

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

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DA INTERAÇÃO DE
Drechslera avenae (EIDAM) SHARIF COM CULTIVARES
E LINHAGENS DE AVEIA (*Avena sativa* L.)**

**Nadia Canali Lângaro
Engenheiro Agrônomo**

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

**Porto Alegre (RS), Brasil
março de 2002**

Aos meus pais, Honorino e Maria, pelo amor, exemplo e educação proporcionados, AGRADEÇO.

Ao meu esposo Ricardo, pelo amor, incentivo e apoio, e aos queridos filhos Fernando e Marina, por compreenderem a minha ausência, AGRADEÇO.

À professora e pesquisadora Maria Irene Baggio Fernandes da Universidade de Passo Fundo, pelo apoio, incentivo e amizade, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de aprendizado.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro concedido no período de estudos.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Trigo), pela colaboração em diversas fases do trabalho experimental, e, em especial, aos pesquisadores Sandra Patussi Brammer, Edson Iorczeski, Ariano Moraes Prestes e Márcio Voz, pelo apoio concedido.

Aos professores Aida T. Santos Matsumura e Marcelo Gravina de Moraes, pela orientação.

À banca de examinadores da tese, pela leitura criteriosa e sugestões apresentadas.

À Universidade de Passo Fundo, pela área cedida para os experimentos de campo.

Aos professores Carlos Alberto Forcelini, Dileta Cecchetti e Elmar Luiz Floss da Universidade de Passo Fundo, pela amizade e auxílio.

À Regina Fontaneli pelas sugestões apresentadas e Regina Martins, pelo auxílio na revisão da bibliografia.

À colega de curso Marta Valim Labres, pelo incentivo, amizade e esteio incondicionais em todos os momentos.

Às colegas da UFRGS Mariluce Disconzi e da Embrapa Paula Wiethölter, Neusa Jorge e Carem Lamb, pela amizade e auxílio durante os trabalhos.

À minha irmã Rosane, pela acolhida, carinho e amizade.

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DA INTERAÇÃO DE *Drechslera avenae* (EIDAM) SHARIF COM CULTIVARES E LINHAGENS DE AVEIA (*Avena sativa* L.)¹

Autor: Nadia Canali Lângaro

Orientador: Aida Terezinha Santos Matsumura

Co-orientador: Marcelo Gravina de Moraes

RESUMO

A helmintosporiose, incitada por *Drechslera avenae* (teleomorfo, *Pyrenophora avenae*), constitui fator limitante à produção e à qualidade do grão de aveia (*Avena sativa* L.). A caracterização biológica e molecular da interação aveia - *D. avenae* pode contribuir para o manejo e a determinação de estratégias de controle da doença. Para a caracterização biológica, foram avaliadas trinta cultivares de aveia quanto à percentagem de área foliar com sintomas da doença e o tipo de lesão, inicialmente sob condições de inoculação artificial com três isolados do fungo e, após, no campo, sob condições naturais de infecção. Os resultados demonstraram haver interações significativas entre os genótipos da planta e isolados do patógeno. Classificaram-se como mais resistentes ao fungo OR 4, UFRGS 7, UFRGS 14, UFRGS 18 e UPF 19. Para a caracterização molecular da interação, cinco genótipos (CTC 5, ORLA 975, preta-comum, UFRGS 18 e UPF 17), não inoculados e inoculados com dois isolados do fungo, foram investigados para a análise de expressão diferencial de genes após 12, 24 e 72 horas após a inoculação. A partir do RNA total extraído das plantas submetidas aos tratamentos, realizaram-se a síntese de cDNA (RT-PCR), o isolamento de cDNAs expressados diferencialmente e a produção de sondas para a verificação de mRNAs induzidos, os quais foram hibridizados por meio de “Southern blot” e “Reverse Northern”. Foram observadas diferenças na expressão de genes, em nível de mRNA, entre plantas sadias e infectadas, tendo-se obtido sete fragmentos de cDNAs relacionados à interação com *D. avenae*, os quais foram comparados quanto a sua similaridade com seqüências depositadas no banco de dados do Genbank. Pela análise de “Reverse Northern”, pôde-se identificar um cDNA denominado E3-IFCO, relacionado com a resposta de defesa da planta.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (73 p). Março, 2002.

**BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE
INTERACTION BETWEEN *Drechslera avenae* (EIDAM) SHARIF
AND OAT (*Avena sativa* L.) GENOTYPES¹**

Author: Nadia Canali Lângaro

Adviser: Aida Terezinha Santos Matsumura

Co-adviser: Marcelo Gravina de Moraes

ABSTRACT

The Helminthosporium leaf spot caused by the fungus *Drechslera avenae* (teleomorph = *Pyrenophora avenae*) is a limiting factor for the production of quality oat (*Avena sativa* L.) grains. The biological and molecular characterization of this pathosystem can contribute to the management of the disease. These studies on biological characterization included thirty oat genotypes, which were assessed for percent diseased area and lesion type, initially under controlled inoculation with three fungal isolates and later under natural infection in the field. There were significant interactions between genotypes and isolates, with OR 4, UFRGS 7, UFRGS 14, UFRGS 18 and UPF 19 being more resistant to the disease. For the molecular studies, five genotypes (CTC 5, ORLA 975, preta-comum, UFRGS 18 and UPF 17) inoculated or not with each of two fungal isolates were examined for gene differential expression after 12, 24, and 72 hours post inoculation. The total RNA extracted from the treated (inoculation vs. time) plants was used for syntheses of cDNA (RT-PCR), isolation of differentially expressed cDNAs, and for production of probes to verify induced mRNAs, which were hybridized by means of “Southern blot” and “Reverse Northern”. Differences in gene expression between healthy and diseased plants were observed at the mRNA level, with the occurrence of seven cDNAs fragments related to the interaction with *D. avenae*. These fragments were then compared to others available in the Genbank data bank. Through “Reverse Northern” analyses, a cDNA (E3-IFCO) related in plant defense response was identified.

¹ Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (73 p). March, 2002.

SUMÁRIO

	Página
1. CAPÍTULO I - Introdução.....	1
2. CAPÍTULO II - Avaliação da resistência de cultivares e linhagens de aveia (<i>Avena sativa</i>) à helmintosporiose (<i>Drechslera avenae</i>).....	15
2.1 Resumo.....	15
2.2 Abstract.....	16
2.3 Introdução.....	17
2.4 Material e métodos.....	21
2.4.1 Avaliação da doença sob condições de casa-de vegetação.....	22
2.4.1.1 Isolamento do patógeno.....	22
2.4.1.2 Obtenção de plantas-teste.....	22
2.4.1.3 Inoculação do patógeno em cultivares de aveia.....	23
2.4.1.4 Severidade da doença.....	24
2.4.2 Avaliação da doença sob condições naturais de infecção.....	24
2.4.3 Análise de dados.....	25
2.5 Resultados e discussão.....	25
2.5.1 Avaliação da doença sob condições de casa-de-vegetação.....	25
2.5.2 Avaliação da doença sob condições naturais de infecção.....	32
3. CAPÍTULO III - Expressão diferencial de mRNAs em cultivares e linhagens de aveia em resposta à helmintosporiose (<i>Drechslera avenae</i>).....	37
3.1 Resumo.....	37
3.2 Abstract.....	38
3.3 Introdução.....	39
3.4 Material e métodos.....	43
3.4.1 Obtenção de amostras	43
3.4.2 Isolamento de RNA total.....	44

3.4.3	Seleção de oligonucleotídeos.....	45
3.4.4	“Differential display de RNA”	46
3.4.4.1	RT-PCR: transcrição reversa de RNA-PCR.....	46
3.4.4.2	Eletroforese de produtos de RT-PCR.....	47
3.4.5	Extração e amplificação de produtos de RT-PCR.....	47
3.4.6	Clonagem, isolamento de plasmídeo e seqüenciamento.....	47
3.4.7	Análise “Southern blot”.....	48
3.4.7.1	Reações de marcação, detecção e revelação.....	48
3.4.8	Análise “Reverse Northern”	48
3.5	Resultados e discussão.....	50
4.	CAPÍTULO IV – Conclusões finais.....	59
5.	Referências bibliográficas.....	61

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
2.1. Análise de variância da percentagem (%) de área foliar com sintomas de helmintosporiose em genótipos de aveia inoculados com <i>Drechslera avenae</i> , Experimento 1. Passo Fundo, RS. 2000.....	26
2.2. Percentagem (%) de área foliar com sintomas de helmintosporiose em genótipos de aveia inoculados com <i>Drechslera avenae</i> : isolado de cv. IAC 7, Rio Grande do Sul (IAC7RS); de cv. UPF 17, de Santa Catarina (UPF17SC), e preta-comum, Paraná (PREPR), Experimento 1. Passo Fundo, RS. 2000.....	27
2.3. Análise de variância da percentagem (%) de área foliar com sintomas de helmintosporiose em genótipos de aveia inoculados com <i>Drechslera avenae</i> , Experimento 2. Passo Fundo, RS. 2000.....	28
2.4. Percentagem (%) de área foliar com sintomas de helmintosporiose em genótipos de aveia inoculados com <i>Drechslera avenae</i> : isolado de cv. IAC 7, Rio Grande do Sul (IAC7RS); de cv. UPF 17, de Santa Catarina (UPF17SC), e preta-comum, Paraná (PREPR), Experimento 2. Passo Fundo, RS. 2000.....	28
2.5. Análise de variância da percentagem (%) de área foliar com sintomas de helmintosporiose em genótipos de aveia inoculados com <i>Drechslera avenae</i> , Experimento 3. Passo Fundo, RS. 2001.....	30
2.6. Percentagem (%) de área foliar com sintomas de helmintosporiose em 30 linhagens e/ou cultivares de aveia inoculadas com <i>Drechslera avenae</i> : isolado de cv. UPF 17, Santa Catarina (UPF17SC) e preta-comum, Paraná (PREPR), Experimento 3. Passo Fundo, RS. 2000.....	31
2.7. Análise de variância da percentagem (%) de área foliar com sintomas de helmintosporiose em genótipos de aveia sob condições naturais de infecção por <i>Drechslera avenae</i> , Experimento 4. Passo Fundo, RS. 2001	34
2.8. Percentagem (%) de área foliar com sintomas de helmintosporiose em cultivares indicadas de aveia (Ensaio Brasileiro de Cultivares), sem e com duas aplicações de 750 ml/ha de tebuconazole, sob condições naturais de infecção por <i>Drechslera avenae</i> , Experimento 4. Passo Fundo, RS. 2001.....	34

- 2.9. Percentagem (%) de área foliar com sintomas de helmintosporiose de cultivares indicadas de aveia (Ensaio Brasileiro de Cultivares), sem e com duas aplicações de 750 ml/ha de tebuconazole, sob condições naturais de infecção por *Drechslera avenae*, em três épocas de avaliação. Experimento 4. Passo Fundo, RS. 2001..... 35
- 3.1. Fragmentos de cDNAs isolados de cultivares e linhagens de *Avena sativa* infectadas pelos isolados IAC7RS e UPF17SC de *Drechslera avenae* e sua similaridade com seqüências disponibilizadas em banco de genes (GenBank). Porto Alegre, RS. 2001..... 54

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

- 3.1. Padrões de cDNAs derivados de genótipos de aveia, não inoculados e inoculados com os isolados IACRS e UPF17SC de *Drechslera avenae*, Repetição 2 (E2), usando a técnica de RT-PCR, “primers” da PCR – oligo 1-oligo 2, resolvidos em gel de acrilamida 6% (Sistema HoeferTMSQ3). Porto Alegre, RS. 2000..... 51
- 3.2. Padrões de cDNAs derivados de genótipos de aveia, não tratados e tratados com os isolados IAC7RS e UPF17SC de *Drechslera avenae*, Repetição 3 (E3), usando a técnica de RT-PCR, primers da PCR - oligo 2 - oligo 4, resolvidas em gel de acrilamida 6% (Sistema HoeferTMSQ3). Porto Alegre, RS. 2001..... 52
- 3.3. “Southern blot” para verificação do acúmulo diferencial de RNA de aveia com a sonda E3-DFO expressada diferencialmente em gel de acrilamida (6%). Porto Alegre, RS. 2001..... 56
- 3.4. Análise “Reverse-Northern” de cDNAs de aveia expressados diferencialmente em gel de seqüenciamento (Figura 3.2): (A) com a sonda denominada cDNA-FPSC, preparada a partir de RNA extraído da cultivar UFRGS 18 inoculada com o isolado UPF17SC de *Drechslera avenae* (hibridização com o cDNA E3-IFCO); (B) com a sonda denominada cDNA-F, preparada a partir de RNA extraído da cultivar UFRGS 18 não inoculada com *D. avenae* (Hibridização com o cDNA E3-FO). Porto Alegre, RS. 2001..... 57

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A aveia pertence à família Poaceae, sendo mais freqüentemente classificada na subfamília Poideae, tribo Aveneae, Gênero *Avena* (Clayton & Renvoize, 1986). As espécies do gênero *Avena* possuem três níveis de ploidia: diplóides $2n=2x=14$, tetraplóides $2n=4x=28$ e hexaplóides $2n=6x=42$ (Ladizinsky & Zohary, 1971; Ladizinsky, 1989; Leggett & Thomas, 1995).

Na agricultura, *A. sativa* constitui-se em espécie alternativa em sistemas produtivos e é cultivada principalmente com o propósito de produzir grãos para a alimentação humana e animal (Floss, 1991).

No Brasil, segundo dados da FAO (2000), a produção de grãos de aveia (*Avena sativa* L., branca e *A. bysantina* C. Koch, amarela) aumentou de 39.000 t (toneladas) em 1976 para 287.000 t em 2000. Atribui-se esse crescimento sobretudo ao desenvolvimento de genótipos com boas características agronômicas e com alta capacidade de produção a partir da introdução de germoplasma básico da Quaker Oats International Nursery (QQIN), em 1977 (Augustin et al., 1999). Destacam-se, no

melhoramento genético de aveia, os programas desenvolvidos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e na Universidade de Passo Fundo (UPF). Esses programas buscam, entre outros, caracteres desejáveis relacionados com a fisiologia da planta, como a duração de períodos vegetativo e reprodutivo, e características físicas de qualidade de grãos, fortemente relacionadas com seu rendimento industrial (Pacheco et al., 1999).

Dentre os fatores que reduzem a produção e a qualidade do grão de aveia estão as doenças foliares, especialmente as ferrugens da folha e do colmo, cujos agentes causais são *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* Eriks e *P. graminis* f. sp. *avenae* Eriks e E. Henn. (Comissão..., 1995). No entanto, a manutenção de restos culturais de aveia com a introdução do plantio direto favoreceu a incidência de doenças causadas por fungos necrotróficos (Pacheco et al., 1999). Em aveia, entre as manchas foliares incitadas por fungos que desenvolveram essa estratégia de ataque, somente a helmintosporiose, causada por *Drechslera avenae* (Eidam) Sharif, teve sua incidência aumentada (Gough & McDaniel, 1974; Corazza et al., 1992; Reis & Soares, 1995).

O primeiro relato de *D. avenae* em aveia foi feito por Briosi & Cavara em 1889, na região de Pavia, na Itália (Drechsler, 1923). No Brasil, a helmintosporiose da aveia foi relatada por Costa Neto (1967) no Rio Grande do Sul.

Drechslera avenae pertence à subdivisão Deuteromicotina, classe Hyphomycetes, subclasse Hyphomycetidae, ordem Hyphales (Moniliales) e à família Dematiaceae. A forma teleomórfica *Pyrenophora avenae* pertence à subdivisão Ascomicotina, classe dos Ascomycetes, subclasse Loculoascomycetidae, ordem Pleosporales e à família Pleosporaceae (Shoemaker, 1959; Alcorn, 1988; Muchovej et al., 1988; Menezes & Oliveira, 1993).

Os sintomas de *D. avenae* em aveia são descritos por Luke et al. (1957), Ellis (1971) e Mehta (1999b) como manchas inicialmente pequenas (1 a 3 x 1 a 2 mm), com o centro branco circundado por um halo marrom-avermelhado semelhante a um olho; posteriormente, essas manchas coalescem e alongam-se, formando pequenas listras longitudinais.

Os esporos do fungo, produzidos no centro das lesões, são transportados pelo vento para as outras folhas, onde podem causar novas infecções. A panícula pode ser atingida, ocorrendo, finalmente, a penetração do patógeno no grão através da casca. O fungo sobrevive no inverno como micélio e esporos em restos culturais (colonização saprofítica) e na superfície ou interior da casca da semente (Drechsler, 1923; Boewe, 1960; Blum et al., 1995). O maior dano associado à helmintosporiose é a redução da qualidade de grãos e sementes, o que ocorre mesmo com baixa intensidade da moléstia no campo (Forcelini, 2002).

Em razão da sua localização nos tecidos da semente de aveia, o controle de *D. avenae* via tratamento químico das sementes não tem resultado em controle eficiente (Reis, 1987; Blum et al., 1996; Lângaro, 1998). No tratamento de sementes (aproximadamente 58% de incidência do fungo) com o fungicida triadimenol (533 ml/100 kg de sementes), Lângaro (1998) verificou 97% de controle de *D. avenae* “in vitro”; no campo, no entanto, o produto não manteve a mesma eficiência, pois não impediu a transmissão do fungo para a parte aérea das plantas.

O emprego de resistência genética no controle de doenças de plantas representa um dos mais significativos avanços tecnológicos da agricultura. Para o agricultor, o uso de cultivares resistentes é de fácil utilização e de baixo custo quando comparado a outros métodos (Camargo & Bergamin Filho, 1995). Espécies selvagens têm sido investigadas como possíveis fontes de resistência para a sua transferência para as

plantas cultivadas. Vários pesquisadores tiveram sucesso nessa busca, investigando as espécies selvagens de aveia, de maneira especial *A. sterilis*, utilizada para obtenção de resistência à ferrugem da folha e do colmo (Frey, 1994; Rose & Scattini, 1994) e VNAC (Virose do Nanismo Amarelo da Cevada) (Frey, 1994). Não foram, contudo, encontradas referências ao uso de *A. sterilis* como fonte de resistência a *D. avenae*.

São poucos os relatos sobre o uso de resistência genética no controle de *Drechslera avenae* em aveia. Trabalhos publicados na Europa por Delgado et al. (1990) e Sebesta et al. (1996) descrevem índices de suscetibilidade de cultivares de aveia e monitoramento de incidência da helmintosporiose. No Brasil, pouco conhecimento tem sido gerado sobre a variabilidade genética de cultivares de aveia em relação a sua interação com o fungo. Na tentativa de reduzir os danos causados por *D. avenae* no Sul do Brasil, o conhecimento dessa variabilidade e a possibilidade de identificação de novos genes, envolvidos com os mais variados mecanismos de defesa da planta, são desafios que possibilitam novas perspectivas na obtenção de plantas resistentes ao patógeno e chamam a atenção de fitopatologistas e melhoristas para a inclusão do estudo do patossistema aveia - *D. avenae* em seus programas de melhoramento.

