a ligninas em genótipos de aveia inoculados com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. A) Sítios de infecção (si) com o desenvolvimento de colônias na linhagem 04B7113-1 e feixes vasculares (b). B) detalhe de células colapsadas do mesofilo (seta) em resposta a infecção pelo fungo e feixes vasculares. Apenas os feixes vasculares reagem positivamente à lignina apresentando coloração vermelha e marrom. Amostras coletadas 120 horas após a inoculação e coradas com cloro-sulfito. Barras indicam 400 e 20  $\mu\text{m}$  em A e B, respectivamente. Porto Alegre, RS. 2009.

Os coeficientes de correlação entre as variáveis estudadas em plântulas são apresentados na Tabela 7. Para o cálculo de cada coeficiente foram utilizados oito pares de dados, no entanto, quando os dados foram correlacionados com a densidade de pústulas, foram utilizados somente sete pares de dados, pois não se dispunha da densidade de pústulas desenvolvidas sobre a linhagem 04B7119-2. A área das colônias não foi significativamente correlacionada com nenhum dos componentes avaliados. A presença de morte celular foi correlacionada negativamente com a presença de tecido esporogênico ( $r_s = -0,762$ ) e com a densidade de pústulas desenvolvidas ( $r_s = -0,929$ ). A densidade de pústulas foi correlacionada positivamente com a presença de tecido esporogênico ( $r_s = 0,786$ ) e negativamente com a presença de compostos autofluorescentes em 120 hai ( $r_s = -0,883$ ). A produção de compostos autofluorescentes 48 hai não

esteve correlacionada com os componentes avaliados. Não foi realizada a análise de correlação entre os componentes da resistência com a ASCPD\*c em função das diferentes condições em que os dados foram obtidos.

TABELA 7. Correlações entre componentes histológicos e epidemiológicos da ferrugem da folha avaliados sobre plântulas de genótipos de aveia com diferentes níveis de resistência. Porto Alegre, RS. 2009.

Componentes da resistência	Morte celular	Tecido esporogênico	Compostos autofluorescentes (48 hai)	Compostos autofluorescentes (120 hai)	Densidade de pústulas
Área da colônia	- 0,143 <sup>a</sup> (0,7358) <sup>b</sup>	0,619 (0,1017)	- 0,512 (0,1942)	- 0,407 (0,3167)	0,357 (0,4316)
Morte Celular		<b>- 0,762</b> (0,0283)	0,415 (0,3069)	<b>0,754</b> (0,0305)	<b>- 0,929</b> (0,0025)
Tecido esporogênico			- 0,610 (0,1084)	- 0,611 (0,1077)	<b>0,786</b> (0,0362)
Compostos autofluorescentes (48 hai)				0,282 (0,4982)	- 0,704 (0,0774)
Compostos autofluorescentes (120 hai)					<b>- 0,883</b> (0,0085)

<sup>a</sup>. Coeficientes de correlação de Spearman;

<sup>b</sup>. Valores indicados entre parênteses correspondem à probabilidade de  $p = 0$ ;

## 5 DISCUSSÃO

As plantas estão constantemente em contato com microrganismos potencialmente patogênicos, mas nem sempre a doença é o resultado desta interação. A resistência aos patógenos é devida a uma combinação de barreiras químicas, físicas, pré-formadas ou induzidas pela infecção quando a planta reconhece o patógeno. Quando isso não ocorre o resultado é o desenvolvimento da doença. As respostas que o hospedeiro desenvolve em relação ao patógeno são denominadas de mecanismos de resistência. Estes mecanismos podem atuar sobre diferentes eventos infecção, colonização ou reprodução do patógeno, resultando em uma menor proporção de tecido doente.

As avaliações durante três anos permitiram discriminar os genótipos quanto à reação à ferrugem da folha. As cultivares URS 22 e UFRGS 17 foram consideradas suscetíveis nos três anos, da mesma forma que a cultivar URS Guapa no ano em que foi avaliada. Os demais genótipos foram considerados resistentes nos três anos de avaliação. Esta afirmação está baseada na baixa ASCPD\*c que estes genótipos apresentaram. Os valores de ASCPD\*c para os genótipos suscetíveis foram semelhantes nos três anos, no entanto, em 2007 algumas linhagens apresentaram ASCPD\*c maiores. Alguns genótipos apresentavam grandes diferenças nas avaliações

de severidade. Isso pode ter contribuído para um maior coeficiente de variação nas análises do ano de 2007 (Tabela 1). Essa variação pode representar uma superação da resistência destes genótipos, mas, mesmo assim, a intensidade da doença foi baixa. A herança da resistência em duas das linhagens avaliadas neste trabalho foi determinada por Santos (2009). Segundo o autor, a linhagem 04B7119-2 apresenta 9 *loci* controlando a resistência, enquanto apenas 3 *loci* para a linhagem 04B7107-2. O autor sugere a superação da resistência em pelo menos um locus durante o ano de 2007. Este fato sugere que mesmo resistências com heranças complexas podem ser superadas em intervalos de tempo curto. Apesar de já haver sido relatada a superação da resistência conferida pelo gene *Pc68* (Martinelli, 1998; Sthuthmann, D. 2005, comunicação pessoal; Graichen, 2006) o genótipo *Pc68/5\*Starter* foi considerado resistente nos três anos, apresentando pústulas somente em plantas adultas no final do ciclo da cultura.

No ano de 2006 foram observadas as presenças de pústulas não esporulantes em algumas linhagens (Tabela 1), porém as mesmas reações não foram observadas no ano de 2007. Isso pode ser explicado por mudança na frequência das raças predominantes. As pústulas formadas foram circundadas por halos, embora foram também observadas pústulas sem halos em alguns casos. A presença de halo circundando as pústulas tem sido interpretada como indício de resistência às ferrugens. No entanto, neste trabalho não se pode relacionar a presença de halos com o nível de resistência. A falha na tentativa de relacionar o nível de resistência a campo com o tipo de infecção produzido, presença de pontos necróticos, pústula

abortada e halos pode ser devido à grande variabilidade do patógeno, de forma que diferentes raças do patógeno podem desencadear diferenças nos sintomas apresentadas. Em um mesmo genótipo pôde-se observar a associação de halos e pústulas abortadas com tipo de infecção característico de suscetibilidade, ou ainda a ausência destes fatores associados com alto nível de resistência na linhagem Pc68/5\*Starter (Tabelas 1 e 3).

O período latente é considerado um componente de resistência parcial muito importante para ferrugem da folha do trigo e da cevada. Diferenças no período latente em plântulas entre linhagens com resistência parcial e suscetível variaram entre 3,7 e 7,8 dias para ferrugem da cevada (Parlevliet, 1975; Parlevliet *et al.*, 1985), 1,5 a 4,6 dias para ferrugem da folha do trigo (Ohm & Shaner, 1976) e 0,4 a 1,7 dias para ferrugem da folha da aveia (Chaves *et al.* 2004b). O período latente avaliado em plântulas neste trabalho assemelha-se àqueles encontrados por Chaves *et al.* (2004b) e Wesp *et al.* (2005). A pequena variação do período latente entre os genótipos resistentes e suscetíveis permite afirmar que o período latente não apresenta efeito sobre a resistência nestes genótipos, ao menos no estágio de plântula (Tabela 8). Da mesma forma, Chaves *et al.* 2004 não encontraram correlação entre o nível de resistência e o período latente. Em cevada foi observado que as linhagens que apresentavam resistência parcial também apresentavam menor taxa de formação de haustórios. Em consequência disso havia um maior abortamento precoce da infecção, e também um desenvolvimento lento das unidades de infecção que obtinham sucesso. Esse crescimento lento resulta em um período latente maior (Luke

*et al.*, 1984; Niks, 1983; Niks, 1986, Hoogkmap, 1998). Assim, a semelhança na duração do período de latência entre as linhagens avaliadas e os genótipos suscetíveis URS 22, e UFRGS 7 e UFRGS 17 indica que mecanismos de resistência pré-haustoriais podem estar ausentes e a velocidade do desenvolvimento do fungo no interior da planta não é alterado. O genótipo Pc68/5\*Starter é exceção a esta observação, pois neste genótipo não pôde ser determinado o período latente pela ausência do desenvolvimento de pústulas. Em trigo o gene *Lr16* apresenta um tipo de infecção baixo com pequenas lesões associadas com necrose. Nos genótipos portadores deste gene o período de latência é maior (Tormelin *et al.*, 1983).

A densidade de lesões apresenta efeito sobre o tamanho das lesões desenvolvidas e produção de uredósporos por lesão, mas não sobre o período latente (Rimé *et al.* 2005). Em trigo, Martinez *et al.* 2001 não encontraram diferenças significativas na densidade de pústulas entre genótipos suscetíveis e linhagens quase isogênicas com os genes *Lr34* e *Lr46* em estágio de plântula e nem mesmo em estágio de planta adulta. No entanto, estas linhagens apresentavam maior período de latência e maior proporção de unidades de infecção com abortamento precoce. A relação que os autores fazem é que nestas linhagens e na linhagem Akabozu, com resistência parcial, a menor quantidade da doença está relacionada com o abortamento precoce e o maior período de latência. As diferenças na densidade de pústulas apresentadas pelos genótipos refletem os mecanismos de resistência apresentados por estes. A maior densidade nos genótipos URS 22, URS Guapa, UFRGS 7 (Tabela 2) pode revelar a

inabilidade de barrar o desenvolvimento do fungo. A pequena produção de pústulas na cultivar URS 21 mostra que a planta exibe resistência mesmo em plântula.

