

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

ASPECTOS MOLECULARES E BIOQUÍMICOS ASSOCIADOS
À RESISTÊNCIA PARCIAL À FERRUGEM DA FOLHA EM *Avena sativa* L.

Adriana de Andrade Figueiró
Bióloga/PUCRS
Mestre em Fitotecnia/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Ênfase Melhoramento e Biotecnologia Vegetal

Porto Alegre (RS) Brasil
Julho de 2012

“Depois de uma longa espera consegui, finalmente, plantar o meu jardim. Tive de esperar muito tempo porque jardins precisam de terra para existir. Mas a terra eu não tinha. De meu, eu só tinha o sonho. Sei que é nos sonhos que os jardins existem, antes de existirem do lado de fora. Um jardim é um sonho que virou realidade, revelação de nossa verdade interior escondida, a alma nua se oferecendo ao deleite dos outros, sem vergonha alguma... Mas os sonhos, sendo coisas belas, são coisas fracas. Sozinhos, eles nada podem fazer: pássaros sem asas... São como as canções, que nada são até que alguém as cante; como as sementes, dentro dos pacotinhos, à espera de alguém que as liberte e as plante na terra. Os sonhos viviam dentro de mim. Eram posse minha. Mas a terra não me pertencia...”

Rubem Alves

AGRADECIMENTOS

Principalmente a Deus, pela presença constante de luz em minha vida.

Aos meus orientadores Carla Delatorre e Marcelo Pacheco pela amizade, conhecimentos transmitidos e disposição em ajudar em todos os momentos.

Ao Dr. Jeff Stein pelo aceite de orientação na South Dakota State University.

Aos Prof. Jose Gonzalez e Neil Resse pelo auxílio e confiança depositada.

Aos Prof. Federizzi e Martinelli pelos inúmeros auxílios prestados durante estes quatro anos.

Aos meus pais e ao meu filho faço da minha conquista o instrumento de gratidão, respeito, amor, carinho e reconhecimento.

Ao meu irmão pelo apoio e palavras de carinho nos momentos mais difíceis.

Ao Rodrigo Sampaio pela presença constante em minha vida durante estes quatro anos, me apoiando e sempre disposto a auxiliar.

Aos amigos que aqui conquistei e que, com carinho, compreensão e amizade, contribuíram para a realização desta etapa de minha vida. Agradecimento especial às meninas, Ana Paula Valentini, Carolina Cover, Cibele da Costa, Kelly Pellizaro e Letícia Tonello.

Aos amigos que fiz na South Dakota State University, em especial a Winnie Baker, Phil Baker, Doris Shumaker e Olaya Peres.

Agradeço também ao amigo Guilherme Loss pelo auxílio com a bioinformática. Ao Felipe Graichen e Caroline Wesp pelas dicas do até então mundo obscuro da ferrugem da folha.

Ao Fábio, técnico de laboratório do Departamento de Plantas de Lavoura, pela dedicação, paciência e auxílio.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos no país e ao CNPq pela bolsa de estudos no exterior.

ASPECTOS MOLECULARES E BIOQUÍMICOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA PARCIAL À FERRUGEM DA FOLHA EM *Avena sativa* L.¹

Autor: Adriana de Andrade Figueiró
Orientador: Carla Andréa Delatorre
Coorientador: Marcelo Teixeira Pacheco

RESUMO

Ferrugem da folha, causada por *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*, é a principal doença da aveia (*Avena sativa* L.). Tradicionalmente, a resistência utilizada nos programas de melhoramento é a completa, controlada por um ou poucos genes, sendo superada rapidamente pelo patógeno. Há várias décadas, tem sido sugerido que a resistência parcial pode ser mais durável. A cultivar URS 21 apresenta resistência parcial à ferrugem da folha e tem permanecido resistente desde seu lançamento, no ano 2000. Este estudo visou identificar aspectos bioquímicos e moleculares envolvidos na resistência parcial de URS 21 à ferrugem da folha. Foram utilizados dois genótipos suscetíveis e um completamente resistente como controles. Em plântulas e plantas inoculadas com o patógeno, foi verificado em URS 21 um aumento na síntese de compostos fenólicos máximo em 24 horas após a inoculação (hai), enquanto que URS 22 (susceptível) teve aumento tardio, 120 hai, provavelmente relacionado com a colonização do fungo. Em URS 21, foi verificado aumento da expressão de genes envolvidos na produção de avenantramidas, elevada concentração de compostos fenólicos totais, expressão de peroxidase, acúmulo de peróxido na epiderme, 24 hai, sugerindo síntese de compostos fenólicos estruturais. O decréscimo na produção de peróxido, em URS 21, a partir de 24 hai, também pode dever-se a produção de fenólicos estruturais. Além disso, em 24 hai, a atividade de ascorbato peroxidase, catalase e glutatona peroxidase, em URS 21, foram inferiores aos demais tempos, sugerindo que o peróxido foi consumido por peroxidases na síntese de fenólicos estruturais. Em plantas adultas de URS 21, inoculadas com o fungo, houve incremento na concentração de saponinas esteroidais, até 72 hai, enquanto que URS 22 em 48 hai, apresentou 15% da concentração máxima encontrada em URS 21, evidenciando a importância deste composto na resistência parcial à ferrugem da folha em URS 21. Além disso, a análise da expressão gênica e transcriptômica indicou a síntese de saponinas esteroidais do tipo avenacosides em URS 21. Das sequências geradas pelo RNA-sequenciamento, com função conhecida, muitas estão envolvidas no metabolismo secundário, estresse oxidativo, regulação transcricional, transporte, morte celular e defesa. Conclui-se que compostos fenólicos e saponinas são os principais componentes do mecanismo de defesa à resistência parcial à ferrugem da folha de URS 21.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, (188p.) Julho, 2012.