O melhoramento para a resistência pode ser considerado um processo integrado que requer o desenvolvimento de técnicas de seleção, a procura por fontes de resistência e sua transferência para cultivares de interesse, algumas vezes de espécies selvagens, de linhagens avançadas, as quais, freqüentemente, requerem um programa de retrocruzamento (Innes, 1992; Douiyssi et al., 1998). Porém, apesar do esforço de melhoristas em aumentar a produtividade de seus materiais, a realização desse potencial está sendo continuamente restringida pela evolução de patógenos hábeis em superar a resistência de novas cultivares (Khan, 1969; Tekauz & Buchannom, 1977; Karki & Sharp, 1986; Martinelli, 1993).

Para Burdon & Silk (1997), o entendimento do papel da genética da estrutura de populações requer o conhecimento de sua diversidade, origens e intercâmbio evolucionário que ocorre entre os patógenos e seus hospedeiros. As principais fontes de variabilidade de fungos patogênicos são a mutação e a recombinação. Corroborando esses processos, pode-se citar o “fluxo gênico” entre as populações, que dissemina os propágulos de uma área epidemiológica para outra.

Além de variações genéticas no patógeno, a resistência pode ser afetada por variações ambientais, especialmente a temperatura, que modifica a interação patógeno-hospedeiro (Van der Plank, 1963; Khan & Boyd, 1969; Leonard & Czochor, 1980; Van der Plank, 1984).

O estudo de modo de ação e a quantificação do número de genes envolvidos na resistência de genótipos de trigo hexaplóides a *Helminthosporium sativum* em gerações F1 e F2 da planta (expostas à ação de filtrados tóxicos do fungo), possibilitou dividir os genótipos em quatro grupos: resistente, moderadamente resistente, moderadamente suscetível e suscetível (Barbieri et al., 1997). A variabilidade foi detectada na progênie, sugerindo que os pais possuíam constituições genéticas distintas. A ação aditiva de genes foi predominante e o ganho genético pareceu ser possível por meio de seleção, sendo provável que existam poucos genes maiores e menores responsáveis pelo fenótipo; o ambiente foi responsável por 50%, ou mais, da variação de respostas.

Tekauz (1986) avaliou a posição de folhas e a idade de plantas de cevada na reação a *Pyrenophora graminea*. As plantas, avaliadas em três estádios de crescimento - de plântula, de perfilhamento e de espigamento -, apresentaram níveis maiores de resistência no último, quando comparadas com o biótipo que produziu as lesões “em rede”, típicas da doença. Por outro lado, o autor observou níveis maiores de suscetibilidade nas mesmas plantas, quando inoculadas com o biótipo que provocou

lesões de tipo mancha. Em outro trabalho, Tekauz (1990) observou que as reações de cultivares de cevada ao patógeno, em condições naturais de infecção, mostraram-se mais efetivas para a diferenciação de genótipos, pois a severidade de doença pode ser superestimada quando avaliada sob condições artificiais de inoculação de patógeno.

Em relação aos tipos de reações de folhas de trigo a *P. tritici-repentis*, Lamari & Bernier (1989) constataram que, em câmara de crescimento e em plantas maduras no campo, as obtidas no estágio de duas folhas foram similares às de quatro a seis folhas. No trabalho, não observaram mudanças nos tipos de reações quando promoveram o aumento do período de molhamento pós-inoculação, e uma maior proporção de genótipos resistentes foi observada em espécies selvagens de trigo quando comparadas com espécies tetra e hexaplóides.

A suscetibilidade e resistência de plantas às doenças são governadas pela combinação de genótipos do hospedeiro e do patógeno e dependem de um complexo intercâmbio de sinais e respostas, que ocorre sob determinadas condições ambientais (Durner et al., 1997; Castro, 1999). Os genes de resistência funcionam como receptores, existindo evidências de interação física de proteínas elicitoras dos agentes patogênicos com proteínas receptoras do hospedeiro, em muitos casos ativando as vias de transdução de sinais, que podem levar à oxidação e à morte programada das células (Hahn, 1996; Jackson & Taylor, 1996; Hutcheson, 1998).

Há uma ampla variedade de genes de resistência induzidos nas plantas em resposta ao ataque de patógenos. O produto de muitos desses genes tem atividade antifúngica, tais como quitinases e β -1,3-glicanases, ou é envolvido na biossíntese de compostos com atividade antifúngica, incluindo fitoalexinas, e na constituição da parede celular, relacionado com a síntese de lignina. Um grupo desses genes, conhecidos por sintetizar

proteínas PR (“pathogenesis-related”), é induzido em diversas espécies de plantas em resposta à infecção por patógenos ou outros estresses (Van Loon et al., 1987; Cutt & Klessig, 1992).

Em interações gene-a-gene entre plantas e seus patógenos, a resistência é uma característica genética dominante ou semidominante na planta correspondente a um gene de avirulência (*Avr*) no patógeno (Afanasenko & Kushnirenko, 1989). Os genes *R*, em sua maioria: a) permitem à planta detectar moléculas específicas do patógeno (genes *Avr*); b) iniciar sinais de transdução para a ativação de genes de defesa; c) têm a capacidade de envolver, habilmente, novas especificidades de genes *R*. O isolamento de genes *R* tem revelado classes de seqüências de genes cujos produtos parecem ativar mecanismos similares de defesa. A descoberta da estrutura e *loci* de genes *R* propicia o entendimento de suas funções, devendo levar a novas estratégias para o controle de doenças (Hammond-Kosack & Jones, 1997).

Estes conceitos foram intensivamente discutidos por Flor (1955) e (1971), estudando o patossistema do linho - *Melampsora lini*. Desde então, muitos patologistas e geneticistas de plantas têm procurado conhecer os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos em patossistemas de seu interesse (De Wit, 1997).

Existem relatos de genes *R* codificados por proteínas citoplasmáticas, os genes *RPS1* e *RPS2*, de *Arabidopsis*, que conferem resistência a raças de *P. syringae* portadoras de *avRpt1* e *avRpm2* (Bent et al. 1994; Grant et al. 1995). Plantas de *Nicotiana tabacum* portadoras do gene *N* são resistentes à maioria das raças de TMV (“tobacco mosaic virus”) (Whithan et al., 1994) e o gene *Pto*, de tomate, confere resistência a *Pseudomonas syringae* pv. tomato (gene correspondente *avrPto*), sendo o primeiro gene “raça-específica” a ser isolado (Martin et al., 1993).

Há, também, genes *R* codificados por domínios de proteínas extra-citoplasmáticas, de que são exemplos o gene *Xa21*, de arroz, que fornece proteção contra mais de trinta raças distintas de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Song et al., 1995), e os genes *Cf-9*, *Cf-2*, *Cf-4* e *Cf-5*, de tomate, que conferem resistência a genes *avr* de *Cladosporium fulvum* (Van Den Ackerveken, Van Kan & De Wit, 1992). Por exemplo, os isolados de *C. fulvum* que expressam o *avr9* produzem um peptídeo, com o amino-ácido cisteína em localização específica, o qual pode ser isolado de folhas infectadas durante interações incompatíveis (Kooman-Gersmann et al., 1997).

Estudando a interação molecular do patossistema de trigo - *Pyrenophora tritici-repentis*, Zheng & Ballance (1994) constataram a expressão de gene PR na cv. de trigo Erik (resistente a *P. tritici-repentis*) e na linha 6B699 (suscetível). Após a inoculação, uma reação não específica de resistência foi observada na expressão de beta-1,3-glicanase (PR-2), quitinase (PR-3) e PAL (fenil-alanina-liase) na cultivar resistente e na suscetível. Os três genes apresentaram características de transcrição similares 8-16 h após a inoculação, com uma acumulação máxima de mRNA em 48 h. A transcrição de mRNA precedeu em 16 h o desenvolvimento de sintomas.

A cultivar de aveia Park, portadora de gene *Vb*, sensível à toxina hospedeiro-específica victorina de *Drechslera victoriae*, e a cv. Erbgraf, sem o gene *Vb*, reagem distintamente à infecção pelo fungo *D. victoriae*: em Park, uma fitoalexina de resistência antifúngica, a avenalumina 1, atingiu sua acumulação máxima em 12 h após a inoculação, com decréscimo após, ao passo que, em Erbgraf, houve baixa acumulação em 12 horas após a inoculação, aumentando após (Scharpff et al., 1994). Segundo o relato, a cv. Park exibiu sucessivos sintomas de clorose, amarelecimento, necrose e maceração, ao passo que Erbgraf exibiu somente lesões marrom-escuras. Esse sistema foi considerado viável para o estudo de efeitos causados por estresses bióticos e

abióticos em resistência potencial em folhas de aveia, determinada por níveis de fator avenalumina 1.

Estudos moleculares quanto à variabilidade genética de aveia e à influência do agente patogênico sobre a expressão do genótipo do hospedeiro poderiam contribuir para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na interação, auxiliando no melhoramento para a resistência à doença. Ainda, o conhecimento da localização dos genes de resistência no genoma da planta permitiria o desenvolvimento de marcadores para esses genes de interesse.

A técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) utilizando oligonucleotídeos de seqüência arbitrária abriu uma perspectiva inteiramente nova para a análise genômica de indivíduos de populações. Desde a sua descrição (Welsh & McClelland, 1990; Williams et al., 1990), o uso de marcadores RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) em análise genética e melhoramento de plantas tem tido uma difusão extremamente rápida. As aplicações incluem: a obtenção de “fingerprints” genômicos de indivíduos, variedades e populações; a análise de estrutura e de diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e de bancos de germoplasma; o estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies e, finalmente, a construção de mapas genéticos e a localização de genes de interesse econômico (Ferreira & Grattapaglia, 1995)

A técnica de RAPD, em combinação com o método BSA (“bulked segregant analysis”), auxiliou na identificação de três marcadores ligados ao gene dominante *Bls*, que confere resistência ao ascomiceto *Stegophora ulmea* (Schw. Fries) Sydow & Sydow, agente causal da mancha-negra das folhas de olmo (*Ulmus parvifolia* e *U. pumila*). A análise de progênie revelou que o gene que confere altos níveis de resistência à doença em híbridos interespecíficos de olmo tem associação significativa com os marcadores

ligados ao gene *Bls*, apesar de outros fatores genéticos poderem estar envolvidos na determinação fenotípica da resistência (Benet et al., 1995).

Haley (1993) identificou marcadores RAPD ligados ao gene de resistência a *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger var. *appendiculatus*, causador da ferrugem do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). A técnica RAPD mostrou-se útil para a seleção de genótipos assistida por marcadores moleculares e para a piramidização de genes de resistência em germoplasmas suscetíveis de feijoeiro.

Mehta (1999a) utilizou a técnica de análise de DNA ribossomal (rDNA) e a de RAPD na tentativa de avaliar diferenças genéticas em isolados de *D. avenae* causadores de manchas morfológicamente distintas em aveia, sugerindo a ocorrência de duas taxas distintas. Também investigando o rDNA, para correlacionar geneticamente isolados patogênicos de *Pyrenophora* spp. causadoras de manchas em cevada e em aveia, Stevens et al. (1998) constataram aproximadamente 17% de divergência na seqüência de região ITS1 em dois isolados de *P. avenae*, quando comparados com outras espécies de *Pyrenophora*.

A comparação dos procedimentos de análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA), de RAPD, de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) para a identificação de espécies de *Acinetobacter* e tipificação de *Acinetobacter baumannii*, resultou em menor poder discriminatório de espécies para ARDRA, ao passo que foram observados polimorfismos por RAPD e AFLP (Koeleman et al., 1998).

A principal limitação dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por loco. Essa limitação é descrita como “dominância” dos marcadores RAPD; apenas um alelo é detectado, o segmento que é amplificado, ao passo que as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como um alelo nulo. Por essa

técnica, os genótipos heterozigotos não podem ser diretamente discriminados dos homozigotos (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Por esse motivo, em estudos comparativos de marcadores RFLP e RAPD em espécies de crucíferas, com base em resultados de testes de hibridação de fragmentos RAPD, constatou-se que as duas técnicas são muito similares para avaliar relacionamentos intra-específicos, diferindo, no entanto, em relação aos interespecíficos (Thormann et al., 1994).

Estritamente, uma banda RAPD observada no gel só pode ser considerada um marcador de comportamento Mendeliano depois de verificada sua segregação de parentais para descendentes, pré-requisito necessário, em princípio, para todo e qualquer tipo de marcador molecular, como isoenzimas, RFLP ou outros (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Portanto, os estudos que objetivam a identificação de genes de resistência de plantas a patógenos, por meio de avaliação de polimorfismos de DNA por técnicas moleculares, devem ser seguidos de estudos de progênes de parentais e de posterior análise de segregação (F₂), a fim de se determinar a presença ou ausência desses genes nesses genótipos.

O DNA de um organismo codifica todas as moléculas de RNA e de proteínas necessárias para o metabolismo de suas células. A diferenciação celular é alcançada pela acúmulo de moléculas de RNA e de proteínas, resultantes da expressão de diferentes genes. O RNA, por sua vez, é uma molécula de ácido nucléico formada, geralmente, por uma só cadeia. A seqüência de bases é similar à do DNA, exceto pela substituição de desoxirribose por ribose e de timina por uracila. Bishop et al. (1974) constataram que aproximadamente 98% de espécies de mRNA correspondem a 0,01% e 0,001% de mRNA celular, razão pela qual são considerados raros. Os 2% restantes (aproximadamente 200-500) contribuem com mais de 50% do total da massa de

mRNA.

Existem muitas semelhanças entre a síntese de DNA e a de RNA. Entretanto, a função biológica de cada um desses processos é diferente: a síntese de DNA deve ser precisa e uniforme, ao passo que a transcrição espelha o estado fisiológico da célula e, portanto, é extremamente variável para atender às suas necessidades. Em outras palavras, a transcrição representa a diversidade e a complexidade de expressão de genes contidas em um determinado genoma (Schrank & Silva, 1996).

A expressão gênica diferencial ocorre em todas as fases de vida de um organismo, incluindo sua manutenção, desenvolvimento, injúria e morte. Em um sistema biológico particular, para a identificação de genes, é necessário o entendimento de sua função e também dos mecanismos moleculares a esses relacionados (Galindo et al., 1998).

A expressão diferencial de RNA (DD – “differential display” de RNA) (Liang & Pardee, 1992) é uma metodologia utilizada com esse propósito – identificar a expressão diferencial de genes de diversos sistemas eucariotos. As células expressam em torno de 15.000 genes e, a princípio, cada molécula de mRNA pode ser transcrita reversamente pela RT-PCR (“reverse transcription polymerase chain reaction”). O método compreende também a amplificação de fragmentos (cDNAs) pela PCR e, finalmente, a sua resolução em gel de seqüenciamento. É uma tecnologia de “fingerprinting” que facilita a identificação de mRNAs nas células ou tecidos, sendo útil para a identificação de alterações de funções das células resultantes de diferenças na transcrição ou na degradação de mRNA.

A “differential display” de RNA tem estimulado diversos trabalhos de investigação de regulação gênica. Aplicando essa técnica, Bertioli et al. (1995) identificaram diferenças de até 25% nos padrões de bandas entre tecidos de raízes e folhas de cevada não infectadas e infectadas por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

e de batata, por *Globodera rostochiensis*, tendo verificado em ambas dramáticas alterações fisiológicas ao ataque dos patógenos. Entretanto, apesar de extensiva análise com 65 combinações de “primers”, não encontraram diferenças na expressão de genes quando compararam plantas não infectadas com infectadas.

Essas limitações conduziram a estudos com o objetivo de aumentar a eficiência da técnica. Bauer et al. (1993), analisando o potencial da técnica em identificar diversas espécies de mRNA, teórica e experimentalmente, selecionaram uma coleção representativa de “primers” e observaram que a média de bandas por canaleta no gel limitou-se entre 70 e 140. Segundo constataram, muitos dos fragmentos apresentaram-se em duplicatas, ou mesmo em séries de três a quatro bandas de intensidades semelhantes, sugerindo representarem as duas fitas de um mesmo fragmento.

Na aplicação da técnica, outros parâmetros a serem considerados são os efeitos de temperatura de anelamento, concentrações de dNTPs e de magnésio. Bauer et al. (1993) testaram três "primers" e uma amostra de cDNA em diferentes condições de reações: temperatura de anelamento, entre 36 e 44 °C; concentrações de dNTP, entre 0,5 µM e 5,0 µM, e de magnésio, entre 1,0 e 5 mM. Em gel desnaturante de poli(acrilamida), observaram maior número de bandas entre 40 e 42 °C. Quanto à concentração ótima de magnésio, houve variações com os "primers", além de ter sido dependente da concentração de nucleotídeos, sendo 1,25 mM de MgCl₂ adequada a 2 µM de dNTPs. Dada a complexidade dos padrões observados, causada por uma diversidade de bandas derivadas de uma espécie de cDNA, os autores compararam essas condições de reações, “resolvendo” fragmentos em gel não desnaturante. A comparação de amostras idênticas de PCR nos dois sistemas mostrou complexidade claramente reduzida em gel não desnaturante.

Pelo nosso conhecimento, ainda não foram utilizadas técnicas moleculares ao nível de RNA no estudo de expressão diferencial de genes na interação de aveia com *D. avenae*. Neste cereal, foram identificados marcadores de DNA para resistência à ferrugem da folha (Chen et al., 2001), para qualidade física (Groh et al, 2001) e química (Kianian et al., 2000) do grão, entre outros. As tecnologias estão avançando rapidamente e deverá ocorrer em aveia o desenvolvimento de marcadores a partir de ESTs (“Expressed Sequence Tags”) expressas no genoma e de SNPs (“Single Nucleotide Polymorphism”), identificados pela comparação de diferentes indivíduos (Milach, 2002).

Existe uma reação diferenciada de cultivares de aveia a *D. avenae* (Delgado et al., 1990; Sebesta et al., 1996). Considerando-se que essas reações são determinadas pela expressão diferencial de genes, a caracterização de materiais brasileiros a isolados de *D. avenae* possibilitaria identificar fontes de resistência ao patógeno, fornecendo a base para estudos genéticos e a caracterização molecular da interação, tendo-se como meta a sua aplicação em programas de melhoramento.