A avaliação dos processos infectivos mostrou que estes não foram paralisados ou reduzidos. Os genótipos apresentaram taxas semelhantes para germinação dos uredósporos, diferenciação de apressórios, vesículas subestomatais, hifas infectivas, células mãe de haustório e haustórios durante as primeiras 30 horas de infecção (Figuras 6 a 15), de forma que os genótipos resistentes e suscetíveis não puderam ser agrupados em classes distintas (Tabela 8). Em eventos posteriores, não houve diferença estatística na área das colônias estabelecidas, apenas o genótipo Pc68/5\*Starter apresentou o desenvolvimento interrompido e, como consequência, apresentou colônias como menor área (Tabela 5). O genótipo suscetível URS Guapa apresentou tipo de infecção (3), alta densidade de pústulas desenvolvidas e um dos menores tamanhos de colônia, sendo inferior à cultivar URS 21, a qual é altamente resistente com tipo de infecção (TI = 2), e à linhagem 04B7119-2 (TI = 2+N). Estes dados indicam claramente que os mecanismos de resistência apresentados pelos genótipos resistentes não impedem o desenvolvimento da colônia, e sim atuam posteriormente, impedindo ou limitando o desenvolvimento da pústula. Jacobs & Buurlag (1990) relatam que a resistência parcial em trigo à ferrugem da folha não é causada por algum mecanismo que impeça a infecção, mas sim pela redução na taxa de desenvolvimento das colônias, sendo que para genótipos parcialmente resistentes esta taxa é reduzida, gerando colônias com tamanho menor que em genótipos suscetíveis. Ainda de acordo com

estes autores, este tamanho reduzido da colônia é relacionado com um número menor de células mãe do haustório, e um menor tamanho de hifa infectiva (Kooplers & Pretorius, 1997). Com base nestas afirmações, assume-se que o desenvolvimento do fungo no interior dos genótipos analisados neste trabalho é muito similar, não havendo assim um mecanismo que impeça o desenvolvimento do fungo antes que 120 hai. O menor tamanho de colônias e pústulas, refletidos pelos TI = 1 ou 2 nos genótipos resistentes, sugerem ser consequência de eventos gerados posteriormente a esse horário. A ocorrência de eventos tardios que conduzem à resistência é relatada em trigo para a ferrugem da folha (Ashagari & Rowell, 1980; Bender *et al.*, 2000) e ferrugem do colmo (Kooplers & Pretorius, 1997).

O tamanho das colônias tem sido relatado como altamente correlacionado com o tamanho da pústula desenvolvida, tanto para genótipos resistentes quanto para genótipos suscetíveis, havendo uma relação constante entre as duas medidas, sendo que genótipos resistentes apresentam pústulas menores (Ashagari & Rowell, 1980; Jacobs & Buurlage, 1990). Estas afirmações são válidas principalmente para trigo e suas ferrugens. Em aveia o tamanho da pústula não está relacionado com o nível de resistência do hospedeiro (Chaves *et al.*, 2004c; Wesp *et al.* 2008) e tampouco com o tamanho da colônia, como sugerido pelos dados apresentados neste trabalho (Tabela 7 e 8).

Apesar de não haver diferença estatística no tamanho das colônias desenvolvidas, a proporção destas colônias que estavam associadas com tecido esporogênico diferenciou os genótipos resistentes dos suscetíveis

(Tabela 5 e 8). Os genótipos mais resistentes apresentaram uma reduzida proporção de colônias com tecido esporogênico. A menor proporção de colônias com estas características pode ocorrer pela inibição da produção destas estruturas ou pelo atraso no desenvolvimento das colônias, que futuramente podem desenvolver estas estruturas e formar a pústula (Silleros & Rubiales, 2002). A elevada presença de tecido esporogênico em 120 hai não necessariamente indica que este genótipo desenvolverá uma alta densidade de pústulas. Após a formação deste tecido podem ocorrer outros eventos que impeçam a produção dos uredósporos e a ruptura da pústula. Da mesma forma, o inverso também é verdadeiro. Em genótipos suscetíveis, pústulas secundárias podem ser formadas ao redor de uma pústula principal, (Diaz-Lago *et al.* 2003). Estas pústulas podem contribuir para o aumento da doença em condições de ambiente favoráveis, superestimando a eficiência de infecção. No trabalho realizado não foram identificadas pústulas secundárias, indicando que a taxa de infecção está relacionada com a densidade de pústulas desenvolvidas.

Os genótipos resistentes apresentaram uma reduzida proporção de colônias com a presença de tecido esporogênico quando avaliados em 120 hai, associados com uma baixa densidade de pústulas desenvolvidas e à alta proporção de colônias com morte celular (Tabela 2, 4, 5, 7 e 8 e Figura 20). Estes dados demonstram claramente que o desenvolvimento do fungo é paralisado tardiamente, com inibição da reprodução do fungo, sem impedir, contudo, a formação de tecido esporogênico. De acordo com a classificação dos tipos de resistência realizado por Niks & Kiepers (1983) (Apêndice 2) a resistência nestes genótipos é designado como abortamento tardio das

colônias.

A ocorrência de morte celular ocorre durante muitas interações entre plantas e patógenos, podendo estar associada tanto com a resistência quanto a suscetibilidade à doença, dependendo do estilo de vida do patógeno. As respostas da planta envolvendo morte celular podem ser agrupadas em três tipos: a) morte celular em respostas ao produto dos genes de avirulência do patógeno, ocorrendo freqüentemente durante os processos iniciais de infecção e colonização do hospedeiro (caracteristicamente como reação de hipersensibilidade); b) morte celular em resposta a toxinas do patógeno; e c) morte celular devido a dano fatal durante a infecção, principalmente devido a ferimentos, déficit de nutriente ou mau funcionamento do metabolismo celular (Yao *et al.* 2002). A maior parte das colônias dos genótipos resistentes avaliados neste trabalho esteve associada com a ocorrência de morte celular no tecido do hospedeiro (Tabela 5 e 8). Este tipo de reação ocorreu em células circundantes à cavidade subestomatal que desenvolveram as estruturas do fungo no genótipo Pc68/5\*Starter, com desenvolvimento de colônias reduzido e limitado a esta região. Este tipo reação é característico da resistência através da hipersensibilidade conferida por genes de grande efeito (Heath, 1981, 1982; Niks & Dekens, 1991; Lin *et al.*, 1998). A morte celular nos genótipos URS 21, 04B7113-1 e 04B7119-2 apresentou um modelo diferente do apresentado pelo genótipo Pc68/5\*Starter, onde as células mortas estavam dispersas pela área da colônia. O maior desenvolvimento da colônia nestes genótipos, indica que a morte celular ocorreu mais tardiamente em relação ao genótipo Pc68/5\*Starter.

Uma das conseqüências da morte celular é sua habilidade em barrar a colonização do patógeno, matando o fungo durante este processo (Bushnell, 1982; Richael & Gilchrist, 1999), contudo, em muitos casos, as hifas dos fungos demonstram ser viáveis por vários dias após a ocorrência da morte celular, com a possibilidade de restabelecimento de uma relação de compatibilidade se o desenvolvimento normal do fungo for retomado (Sharp & Emge, 1958; Zimmer & Schafer, 1961; Shimony & Friend, 1975; Bushnell, 1982). Quando a morte celular ocorre nos estádios iniciais do desenvolvimento fúngico, ocorre a paralisação completa do fungo levando-o a morte, este tipo de situação é observado nos genótipos altamente resistentes. Em genótipos possuidores de resistência intermediária, em que a morte celular ocorre relativamente tarde, em estádios avançados da infecção, o fungo não é morto rapidamente e pode continuar crescendo lentamente. Em algumas interações entre plantas com resistência intermediária e fungos causadores de ferrugens ou oídios o fungo continua a crescer apesar da ocorrência da morte celular, nestes casos somente crescimento do fungo é apenas limitado, não cessando totalmente, então não pode ser considerada como uma reação de hipersensibilidade *stricto sensu* (Bushnell, 1982; Richael & Gilchrist, 1999; Barrilli *et al.*, 2009). A ocorrência da morte celular tardiamente (120 hai) em grupos de células dispersas pelas colônias nos genótipos URS 21, 04B7113-1 e 04B7119-1 pode indicar a ocorrência de um mecanismo de resistência distinto e anterior à morte celular (hipersensibilidade). Durante o estabelecimento da relação de compatibilidade os fungos causadores das ferrugens e oídios produzem uma série de elicitores que atuam modificando o metabolismo da planta

inibindo as respostas de resistência, incluindo inibidores da morte celular (Gregersen *et al.*, 1997; Moerschbacher *et al.*, 1999; Deuschle *et al.*, 2001; Schulze-Lefert & Panstruga, 2003). A ocorrência da morte do patógeno por outro mecanismo de resistência após o patógeno estar estabelecido pode levar a restrição da produção dos elicitores que mantém a relação de compatibilidade pelo patógeno, conduzindo a morte celular no hospedeiro devido aos danos celulares ocasionados durante a penetração e desenvolvimento das estruturas do patógeno no interior da célula do hospedeiro. De maneira semelhante Silva *et al.* (2002) relataram o acúmulo de compostos semelhantes a pectinas contendo compostos fenólicos entre 5 e 7 dias após a inoculação em genótipos resistentes a ferrugem em café, concomitante a este acúmulo ocorre também a morte das células do fungo e, após isto, ocorre a morte das células do hospedeiro.

Compostos autofluorescentes são freqüentemente acumulados em resposta à invasão por fungos. A natureza desta fluorescência é atribuída à presença de substâncias fenólicas (Mayama & Shishiyama, 1978; Koga *et al.*, 1988, 1990; Carver *et al.*, 1991, 1992, 1994; Zeyen *et al.*, 1995). Stadnik & Buchenauer (1999) sugerem duas categorias de repostas autofluorescentes ao acúmulo de compostos fenólicos: o primeiro tipo constitui-se do acúmulo destes compostos nas paredes das células da epiderme, e uma segunda resposta onde as células da epiderme morrem em consequência da reação de hipersensibilidade, acumulando compostos fenólicos em seu interior e toda a célula torna-se autofluorescente (Mayama *et al.* 1982; Southerton & Deverall, 1990; Tiburzy & Reisener, 1990). Esta resposta é reduzida em aveia quando são inibidas enzimas chaves na

síntese de compostos fenólicos. Associada a isto, também é reduzido o nível de resistência à *Blumeria graminis* f. sp. *avenae* (Carver *et al.*, 1991, 1994). Este tipo de reação parece ser um evento comum em resposta a uma série de patógenos em aveia (Tada *et al.*, 2005, Mayama *et al.*, 1982). Dentre os compostos fenólicos acumulados em aveia destacam-se ácido diferúlico (Ikegawa *et al.*, 1996) e avenantramidas (Mayama *et al.*, 1982). Mayama & Tani (1982) relatam que as células do mesófilo que acumularam avenantramidas apresentavam autofluorescência amarelo-limão com máxima autofluorescência de 500 nm, semelhante ao utilizado neste trabalho. No entanto, não se pode afirmar que os compostos autofluorescentes acumulados pelos genótipos aqui estudados sejam verdadeiramente avenantramidas. Yang *et al.* (2004) constataram o acúmulo de mRNA de enzimas envolvidas na síntese de avenantramidas em repostas à *P. coronata* f. sp. *avenae*, tanto em interações compatíveis quanto incompatíveis, porém mais rapidamente nas compatíveis. Contudo, o acúmulo de avenantramidas ocorre somente em interações incompatíveis. Estes dados sugerem que em genótipos suscetíveis as avenantramidas podem não serem sintetizadas ou são degradadas após serem sintetizadas. Uma vez que as células de aveia permanecem vivas até os estádios finais da colonização em genótipos suscetíveis (Yao *et al.*, 2002), as avenantramidas podem ser degradadas simultaneamente como uma resposta metabólica, envolvendo peroxidases para remover compostos tóxicos gerados durante a patogênese (Okazaki *et al.*, 2004). Por outro lado, nas interações incompatíveis (resistentes), quando ocorre a morte celular em estádios iniciais da infecção, as avenantramidas podem não ser

metabolizadas, e por isso se acumulam nas células mortas (Mayama *et al.* 2001; Tada *et al.* 2001; Yang *et al.*, 2004).

A morte celular apresentada pelos genótipos esteve relacionada com o acúmulo de compostos fenólicos por se mostrarem autofluorescentes e por terem sido corados com *o*-toluidina (Tabela 6 e 7, Figura 15). Segundo Mayama *et al.* (1982), o acúmulo de avenantramidas em genótipos altamente resistentes a *P.c. f. sp. avenae* (TI= 0) ocorreu entre 24 e 48 hai, sendo que o atraso no acúmulo destas substâncias reduziu o nível de resistência dos genótipos. Os genótipos resistentes avaliados neste trabalho apresentaram um modelo semelhante ao proposto, com alta proporção de colônias com compostos fenólicos associados com morte celular. A detecção precoce destes compostos no genótipo Pc68/5\*Starter em 48 hai está relacionada com o desenvolvimento de TI= 0 e um pequeno tamanho de colônia. Por outro lado, o acúmulo posterior dos mesmos nos genótipos URS 21 e 04B7119-2, teve como consequência um maior desenvolvimento inicial das colônias e produção de um tipo de infecção diferente, maior do que o tipo TI=0 (Tabela 4).

A linhagem 04B7113-1 apresentou alta proporção de colônias com morte celular e baixa densidade de pústulas desenvolvidas. No entanto, a proporção de colônias com acúmulo de compostos autofluorescentes foi semelhante aos genótipos suscetíveis (Figura 15). No ensaio em que foi avaliada a presença destes compostos, este genótipo apresentou TI= (3) (Tabela 4) e uma maior proporção de colônias com tecido esporogênico (Tabela 5 e Apêndice 11) com uma baixa proporção de colônias autofluorescentes ou coradas com *o*-toluidina (Tabela 7 e Figura 15).

Segundo Mayama *et al.* (1982), o acúmulo de compostos fenólicos é reduzido sob condições de temperaturas elevadas (30°C), permitindo com que o desenvolvimento fúngico ocorra normalmente. Segundo Bonnett *et al.* (2002), a sensibilidade à temperatura é um fenômeno dependente da interação raça do patógeno com genótipo do hospedeiro, sendo específica para algumas interações envolvendo principalmente os genes *Pc39* e *Pc67*. Infelizmente não se dispõem de registros detalhados da temperatura em que este experimento foi conduzido, e se fato houve alteração deste fator, também eram esperadas efeitos sobre os demais genótipos. Deve-se salientar que durante a condução deste experimento, três dias após a inoculação e por um período de 9 dias que seguiram, houve uma variação não controlada da temperatura na câmara de incubação, aumentando-a para aproximadamente 26°C, o que resultou aparentemente em um maior tamanho de colônias (dados não mensurados) e maior proporção destas com tecido esporogênico (Apêndice 11). Ainda segundo Mayama *et al.* (1982), o acúmulo de avenantramidas em genótipos com níveis moderados de resistência (TI= 1 e 2) ocorre entre 72 e 96 hai e pode ser reduzido com a ocorrência de temperaturas elevadas (30 °C). Os dados sobre o mecanismo de resistência apresentado por este genótipo não são conclusivos. Não se descarta, contudo, a possibilidade de que a elevação da temperatura tenha alterado as respostas à ferrugem neste genótipo, embora não tenham sido alterados para os demais.

Em cereais, a lignificação induzida tem sido apresentada como um mecanismo de resistência importante para várias doenças, incluindo-se neste grupo as ferrugens (Beardmore *et al.* 1983; Moerschbacher *et al.*,

1990; Tiburzy & Reisener, 1990; Moldenhauer *et al.*, 2006). Os compostos semelhantes à ligninas podem ser depositados junto à papilas tornando-as mais resistentes à penetração fúngica (Moerschbacher & Mendgen, 2000) e podem acumular-se na morte das células envolvidas na reação de hipersensibilidade (Moerschbacher *et al.*, 1990). Em trigo, genótipos possuidores dos genes *Sr5* e *Sr6* respondem hipersensitivamente à penetração por *P. graminis* f. sp. *tritici* com acúmulo de compostos possuidores de espectro semelhante aos apresentados pelas células fluorescentes de aveia (Tiburzy & Reisener, 1990). Essas células também apresentavam reação positiva às reações de Weisner e Mauler, indicando a presença de unidades de siringilpropanas e grupos coniferaldeídos, respectivamente. Os compostos fenólicos produzidos pelos genótipos analisados, não reagem positivamente a estas reações não sendo, portanto, precursores ou semelhantes à ligninas. A identificação de compostos fenólicos através de *o*-toluidina e autofluorescência com a reação negativa aos reagentes para ligninas, permite afirmar que a lignificação não ocorre como mecanismo de resistência nos genótipos avaliados Estes dados estão de acordo com os apresentados por Yamamoto *et al.* (1977) e Ikegawa *et al.* (1996) para a ferrugem da folha da aveia e Southerton & Deveral (1990) para a ferrugem do colmo do trigo.

Nos genótipos avaliados, a proporção de colônias com morte celular parece estar associada com o acúmulo de compostos autofluorescentes e compostos fenólicos (Tabela 7). Esta resposta ocorre antecipadamente no genótipo Pc68/5\*Starter (48 hai) e tardiamente nos genótipos URS 21 e 04B7119-1, detectados em níveis baixos em 48 hai. Esta associação

também foi verificada por Southerton & Deverall (1990), onde genótipos de trigo apresentavam aumento de compostos fenólicos 4 horas após a HR.

A formação de papilas é um dos mecanismos de resistência mais conhecidos, principalmente nas interações envolvendo oídios e cereais. Em relação às ferrugens, a formação de papilas contendo principalmente calose aumenta a resistência à penetração aos fungos (Niks, 1986, Tiburzy & Reisner, 1990). Além disto, a redução no desenvolvimento das colônias é atribuída à formação de aposições na parede celular (Niks, 1986). A rara ocorrência da formação de papilas nas colônias observadas descarta a possibilidade de papilas atuarem como mecanismo de resistência nos genótipos avaliados.

A linhagem 04B7107-2 foi resistente quando avaliada no campo durante os três anos. No entanto, apresentou uma densidade de pústulas semelhante aos genótipos suscetíveis, a maior proporção de colônias com tecido esporogênico e com uma pequena proporção de colônias com morte celular. Estes dados mostram que o mecanismo de resistência deste genótipo pode ser desencadeado após formação das pústulas ou não serem expressos nas plântulas. Nas avaliações no campo, esta linhagem apresentou ASCPD\*c reduzida, embora se pôde observar um aumento na da intensidade da doença no decorrer dos três anos de avaliação, com alta variação na severidade entre as parcelas. Este fato sugere que sua resistência tenha sido superada pelo surgimento de nova raça, a qual pode ainda estar em baixa freqüência.

TABELA 8. Distinção entre as variáveis epidemiológicas e histológicas avaliadas neste trabalho quanto à capacidade em distinguir os genótipos resistentes dos suscetíveis. Porto Alegre, RS. 2009.

<b>Diferenciou os genótipos resistentes dos suscetíveis</b>	<b>Não diferenciou os genótipos resistentes dos suscetíveis</b>
ASCPD*c;	Período latente;
Tipo de infecção;	Porcentagem de pontuações necróticas;
Proporção de colônias com tecido esporogênico (120 hai);	Presença de pústulas mortas;
Densidade de pústulas;	Presença de pústulas associadas a halos;
Morte celular;	Proporção de germinação dos uredósporos;
Pc68/5*Starter morte celular nas células circundantes ao estômato;	Diferenciação de apressório;
URS 21 e linhagens resistentes: a morte celular ocorre tardiamente em células dispersas em toda a área da colônia;	Vesículas subestomáticas;
Acúmulo de compostos fenólicos e autofluorescentes.	Hifas infectivas;
	Células mãe do haustório;
	Haustório;
	Área da colônia (com exceção do genótipo Pc68/5*Starter);
	Lignificação;
	Aposição de calose na parede celular.