O objetivo deste trabalho foi, portanto, estudar a variabilidade de cultivares e linhagens de aveia em relação a *D. avenae*, procurando identificar, biologicamente e em nível molecular, diferenças genéticas relacionadas com a resistência ao patógeno. Segundo nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho realizado com tal abordagem em relação ao patossistema aveia-*D. avenae*.

Os resultados deste trabalho serão apresentados em forma de artigos, sendo o primeiro (Capítulo II) relacionado à caracterização da resistência de aveia a *D. avenae*, o segundo (Capítulo III) ao estudo de expressão de genes de resistência ao patógeno e o terceiro (Capítulo IV) serão apresentadas as conclusões finais referentes aos dois artigos.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE CULTIVARES E LINHAGENS DE AVEIA (*Avena sativa*) À HELMINTOSPORIOSE (*Drechslera avenae*)

2.1 RESUMO

A helmintosporiose da aveia, causada por *Drechslera avenae*, é considerada um dos principais problemas fitopatológicos da cultura da aveia (*Avena sativa* L.). Na busca por alternativas de controle da doença, avaliaram-se e classificaram-se trinta genótipos de aveia quanto à resistência a *D. avenae*, inicialmente, sob condições de inoculação artificial em casa-de-vegetação e, após, no campo, sob condições naturais de infecção pelo patógeno. Em casa-de-vegetação, as cultivares foram inoculadas separadamente com três isolados do fungo, tendo-se quantificado a percentagem de área foliar com sintomas da doença (severidade) e o tipo de lesão. No campo, cultivares indicadas pela Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia foram avaliadas para a severidade da doença três vezes durante o desenvolvimento da cultura. A análise estatística dos dados demonstrou haver interações significativas entre os genótipos da planta e isolados do patógeno. Tendo-se por critério as reações das cultivares nas

condições testadas, classificaram-se como mais resistentes ao fungo OR 4, UFRGS 7, UFRGS 14, UFRGS 18 e UPF 19. Em relação às lesões provocadas pelo patógeno, predominaram nas plantas as do tipo resistente (R) e moderadamente resistente (MR). O conhecimento sobre a variabilidade genética de aveia na interação com *D. avenae* pode contribuir para o manejo da doença e para futuros estudos genéticos, a fim de gerar e desenvolver genótipos melhorados.

ABSTRACT

Evaluation the resistance of oat (*Avena sativa*) genotypes to helminthosporium leaf spot (*Drechslera avenae*)

The Helminthosporium leaf spot, caused by the fungus *Drechslera avenae*, is one of the main diseases of the oat crop (*Avena sativa* L.). In a search for disease control alternatives, thirty oat genotypes were evaluated and classified regarding their resistance to Helminthosporium leaf spot, initially in a greenhouse under artificial inoculation, and lately under field conditions and natural infection. In greenhouse, the cultivars were inoculated individually with each of three fungal isolates and later assessed for percent disease severity and type of lesion. In the field, several oat cultivars recommended by the “Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia” (Brazilian Committee for Oat Research) were examined for disease severity three times along the crop development. The data statistical analyses showed significant interactions between oat genotypes and fungal isolates. According to their reaction to the disease, the cultivars OR 4, UFRGS 7, UFRGS 14, UFRGS 18 and UPF 19 were considered more resistant. Most of the lesions caused by the disease were of the resistant (R) and moderate resistant (MR) types. This information on oats genetic variability to *D. avenae* may

improve disease management and enable future genetic studies focused on the development of better genotypes.

INTRODUÇÃO

As cultivares de aveia atualmente comercializadas no Brasil foram desenvolvidas a partir de germoplasma básico, introduzido na década de 70 pela “Quaker Oats International Nursery” (QQIN) (Augustin et al., 1999). Os programas de melhoramento genético de aveia buscam, entre outros, caracteres desejáveis relacionados com a fisiologia da planta e características físicas de qualidade de grãos, fortemente relacionadas com seu rendimento industrial (Pacheco et al., 1999).

O cultivo de aveia tem importante papel como alternativa à rotação de culturas no sistema de plantio direto, na utilização industrial de grãos para a alimentação humana e para o arraçamento de animais, especialmente cavalos de corrida (Floss, 1991). A manutenção de restos culturais de aveia com a introdução do plantio direto, no entanto, favoreceu a incidência de doenças causadas por fungos necrotróficos (Pacheco et al., 1999). Em aveia, entre as manchas foliares incitadas por fungos que desenvolveram essa estratégia de ataque, somente a helmintosporiose, causada por *Drechslera avenae* (Eidam) Sharif (teleomorfo *Pyrenophora avenae* Ito & Kurib.), teve sua incidência aumentada (Gough & McDaniel, 1974; Corazza et al., 1992; Reis & Soares, 1995; Blum et al., 1997).

Os sintomas iniciais da mancha foliar podem ser detectados após a emergência da planta, caracterizando-se por manchas elípticas ou lineares de cor palha, tornando-se posteriormente marrom-claras (Mehta, 1999) ou marrom-avermelhadas (Ellis, 1971). Com o progresso da doença, novas lesões aparecem nas folhas superiores, atingindo o

grão em formação. O desenvolvimento de manchas escuras nos grãos de aveia é correlacionado com a densidade de micélio de *D. avenae* em sua superfície, o que os desqualifica para o aproveitamento na indústria (Bocchese et al., 2001).

Lângaro (1998) constatou que o controle de *D. avenae* em sementes não impediu a transmissão do fungo para a parte aérea das plantas; tentativas de controle químico da doença no campo também se mostraram pouco eficazes na redução de inóculo em grãos e em sementes (Blum et al., 1996; Forcelini, 2002).

A utilização de cultivares resistentes e técnicas integradas de cultivo, como a rotação de culturas e população adequada de plantas hospedeiras, foram relatadas por vários autores como estratégias de controle da helmintosporiose (Delgado et al., 1990; Sebesta et al., 1995; Sebesta et al., 1996). No Brasil, pouco conhecimento tem sido gerado sobre a variabilidade genética de cultivares de aveia em relação à resistência ao fungo. O conhecimento dessa variabilidade e a identificação de novos genes, envolvidos com os mais variados mecanismos de defesa da planta, são desafios que abrem novas perspectivas para a obtenção de plantas resistentes ao patógeno.

O melhoramento para a resistência pode ser considerado um processo integrado, que requer o conhecimento da variabilidade de patógenos - e de reações de cultivares locais a esses para a identificação de genótipos resistentes-, o desenvolvimento de técnicas de seleção desses genes e sua transferência para cultivares comerciais (Camargo & Bergamin Filho, 1995; Douiyssi et al., 1998). Algumas vezes, torna-se necessária a busca por fontes de resistência em espécies selvagens ou em linhas avançadas, as quais requerem um programa de retrocruzamento (Innes, 1992). Vários pesquisadores tiveram sucesso nessa busca. Sebesta et al. (1995) citam os trabalhos realizados por Grachev (1962) e Kunowski & Breshkov (1981), nos quais foi encontrada resistência a *D. avenae* na cultivar “Iowa 2052 – Aigorudo”, selecionada de

“Garry” e de acessos de *A. byzantina*, *A. strigosa* e *A. brevis*. Em espécies selvagens de aveia, *A. sterilis* foi utilizada para obtenção de resistência à ferrugem da folha e do colmo (Frey, 1994; Rose & Scattini, 1994) e VNAC (Virose do Nanismo Amarelo da Cevada) (Frey, 1994); não foram, contudo, encontradas referências desta fonte para a resistência a *D. avenae*.

Avaliações de reações de trigo (*Triticum aestivum* L.) a *Pyrenophora tritici-repentis* (Died) Drechs e de cevada (*Hordeum vulgare* L.) a *P. graminea* (Ito & Kuribayashi) têm contribuído para estudos genéticos de resistência nessas culturas e para a adaptação das metodologias utilizadas a outros patossistemas (Tekauz, 1983; Cox & Hosford, 1987; Hahn et al., 1993). Quanto às reações de trigo a *P. tritici-repentis*, Lamari & Bernier (1989) constataram similaridades nas reações avaliadas no estágio de duas folhas, quando comparadas com o de quatro a seis folhas. De outro modo, plantas de cevada avaliadas para a reação a *Pyrenophora graminea* em três estádios de crescimento - de plântula, de perfilhamento e de espigamento - apresentaram níveis maiores de resistência no último estágio (Tekauz, 1986).

Em relação ao fungo, suas principais fontes de variabilidade são a mutação e a recombinação sexual. Corroborando esses processos, pode-se citar o “fluxo gênico” entre as populações, que dissemina os propágulos de uma área epidemiológica para outra (Burdon & Silk, 1997). Outras fontes de variabilidade são a parassexualidade, a heterocariose e fatores citoplasmáticos, conhecidos em fungos fitopatogênicos em particular (Azevedo, 1976).

Relatos de ocorrência de patótipos de *Drechslera teres* f. sp. *teres* (Sacc.) Shoem. (teleomorfo: *Pyrenophora teres* Drechs.), agente causal da mancha-em-rede da cevada (*Hordeum vulgare* L.) (Tekauz & Buchannon, 1977), de diferenças regionais na distribuição da virulência e no tipo de lesão produzida por isolados do fungo (Crill,

1977; Karki & Sharp, 1986) levaram a investigações sobre a herança da resistência à doença. Segundo Afanasenko & Kushnirenko (1989), estes estudos têm revelado a ação de um ou dois genes, dominantes ou parcialmente dominantes. Mais recentemente, Jonsson et al. (1997) identificaram, entre linhas de cevada, uma ampla variação de reações de resistência, separadas em quatro grupos: a) somente reações de resistência; b) reações diferenciais; c) somente reações intermediárias e d) somente reações suscetíveis.

O estudo de modo de ação e avaliação de número de genes envolvidos na resistência de genótipos de trigo hexaplóides à ação de filtrados tóxicos de *Helminthosporium sativum* também possibilitou a Barbieri et al. (1997) realizarem a separação dos genótipos em quatro grupos: resistente, moderadamente resistente, moderadamente suscetível e suscetível; o ambiente foi responsável por 50% da variação de respostas.

A suscetibilidade e a resistência de plantas às doenças dependem de um complexo intercâmbio de sinais e respostas que ocorrem sob determinadas condições ambientais. O reconhecimento molecular é, freqüentemente, caracterizado pela relação gene-a-gene, na qual um gene de resistência *R* específico na planta corresponde a um gene de avirulência (*avr*) no patógeno, o que resulta na ativação do sistema de defesa, podendo provocar a morte das células do hospedeiro e do patógeno (reação de hipersensibilidade) (Jackson & Taylor, 1996; Castro, 1999). Além da morte celular, a ativação de genes de defesa pode resultar no aumento da rigidez da parede celular a partir da via biossintética de fenilpropanoides, envolvidos na síntese de lignina e, entre outras, na ativação de genes responsáveis pela síntese de enzimas hidrolíticas, capazes de degradar componentes da parede celular do fungo (Keen, 1992; Leite & Roncato, 1997).

Considerando-se que essas reações de defesa são determinadas pela expressão diferencial de genes, a caracterização de materiais brasileiros a isolados de *D. avenae* pode possibilitar a identificação de fontes de resistência ao patógeno e, também, servir de base para a realização de estudos genéticos e moleculares da interação, tendo-se como meta a sua aplicação em programas de melhoramento. Este é o primeiro trabalho realizado no Brasil com esse objetivo.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

A fim de caracterizar a interação previamente descrita, conduziram-se três experimentos em casa-de-vegetação (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Trigo): nos Experimentos 1 e 2 foram avaliadas, respectivamente, as reações de 24 e 23 genótipos de aveia (preta-comum, cultivares e linhagens) a três isolados de *D. avenae* e, no Experimento 3, trinta genótipos de aveia a dois isolados do fungo.

Cultivares indicadas pela Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Aveia (Ensaio Brasileiro de Cultivares) também foram avaliadas para a percentagem de área foliar com sintomas da helmintosporiose no campo, sob condições naturais de infecção por *D. avenae* (Experimento 4). Vinte cultivares foram semeadas em junho de 2001 [adubação de 250 kg/ha de NPK (nitrogênio-fósforo-potássio) (5-25-25)] em área experimental da Faculdade de Agronomia da Universidade de Passo Fundo (UPF). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, em três repetições, sem e com duas aplicações de fungicida tebuconazole (750 ml/ha) na parte aérea, e esquema de avaliação de parcelas sub-divididas em três épocas. O fungicida foi aplicado após a primeira avaliação da severidade da doença no campo, tendo-se por objetivo proporcionar uma melhor distinção dos sintomas de *D. avenae*, a partir do controle da

ferrugem-da-folha da aveia (*Puccinia coronata* f. sp. *avenae* Eriks.), doença de ocorrência freqüente e destrutiva (Forcelini et al., 1993). Em cada parcela (4 linhas de 7 m de comprimento) dez plantas foram avaliadas em relação à severidade da doença, na segunda folha totalmente expandida.

2.4.1 Avaliação da doença sob condições de casa-de-vegetação

2.4.1.1 Isolamento do patógeno

Os isolados do patógeno foram obtidos a partir de sementes de aveia provenientes dos estados do Rio Grande do Sul (isolado da cultivar IAC-7, denominado IACRS), Santa Catarina (isolado da cv. UPF 17, denominado UPF17SC) e Paraná (isolado de aveia preta-comum, denominado PREPR). Para o isolamento do patógeno, as sementes foram desinfestadas [etanol a 50%, por 30 s; hipoclorito de sódio a 1%, por 45 s, e ADE (água destilada e esterilizada)] (Jonsson et al., 1997), distribuídas em placas de Petri contendo BSA (batata-sacarose-ágar) e incubadas a 20 °C em estufa BOD (Demanda Biológica de Oxigênio), sob fotoperíodo de 12 h, por sete dias. Após a germinação, foram identificados conídios do fungo em microscópio estereoscópio. Os isolados (polispóricos) do fungo foram repicados para placas com BSA e incubados nas condições previamente descritas. Acrescentou-se ADE nas placas, obtendo-se uma suspensão densa de esporos para cada isolado, a qual foi vertida em tubos de ensaio com papel-filtro, esterilizado e seccionado na forma de pequenos círculos (0,5 cm); os isolados foram conservados a 4 °C, até serem utilizados.

2.4.1.2 Obtenção de plantas-teste

Selecionaram-se linhagens e cultivares de aveia (*Avena sativa* L.; *A. strigosa* L.) desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento de Aveia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e da Universidade de Passo Fundo (UPF), entre outras indicadas pela Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Aveia.

A unidade experimental constituiu-se de um pote plástico (P-500, com terra e areia) no qual foram distribuídas dez sementes, em quatro repetições (Experimentos 1 e

2) e três repetições (Experimento 3), em delineamento completamente casualizado. Para cada cultivar, reservaram-se plantas que não foram inoculadas. Preliminarmente, foram inoculados diferentes isolados de *D. avenae* em “plantas-teste” com o objetivo de selecionar alguns isolados que diferissem na patogenicidade.

2.4.1.3 Inoculação do patógeno em cultivares de aveia

Secções de papel-filtro contendo esporos de *D. avenae* foram dispostas em meio V-8 (Fernandez, 1993). Para o incremento da esporulação do fungo, as placas foram incubadas a 20 °C em BOD equipada com luz negra (“NUV” - 310 nm a 400 nm) sob fotoperíodo de 12 h, por 12 dias. Após o período de incubação, acrescentaram-se 100 ml de ADE às colônias de *D. avenae* e, com o auxílio de um pincel, estas foram retiradas do meio de cultura, liquidificadas brevemente e filtradas. A seguir, quantificou-se o número de conídios (4x) em câmara de Neubauer. Após o cálculo da concentração, ajustou-se cada suspensão para 2×10^4 conídios/ml (Jonsson et al., 1997). Finalmente, adicionaram-se duas gotas (0,04 ml) de Tween 20 (“polyoxyethylene sorbitan monolaurate”) em 100 ml de suspensão de esporos (Faris et al., 1997).

As plantas, no estágio de plântula com duas folhas completamente expandidas (12-13 da escala de Zadoks et al., 1974), foram inoculadas (atomizador DeVilbiss), separadamente, com cada isolado do fungo. A seguir, juntamente com a testemunha, foram incubadas em câmara úmida a 20 °C, sob fotoperíodo de 12 h, por 72 horas; após, foram transferidas para casa-de-vegetação (Experimentos 1 e 2) e para o telado (Experimento 3), nos quais permaneceram por dez dias.

2.4.1.4 Severidade da doença

Após dez dias da inoculação, as plantas foram destacadas dos vasos e avaliadas quanto à percentagem de área foliar atacada pela doença (severidade) na segunda folha totalmente expandida, como proposto por Reis (1994), com modificações. Para o cálculo, utilizou-se a fórmula: $S=ANFD/TF$, na qual “ANFD” representa a área necrosada das folhas doentes em porcentagem (área necrosada na folha /área total da folha) e “TF”, o número total de folhas na amostra (sadias + doentes) (Reis, 1994).

O tipo de lesão foi avaliado pela escala de Lamari & Bernier (1989), para *P. tritici-repentis* (Died), com modificações, classificado de 1 a 4: 1 - resistentes (R); 2 moderadamente resistentes (MR); 3 moderadamente suscetíveis (MS) e 4 suscetíveis (S).

2.4.2 Avaliação da doença sob condições naturais de infecção

Durante o ciclo da cultura da aveia, foram feitas três avaliações da severidade da doença nas plantas (estádio 27 – 39, Zadoks et al., 1974), conforme previamente descrito (Reis, 1994), em intervalos de 7 a 10 dias (Tabela 2.8).

2.4.3 Análise de dados

Foi utilizada a análise de variância para verificar a interação dos isolados de *D. avenae* com as cultivares (Experimentos 1, 2 e 3) e o teste de Scott-Knott (5%) para a comparação de médias das cultivares entre os tratamentos (Experimentos 1, 2, 3 e 4). Para a correlação entre a severidade e o tipo de lesão, aplicou-se a análise de Pearson (5%); para a comparação dos genótipos quanto ao tipo de lesão (análise não-paramétrica), o teste de Kruskal-Wallis (5%) (Experimento 1).

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Avaliação da doença sob condições de casa-de-vegetação

Foram avaliadas em três experimentos, as reações de um total de 30 genótipos de aveia a três isolados de *D. avenae*. Nos três experimentos, foram evidenciadas especificidades entre isolados do patógeno com genótipos da planta, indicadas nas análises de variância por interações altamente significativas (1%) (tabelas 2.1; 2.3 e 2.5). As médias de severidade da doença foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (1974) e os genótipos da planta foram apresentados por grupos de reações aos isolados do fungo (Tabelas 2.2; 2.4 e 2.6). Por possuir poder elevado, taxas de erro tipo I quase sempre de acordo com os níveis nominais e por apresentar resultados com ausência de ambigüidade, Silva et al. (1999) recomendam o uso deste teste para procedimentos de comparações múltiplas de médias.