Uma das maiores dificuldades enfrentada pelos melhoristas em aveia é a obtenção de cultivares com resistência durável á ferrugem da folha. Tradicionalmente, as novas cultivares têm sua resistência superada pelo patógeno em um intervalo de um ou dois anos após seu lançamento. Dentre os mecanismos de resistência, a reação de hipersensibilidade é apresentada como o mecanismo com menor potencial de durabilidade. Segundo Johnson

(1984), a resistência durável é aquela que permanece efetiva em uma variedade cultivada por um longo período de tempo em um ambiente favorável à doença. Nos últimos anos, cerca de 40% da área cultivada com aveia no Brasil foi semeada com a cultivar URS 21 (L. C. Federizzi – comunicação pessoal), sendo que esta cultivar apresenta-se altamente resistente desde seu lançamento no ano de 2001, apesar de já terem sido relatadas raças virulentas à esta cultivar (Vieira *et al.*, 2006b). URS 21 preenche plenamente os requisitos para ser classificada como uma cultivar com resistência durável *sensu* Johsonn (1984), por apresentar um comportamento estável frente ao patógeno, com pequenas quantidades de doença, particularmente na fase inicial de desenvolvimento das plantas, independente do ambiente variável entre anos. No entanto, paradoxalmente o mecanismo de resistência desta cultivar esta associada à morte celular. Isso indica que este mecanismo por si só não é suficiente para prever a durabilidade de uma determinada resistência. Deve-se, outrossim, considerar outros fatores envolvidos na sinalização e expressão do mecanismo. Por exemplo, o momento em que ocorre a morte celular e o acúmulo de compostos fenólicos, são sugeridos pelas descobertas deste trabalho possuir um papel determinante na inespecificidade e na durabilidade da resistência conferida a um genótipo de aveia. Assim, temos que a morte celular em “URS 21” ocorre em 120 hai, o que é considerado um tempo longo, ao contrário dos genes qualitativos, de grande efeito, cuja morte celular ocorre em torno de 30 horas após a infecção e cuja resistência tem se mostrado efêmera. A produção também tardia de altos níveis de compostos fenólicos em URS 21 pode estar associada à sua morte celular e,

principalmente, ao impedimento do desenvolvimento futuro das colônias do fungo, visto que compostos fenólicos também são fungistáticos e/ou fungicidas (J. A. Martinelli, dados não publicados). A interação destes dois efeitos pode ser considerada como um mecanismo mais complexo de sua resistência, garantindo sua durabilidade. A inespecificidade deste mecanismo está justamente na sua estratégia de permitir o ingresso, ou infecção, de raças virulentas, criando assim condições posteriores inadequadas aos seus desenvolvimentos plenos. A superação deste mecanismo de resistência devido ao acúmulo de altos níveis fenólicos está, provavelmente, além de uma única mutação no patógeno.

## 6 CONCLUSÕES

Nas condições em que foram desenvolvidos e conduzidos os experimentos conclui-se:

1. As avaliações realizadas no campo permitiram diferenciar os genótipos resistentes dos suscetíveis, porém não dão subsídios para um entendimento do mecanismo que está operando;

2. Os eventos de colonização e infecção não são alterados pelo diferentes tipos e níveis de resistência nos genótipos de aveia;

3. Dentre os componentes de resistência conhecidos, a eficiência de infecção expressa melhor a efetividade da resistência observada nos genótipos estudados neste trabalho, enquanto que o período latente se mostra sem efeito e utilidade para este fim;

4. O mecanismo das maiores resistências observadas dentre os genótipos estudados, apresentados pelos genótipos URS 21, 04B7119-2, 04B7113-1 e Pc68/5\*Starter, é por morte celular associada ao acúmulo de compostos autofluorescentes, provavelmente de natureza fenólica;

5. A durabilidade da resistência de URS 21 está associada à morte celular tardia concomitante com o acúmulo de compostos autofluorescentes;

e

6. A semelhança entre os mecanismos de resistência do genótipo 04B7119-2 e a cultivar URS 21 permite estimar que a resistência dessa pode ser durável, quando exposta ao campo sob condições epidêmicas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5 ed. San Diego: Elsevier, 2005. 922p. Chapter 11: Plant diseases caused by fungi.
- ALLAGUI, M.B.; CHAKROUN, M. Oat crown rust in Tunisia in 2003. In: INTERNATIONAL OAT CONFERENCE, 7., 2004, Helsinki – FI. **Proceedings...** Helsinki, 2004. p. 180. (Agrofood Research Reports, 51).
- ALLEN, E.A.; HAZEN B.E.; HOCH, H.C.; KWON, Y.; LEINHOS, G.M.E.; STAPLES, R.C.; STUMPF, M.A.; TERHUNE, B.T. Aporosporium formation in response to topographical signals by 27 rust species. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p. 323-331, 1991.
- 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.
- ASHAGARI, D.; ROWELL, J.B. Postpenetration phenomena in wheat cultivars with low receptivity to infection by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, p. 624-627, 1980.
- BAKER, C.J.; ORLANDI, E.W. Active oxygen in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 299-321, 1995.
- BARILLI, E.; SILLERO, J.C.; SERRANO, A.; RUBIALES, D. Differential response of pea (*Pisum sativum*) to rusts incited by *Uromyces viciae-fabae* and *U. pisi*. **Crop Protection**, Guildford, v. 28, p. 980-986, 2009.
- BEARDMORE, J.; RIDE J.P.; GRANGER, J.W. Cellular lignification as a factor in the hypersensitive resistance of wheat to stem rust. **Physiological Plant Pathology**, Oxford, v. 22, p. 209–20, 1983.
- BENDER, C.M.; PRETORIUS, F.J.; KLOPPERS, F.J.; SPIES, J.J. Histopathology of leaf rust infection and development in wheat genotypes containing *Lr12* and *Lr13*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, p. 65-76, 2000.
- BEDENDO, I.P. Ferrugens. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1. p. 872-888.

BOLWELL, G.P. Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 2, p. 287-294, 1999.

BONNETT, D.G.; PARK, R.F.; McINTOSH, R.A.; OATES, F.D. The effects of temperature and light on interactions between *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* and *Avena* sp. **Australasian Plant Pathology**, Reckhampton, v. 31, p. 185-192, 2002.

BORDEN, S.; HIGGINS, V.J. Hydrogen peroxide plays a critical role in the defence response of tomato to *Cladosporium fulvum*, **Physiological and molecular Plant Pathology**, London, v. 61, p. 227-236, 2002.

BORDIN, A.P.A.; MAYAMA, S.; TANI, T. Potential elicitors for avenalumin accumulation in oat leaves. **Annual Phytopathology Society of Japan**, Tokyo v. 57, p. 688-695, 1991.

BUSHNELL, W.R. Hypersensitivity in rusts and powdery mildews. In: ASADA, Y.; BUSHNELL, W.R.; OUCHI, S.; VANCE, C.P. (Eds). **Plant Infection: the physiological and biochemical basis**. Japan: Japan Scientific Press, 1982. p. 97-116.

CAIERÃO, E.; CARVALHO, F.I.F.; FLOSS, W.E.L.; SÁNCHEZ-CHACÓN, C.D.; LORENCETTI, C.; MARCHIORO, V. Efeito de níveis de severidade e incidência da ferrugem-da-folha e ferrugem-do-colmo no rendimento de linhagens de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 43-53, 2001.

CAÑO-DELGADO, A.; PENFIELD, S.; SMITH, C.; CATLEY, M.; BEVAN, M. Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 34, p. 351-362, 2003.

CARVER, T.L.W.; ROBBINS, M.P.; ZEYEN, R.J. Effects of two PAL inhibitors on the susceptibility and localized autofluorescent host cell responses of oat leaves attacked by *Erysiphe graminis* DC. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 39, p. 269-287, 1991.

CARVER, T.L.W.; ZEYEN, R.J.; BUSHNELL, W.R.; ROBBINS, M.P. Inhibition of phenylalanine ammonia lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase increases quantitative susceptibility of barley to powdery mildew (*Erysiphe graminis* D.C.). **Physiological and molecular plant pathology**, London, v. 44, p. 261-272, 1994.

CARVER, T.L.W.; ZEYEN, R.J.; ROBBINS, M.P.; DEARNE, G.A. Effects of the PAL inhibitor, AOPP, on oat, barley and wheat cell responses to appropriate and inappropriate formae speciales of *Erysiphe graminis* DC. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, p. 397-409, 1992.

CARVER, T.L.W.; ZHANG, L.; ZEYEN, R.J.; ROBBINS, M.P. Phenolic biosynthesis inhibitors suppress adult plant resistance to *Erysiphe graminis* in

oat at 20°C and 10°C. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, p. 121-141, 1996.

CHAVES, M.S.; CARVALHO, F.I.F.; CARGNINI, A.; SIMION, D.; SCHIMIDT, D.A.M.; HARTWIG, I. Efeito da ferrugem da folha sobre o rendimento e qualidade de grãos em genótipos elite de aveia. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA EM AVEIA, 22., 2002, Passo Fundo. **Resultados experimentais**. Passo Fundo, RS, 2002. 463-470.

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

CHAVES, M.S.; MARTINELLI, J.A.; FEDERIZZI, L.C. Resistência quantitativa à ferrugem da folha em genótipos de aveia branca: I - Caracterização da reação em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 39-46, 2004a.

CHAVES, M.S.; MARTINELLI, J.A.; FEDERIZZI, L.C. Resistência quantitativa à ferrugem da folha em genótipos de aveia branca: II – Avaliação de Componentes de Resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 47-55, 2004b.

CHAVES, M.S.; MARTINELLI, J.A.; FEDERIZZI, L.C. Resistência quantitativa à ferrugem da folha em genótipos de aveia branca: III - Correlação de componentes de resistência entre si e com a quantidade de doença no campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 197-200, 2004c.

CHONG, J.; LEONARD, K.J.; SALMERON, J.J. A North American system of nomenclature for *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, p. 580-585, 2000.

CHONG, J; AUNG, T. Suppression of crown rust resistance gene *Pc94*. **Oat Newsletter**, (s.l.) v. 45. 1999. Disponível em: <<http://grain.jouy.inra.fr/ggpage/oatnewsletter/v45/>>. Acesso em 14 dez. 2005.

COLLINS, F.W. Oat phenolics: avenanthramides, novel substituted *N*-cinnamoylanthranilate alkaloids from oat groats and hulls. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, DC., v. 37, p. 60-66, 1989.

COLLINS, T.J.; MOERSCHBACHER, B.M.; READ, N.D. Synergistic induction of wheat stem rust appressoria by chemical and topographical signals. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 58, p. 259-266, 2001.

COLLINS, T.J.; READ, N.D. Apressorium induction by topographical signals in six cereal rusts. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 51, p. 169-179, 1997.

COUEY, H.M.; SMITH, F.G. Effect of cations on germination & germ tube development of *Puccinia coronata* uredospores. **Plant Physiology**, Rockville, v. 36, p. 14-19, 1961.

DANIEL, R.; GUEST, D. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 67, p. 194–201, 2006.

DE VALLAVIEILLE-POPE, C.; HUBER, L.; LCONTE, M.; BETHERNOD, O. Preinoculation effects of light quantity on infection efficiency of *Puccinia striiformis* and *P. triticina* on wheat seedlings. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, p. 1308-1314, 2002.

DE VLEESSCHAUWER, D.; CHERNIN, L.; HÖFTE, M. Differential effectiveness of *Serratia plymuthica* IC1270-induced system c resistance against hemibiotrophic and necrotrophic leaf pathogens in rice. **BMC Plant Biology**, London, v. 9, (não paginado - article n.º. 9), 2009. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2229-9-9.pdf>. Acesso em: 28 set. 2009.

DE VLEESSCHAUWER, D.; DJAVAHARI, M.; BAKKER, P.A.H.M.; HOFTE, M. *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 148, p. 1996–2012, 2008.

DEON, J.F.D. Lignin analysis. In: DASHEK, W.V. (Ed). **Methods in plant biochemistry and molecular biology**. Boca Raton: CCR Press, 1997. p. 199-215, cap. 17.

DEUSCHLE, K.; FUNCK, D.; HELLMANN, H.; DASCHNER, K.; BINDER, S.; FROMMER, W.B. A nuclear gene encoding mitochondrial  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. **Plant Journal: for cell and molecular biology**, Oxford, v. 27, p. 345-355, 2001.

DÍAZ-LAGO, J. E.; STUTHMAN, D. D.; LEONARD, K. J. Evaluation of components of partial resistance to oat crown rust using digital image analysis. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, p. 667-674, 2003.

DIXON, R.A.; ACHNINE, L.; KOTA, P.; LIU, C.J.; REDDY, M.S.S.; WANG, L. The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 3, p. 371-390, 2002.

DOREY, S.; BAILLIEUL, F.; PIERREL, M.A.; SAINDRENAN, P.; FRITIG, B.; KAUFFMANN, S. Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v. 10, p. 646-655, 1997.

FEDERIZZI, L.C. Global and mega – regional breeding perspective: Latin America. In: INTERNATIONAL OATS CONFERENCE, 6., 2000, Lincoln. **Proceedings...** Christchurch : New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited, 2000. p. 177-184.

FINK, W.; LIEFLAND, M.; MENDGEN, K. Comparison of various stress responses in oat in compatible and nonhost resistant interactions with rust fungi. **Physiology Molecular Plant Pathology**, London, v. 37, p. 309-321, 1990.

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

GLEN, M.; ALFENAS, A.C.; ZAUZA E.A.V.; WINGFIELD, M.J.; MOHAMMED, C. *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy - a review. **Australasian Plant Pathology**, Reckhampton, v. 36, p. 1-16, 2007.

GOODMAN, R.N.; NOVACKY, A.J. **The Hypersensitive Reaction in Plant to Pathogen**: a resistance phenomenon. St. Paul: APS Press, 1994. 256p.

GRAICHEN, F.A.S. **Herança e caracterização da resistência à ferrugem da folha conferida pelo gene *Pc68* em linhagens recombinantes de aveia**. 2006. 106f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

GREGERSEN, P.L.; THORDAL-CHRISTENSEN, H.; FORSTER, H.; COLLINGE D.B. Differential gene transcript accumulation in barley leaf epidermis and mesophyll in response to attack by *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (syn. *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). **Physiology and Molecular Plant Pathology**, London, v. 51, p. 85-97, 1997.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 77-74, 1999.

HAMMERSCHMIDT, R. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p.285-306, 1999.

HAMMERSCHMIDT, R.; NICHOLSON, R.L. A survey of plant defense responses to pathogens. In: AGRAWAL, A.A.; TUZUN, S.; BENT, E. (Eds). **Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores**. St. Paul: APS Press, 1999. p. 55-71.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J.D.G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Eds). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. Chapter 11. p. 1102-1156.

HARDER, D.E. Electron microscopy of urediospore formation in *Puccinia*

*coronata* f. sp. *avenae*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 54, p. 1010-1019, 1976.

HEATH M.C. Nonhost resistance and non-specific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 315-319, 2000.

HEATH, M.C. Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, p. 117-124, 1998.

HEATH, M.C. Host defense mechanisms against infection by rust fungi. In: SCOTT, K.J.; CHAKRAVORTY, A.K. (Eds). **The Rust Fungi**. London: Academic Press, 1982. p. 223-45.

HEATH, M.C. Resistance of plants to rust infection. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, p. 971-974, 1981.

HEATH, M.C. Signalling between pathogenic rust fungi and resistance or susceptible host plants. **Annals of Botany**, Ottawa, v. 80, p. 713-720, 1997.

HOCH, H.C.; BOJKO, R.J.; WHITEHEAD, B.; COMEAU, J.; WOLF, E.D. Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. **Science**, New York, v. 235, p. 1659-1662, 1987.

HOOBKAMP, T. J. H.; CHEN, W.-Q.; NIKS, R. E. Specificity of prehaustorial resistance to *Puccinia hordei* and to two inappropriate rust fungi in barley. **Phytopathology**, St Paul, v. 88, p. 856-861, 1998.

IKEGAWA, T.; MAYAMA, S.; NAKAYASHIKI, H.; KATO, H. Accumulation of diferulic acid during the hypersensitive response of oat leaves to *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* and its role in the resistance of oat tissues to cell wall degrading enzymes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 48, p. 245-255, 1996.

ISHIHARA, A.; HASHIMOTO, Y.; TANAKA, C.; DUBOUZET, J.G.; NAKAO, T.; MATSUDA, F.; NISHIOKA, T.; MIYAGAWA, H.; WAKASA, K. The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. **The Plant Journal**, Oxford, v. 54, p. 481-495, 2008.

JACOBS, Th.; BUURLAGE, M.H. Growth of wheat leaf rust colonies in susceptible and partially resistant spring wheats. **Euphytica**, Dordrecht, v. 45, p. 71-80, 1990.

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

JØRGENSEN, J.H. Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in Barley. **Euphytica**, Dordrecht, v. 63, p. 141 - 152, 1992.

KLOPPERS, F.J.; PRETORIUS, Z.A. Effects of combination amongst genes

*Lr13*, *Lr34* and *Lr37* on components of resistance in wheat to leaf rust. **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, p. 737-750, 1997.

KNEALE, J.; FARRAR, J.F. The localization and frequency of haustoria in colonies of brown rust on barley leaves. **The New Phytologist**, Oxford, v. 101, p. 495-505, 1985.

KOCHMAN, J.K.; BROWN, F.J. Development of the stem and crown rust fungi on leaves, sheaths, and peduncles of oat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 65, p. 1404-1408, 1975.

KOGA, H.; BUSHNELL, W.R.; ZEYEN, R.J. Specificity of cell type and timing of events associated with papilla formation and the hypersensitive reaction in leaves of *Hordeum vulgare* attacked by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 68, p. 2344–2352, 1990.

KOGA, H.; ZEYEN, R.J.; BUSHNELL, W.R.; AHLSTRAND, G.G. Hypersensitive cell death, autofluorescence, and insoluble silicon accumulation in barley leaf epidermal cells under attack by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 32, p. 395-409, 1988.

KOMBRINK, E.; SOMSSICH I.E. Defense responses of plants to pathogens. **Advances in Botanical Research**, New York, v. 21, p. 2-33, 1995.

LALOI, C.; APEL, K.; DANON, A. Reactive oxygen signalling: the latest news. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 323-328, 2004.

LEONARD, K.; SZABO L.J. Stem rust of small grasses caused by *Puccinia graminis*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 6, p. 99-111, 2005.

LEONARD, K.J. Regional frequencies of virulence in oat crown rust in the United States from 1999 through 2000. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, p. 1301-1310, 2003.

LEONARD, K.J.; ANISKSTER, Y.; MANISTERSKI, J. Patterns of virulence in natural populations of *Puccinia coronata* on wild oat in Israel and agricultural populations on cultivated oat in the United States. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, p. 505-514, 2004.

LEONARD, K.J.; HUERTA-ESPINO, J.; SALMERON, J.J. Virulence of oat crown rust in Mexico. **Plant Disease**, St. Paul, v. 8, p. 941-948, 2005.

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

LIN, K.C.; BUSHNELL, W.R.; SMITH, A.G.; SZABO, L.J. Temporal accumulation patterns of defense response gene transcripts in relation to resistant reactions in oat inoculated with *Puccinia graminis*. **Physiological and Molecular plant pathology**, London, v. 52, p. 95-114, 1998.