No experimento 1 (Tabelas 2.1 e 2.2), entre os genótipos testados com o isolado IAC7RS de *D. avenae*, destacaram-se como resistentes UFRGS 14 e UPF 7 e suscetíveis IAC 7, UFRGS 17 e UPF 15. Para o isolado UPF17SC foram resistentes CTC 5, UFRGS 7 e preta-comum; e suscetíveis ORLA 975 e UPF 17. Já para o isolado PREPR, foram resistentes UFRGS 15, UPF 18, UPF 15 e UFRGS 960257-5 e suscetíveis UPF 14 e UPF 16. Nesse experimento, o isolado IAC7RS foi o mais virulento.

Verificaram-se correlações significativas (Pearson 5%) entre a percentagem de área foliar com sintomas de helmintosporiose e o tipo de lesão nos seguintes genótipos: UPF 92151-5; UPF 16; UPF 17; ORLA 975; UFRGS 970486-3; CTC 5; UPF 15; UFRGS 910355; UFRGS 7; UFRGS 14; UFRGS 18; UPF 18 e UFRGS 960257-5

(Tabela 2.2).

Quanto ao tipo de lesão (Experimento 1, Tabelas 2.1 e 2.2), predominou a do tipo moderadamente resistente (MR), com algumas reações diferenciais de cultivares detectadas pelo teste de Kruskal-Wallis (5%): UFRGS 19 diferiu de UPF 18, UPF 15, UFRGS 970486-3, UFRGS 960257-5, UFRGS 16 e UFRGS 18; esta diferiu de UFRGS 910354, que, por sua vez, diferiu de UFRGS 16. A reduzida variação de sintomas da doença observada entre as cultivares de aveia dificultou a classificação baseada no tipo de lesão, técnica empregada por diversos autores para a avaliação de resistência (Larez et al., 1986; Lamari & Bernier, 1989). De outro modo, a inoculação de cultivares de trigo, incluindo espécies selvagens, com isolados de *P. tritici-repentis* resultou em vários tipos de lesões, com sintomas diferenciais de tecidos necróticos e cloróticos circundando o centro das mesmas (Lamari & Bernier, 1989). Não se observou clorose associada às lesões causadas por *D. avenae*.

Tabela 2.1. Análise de variância da percentagem (%) de área foliar com sintomas de helmintosporiose em genótipos de aveia inoculados com *Drechslera avenae*, Experimento 1. Passo Fundo, RS. 2000

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	Pr >F
Genótipos	23	22,73	0,00001
Isolados	2	384,43	0,00001
Genótipos*Isolados	46	47,74	0,00001
Resíduo	216	0,61	
Total	287		

Tabela 2.2. Percentagem (%) de área foliar com sintomas de helmintosporiose em genótipos de aveia inoculados com *Drechslera avenae*: isolado de cv. IAC 7, Rio Grande do Sul (IAC7RS); de cv. UPF 17, de Santa Catarina (UPF17SC), e preta-comum, Paraná (PREPR), Experimento 1. Passo Fundo, RS. 2000

Genótipos	Médias - Isolados			Médias
	IAC7RS	UPF17SC	PREPR	
UPF 92151-5	4,07 Eb	5,52 Ca	4,30 Bb	4,63*
UPF 14	5,80 Ca	2,60 Fb	5,12 Aa	4,51
UPF 16	6,10 Ca	2,17 Fc	4,85 Ab	4,37*
UPF 17	5,92 Ca	6,95 Ba	1,02 Fb	4,63*
ORLA 975	3,87 Eb	8,60 Aa	1,27 Fc	4,58*
UFRGS 19	3,20 Fb	5,87 Ca	2,62 Db	3,90
IAC 7	9,50 Aa	1,07 Hc	2,00 Eb	4,19
UFRGS 970486-3	4,70 Da	4,35 Da	1,60 Eb	3,55*
CTC 5	6,60 Ca	0,47 Ic	3,85 Bb	3,64*
UFRGS 930879-1	2,85 Fb	2,25 Fb	4,00 Ba	3,03
UFRGS 910354	3,50 Fa	3,32 Ea	1,90 Eb	2,90
UPF 15	8,25 Ba	1,55 Gb	0,85 Gc	3,55*
UPF 7	1,85 Gb	3,65 Ea	3,10 Ca	2,87
UFRGS 17	9,42 Aa	0,80 Hb	0,97 Fb	3,73
UFRGS 16	2,85 Fa	1,85 Fb	3,45 Ca	2,72
UFRGS 910355	4,67 Da	1,42 Gc	2,35 Db	2,81*
OR 2	2,65 Fa	2,45 Fa	2,85 Ca	2,65
UFRGS 15	5,40 Da	1,97 Fb	0,62 Gc	2,67
UFRGS 7	4,05 Ea	0,52 Ic	3,15 Cb	2,57*
UFRGS 14	0,62 Hc	5,60 Ca	1,25 Fb	2,49*
UFRGS 18	3,30 Fa	1,95 Fb	1,17 Fc	2,14*
UPF 18	5,07 Da	1,32 Gb	0,75 Gc	2,38*
UFRGS 960257-5	3,37 Fa	2,17 Fb	0,90 Gc	2,15*
PRETA	4,60 Da	0,60 Ic	1,52 Eb	2,24
Médias	4,41	2,50	2,11	3,29

C.V.= 7,91

Os dados foram transformados segundo arco seno da raiz de $x/100$.

Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

* Correlações de Pearson (5%) entre a percentagem de área foliar com sintomas de helmintosporiose e o tipo de lesão.

No experimento 2 (Tabelas 2.3 e 2.4), considerando-se o isolado IAC7RS destacaram-se como resistentes UFRGS 17, UPF 17 e UFRGS 910354, e suscetíveis IAC 7, UFRGS 16, preta comum e UFRGS 930879-1. Para o isolado UPF17SC foram resistentes UPF 17, UPF 15 e UPF 7 e suscetíveis IAC 7, UFRGS 910354, ORLA 975 e UFRGS 930879-1. Em relação ao isolado PREPR, foi resistente UFRGS 15 e suscetíveis preta-comum e IAC7, sendo o isolado do fungo denominado PREPR o mais

virulento.

Tabela 2.3. Análise de variância da percentagem (%) de área foliar com sintomas de helmintosporiose em genótipos de aveia inoculados com *D. avenae*, Experimento 2. Passo Fundo, RS. 2000

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	Pr >F
Genótipos	22	2,15	0,00001
Isolados	2	0,84	0,00001
Genótipos*Isolados	44	0,33	0,00001
Resíduo	207	0,23	
Total	275		

Tabela 2.4. Percentagem (%) de área foliar com sintomas de helmintosporiose em genótipos de aveia inoculados com *Drechslera avenae*: isolado de cv. IAC 7, Rio Grande do Sul (IAC7RS); de cv. UPF 17, de Santa Catarina (UPF17SC), e preta-comum, Paraná (PREPR), Experimento 2. Passo Fundo, RS. 2000

Genótipos	Médias - Isolados			Médias
	IAC7RS	UPF17SC	PREPR	
IAC 7	31,95 Ab	18,50 Ac	48,80 Aa	33,08
PRETA	21,17 Bb	08,77 Cc	51,50 Aa	27,15
UFRGS 930879-1	23,00 Ba	15,32 Ab	26,60 Ca	21,64
ORLA 975	15,52 Cb	16,25 Aa	35,90 Ba	22,56
UPF 92151-5	15,32 Cb	10,72 Bb	41,85 Ba	22,63
UFRGS 16	21,35 Ba	09,65 Cb	26,12 Ca	19,04
UPF 15	19,30 Cb	03,60 Ec	37,82 Ba	20,24
UFRGS 18	16,35 Cb	06,40 Dc	31,50 Ca	18,08
UPF 18	11,92 Db	10,37 Bb	30,00 Ca	17,43
OR 2	11,90 Db	07,07 Dc	33,62 Ca	17,53
UFRGS 910355	12,10 Db	07,15 Dc	30,10 Ca	16,45
UPF 16	07,55 Ec	11,55 Bb	29,50 Ca	16,20
UFRGS 970486-3	07,45 Eb	08,70 Cb	32,30 Ca	16,15
UFRGS 19	13,57 Db	06,60 Dc	25,45 Ca	15,20
UFRGS 14	09,60 Db	08,40 Cb	25,67 Ca	14,57
UFRGS 7	10,47 Db	06,10 Dc	29,27 Ca	15,28
CTC 5	16,02 Ca	05,80 Db	19,97 Da	13,93
UFRGS 910354	05,75 Fb	17,60 Aa	17,52 Da	13,62
UPF 14	11,15 Da	06,32 Db	14,50 Da	10,66
UFRGS 15	10,10 Da	12,87 Ba	07,75 Eb	10,24
UPF 7	08,50 Eb	04,37 Ec	17,72 Da	10,20
UPF 17	06,45 Fb	02,47 Ec	24,20 Ca	11,04
UFRGS 17	05,05 Fb	05,50 Db	18,72 Da	09,76
Médias	12,90	08,62	27,83	17,07
C.V = 3,42				

Os dados foram transformados segundo \log de $y + 10$.

Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Comparando-se as reações dos genótipos aos isolados testados nos Experimentos

1 e 2, foram observadas instabilidades de reações em diversos materiais, entre eles,

UPF 14, UPF 16, ORLA 975, IAC 7 e UFRGS 17.

Cultivares consideradas resistentes em um estudo científico podem ser moderadamente suscetíveis ou até suscetíveis em uma outra avaliação, variações que podem ser atribuídas a diferenças de escalas, às variações de temperatura, à virulência de isolados e, até mesmo, a fatores subjetivos, como o critério de avaliadores (Bronson & Scheffer, 1977; Lamari & Bernier, 1989). Lamari & Bernier (1994) demonstraram que temperaturas superiores a 27 °C causam, em plântulas de trigo, a perda de suscetibilidade a *P. tritici-repentis*, a qual pode ser correlacionada à perda da sensibilidade à toxina *Ptr*, causadora de necrose. Nos experimentos 1 e 2, em relação a temperatura na casa de vegetação, essa variou entre 20 e 30 °C, o que poderia justificar, pelo menos em parte, as instabilidades observadas nos materiais avaliados.

Sebesta et al. (1995) chamam a atenção para a cv. Pan de aveia: considerada resistente em um local em 1990 (moderada ocorrência da doença), foi moderadamente suscetível no mesmo local em 1991 (moderada ocorrência). Segundo os autores, isso ocorreu em virtude de diferenças entre as populações do patógeno.

Com o objetivo de estabelecer com maior segurança os critérios de classificação dos genótipos quanto à resistência a *D. avenae*, conduziu-se o Experimento 3 - nas mesmas condições descritas para os Experimentos 1 e 2, exceto que, após a inoculação, as plantas foram transferidas para o telado. Pôde-se, dessa maneira, controlar a magnitude de variação de temperaturas diurnas nas reações das cultivares ao patógeno. Neste experimento, a inclusão de seis cultivares de aveia (FAPA 4, OR 3, OR 4, UPF 19, URS 21, URS 22) possibilitou ampliar o “pool” gênico estudado frente ao patógeno. Observou-se uma maior uniformidade de reações em relação aos Experimentos 1 e 2, permitindo a separação dos materiais em somente dois grupos de

reações (Tabelas 2.5 e 2.6). Nas condições testadas foram considerados resistentes ao isolado UPF17SC os genótipos de aveia: CTC 5, IAC 7, OR 2, OR 4, ORLA 975, UPF 7, UPF 15, UPF 18, UPF 19, UPF 92151, UFRGS 7, UFRGS 14, UFRGS 15, UFRGS 17, UFRGS 18, UFRGS 19, UFRGS 930879 e UFRGS 970486. Já para o isolado PREPR foram resistentes FAPA 4, OR 4, UPF 15, UPF 16, UPF 18, UPF 19, UFRGS 14, UFRGS 18, UFRGS 910354, UFRGS 930879, e UFRGS 970486-3. Chamam a atenção as variações de respostas de alguns genótipos da planta quando confrontados com diferentes isolados do fungo, ou quando inoculadas com um mesmo isolado em experimentos realizados em épocas distintas. Estudos morfológicos, enzimáticos e de virulência de 108 isolados de *P. avenae* revelaram serem esses totalmente variáveis e instáveis, sugerindo a heterocariose como mecanismo de recombinação gênica (Bocchese et al., 2000), favorecedora do aparecimento de novas raças, o que poderia ser uma das causas destas variações.

Tabela 2.5. Análise de variância da percentagem (%) de área foliar com sintomas de helmintosporiose em genótipos de aveia inoculados com *Drechslera avenae*, Experimento 3. Passo Fundo, RS. 2001

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	Pr >F
Genótipos	29	57,53	0,00001
Isolados	1	539,10	0,00001
Genótipos*Isolados	29	45,29	0,00010
Resíduo	120	16,43	
Total	179		

Tabela 2.6. Percentagem (%) de área foliar com sintomas de helmintosporiose em 30 genótipos de aveia inoculados com *Drechslera avenae*: isolado de cv. UPF 17, Santa Catarina (UPF17SC) e preta-comum, Paraná (PREPR), Experimento 3. Passo Fundo, RS. 2000

Genótipos	Médias - Isolados		Médias ¹
	UPF17SC	PREPR	
URS 20	20,00 Aa	11,33 Ab	15,67
UPF 20	13,00 Aa	11,00 Aa	12,00
UFRGS 17	5,67 Bb	16,67 Aa	11,17
IAC 7	4,00 Bb	17,83 Aa	10,97
UPF 17	7,58 Ab	14,00 Aa	10,79
UPF 14	7,50 Aa	14,00 Aa	10,75
OR 3	10,83 Aa	9,67 Aa	10,25
UFRGS 7	6,33 Bb	13,17 Aa	9,75
URS 21	10,16 Aa	9,00 Aa	9,58
CTC 5	4,37 Bb	13,33 Aa	8,85
UFRGS 16	6,67 Aa	10,67 Aa	8,67
URS 22	7,50 Aa	9,67 Aa	8,58
UFRGS 19	3,67 Bb	13,18 Aa	8,42
OR 2	6,17 Ba	10,67 Aa	8,42
Preta-comum	8,33 Aa	8,50 Aa	8,42
UPF 7	5,17 Ba	11,18 Aa	8,17
ORLA 975	4,00 Bb	11,67 Aa	7,83
UPF 16	8,00 Aa	6,67 Ba	7,33
OR 4	5,83 Ba	7,67 Ba	6,75
UFRGS 15	1,90 Bb	11,00 Aa	6,49
UPF 18	5,17 Ba	7,67 Ba	6,42
FAPA 4	10,33 Aa	2,47 Bb	6,40
UPF 92151	3,17 Bb	8,67 Aa	5,92
UFRGS 910354	7,50 Aa	3,50 Ba	5,50
UPF 19	3,00 Ba	7,00 Ba	5,00
UFRGS 14	4,33 Ba	5,50 Ba	4,92
UFRGS 930879	5,00 Ba	3,83 Ba	4,42
UPF 15	2,50 Ba	5,00 Ba	3,75
UFRGS 18	1,75 Ba	5,33 Ba	3,54
UFRGS 970486-3	2,17 Ba	2,50 Ba	2,33
Médias	6,38	9,41	7,90
C.V = 26,19			

Os dados foram transformados segundo arco seno da raiz de $x/100$.

Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Interações significativas entre cultivares de aveia com populações de *Pyrenophora avenae* e de *Helminthosporium victoriae* (Meehan & Murphy, 1946) indicam existir especialização do patógeno ao hospedeiro e foram relatadas por diversos autores (Tveit, 1956; Pandey & Misra, 1973; Sebesta et al., 1995). Essa especialização, segundo Parlevliet (1997) pode provocar a ocorrência de efeitos de

resistência raça específica (qualitativa) em genótipos caracterizados como tendo resistência não específica-à-raça (quantitativa) quando estes são testados com diferentes genótipos do patógeno. Em patossistema semelhante, a resistência de trigo a *P. tritici-repentis* foi relatada por Lamari & Bernier (1989) sendo de herança qualitativa e por Elias et al. (1989) quantitativa.

A utilização de isolados polispóricos de *D. avenae* dificultou o entendimento quanto às especificidades entre os isolados do fungo e os genótipos da planta e a interpretação de como ocorre o controle genético da resistência em aveia. Esse fato pode ter contribuído, também, para a instabilidade de respostas de alguns materiais aos isolados do fungo. Por outro lado, pôde-se identificar materiais, como por exemplo UFRGS 18 e UFRGS 970486-3, que apresentaram uma maior estabilidade de reações aos diferentes isolados ou, considerando-se a magnitude de variações fenotípicas, expressaram reações intermediárias. Avaliações conjuntas dos genótipos de aveia, para a análise de expressão de resistência, em diferentes condições ambientais podem contribuir para identificar com maior segurança o tipo de resistência envolvido no patossistema.

2.4.2 Avaliação da doença sob condições naturais de infecção

As condições meteorológicas do período em que a cultura se desenvolveu no campo não favoreceram o desenvolvimento da doença, resultando em baixos níveis de severidade. Apesar disso, os resultados foram considerados nesse estudo, tendo-se em vista que o maior dano associado à helmintosporiose é a redução da qualidade de grãos e sementes, o que ocorre mesmo com baixa intensidade da moléstia no campo (Forcelini, 2002).

No campo, também puderam ser observadas respostas diferenciais significativas entre as cultivares quanto à severidade da doença (Experimento 4, Tabelas 2.7 e 2.8), constatadas mais por diferenças no número de lesões por folha do que pela variação de tamanho ou tipo de lesões. Lesões características da helmintosporiose desenvolveram-se mais lentamente nas folhas do que em condições artificiais de inoculação pelo fungo (Experimentos 1, 2 e 3). À semelhança com aveia - *D. avenae*, Khan & Boyd's (1969) observaram que plantas de cevada mais desenvolvidas tendem a ser mais resistentes a *P. teres* quando comparadas com plantas mais jovens, ocorrendo um aumento de resistência com o desenvolvimento da planta em cultivares anteriormente classificadas como suscetíveis. Também nessa espécie, Tekauz (1990) observou que as reações a *Pyrenophora graminea*, em condições naturais de infecção, mostraram-se mais efetivas para a diferenciação de genótipos, pois a severidade de doença pode ser superestimada quando avaliada sob condições artificiais de inoculação do patógeno.