LITTLEFIELD, L.J.; HEATH, M.C. **Ultrastructure of rust fungi**. New York: Academic Press, 1979. 277 p.

LUKE, H.H.; BARNETT, R.D.; PFAHLER, P.L. Postpenetration development of *Puccinia coronata avenae* in slow- and fast-rusting cultivars of *Avena byzantina*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, p. 899-903, 1984.

MacBRYDE, M.C. A method of demonstrating rust hyphae and haustoria in unsectioned leaf tissue. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 23, p. 686-688, 1936.

MANSFIELD, J.; BENNETT, M.; BESTWICK, C.; WOODS-TOER, A. Phenotypic expression of gene-for-gene interaction involving fungal and bacterial pathogens: variation from recognition to response. In: CRUTE, I.R.; HOLUB, E.B.; BURDON, J.J. (Eds). **The Gene-For-Gene Relationship in Plant-Parasite Interactions**. New York: CAB International, 1997. p. 265-291.

MARTE, M.; MONTALBINI, P. Histological observation on *Uromyces phaseoli* and *Puccinia recondita* infection in allopurinol-treated susceptible plants. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, p. 163- 68, 1999.

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

MARTINELLI, J.A. Oat diseases and their control. In: SUTTIE, J.M.; REYNOLDS, S.G. (Eds.). **Fodder oats: a world overview**. Roma: FAO, 2004. Cap. 12. p. 197-214.

MARTINELLI, J.A.; BUSS, A. Comportamento de populações heterogêneas de aveia frente à ferrugem da folha nas condições do Sul do Brasil. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA EM AVEIA, 19., 1999, Porto Alegre. **Resultados experimentais**. Porto Alegre, RS, 1999. p. 118-126.

MARTINELLI, J.A.; FEDERIZZI, L.C.; BENNEDETTI, A.C. Redução do rendimento de grão da aveia em função da severidade da ferrugem da folha. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 20, p.110-113, 1994.

MARTÍNEZ, F.; NIKS, R.F.; SINGH, R.P.; RUBIALES, D. Characterization of *Lr46*, a gene conferring partial resistance to wheat leaf rust. **Hereditas**, Lund, v. 135, p. 111-114, 2001.

MAYAMA, S.; SHISHIYAMA, J. Localized accumulation of fluorescent and u.v.-absorbing compounds at penetration sites in barley leaves infected with *Erysiphe graminis hordei*. **Physiological Plant Pathology**, Oxford, v.13, p. 347-350, 1978.

MAYAMA, S.; HAYASHI, S.; YAMAMOTO, R.; TANI, T.; UENO, T.; FUKAMI, H. Effects of elevated temperature and  $\alpha$ -aminoxyacetate on the

accumulation of avenalumin in oat leaves infected with *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. **Physiological Plant Pathology**, Oxford, v. 20, p. 305-312, 1982.

MAYAMA, S.; TADA, Y.; HATA, S.; TAKATA, Y.; YAO, N.; MORI, T.; YANG, Q.; BETSUYAKU, S.; NAKAYASHIKI, H.; TOSA, Y.; PARK, P. Apoptotic response in defense of oats to infections and elicitors. In: KEEN, N.T.; MAYAMA, S.; LEACH, J.E.; TSUYUMU, S. (Eds). **Delivery and Perception of Pathogen Signals to Plants**. St. Paul: APS, 2001. p. 220-228

MAYAMA, S.; TANI, T. Microspectrophotometric analysis of the location of avenalumin accumulation in oat leaves in response to fungal infection. **Physiological Plant Pathology**, Oxford, v. 21, p. 141-149, 1982.

MAYAMA, S.; TANI, T.; MATSURA, Y.; UENO, T.; FUKAMI, H. The production of phytoalexins by oat (*Avena sativa*) in response to crown rust, *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. **Physiological Plant Pathology**, Oxford, v. 19, p. 217-226, 1981.

MAYAMA, S.; TANI, T.; UENO, T.; MIDLAND, S.L.; SIMS, J.J.; KEEN, N.T. The purification of victorin and its phytoalexin elicitor activity in oat (*Avena sativa*) leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 29, p. 1-18, 1986.

MELLERSH, D.G.; HEATH, M.C. Plasma Membrane-Cell Wall Adhesion Is Required for Expression of Plant Defense Responses during Fungal Penetration. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 413-424, 2001.

MENDGEN, K.; ESTRUCK, C.; VOEGEL, R.T.; MATTHIA, H. Biotrophy and rust haustoria. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 56, p. 141-145, 2000.

MIYAGAWA, H.; ISHIHARA, A.; KUWAHARA, Y.; UENO, T.; MAYAMA, S. A stress compound in oats induced by victorin, a host-specific toxin from *Helminthosporium victoriae*. **Phytochemistry**, New York, v. 41, p. 1473-1475, 1996.

MOERSCHBACHER, B.M.; MENDGEN, K. Structural aspects of defense. In: SLUSARENKO, A.; FRASER, R.S.S.; VAN LOON, L.C. (Eds). **Mechanisms of Resistance to Plant Diseases**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 231-277.

MOERSCHBACHER, B.M.; MIERAU, M.; GRAEBNER, B.; NOLL, U.; MORT, A.J. Small oligomers of galacturonic acid are endogenous suppressors of disease resistance reactions in wheat leaves. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, p. 605-612, 1999.

MOERSCHBACHER, B.M.; NOLL, U.; GORRICHON, L.; REISENER, H.J. Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 93, p. 465-70, 1990.

MOLDENHAUER, J.; MOERCSHBACHER, B.M.; van der WESTHUIZEN, A.J. Histological investigation of stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*). **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, p. 469-474, 2006.

NEILL S.; DASIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 388-395, 2002.

NIKS, R.E. Haustorium formation by *Puccinia hordei* in leaves of hypersensitive, partially resistant, and nonhost plant genotypes. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, p. 64-66, 1983.

NIKS, R.E. Failure of haustorial development as a factor in slow growth and development of *Puccinia hordei* in partially resistant barley. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 28, p. 309-322, 1986.

NIKS, R.E.; DEKENS, R.G. Prehaustorial and posthaustorial resistance to wheat leaf rust in diploid wheat seedling. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, p. 847-851. 1991.

NIKS, R.E.; KIUPER, H.J. Histology of the relation between minor and major genes for resistance of barley to leaf rust. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, p. 55-59, 1983.

NIKS, R.E.; RUBIALES, D. Potentially durable resistance mechanism in plants to specialized fungal pathogen. **Euphytica**, Dordrecht, v. 124, p. 201-216, 2002.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; McCULLY, M. Polychromatic staining of plant cell wall by toluidine blue. **Protoplasma**, New York, v. 59, p. 367-373, 1964.

OATES, J.D. Disease on oats! What disease on oats? In: INTERNATIONAL OATS CONFERENCE, 6., 2000, Lincoln. **Proceedings...** Christchurch: New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited, 2000. p. 265 - 275.

OHM, H. W.; SHANER, G. Three components of slow leaf-rusting at different growth stages in wheat. **Phytopathology**, St Paul, v. 66, p. 1356-1360, 1976.

OKAZAKI, Y.; ISOBE, T.; IWATA, Y.; MATSUKAWA, T.; MATSUDA, F.; MIYAGAWA, H.; ISHIHARA, A.; NISHIOKA, T.; IWAMURA, H. Metabolism of avenanthramide phytoalexins in oats. **The Plant Journal: for cell and molecular biology**, Oxford, v. 39, p. 560-572, 2004.

PANSTRUGA, R. Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, p. 320-326, 2003.

PARK, R.F. Occurrence and pathogenic specialization of *Puccinia coronata* (oat crown rust pathogen) in Australia - 1998 - 1999. **Oat Newsletter**, v. 46, 2000. Disponível em: <<http://wheat.pw.usda.gov/ggppages/oatnewsletter/v46/>>. Acesso em 14 dez. 2005.

PARK, R.F. Pathogenic changes in *Puccinia coronata* (oat crown rust pathogen) with respect to recently deployed crown rust resistance cultivars in Australia. **Oat Newsletter**, v. 45, 2000. Disponível em: <<http://grain.jouy.inra.fr/ggpage/oatnewsletter/v45/>>. Acesso em 14 dez. 2005.

PARLEVLIET, J. E. Partial resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. I. Effect of cultivar and development stage on latent period. **Euphytica**, Dordrecht, v. 24, p. 21-27, 1975.

PARLEVLIET, J. E. Present concepts in breeding for disease resistance private. In: ZAMBOLIN, L.; RIBEIRO do VALE, F. X. (Eds.). **Fitopatologia Brasileira: Resistência de plantas a doenças; palestras**. Brasília, DF. 1997. p. 7-15.

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.

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

PERFECT, S.E.; GREEN, J.R. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal pathogens. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 2, p. 101-108, 2001.

READ, N.D.; KELLOCK, L.J.; COLLINS, T.J.; GUNDLACH, A.M. Role of topography sensing for infection-structure differentiation in cereal rust fungi. **Planta**, Berlin, v. 202, p. 163-170, 1997.

REISIGE, K.; GORZELANNY, C.; DANIELS, U.; MOERSCHBACHER, B.M. The C28 aldehyde octacosanal is a morphogenetically active component involved in host plant recognition and infection structure differentiation in the wheat stem rust fungus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, p. 33-40, 2006.

RIBEIRO do VALE, F.X.; PARLEVLIET, J.D.; ZAMBOLIM, L. Concepts in plant disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 577-589, 2001.

RICHAEL, C.; GILCHRIST, D. The hypersensitive response: a case of hold or fold. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 55, p.5-12, 1999.

RIMÉ, D.; ROBERT, C.; GOYEAU, H.; LANNOU, F. Effect of host genotype on leaf rust (*Puccinia triticina*) lesion development and urediniospore production in wheat seedlings. **Plant Pathology**, Oxford, v. 54, p. 287-298, 2005.

RODERICK, H.W.; THOMAS, B.J.; Infection of ryegrass by three rust fungi (*Puccinia coronata*, *P. graminis* and *P. loliina*) and some effect of

temperature on the establishment of the disease and sporulation. **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, p. 751-756, 1997.

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

SAS Institute Inc. **SAS Software, versão 8.0**. Cary, NC, 2000.

SCHULZE-LEFERT, P.; PANSTRUGA, R. Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 641-67, 2003.

SHARP, E.L.; EMGE, R.G. A 'tissue transplant' technique for obtaining abundant sporulation of races of *Puccinia graminis* var. *tritici* occurring on resistant varieties. **Phytopathology**, St Paul, v. 48, p. 696-697, 1958.

SHIMONY, C.; FRIEND, J. Ultrastructure of the interaction between *Phytophthora infestans* and leaves of two cultivars of potato (*Solanum tuberosum* L.) Orion and Majestic. **The New Phytologist**, Oxford, v. 74, p. 59-65, 1975.

SILLERO, J. C.; RUBIALES, D. Histological characterization of resistance to *Uromyces viciae-fabae* in faba bean. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, p. 294-299, 2002.

SILVA, M.C.; NICOLE, M.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RODRIGUES Jr., C.J. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, p. 169-183, 2002.

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

SINGH, R.P.; HUERTA-ESPINO, J.; WILLIAM, H.M. Genetics and breeding for durable resistance to leaf and stripe rusts in wheat. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 29, p. 121-127, 2005.

SOOVÄLI, P.; KOPPEL, M. Genetic control of oat rust diseases. **Agronomy Research**, Tartu, v. 1, p. 245-251, 2003.

SOUTHERTON, S.G.; DEVERALL, B.J. Changes in phenolic acid levels in wheat leaves expressing resistance to *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. **Physiological and molecular plant pathology**, London, v. 37, p. 437-450, 1990.

STADNIK, M.J.; BUCHENAUER, H. Accumulation of autofluorogenic compounds at the penetration site of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* is

associated with both benzothiadiazole induced and quantitative resistance of wheat. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, p. 615-622, 1999.

STAPLES, R.C. Research on the rust fungi during the twentieth century. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 49-69, 2000.

STRUCK, C.; ERNEST, M.; HAHN, M. Characterization of a developmentally regulated amino acid transporter (AAT1p) of the rust *Uromyces fabae*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v.3, p. 23-30, 2002.

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

TADA, Y.; HATA, S.; TAKATA, Y.; NAKAYASHIKI, H.; TOSA, Y.; MAYAMA, S. Induction and signaling and apoptotic response typified by DNA laddering in the defense response of oats to infection and elicitors. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v. 14, p. 477-486, 2001.

TADA, Y.; KUSAKA, K.; BETSUYAKU, S.; SHINOBI, T.; SAKAMOTO, M.; OHURA, Y.; HATA, S.; MORI, T.; TOSA, T.; MAYAMA, S. Victorin triggers programmed cell death and the defense response via interaction with a cell surface mediator. **Plant & Cell Physiology**, Tokyo, v. 46, p. 1787-1798, 2005.

TIBURZY, R.; REISENER, H.J. Resistance of wheat to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*: association of the hypersensitive reaction with the cellular accumulation of lignin-like material and callose. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 36, p. 109-120, 1990.

TORMELIN, J.R.; EVERSMEYER, M.G.; KRAMER, C.L.; BROWDER, L.E. Temperatures and host effects on latent and infectious period and on urediniospore production of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. **Phytopathology**, St Paul, v. 73, p. 414-419, 1983.

VAN DER PLANK, J.E. **Plant diseases: epidemics and control**. New York: Academic Press, 1963. 349 p.

VAN DOORN, W.G.; WOLTERING, E.J. Many ways to exit? Cell death categories in plants. **TRENDS in Plant Science**, Oxford, v. 10, p. 117-122, 2005.

VAN NIEKERK, B.D.; PRETORIUS, Z.A.; BOSHOFF, W.H.P. Pathogenic variability of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* and *P. graminis* f. sp. *avenae* on oat in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, p. 1085-1090, 2001.

VAN WEES. **Phenotypic Analysis of Arabidopsis Mutants: Trypan Blue Stain for fungi, Oomycetes, and dead plant cells**. Cold Spring Harbor Protocols. Disponível em: <http://cshprotocols.cshlp.org/cgi/content/abstract/2008/9/pdb.prot4982>. Acesso em 24 jun. 2008.

VAZ PATTO, M.C.; NIKS, R.E. Leaf wax layer may prevent appressorium differentiation but does not influence orientation of the leaf rust fungus *Puccinia hordei* on *Hordeum chilense* leaves. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 795-803, 2001.

VIEIRA, E.A.; CARVALHO, F.I.F.; CHAVES, M.S.; OLIVEIRA, A.C.; MARTINS, A.F.; SILVA, J.A.G.; HARTWIG, I.; SILVA, G.O.; CARVALHO, M. F.; BUSATO, C.C. Diversidade e estrutura genética para virulência de três populações sul brasileiras de *Puccinia coronata*. **Bragantia**, Campinas, v. 65, p. 147-155, 2006a.

VIEIRA, E.A.; DE CARVALHO, F.I.F.; CHAVES, M.S.; DE OLIVEIRA, A.C.; BERTAN, I.; MARTINS, A.F.; HARTWIG, I.; BENIN, G.; VALERIO, P.; FONSECA, D.A.R. Resistance pattern of white oat genotypes to crown rust in the definition of crosses. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 607-614, 2006b.

VOEGELE, R.T.; MENDGEN, K. Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. **The New Phytologist**, London, v. 159, p. 93-100, 2003.

VOEGELE, R.T.; STRUCK, C.; HAHN, M.; MENDGEN, K. The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. **Proceedings of National Academy of Science of United States of America**, Washington D.C., v. 98, p. 8133-8138, 2001.

WESP, C. de L. **Componentes da resistência quantitativa à ferrugem da folha em linhagens recombinantes de aveia**. 2005. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

WESP, C.L.; MARTINELLI, J.A.; CHAVES, M.S.; GRAICHEN, F.A.S.; FEDERIZZI, L.C. Herança da resistência quantitativa à ferrugem da folha em linhagens recombinantes de aveia branca. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 138-147, 2008.

WIETHÖLTER, N.; HORN, S.; REISIG, K.; BEIKE, U.; MOERSCHBACHER, B.M. In vitro differentiation of haustorial mother cells of the wheat stem rust fungus, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, triggered by the synergistic action of chemical and physical signals. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, p. 320-326, 2003.

WONG, L.S.L.; MCKENZIE, R.I.H.; HARDER, D.E.; MARTENS, J.W. The inheritance of resistance to *Puccinia coronata* and of floret characters in *Avena sterilis*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 25, n. 4, p. 391-225, 1983.

WYSS, G.S.; MÜLLER-SCHÄRER, H. Infection process and resistance in the weed pathosystem *Senecio vulgaris* - *Puccinia lagenophorae* and implications for biological control. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 77, p. 361-369, 1999.

XIN YU, G.; BRAUN, E.; WISE, R.P. *Rds* and *Rih* mediate hypersensitive cell death independent of gene-for-gene resistance to the oat crown rust pathogen *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 14, p. 1376-1383, 2001.

YAMAMOTO, H.; HOKIN, H.; TANI, T.; KADOTA, G. Phenylalanine ammonia-lyase in relation to oat crown rust resistance. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 90, p. 203-211, 1977.

YANG, Q.; TRINH, H.X.; IMAI, S.; ISHIHARA, A.; ZHANG, L.; NAKAYASHIKI, H.; TOSA, Y.; MAYAMA, S. Analysis of the involvement of hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyltransferase and caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase in phytoalexin biosynthesis in oat. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v. 17, p 81-89, 2004.

YAO, N.; IMAI, S.; TADA, Y.; NAKAYASHIKI, H.; ROSSA, Y.; PARK, P.; MAYAMA, S. Apoptotic cell death is a common response to pathogen attack in oats. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v. 15, p. 1000-1007, 2002.

YIRGOU, D.; CALDWELL, R.M. Stomatal penetration of wheat seedlings by stem and leaf rust - effect of light and carbon dioxide. **Science**, New York, v. 141, p. 272-273, 1963.

ZAR, J.H. **Bioestatistical analysis**. 5 ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2009. 944 p.

ZEYEN, R.J.; BUSHNELL, W.R.; CARVER, T.L.W.; ROBBINS, M.P.; CLARK, T.A.; BOYLES, D.A.; VANCE, C.P. Inhibiting phenylalanine ammonia lyase and cinnamyl-alcohol dehydrogenase suppresses *Mla1* (HR) but not *mlo5* (non-HR) barley powdery mildew resistances **Physiological and molecular plant pathology**, London, v. 47, p. 119-140, 1995.

ZIMMER, D.E.; SCHAFER, J.F. Relation of temperature to reaction type of *Puccinia coronata* on certain oat varieties. **Phytopathology**, St Paul, v. 51, p. 202-203, 1961.

## 8 APÊNDICES

APÊNDICE 1. Genealogia das cultivares e linhagens utilizados nas avaliações realizadas neste trabalho. Porto Alegre, RS. 2009.