Nas cultivares avaliadas no campo, também predominaram as lesões do tipo resistente (R) a moderadamente resistente (MR), observando-se, raramente, lesões do tipo moderadamente suscetível (MS) e suscetível (S). Após a terceira avaliação, o aumento da ferrugem-da-folha da aveia, apesar do tratamento com tebuconazole, dificultou a distinção dos sintomas da helmintosporiose, impedindo avaliações subseqüentes. Considerando-se a análise conjunta das vinte cultivares com e sem tratamento com fungicida, nas três avaliações no campo, destacaram-se como resistentes UFRGS 14, UFRGS 15 e UFRGS 18; as cultivares suscetíveis foram IAC 7, UPF 20, UPF 17, FAPA 4 e UPF 16 (Tabela 2.8).

Quanto à época de avaliação, houve um aumento significativo de severidade da doença da primeira para a segunda, sendo que para alguns genótipos houveram reduções de severidade na terceira avaliação. Em relação à aplicação de tebuconazole, houve

redução significativa da severidade da doença tanto na segunda como na terceira época, o que não dependeu do genótipo avaliado (Tabela 2.9).

Tabela 2.7. Análise de variância da porcentagem (%) de área foliar com sintomas de helmintosporiose em genótipos de aveia sob condições naturais de infecção por *Drechslera. avenae*, Experimento 4. Passo Fundo, RS. 2001

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio	Pr >F
Genótipos	19	4,90	0,00001
Fungicida	1	47,31	0,00001
Genótipos*Fungicida	19	0,17	0,9547
Erro a	78	0,33	
Época de avaliação	2	26,28	0,0023
Erro b	4	0,66	
Época de avaliação*Genótipos	38	0,52	0,0081
Época de avaliação*Fungicida	2	10,58	0,00001
Época de avaliação *Genótipo*Fungicida	38	0,17	0,9762
Erro c	158	0,29	
Total	359		

Tabela 2.8. Porcentagem de área foliar (%) com sintomas de helmintosporiose em cultivares indicadas de aveia (Ensaio Brasileiro de Cultivares), sem e com duas aplicações de 750 ml/ha de tebuconazole, sob condições naturais de infecção por *Drechslera avenae*, Experimento 4. Passo Fundo, RS. 2001

Genótipos	Épocas de avaliação			Fungicida		Média
	1	2	3	com	sem	
IAC 7	1,17 c	3,50 a	2,83 b	2,00 ns	2,99 ns	2,50 A
UPF 20	1,33 c	3,17 a	2,17 b	1,89	2,55	2,22 A
UPF 17	1,75 a	2,50 a	2,17 a	1,89	2,39	2,13 A
FAPA 4	0,91 b	2,83 a	2,33 a	1,67	2,39	2,02 A
UPF 16	1,50 b	2,67 a	1,83 b	1,55	2,44	2,00 A
OR 2	1,25 c	2,17 a	1,75 b	1,27	2,18	1,72 B
UPF 18	1,25 b	2,17 a	1,67 b	1,44	1,96	1,69 B
UFRGS 19	0,83 b	1,83 a	1,50 a	0,89	1,89	1,38 C
URS 20	1,00 a	1,66 a	1,50 a	0,94	1,83	1,38 C
URS 21	0,75 b	1,92 a	1,42 a	1,00	1,72	1,36 C
UPF 19	0,92 a	1,50 a	1,50 a	0,83	1,78	1,30 C
UFRGS 16	0,92 b	1,75 a	1,25 b	0,95	1,67	1,30 C
OR 3	0,92 a	1,33 a	1,58 a	0,78	1,78	1,27 C
OR 4	1,00 a	1,33 a	1,17 a	0,89	1,45	1,16 C
UPF 15	0,75 a	1,42 a	1,17 a	0,78	1,45	1,11 C
UFRGS 17	0,75 a	1,33 a	1,00 a	0,67	1,39	1,02 C
URS 22	0,50 b	1,42 a	1,17 a	0,67	1,39	1,02 C
UFRGS 18	0,75 a	1,17 a	0,75 a	0,66	1,10	0,88 D
UFRGS 15	0,33 a	1,08 a	0,67 a	0,50	0,89	0,69 D
UFRGS 14	0,33 a	0,75 a	0,75 a	0,33	0,89	0,61 D
Médias	0,95	1,87	1,51	1,08 b	1,80 a	1,44

C.V. parcela = 40,23

C.V. subparcela = 56,25

C.V. sub-subparcela = 37,62

Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.
ns = não significativo. 1, 2 e 3: primeira (02/08), segunda (15/08) e terceira (21/08/2001) avaliações da percentagem (%) de área foliar atacada por *D. avenae*.

Tabela 2.9. Percentagem (%) de área foliar com sintomas de helmintosporiose de cultivares indicadas de aveia (Ensaio Brasileiro de Cultivares), sem e com duas aplicações de 750 ml/ha de tebuconazole, sob condições naturais de infecção por *Drechslera avenae*, em três épocas de avaliação. Experimento 4. Passo Fundo, RS. 2001

Época de avaliação	Médias – Fungicida		Médias
	com	Sem	
02/08/2001	0,92 a	0,97 a	0,94
15/08/2001	1,32 b	2,43 a	1,87
21/08/2001	1,00 b	2,02 a	1,50
Médias	1,08b	1,80 ^a	1,44
C.V. = 37,62			

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Para fins práticos, apesar da complexidade observada, os genótipos de aveia foram classificados tendo-se por critério à sua reação à maioria dos isolados de *D. avenae* testados (Experimentos 1, 2 e 3), sendo consideradas as reações daqueles que foram, também, testados no campo (Experimento 4). Classificaram-se como resistentes (R) a moderadamente resistentes (MR) OR 4*, UFRGS 7, UFRGS 14, UFRGS 18 e UPF 19*; moderadamente resistentes (MR) a moderadamente suscetíveis (MS) CTC 5, OR 2, OR 3*, preta-comum, UFRGS 15, UFRGS 16, UFRGS 17, UFRGS 19, UFRGS 910354, UFRGS 930879, UFRGS 970486-3, UPF 7, UPF 14, UPF 15, UPF 16, UPF 17, UPF 18, URS 20*, URS 21* e URS 22*; e moderadamente suscetíveis (MS) a suscetíveis (S) FAPA 4*, IAC 7, ORLA 975, UPF 20* e UPF 92151.

No que se refere a metodologia aplicada nos experimentos de casa-de-vegetação, a utilização de isolados monospóricos de *D. avenae* na obtenção de inóculo para os testes de cultivares, poderia resultar em uma maior reprodutibilidade nas reações, mas deve-se considerar a possibilidade de ocorrência de heterocariose (coexistência de dois núcleos geneticamente distintos em uma única hifa), o que pode levar ao aparecimento

* genótipos de aveia testados somente no experimento 3 e 4 (tabelas 2.6 e 2.8).

de novos genótipos do fungo (Matsumura, 1991; Valim-Labres et al., 1997).

Sugere-se, também, a busca de outras fontes de resistência à doença em germoplasma selvagem de aveia, isto é, não cultivado, como por exemplo *A. sterilis*, utilizada na resistência à ferrugem da folha e do colmo (Rose & Scattini, 1994) e a VNAC (Frey, 1994) e ainda não estudada como fonte de resistência a *D. avenae*.

A análise de resultados evidenciou a complexidade envolvida na interação estudada. Fatores críticos como a temperatura e a umidade nos testes de patogenicidade desempenham papel importante desde os primeiros estágios da patogênese até o pleno estabelecimento do fungo na planta e devem ser controlados com maior rigor em estudos futuros.

Em um aspecto mais amplo da cultura no campo, deve-se considerar, também, que a escolha de cultivares, de práticas culturais ou de outras medidas que possam intervir na interação, podem levar a mecanismos de retroação positiva ou negativa da população do patógeno e, conseqüentemente, no processo da doença (Camargo & Bergamin Filho, 1995).

Há, portanto, a necessidade de se ampliar o conhecimento sobre o processo da doença, que envolve vários ciclos superpostos de infecção do fungo na planta. Informações sobre reações diferenciais de cultivares em relação ao período de latência e esporulação do patógeno também podem contribuir para elucidar os mecanismos genéticos envolvidos na resistência e auxiliar no manejo da doença.

CAPÍTULO III

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE mRNAs EM CULTIVARES E LINHAGENS DE AVEIA EM RESPOSTA À HELMINTOSPORIOSE (*Drechslera avenae*)

3.1 RESUMO

Drechslera avenae, forma anamórfica de *Pyrenophora avenae*, vem gradativamente aumentando a sua frequência em aveia (*Avena sativa* L.), sobretudo em áreas em monocultura e plantio direto. O controle da doença é difícil, e as técnicas atualmente disponíveis têm se mostrado pouco eficientes. Por essa razão, o conhecimento da interação aveia-*D. avenae*, em nível molecular, pode contribuir para a compreensão dos mecanismos pelos quais os produtos gênicos são transcritos, de suas prováveis funções, e o conhecimento de seqüências no genoma da planta que modulam sua expressão pode levar a novas estratégias para o controle da doença. Para a caracterização molecular da interação, cinco genótipos de aveia (CTC 5, ORLA 975, preta-comum, UFRGS 18 e UPF 17), não inoculados e inoculados com dois isolados do fungo, foram investigados para a análise de expressão diferencial de genes em 12, 24 e 72 h após a inoculação. A partir do RNA total extraído das plantas submetidas aos tratamentos, foram realizadas a síntese de cDNA (RT-PCR), o isolamento de cDNAs expressados diferencialmente e a produção de sondas para verificar mRNAs induzidos,

os quais foram hibridizados por meio de “Southern blot” e “Reverse Northern”. Foram observadas diferenças na expressão de genes entre plantas saudas e infectadas, evidenciadas pelo acúmulo de mRNA 72 h após a sua inoculação com os isolados do fungo. Foram obtidos sete fragmentos de cDNAs relacionados à interação com *D. avenae*, os quais foram comparados com seqüências depositadas no banco de dados do Genbank. Pela análise de “Reverse Northern”, pôde-se identificar um cDNA, denominado E3-IFCO, relacionado com a resposta de defesa da planta.

3.2 ABSTRACT

Differential expression of mRNAs in oat genotypes in response to helminthosporium leaf spot (*Drechslera avenae*)

The helminthosporium leaf spot, caused by fungus *Drechslera avenae*, the anamorphic stage of *Pyrenophora avenae*, is increasing its occurrence in oats (*Avena sativa* L.), especially in areas under monoculture and no tillage. The control strategies available for this disease are not reliable technically, which makes disease control very difficult. The knowledge of how oats and *D. avenae* interact at the molecular level can elucidate the transcription of some gene products and their most probable functions. Also, the knowledge of plant genetic sequences that model gene product expression can lead to new disease control strategies. These molecular studies included five oat genotypes (CTC 5, ORLA 975, preta-comum, UFRGS 18 and UPF 17), which were inoculated or not with fungal isolates and examined for gene differential expression after 12, 24, and 72 hours post inoculation. The total RNA extracted from the treated (inoculation vs. time) plants was used for syntheses of cDNA (RT-PCR), isolation of

differentially expressed cDNAs, and for production of probes to verify induced mRNAs, which were hybridized by means of “Southern blot” and “Reverse Northern”. The amount of mRNA accumulated 72 hours after inoculation indicates differences in gene expression between healthy and diseased plants. There were seven cDNAs fragments related to the interaction with *D. avenae*, which were then compared to others available in the Genbank data bank. Through “Reverse Northern” analyses, a cDNA (E3-IFCO) related in plant defense response was identified.

3.3 INTRODUÇÃO

O gênero *Avena* compreende uma série poliplóide de 31 espécies, selvagens, invasoras e cultivadas, com quatro e cinco combinações genômicas e o número básico de sete cromossomos (Leggett & Thomas, 1995). Na agricultura, *A. sativa* constitui-se em espécie alternativa nos atuais sistemas produtivos e é cultivada principalmente com o propósito de produzir grãos para a alimentação humana e animal (Floss, 1991).

No sul do Brasil, em razão de prejuízos atribuídos às ferrugens da folha e do colmo (*Puccinia coronata* f. sp. *avenae* Eriks e *P. graminis* f. sp. *avenae* Eriks e E. Henn), os programas de melhoramento genético de aveia têm priorizado a seleção de genótipos resistentes a esses patógenos (Federizzi et al., 2000). Nas últimas décadas, no entanto, a manutenção de restos culturais de aveia com a introdução do plantio direto favoreceu o aumento da incidência da helmintosporiose, causada por *Drechslera avenae* (Eidam) Sharif (teleomorfo *Pyrenophora avenae* Ito & Kurib.) (Gough & McDaniel, 1974; Arora et al., 1978; Corazza et al., 1992; Reis & Soares, 1995; Pacheco et al., 1999). Sob condições ambientais favoráveis, o patógeno é transmitido das sementes e restos culturais infectados para os órgãos aéreos da planta até atingir as

brácteas e panículas e se estabelecer nos grãos, causando danos expressivos em sua qualidade (Forcelini & Reis, 1997). Os estudos relacionados à helmintosporiose têm indicado o tratamento químico de sementes somente em cultivos destinados à produção de sementes; já na parte aérea o tratamento com os fungicidas disponíveis tem se mostrado pouco eficazes na redução de inóculo em grãos e sementes (Blum et al., 1996; Lângaro, 1998; Forcelini, 2002).

Na busca por alternativas de controle da doença, o conhecimento da interação aveia-*D. avenae* em nível molecular pode contribuir para a compreensão dos mecanismos pelos quais os produtos gênicos são transcritos, suas prováveis funções, e o conhecimento de seqüências no genoma da planta que modulam sua expressão pode levar a novas estratégias para o controle da doença.

As relações gene-a-gene entre plantas e patógenos foi intensivamente discutida por Flor (1971). Estudando o patossistema do linho - *Melampsora lini*, Flor (1955) identificou no fungo genes recessivos de avirulência (*Avr*), complementares aos genes dominantes de resistência (*R*) no linho. Desde então, muitos patologistas e geneticistas de plantas têm procurado conhecer os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos em patossistemas de seu interesse.

Há uma ampla variedade de genes de resistência induzidos nas plantas em resposta ao ataque de patógenos. Muitos desses genes têm atividade antifúngica, tais como quitinases e β -1,3-glucanases, ou são envolvidos na biossíntese de fitoalexinas e lignina. Um grupo desses genes, conhecidos por sintetizar proteínas PR (“pathogenesis-related”), é induzido em diversas espécies de plantas em resposta à infecção por patógenos ou outros estresses (Van Loon et al., 1987; Cutt & Klessig, 1992; Wubben et al., 1996).

A expressão de genes que codificam para “PRs” também foi constatada por Zheng & Ballance (1994) na cultivar (cv.) Erik, resistente a *Pyrenophora tritici-repentis*, e na linha 6B699, suscetível ao patógeno. Após a inoculação com o fungo, uma reação não específica de resistência foi observada na expressão de beta-1,3-glucanase (PR-2), quitinase (PR-3) e PAL (fenil-alanina-liase) na cultivar resistente e na suscetível. Os três genes apresentaram acúmulo de mRNA em 8-16 h após a inoculação, atingindo seu máximo em 48 horas. O acúmulo de mRNA precedeu em 16 h o desenvolvimento de sintomas.

Valè et al. (1994) observaram a ativação de uma série específica de genes de plantas quando inocularam raízes de cevada com isolados de *Drechslera graminea*. A resistência de cevada ao patógeno é controlada por interações dos tipos “raça-específica” e “não-específica”. A análise “Northern blot” permitiu a detecção de três famílias de mRNAs em resposta à inoculação com o fungo e a sua clonagem, de padrões específicos de expressão de genes que codificam para os produtos com ação antimicrobiana: peroxidase, tionina e proteínas TL (“thaumatin-like proteins”).

A cv. de aveia Park, portadora de gene Vb, sensível à toxina hospedeiro-específica "victorina" de *Drechslera victoriae*, e a cv. Erbgraf, sem o gene Vb, reagem distintamente à infecção pelo fungo: na cv. Park, uma fitoalexina de resistência antifúngica (avenalumina 1), atinge a acumulação máxima em 12 h, com decréscimo após, ao passo que, na cv. Erbgraf, tem baixa acumulação em 12 h, aumentando após (Scharpff et al., 1994).

Em relação a *Drechslera avenae*, iniciaram-se nos últimos anos, principalmente no sul do Brasil, estudos relacionados sobretudo aos aspectos epidemiológicos da doença, variabilidade, patogenicidade e controle químico do patógeno (Blum et al., 1996; Lângaro, 1998; Bocchese & Martinelli, 1999; Rezera et al., 2000). Contudo, são

poucos os que envolvem técnicas de DNA recombinante, como o de Bakonyi et al. (1995), no qual foram comparadas por RAPD (“Random amplified polimorphic DNA”) diversas espécies de *Bipolaris*, *Drechslera* e *Exserohilum*, e de Mehta (1999), que, além desta técnica, utilizou a análise de DNA ribossomal (rDNA) para avaliar a variabilidade genética de isolados de *D. avenae* causadores de manchas morfológicamente distintas em aveia.

Também investigando o rDNA para correlacionar geneticamente isolados patogênicos de *Pyrenophora* spp., Stevens et al. (1998) observaram divergências na seqüência de região ITS1 em dois isolados de *P. avenae*, quando comparados com outras espécies de *Pyrenophora*.

Considerando-se a relevância desses estudos, no entanto, constata-se que poucas estratégias têm sido conduzidas para o entendimento da interação aveia - *D. avenae*. Bibliotecas de cDNAs relacionadas a genes específicos envolvidos nas principais culturas, tais como milho, tomate, arroz, trigo, soja e feijão, entre outras, são, em geral, disponíveis. Em aveia, contudo, não se tem conhecimento de uma biblioteca de cDNAs específicas para genes relacionados à resistência a *D. avenae*, o que auxiliaria os programas de melhoramento na obtenção de cultivares resistentes.

Um aspecto importante a considerar em estudos genéticos para resistência a moléstias é que a maioria dos marcadores moleculares usados são neutros em relação a efeitos fenotípicos, com mínimo ou nulo efeito epistático ou pleiotrópico. Na sua maioria, os marcadores são co-dominantes, contendo maior quantidade de informação genética por loco; os morfológicos, por sua vez, são, em sua maioria, dominantes ou recessivos (Stuber, 1992).

A maioria das proteínas numa célula é produzida em quantidades que não podem ser detectadas pela maioria das técnicas de eletroforese. No entanto, os mRNAs que

codificam para essas proteínas, mesmo em quantidades mínimas, podem ser detectados por técnicas mais sensíveis. Trabalhos recentes relatam o uso de “differential display” de RNA como ferramenta para estudos de expressão gênica diferencial, fenômeno que ocorre em todas as fases de vida de um organismo interagindo com o ambiente (Liang & Pardee, 1992; Welsh et al., 1992). A técnica, segundo estes autores, é sensível e rápida para a identificação de alterações funcionais resultantes de diferenças na transcrição ou degradação de mRNA.

O presente estudo objetiva caracterizar, em nível molecular, a interação de cultivares de aveia com *D. avenae*, tendo por meta identificar genes na planta relacionados com a resistência ao patógeno. Segundo nosso conhecimento, é o primeiro trabalho realizado com esta abordagem neste patossistema.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Obtenção de amostras

Para o estudo de expressão diferencial de genes, foram selecionados cinco genótipos da planta: UFRGS 18 (resistente, R, a moderadamente resistente, MR); preta-comum (MR a moderadamente suscetível, MS); CTC 5 (MR a MS); UPF 17 (MR a MS); e ORLA 975 (MS a suscetível, S); e dois isolados do fungo, IAC7RS e UPF17SC.

A unidade experimental constituiu-se de um pote plástico (P-500, com terra e areia) no qual foram distribuídas dez sementes. Para cada cultivar, reservaram-se plantas que não foram inoculadas.

O isolado do patógeno denominado IAC7RS foi obtido a partir de sementes de aveia da cv. IAC-7 proveniente de lavouras do Rio Grande do Sul (RS) e o isolado UPF17SC, da cv. UPF 17, de Santa Catarina (SC). Para o isolamento do patógeno, as

sementes foram desinfestadas [etanol (50%), por 30 s; hipoclorito de sódio (1%), por 45 s, e ADE (água destilada e esterilizada)] (Jonsson et al., 1997), distribuídas em placas de Petri contendo BSA (batata-sacarose-ágar) e incubadas a 20 °C em estufa BOD (Demanda Biológica de Oxigênio), sob fotoperíodo de 12 h, por sete dias. Após a germinação, foram identificados conídios do fungo em microscópio estereoscópio. Para a obtenção de culturas puras do fungo, isolados (polispóricos) foram repicados para placas com BSA e incubados nas condições anteriormente descritas. Acrescentou-se ADE nas placas, obtendo-se uma suspensão densa de esporos para cada isolado, a qual foi vertida em tubos de ensaio com papel-filtro, esterilizado e seccionado na forma de pequenos círculos (0,5 cm); os isolados foram conservados a 4 °C, até serem utilizados.

Secções de papel-filtro contendo esporos de *D. avenae* foram dispostas em meio V-8 (Fernandez, 1993). Para o incremento da esporulação do fungo, as placas foram incubadas a 20 °C em BOD equipada com luz negra (“NUV” - 310 nm a 400 nm) sob fotoperíodo de 12 h, por 12 dias. Após o período de incubação, acrescentaram-se 100 ml de ADE às colônias de *D. avenae*, que foram retiradas do meio de cultura, liquidificadas brevemente e filtradas. A seguir, quantificou-se o número de conídios (4x) em câmara de Neubauer, ajustando-se cada suspensão para 2×10^4 conídios/ml (Jonsson et al., 1997). Finalmente, adicionaram-se duas gotas (0,04 ml) de Tween 20 (“polyoxyethylene sorbitan monolaurate”) / 100 ml de suspensão de esporos (Faris et al., 1997).

As plantas foram inoculadas separadamente, dez dias após a semeadura, com os dois isolados do fungo, com exceção da testemunha, sem tratamento. As partes aéreas das plantas foram coletadas 12, 24 e 72 horas após a inoculação, sendo imersas em

nitrogênio líquido e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem utilizadas. O experimento foi repetido três vezes (E1; E2 e E3) no intervalo de sete dias.

3.4.2 Isolamento de RNA total

Para o isolamento de RNA (Bugos et al., 1995, com modificações), foram acrescentados à amostra (100-200 mg) 400 μl de solução de extração [100 mM Tris-HCl pH 9,0; 200 mM NaCl; 15 mM EDTA (ácido etileno diamino tetra acético) e 0,5% SDS, sódio dodecil sulfato]; 2,3 μl de β -mercaptoetanol; 400 μl de fenol e 80 μl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). A mistura foi homogeneizada por 2 min em um agitador de tubos tipo vórtex. A seguir, acrescentaram-se a ela 28 μl de acetato de sódio 3M (pH 5,2), agitando-se por 1 min em vórtex, seguido de incubação por 15 min. As amostras, então, foram centrifugadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob 13.000 g, por 10 min. Após, foram adicionados à fase aquosa 400 μl de fenol e 80 μl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), homogeneizando-a por 2 min e centrifugando-a a 13.000 g, por 5 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionando-se aproximadamente 500 μl (1 v) de isopropanol, deixando-se por 1 h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, após, centrifugada a 10.000 g por 10 min. A seguir, foi acrescentado 1 v de etanol 70% ao precipitado, centrifugando-se a 10.000 g por 5 min. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado, incubado em temperatura ambiente por aproximadamente 10 min. O precipitado foi solubilizado em 90 μl de água ultrapura (Millipore – Direct-QTM), acrescido de 30 μl de LiCl_2 (8 M), incubando-se por 3 h no gelo; após, os tubos foram centrifugados a 14.000 g, por 10 min. Acrescentou-se ao precipitado 1 v de etanol (70%), centrifugando-se a 10.000 g, por 5 min; após, o sobrenadante foi descartado, deixando-se o RNA precipitado em temperatura ambiente por aproximadamente 10 min. O RNA foi, então, solubilizado em

50 µl de água, incubado em temperatura ambiente por 10 min e armazenado a -20 °C até ser utilizado. Finalmente, o RNA foi quantificado, avaliado para a sua qualidade em espectrofotômetro e resolvido em gel de agarose. Todo o procedimento foi repetido três vezes para cada amostra.

3.4.3 Seleção de oligonucleotídeos iniciadores

Previamente a RT-PCR (transcrição reversa de RNA seguida de amplificação de fragmentos de cDNA), o RNA extraído de UPF 17 foi testado com diferentes combinações de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”).

Os “primers” testados foram: oligo 1 (dTc), 5' AAG CTT TTT TTT C 3'; oligo 2, 5' AAG CTT CAT TCC G 3'; oligo 3, 5' AAG CTT CGG CAT A 3'; oligo 4 (dTG), 5' AAG CTT TTT TTT TTT G 3' e oligo 5 (dTA), 5' AAG CTT TTT TTT TTT A 3'. As combinações testadas dos “primers” foram: oligo 1-oligo 2; oligo 1- oligo 3; oligo 4 - oligo 2; oligo 4 - oligo 3; oligo 5 -oligo 2; oligo 5 - oligo 3, conjuntamente com os respectivos controles negativos, sem RNA. As amostras foram submetidas a RT-PCR (conforme condições descritas a seguir), e resolvidas em gel de agarose 1,5 %.

3.4.4 “Differential display” de RNA (Averboukh et al., 1996, com modificações)

3.4.4.1 RT-PCR: transcrição reversa de RNA-PCR

Os RNAs isolados de aveia foram submetidos à técnica de RT-PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores selecionados anteriormente (item 3.4.3).

O volume da reação RT totalizou 5 µl: 2 µl de RNA (0,2 µg), 6,6 mM de DTT (“ditiotretitol”, Gibco); 1 µl tampão [estoque 5x: 100 mM Tris-HCl (pH 9, 0), 200 mM NaCl, 15 mM EDTA, 0,5% Sarkosyl (Gibco)]; 1,32 µM oligo (dT) (Gibco); 340 µM de

dNTPs (Gibco); 6,8 U de transcriptase reversa (M-MLV, Gibco) e água para completar o volume. A reação foi incubada a 37 °C por 1 h em termociclador PT-100™ (“Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc.”).

Para a PCR, o volume totalizou 25 µl: 5 µl de reação RT (cDNA), tampão 1x [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl] (Gibco); 2 mM MgCl₂; 200 µM de mistura de dNTPs; 0,8 µM de cada “primer” da combinação selecionada; 1,5 U Taq polimerase (Gibco). As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C, 2 min; 39 ciclos de desnaturação a 94 °C, 30 s; anelamento 40 °C, 2 min e extensão 72 °C, 1 min 30 s; e extensão final 72 °C, 5 min.

3.4.4.2 Eletroforese de produtos de RT-PCR

Para a separação de produtos de RT-PCR, realizaram-se três reações de "differential display", nas quais se resolveram as amostras de cDNAs de cada repetição (E1, E2 e E3). O gel de acrilamida a 6 % foi preparado conforme descrito em Promega... (1993). Em sistema de seqüenciamento de DNA Hoefer™ SQ3, o gel permaneceu a 55 W (pré-corrída) até sua temperatura estabilizar em 45 °C. Os cDNA foram previamente incubados a 70 °C por 2 minutos e resolvidos no gel por aproximadamente 4 h 30 min. O controle utilizado foi pGEM⁺-3Zf (+) (Promega..., 1993) seqüenciado com o “primer” pUC/M13 “forward” (Biogen) (Sanger et al., 1977). Após a resolução das amostras, o gel foi tratado com coloração prata (Silver Sequence™, Promega..., 1993) e a seguir fotografado (Kodak Digital Science 1D™).

3.4.5 Extração e amplificação de produtos de RT-PCR

Os cDNAs expressados diferencialmente foram isolados do gel utilizando-se a técnica de excisão de bandas baseada na PCR (Wilton et al. 1999), nas mesmas condições anteriormente descritas, exceto na redução da temperatura de anelamento de 40 para 35 °C.

3.4.6 Clonagem, isolamento de plasmídeo e seqüenciamento

Foram empregadas duas estratégias para a clonagem dos cDNAs selecionados no “differential display” de RNA: na primeira, os cDNAs de aveia e o plasmídeo pGEM[®]-3Z(+) (3199 pb) foram digeridos, ligados e introduzidos em uma população de células da linhagem XL 1 (Stratagene[®]) de *Eschericia coli* conforme descrito por Brasileiro et al. (1998). Na segunda estratégia, utilizou-se diretamente os cDNAs excisados do gel e amplificados pela PCR em uma reação de ligação com vetor Topo TA[®], seguida, também, da transformação em células de *E. coli* (“TOPO[®]- Cloning Reaction”, Invitrogen, 2001). Previamente à transformação, os cDNAs e o plasmídeo foram purificados (“Concert matrix gel extraction system”, Gibco, Life Technologies..., 1998). O DNA plasmidial foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Brasileiro et al. (1998) e, após, seqüenciado (Sanger et al., 1977). As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C, 2 min; 59 ciclos de desnaturação a 95 °C, 30 s, anelamento 42 °C, 30 s e extensão 70 °C, 1 min.

3.4.7 Análise “Southern blot”

O cDNA denominado E3-DFO (Figuras 3.2 e 3.3A) foi marcado e usado como sonda nas hibridizações (Sambrook et al., 1989). Previamente, produtos de RT-PCR (repetição 3) foram resolvidos em gel de agarose (2%) e transferidos por capilaridade

(NaOH 0,4 M) para uma membrana Hybond⁺, por aproximadamente 15 h. Após a transferência, para fixar o DNA na membrana, essa foi incubada em temperatura ambiente por 1 h e colocada a uma distância de 10 cm de uma fonte de ultravioleta (312 nm) por 2 min.

3.4.7.1 Reações de marcação, detecção e revelação

Para a reação de marcação seguiu-se o protocolo descrito em “Gene Images Random Prime Labelling Module”, e para a reação de detecção “Gene Images CDP-Star detection module” (Amershan..., 1998b). Após a reação de detecção, colocou-se a membrana em contato com o filme de raio X (Kodack) por três horas; o filme foi revelado conforme instruções do fabricante.

3.4.8 Análise “Reverse Northern”

Para a análise "Reverse Northern" (Alwine et al., 1997), sete cDNAs isolados do gel (Wilton et al. 1999) (E3-AFP_rC, E3-BFC, E3-DFO, E3-EFCO, E3-FO, E3-IFCO e E3-KF) foram reamplificados pela PCR, resolvidos em gel de agarose (1,5%) e transferidos, na mesma ordem, para duas membranas. Para as hibridizações, em uma membrana utilizou-se a sonda denominada cDNA-FPSC (preparação descrita a seguir) obtida 72 h após a inoculação de UFRGS 18 com o isolado UPF17SC de *D. avenae*. Na outra membrana, utilizou-se a sonda denominada cDNA-F, obtida da mesma cultivar, não inoculada com o fungo.

Para o isolamento de mRNA, seguiu-se o protocolo da Promega... (1993) (“Poly Atract mRNA isolation Systems I and II”). Foram utilizados 100 µg de cada RNA total para o isolamento de mRNA. Para a preparação das sondas, reservaram-se 25,5 µl de

cada mRNA, aos quais foram acrescentados 0,3 µl de oligo dT, incubando-se a 72 °C, por 2 min. A seguir, acrescentaram-se a cada mRNA: 10 µl de tampão (100 mM Tris-HCl (pH 9, 0), 200 mM NaCl, 15 mM EDTA, 0,5% Sarkosyl (Gibco); 5 µl DTT 0,1 M; 1,8 µl de (ACG)TPmix (10 mM de dATP, de dCTP e dGTP; 1,6 µl dTTP 10 mM; 1,6 µl dUTP 1 mM marcado com fluoresceína, e 1 µl de enzima MMLV-RT (200 U/µl). Esta reação, então, foi incubada a 37 °C, por 1 h.

Após a incubação, acrescentaram-se 12 µl de NaOH 3 M, incubando-se a 68 °C, por 30 min; e 12 µl de HCl 2 N, 36 µl de água, 40 µl Tris-HCl 1 M, pH 7,4. Finalmente, cada sonda foi misturada com a solução de pré-hibridização e à respectiva membrana as quais foram incubadas a 60 °C, sob baixa rotação, por 15 h.

Para a reação de detecção, seguiu-se o procedimento descrito pela Amersham... (1998) (“Gene Images CDP-star detection module”) e, para a revelação de bandas em autoradiografia, o da Kodack.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os estudos de expressão diferencial de genes, obteve-se o RNA total de cinco genótipos de aveia, não inoculados e inoculados com dois isolados de *D. avenae*, em 12, 24 e 72 h após a inoculação. Os genótipos de aveia foram selecionados tendo-se por base as suas reações a diferentes isolados de *D. avenae* (Lângaro et al., 2000).

Para a RT-PCR, foram selecionadas as combinações de oligonucleotídeos iniciadores oligo 1 - oligo 2 e oligo 2 - oligo 4, pois resultaram em maior polimorfismo de RNA (não apresentado).

Verificou-se um padrão semelhante de expressão de fragmentos de cDNA em três reações de "differential display" (repetições E1, E2 e E3) em sistema de seqüenciamento HoeflerTM SQ3, representadas pelas Figuras 3.1 e 3.2.

Após a eletroforese em gel de acrilamida, selecionaram-se os cDNAs acumulados diferencialmente quanto à inoculação com *D. avenae*. A interação diferencial entre genótipos da planta e isolados do fungo nos diferentes tratamentos foi evidenciada pela presença ou ausência de fragmentos no gel. De outro modo, diferenças na intensidade de fragmentos entre os genótipos, em resposta a um isolado do fungo, podem estar relacionadas a reações não específicas da planta ao patógeno.

Na reação de "differential display", na qual foram resolvidas as amostras de RT-PCR obtidas a partir da extração de RNA da repetição E1, selecionou-se apenas um cDNA expressado diferencialmente em relação à inoculação com *D. avenae* (não apresentado). Em outra reação, na qual se resolveram as amostras da repetição E2, selecionaram-se 3 cDNAs expressados diferencialmente aos isolados do fungo: E2-AFPrCO (12 e 24 h), E2-BP (12 e 24 h) e E2-CC (12 e 72 h) (Figura 3.1).

Em relação à repetição E3, foi observado um maior acúmulo de mRNA 72 h da inoculação nos cinco genótipos de aveia com o isolado UPF17SC de *D. avenae*. Nesta repetição, selecionaram-se para serem estudados 11 cDNAs expressados diferencialmente (Figura 3.2), os quais foram então extraídos do gel e reamplificados conforme descrito anteriormente (Wilton et al. 1999). O maior número de fragmentos de cDNAs selecionados na repetição E3, comparado com a E1 e E2 confirma as diferenças observadas no ensaio biológico, no qual a inoculação com os isolados do fungo resultou em maior severidade da doença. O tamanho dos fragmentos de cDNA isolados do gel variou entre 150 e 400 pb e somente seqüências parciais desses foram obtidas para serem comparadas com seqüências depositadas no banco de dados do Genbank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (“National Center For Biotechnology Information”, NCBI, National..., 2002). Foram obtidas as seqüências parciais de E2-AFPrCO (Figura 3.1; Tabela 3.1) e E3-AFPrC, E3-DFO, E3-EFCO, E3-FO, E3-IFCO, E3-KF (Figura 3.2; Tabela 3.1). As seqüências expressadas na interação aveia - *D. avenae* foram comparadas com as seqüências de genes disponibilizadas no banco de dados referido, utilizando-se a ferramenta BLAST (Altschul et al., 1990), pela qual se obtém, entre outras informações, a percentagem de similaridade “*T*” (Tabela 3.1) entre as seqüências e o valor “*E*”, parâmetro que descreve o número de vezes que uma seqüência em particular pode ser encontrada em um banco de dados. A identidade entre as seqüências foi separada de acordo com o valor “*E*” em moderadamente significativa ($e^{-3} \leq E \leq e^{-19}$) e não significativa ($E \geq e^{-2}$) (Kim et al., 2001).