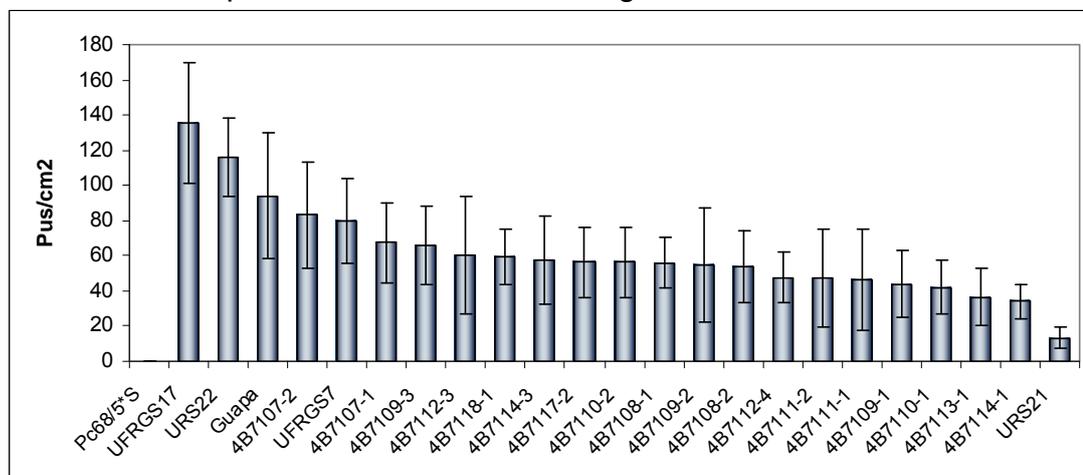
Genótipos	Genealogia
Pc68/5*Starter	Pc68/5*Starter
UFRGS 7	X 1205 / FLA 1093
UFRGS 17	Coronado <sup>2</sup> /Cortez <sup>3</sup> /Pendek/Me1563// 76-29/76-23/75-28/CI833
URS 21	UFRGS 10 / CTC 84B993
URS 22	UFRGS 841110 / UFRGS 884021-1
URS Guapa	UPF 17 Resel.// Guaiba Sel./CTC 84B993
Linhagens	
04B7106-1	04B7112-2
04B7106-2	04B7112-3
04B7107-1	04B7112-4
04B7107-2	04B7113-1
04B7108-1	04B7114-1
04B7108-2	04B7114-2
04B7108-3	04B7114-3
04B7109-1	04B7115-1
04B7109-2	04B7116-1
04B7109-3	04B7116-2
04B7109-4	04B7117-1
04B7110-1	04B7117-2
04B7110-2	04B7117-3
04B7110-3	04B7118-1
04B7111-1	04B7118-2
04B7111-2	04B7119-1
04B7112-1	04B7119-2
	UFRGS 952681 / UFRGS 17

APÊNDICE 2. Designação de unidades de infecção de *Puccinia hordei* em cevada de acordo com seu estágio de desenvolvimento (Niks & Kuiper, 1983). Livre tradução. Porto Alegre, RS. 2009.

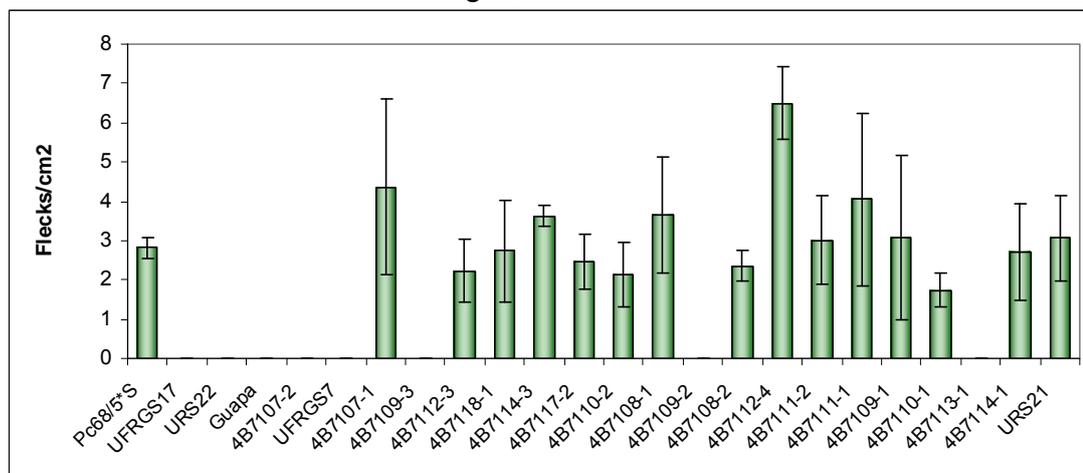
<b>Fase de desenvolvimento</b>	<b>Designação da unidade de infecção</b>	<b>Definição</b>
Pré-penetração	Não penetrante #	Apressório sobre o estômato sem formação de vesícula subestomatal;
Formação da vesícula subestomatal	Vesícula subestomatal abortada #	Vesícula subestomatal sem hifa infectiva;
Estabelecimento	Abortamento precoce da colônia #	Vesícula subestomatal sem hifa de infecção primária e menos que seis células mãe do haustório
Colonização	Estabelecida ou abortamento tardio da colônia #	Hifas ramificadas, seis ou mais células mãe do haustório, tecido esporogêncio presente;
Reprodução	Colônia bem sucedida #	Ao menos alguns uredósporos são formados

# desenvolvimento do fungo paralisado na fase indicada;

APÊNDICE 3. Densidade de pústulas de ferrugem da folha desenvolvidas em diferentes genótipos de aveia. As barras indicam o erro padrão da média. Porto Alegre, RS. 2009.



APÊNDICE 4. Densidade de pontuações necróticas desencadeadas por *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* desenvolvidas em diferentes genótipos de aveia. As barras indicam o erro padrão da média. Porto Alegre, RS. 2009.



APÊNDICE 5. Número de colônias de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* associadas à morte celular do tecido do hospedeiro em 120 hai. Porto Alegre, RS. 2009.

Morte celular	04B7107-2	04B7113-1	04B7119-2	URS Guapa	Pc68/5*Starter	UFRGS 17	URS 21	URS 22	Total
<b>Ausente</b>	57	18	27	43	0	43	15	44	247
<b>Presente</b>	9	38	46	5	32	3	23	1	257
<b>Total</b>	16	56	73	48	32	46	38	45	404

$\chi^2 = 175,29$

Graus de liberdade= 7

P < 0,0001

APÊNDICE 6. Número de colônias de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* com a presença de tecido esporogênico em 120 hai. Experimento A. Porto Alegre, RS. 2009.

Tecido esporogênico	04B7107-2	04B7113-1	04B7119-2	URS Guapa	Pc68/5*Starter	UFRGS 17	URS 21	URS 22	Total
<b>Ausente</b>	49	14	23	20	0	31	3	26	166
<b>Presente</b>	17	42	50	24	32	17	35	19	236
<b>Total</b>	66	56	73	44	32	48	38	45	402

$\chi^2 = 94,67$

Graus de liberdade= 7

P < 0,0001

APÊNDICE 7. Número de colônias de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* associadas a compostos autofluorescentes avaliadas 48 hai. Porto Alegre, RS. 2009.

Composto autofluorescentes	04B7107-2	04B7113-1	04B7119-2	URS Guapa	Pc68/5*Starter	UFRGS 17	URS 21	URS 22	Total
<b>Ausente</b>	107	79	75	103	21	100	25	49	559
<b>Presente</b>	3	3	8	4	77	4	5	1	105
<b>Total</b>	110	82	83	107	98	104	30	50	664

$\chi^2 = 345,65$

Graus de liberdade= 7

P < 0,0001

APÊNDICE 8. Número de colônias de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* associadas a compostos autofluorescentes avaliadas 120 hai. Porto Alegre, RS. 2009.

Compostos autofluorescentes	04B7107-2	04B7113-1	04B7119-2	URS Guapa	Pc68/5*Starter	UFRGS 17	URS 21	URS 22	Total
<b>Ausente</b>	147	60	7	72	0	100	17	71	474
<b>Presente</b>	33	23	68	14	102	11	60	1	312
<b>Total</b>	180	83	75	86	102	111	77	72	786

$\chi^2 = 427,63$

Graus de liberdade= 7

P < 0,0001

APÊNDICE 9. Número de colônias de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* com a presença de tecido esporogênico em 120 hai. Experimento B. Porto Alegre, RS. 2009.

Tecido esporogênico	04B7107-2	04B7113-1	04B7119-2	URS Guapa	Pc68/5*Starter	UFRGS 17	URS 21	URS 22	Total
<b>Ausente</b>	15	11	24	14	102	11	55	20	252
<b>Presente</b>	165	72	51	72	0	100	22	52	534
<b>Total</b>	180	83	75	86	102	11	77	72	786

$\chi^2 = 366,38$

Graus de liberdade= 7

P < 0,0001

APÊNDICE 10. Proporção de colônias de *Puccinia coronata* f.sp *avenae* associadas a compostos autofluorescentes. Porto Alegre, RS. 2009.

Genótipos	Compostos autofluorescentes	
	Genótipos (%)	
	48 hai	120 hai
<b>Pc68/5*Starter</b>	79% a*	100% a*
<b>04B7119-2</b>	10% b	91% b
<b>URS 21</b>	17% b	78% b
<b>04B7107-2</b>	3% b	18% d
<b>URS Guapa</b>	4% b	16% d e
<b>UFRGS 17</b>	4% b	10% e f
<b>04B7113-1</b>	4% b	4% e f
<b>URS 22</b>	2% b	1% f

\*. Proporções seguidas por mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste semelhante ao Tukey 5% (Zar, 2009).

APÊNDICE 11. Proporção de colônias de *Puccinia coronata* f.sp *avenae* com tecido esporogênico em 120 hai. Experimento B. Porto Alegre, RS. 2009.

Genótipos	Tecido esporogênico	
	Genótipos (%)	
<b>04B7107-2</b>	91,67	a
<b>UFRGS 17</b>	90,09	a
<b>04B7113-1</b>	86,75	a c
<b>URS Guapa</b>	83,72	a c
<b>URS 22</b>	72,22	c d
<b>04B7119-2</b>	68,00	c d
<b>URS 21</b>	28,57	e
<b>Pc68/5*Starter</b>	0,00	f

\*. Proporções seguidas por mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste semelhante ao Tukey 5% (Zar, 2009).