Tabela 3.1. Fragmentos de cDNAs isolados de cultivares e linhagens de *Avena sativa* infectadas pelos isolados IAC7RS e UPF17SC de *Drechslera avenae* e sua similaridade com seqüências disponibilizadas em banco de genes (GenBank). Porto Alegre, RS. 2001

SE	Acesso	Origem	Fonte (cDNA)	I	Blast ^e
E2-AFPrCO	AW790432	cDNA conídios	<i>Blumeria graminis</i>	49/51	6e-10
	WEST00875	cDNA embrião	<i>Caenorhabditis elegans</i>	48/51	1e-07
	BM420232	cDNA folhas maduras	<i>Oryza sativa</i> *	64/72	2e-06
E3-AFPrC	BE119074	CDNA	<i>Rattus norvegicus</i>	24/25	0,092
E3-DFO	BM140591	cDNA espiga	<i>Triticum aestivum</i> **	16/16	21,0
	AW288482	cDNA espiga	<i>Zea mays</i> **	17/17	5,40
E3-EFCO	BI948810	cDNA espiga	<i>Hordeum vulgare</i> **	19/20	47,0
	AW20696M	cDNA fruto	<i>L. esculentum</i>	16/16	47,0
	BM138011	cDNA espiga	<i>Triticum aestivum</i> **	15/15	185,0
E3-FO	BG836929	cDNA espiga	<i>Zea mays</i> **	15/15	185,0
	AP002480	DNA crom. 1	<i>Oryza sativa</i>	18/18	3,40
E3-KF	AF209082	DNA (hormônio cresc.)	<i>Pan troglodytes</i>	18/18	3,4
	BI542906	cDNA folhas jovens	<i>Zea mays</i>	50/56	28,0
	AL509257	cDNA cariopse	<i>Hordeum vulgare</i>	27/29	0,11
	AU056649	cDNA folhas maduras	<i>Oryza sativa</i>	19/19	1,80
	C72851	cDNA panícula	<i>Oryza sativa</i>	19/19	1,80
	D22439	cDNA calos	<i>Oryza sativa</i>	19/19	1,80
	BG309300	cDNA plântulas	<i>Hordeum vulgare</i> ***	18/18	7,0
E3-IFCO	HWM021CE	cDNA folhas	<i>Hordeum vulgare</i>	18/18	7,0
	BI778298	cDNA folhas/raízes	<i>Hordeum vulgare</i> ***	21/22	28,0
	S73375	cDNA (Ativador Quinase 5)	Bovinos	21/22	5,4

SE – seqüências expressadas (cDNAs) na interação de cultivares de aveia - *D. avenae*, E3, Repetição 3; primeira letra designa o cDNA, seguida de letra f, quando expressado na cv. UFRGS 18, letras Pr, em preta-comum, letra c, em cv. CTC 5, letra O, na linhagem ORLA 975 e letra P, na cv UPF 17.

I – similaridade das seqüências expressadas na interação de cultivares de aveia - *D. avenae* com seqüências de genes disponibilizadas no GenBank.

e – valor *E*: parâmetro que descreve o número esperado de vezes que uma seqüência particular pode ser encontrada em um banco de dados. Moderadamente significativa ($e^{-3} \leq E \leq e^{-19}$) e não significantes ($E \geq e^{-2}$).

* infectado por *Magnaphorthe grisea*.

** infectado por *Fusarium graminearum*.

***sob estresse (estiolamento).

A seqüência parcial do cDNA E2-AFPrCO foi similar à do cDNA obtido do fungo *Blumeria graminis* (Tabela 3.1). Estudos moleculares com a cultivar “Nipponbare” de *Oryza sativa* 72 h após a inoculação com *Magnaphorthe grisea* (T. T. Hebert) Yaegashi & Udagawa, realizados por Talbot et al. (1993), constataram que 10% do total da biomassa de folhas infectadas do cereal representavam micélio do fungo. A similaridade da seqüência E2-AFPrCO é também moderadamente significativa com as

de embriões de *Caenorhabditis elegans* e com as de cDNAs de folhas de *O. sativa* induzidas por *M. grisea*. A seqüência parcial de E3-AFPrC, por sua vez, é similar à de cDNAs de tecidos de *Rattus norvegicus*.

Constatou-se similaridade de cinco cDNAs expressados na interação de aveia - *D. avenae* com cDNAs derivados de trigo e de cevada infectados por *Fusarium graminearum* (E3-DFO, acessos BM140591 e AW288482; e E3-EFCO, acessos BI948810, BM138011e BG836929, sendo duas parcialmente reduntantes) (*E* não significativo) (Tabela 3.1); o valor *E* decresce exponencialmente com o *Escore* (não informado), traduzido pelo alinhamento entre duas seqüências. O valor *E* poderia ser incrementado com o conhecimento de maior número de bases nitrogenadas das seqüências expressadas. Destacam-se também o cDNA E3-IFCO, similar ao de ativador quinase 5, em bovinos ($e = 5,4$), e o cDNA E3-KF, com similaridade com cDNAs de tecidos estiolados de cevada (acessos BG309300, $e = 7,0$ e BI778298, $e = 28$).

Em relação à análise “Southern blot”, a sonda E3-DFO (Figura 3.3A) hibridizou diferencialmente com derivados de RNA de cultivares não inoculadas e inoculadas, com os isolados IAC7RS e UPF17SC de *Drechslera avenae*, indicando um acúmulo de mRNAs (fragmentos de 250 pb, Figura 3.3B) 72 h após a inoculação de UFRGS 18 e CTC 5 com o isolado IAC7RS e, em UFRGS 18, CTC 5, ORLA 975 e UPF 17, com o isolado UPF17SC. Também se observaram hibridizações não específicas (fragmentos de 500 pb, Figura 3.3B), as quais não diferiram entre o tratamentos.

Na análise “Reverse Northern” (Figura 3.4), observou-se, na autorradiografia, a formação de bandas, resultantes da hibridização diferencial das sondas com os cDNAs fixados nas membranas (E3-AFPrC, E3-BFC, E3-DFO, E3-EFCO, E3-FO, E3-IFCO e E3-KF). A sonda denominada cDNA-FPSC, extraída de UFRGS 18, inoculada com o isolado UPF17SC de *D. avenae*, hibridizou com o cDNA denominado E3-IFCO,

expressado 72 h após a inoculação de UFRGS 18, CTC 5 e ORLA 975 com o mesmo isolado do fungo. Reações específicas de genótipos de aveia a isolados de *D. avenae* foram, também, constatadas na caracterização biológica das cultivares (Capítulo II) (Lângaro et al., 2000). O fragmento E3-IFCO é, portanto, indicativo de respostas de defesa das cultivares ao ataque de *D. avenae* e poderia ser mais estudado a fim de ser utilizado como um marcador para resistência ao patógeno. Quanto à sonda preparada com o cDNA de UFRGS 18 não inoculada com o fungo, denominada de cDNA-F, hibridizou com o cDNA E3-FO, expressado 72 h após a inoculação de UFRGS 18 e ORLA 975 com o mesmo isolado do patógeno, sugerindo que a expressão deste gene não tenha relação com uma resposta da planta à inoculação com o fungo.

Segundo nosso conhecimento, não havia, na literatura, informações relacionadas à interação aveia-*D.avenae* em nível molecular. As seqüências expressadas geradas neste estudo podem, ao menos em parte, representar os processos moleculares que ocorrem durante a interação. A determinação, em estudos posteriores, da seqüência nucleotídica dos cDNAs expressados diferencialmente nesta interação poderia contribuir para uma maior compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no sistema de defesa da planta e para o conhecimento de possíveis genes e suas funções.

Do mesmo modo, a construção de sondas específicas a partir de seqüências relacionadas à resistência em outras culturas, semelhantes a da aveia e disponibilizadas em banco de dados, poderiam auxiliar na caracterização molecular da interação, sendo de fundamental importância para o desenvolvimento de novas estratégias de controle da doença.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES FINAIS

Entre os genótipos da planta testados, puderam-se identificar diferentes níveis de resistência a *D. avenae*, o que, apesar da complexidade observada, permitiu sua separação em três grupos de reações: resistentes (R) a moderadamente resistentes (MR), moderadamente resistentes (MR) a moderadamente suscetíveis (MS) e moderadamente suscetíveis (MS) a suscetíveis (S).

As variações observadas nas reações dificultaram o entendimento quanto às especificidades entre os isolados de *D. avenae* e os genótipos da planta e a interpretação de como ocorre o controle genético da resistência ao fungo em aveia.

A metodologia de estudo da resistência de aveia a *D. avenae* deve ser melhorada. Fatores críticos como a temperatura e a umidade nos testes de patogenicidade devem ser controlados com maior rigor em estudos futuros. Há, também, a necessidade de se conhecer mais o processo da doença em relação aos períodos de incubação, latência e de esporulação do patógeno nas cultivares, bem como a distribuição das populações do patógeno nas diferentes regiões cultivadas com aveia.

Em relação ao estudo de expressão diferencial de mRNAs foi possível identificar diferenças na expressão de genes, em nível de RNA, nos genótipos de aveia testados, relacionadas à inoculação destes com diferentes isolados de *D. avenae*.

Ocorreram reações específicas e não específicas nos genótipos, em nível molecular, aos diferentes isolados de *D. avenae*, o que confirma os resultados obtidos no ensaio biológico (Capítulo II).

A presença de um cDNA em aveia, expressado em resposta a *D. avenae*, poderia ser mais estudada quanto ao seu papel na resistência ao patógeno.

A caracterização parcial de alguns genes expressados na interação - e sua comparação com seqüências de genes disponibilizadas em banco de dados - sugere sua relação com respostas de defesa da planta. A determinação, em estudos posteriores, da seqüência nucleotídica dos cDNAs expressos diferencialmente poderá proporcionar informações decisivas para a compreensão da interação e, também, para o desenvolvimento de novas estratégias de controle da doença.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADI, R.; PERL-TREVES, R.; LEVY, Y. Molecular variability among *Exserohilum turcicum* isolates using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 18, n. 1, p. 29-34, 1996.

ABO-ELWALFA, A.; MURAI, K.; SHIMADA, T. Intra and inter-specific variations in *Lens* revealed by RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, n.3/4, p. 335-340, 1995.

AFANASENKO, O. S.; KUSHNIRENKO, I. YU. Inheritance of resistance to the causative agent of net blotch in some barley varieties. **Genetika**, Sofia, v. 25, p. 1194-2000, 1989.

ALCORN, J. L. The taxonomy of “*Helminthosporium*” species. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v. 26, p. 37-56, 1988.

ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410. 1990.

ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzoyloxymethyl paper hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, [s.l.], v. 74, p. 5350, 1977.

AMERSHAN PHARMACIA BIOTECHNOLOGY. **Gene Images CDP: Star Detection Module**. RPN3510. Buckinghamshire, 1998a. 38 p.

AMERSHAN PHARMACIA BIOTECHNOLOGY. **Gene Images Random Prime Labelling Module: RPN3540**. Buckinghamshire, 1998b. 26 p.

ARORA, R. K.; MANDAHAR, C. L.; PAHWA, R. K. Infection of oat leaves by *Helminthosporium avenae*, I. Infection process. **Indian Journal of Mycological and Plant Pathology**, New Delhi, v. 10, n. 1, p. 8-11, 1978.

AUGUSTIN, L. et al. Melhoramento genético de aveia, na Universidade de Passo Fundo, em 1998. REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 19., 1999, Porto Alegre. **Resultados...** Porto Alegre:[s.n.], 1999. p. 05-07.

AVERBOUKH, L. et al. Better gel resolution and longer cDNAs increase precision of differential display. **BioTechniques**, Natick, v. 20, n. 5, p. 918-921, 1996.

AZEVEDO, J. L. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 3-15, 1976.

BAKONYI, J. et al. Comparison of selected species of *Bipolaris*, *Drechslera* and *Exserohilum* by random amplification of polymorphic DNA. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, Gödöllo, v. 42, n. 4, p. 355-366, 1995.

BALMER, E. Considerações fitopatológicas no melhoramento do milho visando resistência a patógenos. Resistência genética de plantas a doenças. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 12., 1995, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1995. p. 1-10.

BALTAZAR, M. B.; SCHAREN, A. L.; RABOY, V. Selection and characterization of DNA probes from a *Pyrenophora teres* f. *maculata* random genomic library to differentiate isolates of *Pyrenophora teres*. **Revista Mexicana de Fitopatologia**, Chapingo, v. 12, n. 1, p. 89-96, 1994.

BARBIERI, R. L. et al. Genetics of resistance to the fungus *Helminthosporium sativum* in wheat: use of culture filtrates in tissue culture. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 3, p. 477-482, 1997.

BAUER, D. et al. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 21, n. 18, p. 4272-4280, 1993.

BENET, H. et al. Identification of RAPD markers linked to a black leaf spot resistance gene in chinese elm. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, n. 7, p. 1068-1073, 1995.

BENT, A. F. et al. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. **Science**, Washington, v. 265, p. 1856-1860, 1994.

BERTIOLI, D. J. et al. An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4520-4523, 1995.

BISHOP, J. O. et al. Three abundance classes in HeLa cell messenger RNA. **Nature**, London, v. 250, n. 5463, p. 199-204, 1974.

BLUM, M. C. *Pyrenophora avenae*; ocorrência, inóculo, patogenicidade e sobrevivência. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade e Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997

BLUM, M. M. C.; CASA, R. T.; REIS, E. M. Efeito de fungicidas, veículos de cobertura e de processos de beneficiamento do grão, na incidência de *Drechslera avenae* em sementes de aveia. In: Reunião da Comissão Sul-brasileira de Pesquisa de Aveia, 16., 1996, Florianópolis. **Resultados...** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1996. p. 321-323.

BLUM, M. M. C. et al. Decomposição de resíduos culturais de aveia. In: REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 15., 1995, Guarapuava. **Resultados...** Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 1995. p. 187-188.

BOCCHESE, C. A. C.; MARTINELLI, J. A. Agente causal e especificidade a tecido da mancha do grão da aveia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 268, 1999. Suplemento, ref. 140. Edição de Resumos do XXXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, realizado em Curitiba, PR, em 1999.

BOCCHESE, C. A. C. et al. Variabilidade morfológica, isoenzimática e virulência entre isolados de *Pyrenophora avenae*. In: REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 20., 2000, Pelotas. **Resultados...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado : UFPel, 2000. p. 151-152.

BOCCHESE, C. A. C. et al. Especificidade de *Pyrenophora avenae* aos tecidos da semente de *Avena sativa* e sua atividade enzimática. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 180-184. 2001.

BOEWE, G. H. Oat diseases - *Helminthosporium* leaf blotch. In: _____. **Diseases of Wheat, Oats, Barley, and Rye**. Illinois: Illinois Natural Survey, 1960. p. 80-81.

BOUSQUET, J; SIMON, L.; LALONDE, M. DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction. **Canadian Journal for Research**, Ottawa, v. 20, n. 3, p. 254-257, 1990.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de CAMPOS (Ed.). **Manual de Transformação Genética de Plantas**. 2. ed. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-Cenargen, 1998. 309 p.

BRONSON, C. R.; SCHEFFER, R. P. Heat-and aging-induced tolerance of sorghum and oat tissues to host -selective toxins. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, p. 1232-1238, 1977.

BUGOS, R. C. et al. RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine. **BioTechniques**, Natick, v. 19, p. 734-737, 1995.

BURDON, J. J.; SILK, J. Sources and patterns of diversity in plant pathogenic fungi. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 7, p. 664-669, 1997.

CALLARD, D.; LESCURE, B.; MAZZOLINI, L. A method for the elimination of false positives generated by the differential display. **BioTechniques**, Natick, v. 16, p. 1096-1103, 1994.

CAMARGO, L. E. A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 729-760.

CASTRO, C. Aspectos moleculares e bioquímicos de interações planta-patógeno. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 7, p. 299-368, 1999.

CHEN, G. et al. Identification of QTLs for horizontal resistance to crown rust in oat. **Journal of Zhejiang University Agriculture and Life Science**, [s.l.], v. 27, p. 151-155, 2001.

CHONG, J. et al. Identification of the stem rust resistance gene *Pg9* and its association with crown rust resistance and endosperm proteins in “Dumont” oat. **Genome**, Ottawa, v. 37, n. 3, p. 440-447, 1994.

CLAYTON, W. P.; RENVOIZE, S. A. **Genera Graminum Grasses of the World**. London : Royal Botanic Gardens, 1986. 389 p.

COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 1995, Passo Fundo. **Recomendações...** Passo Fundo: UPF, 1995. 50 p.

CORAZZA, L. et al. The principal fungal diseases of oats recorded in 1992. **Informatore Agrário**, Verona, v. 48, n. 37, p. 55-57, 1992.

COSTA NETO, J. P. Fungos observados em gramíneas e leguminosas no Rio Grande do Sul. **Sep. Ver. Faculdade de Agronomia e Veterinária**, Porto Alegre, v. 9, p. 51-56, 1967.

COX, D. J.; HOSFORD Jr., R. M. Resistant winter wheats compared at differing growth stages and leaf positions for tan spot severity. **Plant Disease**, St. Paul, v. 71, p. 883-886, 1987.

CRILL, P. An assessment of stabilizing selection in crop variety development. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v. 15, p. 185-202, 1977.

CUTT, J. R.; KLESSIG, D. F. Pathogenesis related-proteins. In: BOLLER, T.; MEINS, F. (Ed.). **Genes Involved in Plant Defense**. New York: Springer-Verlag, 1992. p. 209-243.

DELGADO, A. et al. Indices of susceptibility in oat varieties to the disease caused by *Drechslera avenae*. I. The effect of some climatic indicators. **Pastos y Forrajes**, Matanzas, Cuba, v. 13, n. 2, p.141-147, 1990.

DENNIS, W. G. Notes on the occurrence of *Pyrenophora avenae* Ito, in Scotland. **Transactions British Mycological Society**, Cambridge, v. 19, p. 288-290, 1935.

DEVOS, K. M.; GALE, M. D. The use of random amplified polymorphic DNA in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 84, n. 5/6, p. 567-572, 1992.

DOUIYSSI, A.; RASMUSSEN, D. C.; ROEFS, A. P. Response of barley cultivars and lines to isolates of *Pyrenophora teres*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, n. 3, p. 316-321, 1998.

DRECHSLER, C. Some graminicolous species of *Helminthosporium*. **Journal of Agriculture Research**, Lahore, v. 24, p. 641-740, 1923.

DURNER, J.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid and disease resistance in plants. **Trends Plant Science**, [s.l.], v. 2, p. 266-274, 1997.

ELIAS, E.; CANTRELL, R. G.; HOSFORD, R. M. Heritability of resistance to tan spot in durum wheat and its association with other agronomic traits. **Crop Science**, Madison, v. 29, p. 299-304, 1989.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew : CAB, 1971. 480 p.

FARIS, J. D. et al. RFLP mapping of resistance to chlorosis induction by *Pyrenophora tritici-repentis* in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 94, n. 1, p. 98-103, 1997.

FEDERIZZI, L. C.; MILACH, S. C. K.; PACHECO, M. T. Programa de melhoramento de aveia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: resultados e perspectivas futuras. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 20., 2000, Pelotas. **Resultados...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado : UFPel, 2000. p.9.

FERNANDEZ, M. R. **Manual para Laboratório de Fitopatologia**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993. 128 p. (Embrapa-CNPT. Documentos, 6).

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995. 220 p.

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

FLOR, H. H. Host-parasite interaction in flax rust - it's genetics and other implications. **Phytopathology**, St. Paul, v. 45, n. 12, p. 680-685, 1955.

FLOSS, E. L. Aveia, alternativa para a produção de grãos, pastagem e cobertura verde. In: CURSO DE ATUALIZAÇÃO EM FITOTECNIA, 1991, Piracicaba. Piracicaba: Ceres, 1991. p.37-49.

FLOSS, E. L. Aveia. In: BAIER, A. C. (Coord.). **As Lavouras de Inverno - 1**. Rio de Janeiro: Globo, 1988. p. 15-46.

FORCELINI, C. A. Moléstias de aveia e seu controle. In: REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 22., 2002, Passo Fundo. **Resultados...** Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2002. p. 72-80.

FORCELINI, C. A. Moléstias de aveia e seu controle. In: REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 22., 2002, Passo Fundo. **Resultados...** Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2002. p. 72-80.

FORCELINI, C. A. et al. Perdas atribuídas à ferrugem da folha (*Puccinia coronata* f. sp. *avenae*) da aveia, no sul do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 315, ago. 1993. Suplemento, ref. 301. Edição de Resumos do XXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, realizado em Aracajú, 1993.

FORCELINI, C. A.; REIS, E. M. Doenças da aveia. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 3 ed. São Paulo: Ceres, 1997. v. 2, p. 105-111.

FREY, K. J. Remaking a crop gene pool: the case of *Avena*. **Agricultural Improvement Station**, Iowa, n. 35, p. 1-14, 1994.

GALINDO, J. E. et al. Differential display of RNA. In: ANOLLÉS, G. C.; GRESSHOFF, P. M. (Ed.). **DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews**. New York : Willey-VCH, 1998. p. 225-236.

GOUGH, F. J.; McDANIEL, M. E. Ocurrence of oat leaf blotch in Texas in 1973. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 58, p. 80-81, 1974.

GRACHEV, A. F. The resistance of oats to crown rust and helminthosporiosis under the conditions of Primorski Krai. **Referativnyi Zhurnal Biology**, Moscou, n. 141G236, 1962.

GRANER, A.; FOROUGH, W. B.; TEKAUZ, A. RFLP mapping of a gene in barley conferring resistance to net blotch (*Pyrenophora teres*). **Euphytica**, Wageningen, v. 91, n. 2, p. 229-234, 1996.

GRANT, M. R. et al. Structure of the Arabidopsis RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. **Science**, Washington, v. 269, p. 843-846, 1995.

GROH et al. Analysis of factors influencing milling yield and their association to other traits by QTL analysis in two hexaploid oat populations. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, p. 1039-1048, 2000.

HAHN, M. G. Microbial elicitors and their receptors. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 387-412, 1996.

HAHN, M. G.; JUNGLING, S.; KNOGGE, W. Cultivar-specific elicitation of barley defense reaction by the phytotoxic peptide NIP1 from *Rhynchosporium secalis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 6, n. 6, p. 746-754, 1993.

HALEY, S. D. et al. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 86, n. 5, p. 505-512, 1993.

HAMMOND-KOSACK; JONES, D. G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Norwich, v. 48, p. 575-607, 1997.
HUTCHESON, S. W. Current concepts of active defense in plants. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v. 36, p. 59-90, 1998.

INNES, N. L. Gene banks and their contribution to the breeding of disease resistant cultivars. **Euphytica**, Wageningen, v. 63, n. 1/2, p. 23-31, 1992.

INVITROGEN. **TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing**: version H, 072701, 25-0276. Carlsbad, 2001. 25 p.

JACKSON, A. O.; TAYLOR, C. B. Plant - microbe interactions: life and death at the interface. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1651-1668, 1996.

JONSSON, R.; BRYNGELSSON, T.; GUSTAFSSON, M. Virulence studies of Swedish net blotch isolates (*Drechslera teres*) and identification of resistant barley lines. **Euphytica**, Wageningen, v. 94, n. 2, p. 209-218, 1997.

KARKI, C. B.; SHARP, E. L. Pathogenic variation in some isolates of *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* on barley. **Plant Diseases**, St. Paul, v. 70, n. 7, p. 684-687, 1986.

KARUPPIAH, N.; KAUFMAN, P. B. Rapide and inexpensive micro-elution of nucleic acid and protein from agarose and polyacrylamide gels. **BioTechniques**, Natick, v. 13, p. 368, 1992.

KEELING, B. L.; BANTTARI, E. E. Factors associated with the resistance of barley to *Helminthosporium teres*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 65, n. 1, p. 464-467, 1975.

KEEN, N. The molecular biology of disease resistance. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 19, p. 109-122, 1992.

KELLER, K. O.; ENGEL, B.; HEINRICH, K. Specific detection of *Gaeumannomyces graminis* in soil using polymerase chain reaction. **Mycology Research**, Cambridge, v. 99, n. 11, p. 1385-1390, 1995.

KHAN T. N.; BOYD, W. J. R. Environmentally induced variability in the host reactin of barley to net blotch. **Australian Journal Biological Sciences**, Victoria, v. 22, n. 5, p. 1237-1244, 1969.

KHAN, T. N. Inheritance of resistance to net blotch in barley. **Canadian Journal of Genetic**, Ottawa, v. 11, n. 4, p. 5587-591, 1969.

KIANIAN, S. F. et al. Quantitative trait loci influencing beta-glucan content in oat (*Avena sativa*, $2n=6x=42$). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, p. 1039-1048, 2000.

KIM, S.; AHN, II-P.; LEE, Y-H. Analysis of genes expressed during rice-*Magnaporthe grisea* interactions. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 14, n. 11, p. 1340-1346. 2001

KOELEMAN, J. G. M. et al. Comparison of amplified ribosomal DNA restrictions analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 9, p. 2522-2529, 1998.

KOOMAN-GERSMANN et al. Assignment of amino acid residues of the *avr9* peptide of *Cladosporium fulvum* that determine elicitor activity. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 10, p. 821-829, 1997.

KUNOWSKI, Z.; BRESHKOV, T. Field resistance of oat varieties from the world collection to *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *avenae* Eriks. et Henn. and *Pyrenophora avenae* Ito. **Rastenievadni Nauki**, Sofia, v. 18, p. 118-123, 1981.

LADIZINSKY, G. Biological species and wild genetic resources in *Avena*. In: _____. **International board for plant genetic resources**. [S.l. : s.n.], 1989. p.19-33. Report for a working group on *Avena*.

LADIZINSKY, G.; ZOHARY, D. Notes on species delimitations, species relationships and polyploidy in *Avena L.* **Euphytica**, Wageningen, v. 20, n. 3, p. 380-395, 1971.

LAMARI, L.; BERNIER, C. C. Evaluation of wheat for reaction to tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) based on lesion type. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 11, n. 1, p. 49-56, 1989.

LAMARI, L.; BERNIER, C. C. Temperature-induced resistance to tan-spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) of wheat. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 16, p. 279-286, 1994.

LÂNGARO, N. C. **Detecção, transmissão e controle de *Drechslera avenae* em sementes de aveia branca**. 1998. 131 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 1998.

LÂNGARO, N. C. et al. O uso de cultivares resistentes no controle da helmintosporiose da aveia. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 20., 2000, Pelotas. **Resultados...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado : UFPEL, 2000. p. 160-161.

LAREZ, C. R.; HOSFORD Jr, R. M.; FREEMAN, T. P. Infection of wheat and oats by *Pyrenophora tritici-repentis* and initial characterization of resistance. **Phytopathology**, St. Paul, v. 76, p. 931-938, 1986.

LEGGET, J. M.; THOMAS, H. Oat evolution and cytogenetics. In: WELCH, R. W. (Ed.). **The oat crop**. New York: Chapman and Hall, 1995. p. 120-149.

LEITE, B.; RONCATO, L. D. B. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 5, p. 235-280, 1997.

LEONARD, K. J.; CZOCHOR, R. J. Theory of genetic interactions among populations of plants and their pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v. 18, p. 237-258, 1980.

LEONARD, K. J.; SUGGS, E. G. *Setosphaeria prolata*. The ascigerous state of *Exserohilum prolatum*. **Mycologia**, New York, v. 66, p. 281-297, 1974.

LIANG, P.; PARDEE, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v. 257, p. 967-971, 1992.

LIFE TECHNOLOGIES. **Concert Matrix Gel Extraction System**. [S.l.], 1998. 16 p. CAT n. 11456-019, part n. 999-00704, 04/98A.

LUKE, H. H.; PFAHLER, P. L.; BARNETT, R. D. Control of *Septoria nodorum* on wheat with crop rotation and seed treatment. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, p. 949-951, 1957.

LUZ, W. C. da. Avaliação da resistência de cultivares de trigo à mancha-bronzeada. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 444-448, 1995.

MACHACEK, J. E.; WALLACE, H. A. H. Longevity of some common fungi in cereal seed. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 30, p. 164-169, 1952.

MARTIN, G. B. et al. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. **Science**, Washington, v. 262, p. 1432-1436, 1993.

MARTINELLI, J. A. Uso de misturas varietais para o controle de doenças em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 1, p. 122-142, 1993.

MATSUMURA, A. T. S. **Variabilidade intraespecífica quanto a patogenicidade, características de cultura e padrão isoenzimático em populações naturais de *Bipolaris sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*)**. 1991. 262 f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.

MEEHAN, F., MURPHY, H. C. A new *Helminthosporium* blight of oats. **Science**, Washington, v. 104, p. 413-414, 1946.

MEHTA, Y. R. Analysis of ribosomal DNA and RAPD for the characterization of *Drechslera* spp. attacking oats in the state of Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 304, ago. 1999. Suplemento, ref. 354. Edição de Resumos do XXXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia Curitiba, PR, 1999a.

MEHTA, Y. R. Ocorrência de *Drechslera* spp. em aveia branca no estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 265-267, 1999b.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. de. **Fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, 1993. 277 p.

MILACH, S. C. K. Avanços da biotecnologia na cultura da aveia. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 22., 2002, Passo Fundo. **Resultados...** Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2002. p. 64-69.

MODE, C. J.; SCHALLER, C. W. Two additional factors for host resistance to net blotch in barley. **Agronomy Journal**, Madison, v. 50, n. 1, p. 15-18, 1958.

MUCHOVEJ, J. J.; MUCHOVEJ, R. M. C.; RIBEIRO NESIO, M. L. Taxonomia de *Drechslera*, *Bipolaris* e *Exserohilum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 3, p. 211-223, 1988.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 05 fev. 2002.

NOBLE, M.; MACGARVIE, A. F.; LEAFE, E. L. Resistance to mercury of *Pyrenophora avenae* in Scottish seed oats. **Plant Pathology**, London, v. 15, p. 23-28, 1966.

PACHECO, M. T.; FEDERIZZI, L. C.; MILACH, S. C. K. Programa de Melhoramento Genético de Aveia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: características e estratégias. In: REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 19., 1999, Porto Alegre. **Resultados...** Porto Alegre : Faculdade de Agronomia da UFRGS, 1999. p. 16-19.

PANDEY, S. C.; MISRA, A. P. Varietal reaction of oats to *Helminthosporium avenae*. **Indian Journal of Mycological and Plant Pathology**, New Delhi, v. 3, p. 214-216. 1973.

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

PROMEGA. **Technical Manual**: Silver Sequence™, DNA Sequencing System. [S.l.], 1993. 18p., part TM023.

REIS, E. M. **Manual de identificação e de quantificação de doenças do trigo**. Passo Fundo : Agroalpha, 1994. 60 p.

REIS, E. M. **Patologia de sementes de cereais de inverno**. São Paulo: CNDA, 1987. 32 p.

REIS, E. M.; ABRÃO, J. R. Effect of tillage and wheat residue management on the vertical distribution and inoculum density of *Cochliobolus sativus* in soil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, n. 10, p. 1088-1089, 1983.

REIS, E. M.; SOARES, R. M. Levantamento, transmissão e controle de fungos patogênicos associados a sementes de aveia. In: REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 15., 1995, Guarapuava. **Resultados...** Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 1995. p 57-259.

REZERA, F.; MARTINELLI, J. A.; FEDERIZZI, L. C. Relação entre incidência de *Pyrenophora avenae* em sementes e severidade na parte aérea, em diferentes condições de semeadura. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 20., 2000, Pelotas. **Resultados...** Pelotas: Embrapa : UFPEL, 2000. p. 154-155.

ROSE, J. L.; SCATTINI, W. J. Registration of australian winter cereal cultivars. *Avena sativa* (oats) cv. Nobby. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Warwick, v. 34, n. 5, p. 705, 1994.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T (Ed.). **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. v. 1. Paginação irregular.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, A. M. P. V dos. **Análise morfológica e genotípica de *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (*Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoem.), fitopatógeno do trigo**. 1996. 86 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

SCHALLER, C. W. Inheritance of resistance to net blotch of barley. **Phytopathology**, St. Paul, v. 45, n. 3, p. 174-176, 1955.

SCHARPFF, S.; KUNZE, C.; SCHLOSSER, E. A model system to determine the influence of ecological factors on the potential of antifungal resistance in oat leaves. **Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Stuttgart, v. 101, n. 1, p. 96-98, 1994. Abstract.

SCHRANK, A.; DA SILVA, S. C. Síntese de RNA - transcrição. In: ZAHA, A. (Coord.). **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. p. 183-200.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SEBESTA, J. et al. Incidence and resistance of oats to fungus diseases in Europe in 1988-1994. **Ochrona Rostlin**, Warsaw, v. 32, n. 2, p. 103-113, 1996. Abstract.

SEBESTA, J.; ZWATZ, B.; CORAZZA, L. Incidence of *Pyrenophora avenae* Ito et Kurib. in Europe and the varietal reaction of oat to it. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Prague, v. 29, n. 6, p. 485-490, 1995.

SHARMA, T. R.; TEWARI, J. P. RAPD analysis of three *Alternaria* species to crucifers. **Mycology Research**, Cambridge, v. 102, n. 7, p. 807-814, 1998.

SHOEMAKER, R. A. Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated from *Helminthosporium*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 37, p. 879-887, 1959.

SILVA da; FERREIRA, D. F.; BEARZOTI, E. Avaliação do poder e taxas de erro tipo I do teste de Scott-Knott por meio do método de Monte Carlo. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 687-696, 1999.

SONG, W-Y. et al. A receptor kinase like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. **Science**, Washington, v. 270, p. 1804-1806, 1995.

STEVENS, E. A.; BLAKMORE, E. J. A.; REEVES, J. C. Relationships amongst barley and oat infecting isolates of *Pyrenophora* spp. based on sequences of the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA. **Molecular Plant Pathology Online**, Cambridge, 1998. Disponível em: <<http://www.bspp.org.uk/mppol/1998/1111stevens>>. Acesso em: 25 out. 2000.

STUBER, C. W. Biochemical and molecular markers in plant breeding. **Plant Breeding Reviews**, Wallingford, v. 9, p. 37-61, 1992.

TEKAUZ, A. Effect of plant age and leaf position on the reaction of barley to *Pyrenophora teres*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 8, p. 380-386, 1986.

TEKAUZ, A. Determination of barley cultivar reaction to *Pyrenophora graminea* using disease nurseries. **Canadian Journal of plant pathology**, Ontario, v. 12, n. 1, p. 57-62, 1990.

TEKAUZ, A. Reaction of canadian barley cultivars to *Pyrenophora graminea*, the incitant of leaf stripe. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 5, p. 294-301. 1983.

TEKAUZ, A.; BUCHANNON, K. W. Distribution of resistance to biotypes of *Pyrenophora teres* in Western Canada. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 57, n. 3, p. 389-395, 1977.

THORMANN, C. E. et al. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 88, n. 8, p. 973-980, 1994.

TINKER, N. A.; FORTIN, M. G. MATHER, D. E. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, p. 976-984, 1993.

TURNER, D. M.; MILLARD, W. A. Leaf-spot of oats, *Helminthosporium avenae* (Bri. and Cav.) Eid. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 18, p. 535-559, 1931.

TVEIT, M. Pathogenicity of species of *Helminthosporium* from Brazilian oats. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 46, n. 1, p. 45-48. 1956.

VALÈ, G. P. et al. Activation of genes in barley roots in response to infection by two *Drechslera graminea* isolates. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 44, n. 3, p. 207-215, 1994.

VALÈ, G. et al. Molecular study on barley *Drechslera graminea* interaction. **Genetica Polonica**, Poznan, v. 35B, p. 25-30, 1994.

VALIM-LABRES, M. E. et al. Variação no aspecto cultural, morfologia e virulência em isolados de *Bipolaris sorokiniana* de trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 4, p. 483-487, 1997.

VAN DEN ACKERVEKEN, G. F. J. M.; VAN KAN, J. A. L.; DE WIT, P. J. G. M. Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene for gene hypothesis. **Plant Journal**, Oxford, v. 2, p. 359-366, 1992.

VAN DER PLANK, J. E. **Disease resistance in plants**. New York: Academic Press, 1984. 206 p.

VAN LOON, L. C.; GERRITSEN, Y. A. M.; RITTER, C. P. Identification, purification and characterization of pathogenesis-related proteins from virus-infected Samsun NN Tobacco leaves. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 9, n. 6, p. 593-609, 1987.

WEINING, S.; LANGRIDGE, P. Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 82, p. 209-216, 1991.

WELSH, J. et al. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, n. 19, p. 4965-4970, 1992.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

WHITHAN, S. et al. The product of tobacco mosaic virus resistance gene *N*: Similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. **Cell**, Cambridge, v. 78, p. 1011-1015, 1994.

WILLIAMS, J. G. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p. 6531-6535, 1990.

WILTON, S. D. et al. Bandstab: a PCR-based alternative to cloning PCR products. In: PARDEE, A. B.; MCCLELLAND, M. (Ed.). **Expression Genetics: Differential Display**. San Diego: Eaton Publishing, 1999. p. 371-375.

WUBBEN, J. P. et al. Detoxification of oat leaf saponins by *Septoria avenae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, p. 986-992, 1996.

ZADOKS, J. C.; CHANG, T. T.; KONZAK, C. F. A decimal code for the growth stages of cereals. **Weed Research**, Oxford, v. 14, p. 415-421, 1974.

ZHENG, Y. L.; BALLANCE, G. M. Molecular interaction between wheat and *Pyrenophora tritici-repentis* (I) PR gene (s) expression induced by pathogen. **Journal of Huazhong Agricultural University**, Wuhan, China., v. 13, n. 3, p. 213-218, 1994. Abstract.