MOLECULAR AND BIOCHEMICAL ASPECTS INVOLVED IN PARTIAL CROWN RUST RESISTANCE IN *Avena sativa* L.¹

Author: Adriana de Andrade Figueiró
Adviser: Carla Andréa Delatorre
Co-adviser: Marcelo Teixeira Pacheco

ABSTRACT

Crown rust caused by *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* is the main disease of oats (*Avena sativa* L.) in the world. Traditionally, the resistance exploited by oat breeders completely prevents reproduction of the fungus on the host and it segregates as a single or a few genes, thus, it is rapidly overcome by the pathogen. For several decades, it has been suggested that the partial resistance can be more durable. The Brazilian oat cultivar URS 21 is partially resistant and has remained resistant to crown rust since its release in 2000. This study aimed to identify the biochemical and molecular mechanisms involved in the partial resistance of URS 21 to crown rust. Two susceptible and one completely resistant cultivar were used as control. URS 21 adult plants and seedlings inoculated with the pathogen showed increasing of total phenolics, with maximum value at 24 hours after inoculation (hai), however in URS 22 (susceptible) there was a later increase, at 120 hai, probably related to the fungus colonization. In URS 21, genes involved in production of avenantramids were up regulated after 24 hai. The increase in the concentration of phenolic compounds, peroxidase expression and accumulation of peroxide in the epidermis, was due to the action of peroxidases at 24 hai and indicated that structural synthesis of phenolic compounds was involved in partial resistance in URS 21. The decrease in peroxide production in URS 21, at 24 hai, may be related to the assembly of structural phenolics. Furthermore, the reduction in the activity of ascorbate peroxidase, catalase and glutathione peroxidase in URS 21, at 24 hai, indicated that peroxide has been consumed by peroxidase and structural phenolics synthesis. After 48 hai, in resistant genotypes, fluorescent cells, indicative of cell death, were visualized. In inoculated URS 21 adult plants, an increase in the concentration of steroidal saponins was observed at 72 hai, while in URS 22 an increase was observed in this compound at 48 hai, about 15% of the maximum concentration found in URS 21, demonstrating the importance of this compound in partial resistance to crown rust in URS 21. Furthermore, gene expression and transcriptomics indicated the synthesis of avenacosides, a type of steroidal saponin, in URS 21. Several sequences generated by RNA sequencing were involved in secondary metabolism, oxidative stress, transcriptional regulation, transport, cell death and defense. The data suggest that phenolic compounds and saponins are the main defense mechanisms of partial resistance to crown rust in URS 21.

¹ Doctoral Thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (188p.) July, 2012.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Objetivos | 3 |
| 1.1.1 Objetivo geral | 3 |
| 1.1.2 Objetivos específicos | 3 |
| 1.2 Hipóteses | 4 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 2.1 Aveia | 5 |
| 2.2 Ferrugem da folha | 7 |
| 2.3 Resistência a doenças | 16 |
| 2.4 Genética da resistência à ferrugem da folha | 25 |
| 2.5 Interação planta-patógeno | 27 |
| 2.6 Sequenciamento de nova geração | 37 |
| 2.6.1 RNA-sequenciamento | 39 |
| 2.6.2 Plataforma solexa | 42 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 46 |
| 3.1 Obtenção e multiplicação dos uredósporos | 47 |
| 3.2 Genótipos de aveia utilizados | 47 |
| 3.3 Inoculação | 49 |
| 3.4 Amostragem | 49 |
| 3.5 Extração e Análise de Metabólitos Secundários | 50 |
| 3.5.1 Compostos fenólicos | 50 |
| 3.5.2 Saponinas esteroidais | 50 |
| 3.6 Metabolismo antioxidativo | 51 |
| 3.6.1 Extração de proteína | 52 |
| 3.6.2 Ensaio enzimático | 52 |
| 3.6.2.1 Catalase | 52 |
| 3.6.2.2 Glutathione redutase | 52 |
| 3.6.2.3 Ascorbato peroxidase | 53 |

| | Página |
|---------|--|
| 3.6.2.4 | Quantificação de peróxido de hidrogênio53 |
| 3.6.2.5 | Quantificação de clorofila e carotenóides53 |
| 3.7 | Análises histopatológicas54 |
| 3.7.1 | Determinação de compostos autofluorescentes semelhantes a compostos fenólicos54 |
| 3.7.2 | Determinação de peróxido de hidrogênio55 |
| 3.7.3 | Determinação de superóxido55 |
| 3.8 | Extração de RNA total para análise de expressão gênica55 |
| 3.9 | Síntese de cDNA para análise da expressão ao longo do tempo57 |
| 3.9.1 | Otimização do número ótimo de ciclos de PCR e síntese de cDNA58 |
| 3.10 | Rastreamento de sequência e projeção de <i>primers</i>60 |
| 3.11 | <i>Primers</i> Tempo Real62 |
| 3.12 | PCR Tempo Real62 |
| 3.13 | RNA-sequenciamento64 |
| 3.13.1 | Extração do RNA total64 |
| 3.13.2 | Sequenciamento e edição das sequências66 |
| 3.14 | Análise estatística67 |
| 4 | RESULTADOS68 |
| 4.1 | Mecanismos bioquímicos68 |
| 4.1.1 | Metabólitos secundários68 |
| 4.1.2 | Estresse oxidativo71 |
| 4.1.3 | Pigmentos75 |
| 4.2 | Mecanismos histopatológicos77 |
| 4.3 | Mecanismos moleculares82 |
| 4.3.1 | Padronização do número de ciclos para a síntese de cDNA dupla fita82 |
| 4.3.2 | Expressão gênica83 |
| 4.3.3 | RNA-sequenciamento93 |
| 5 | DISCUSSÃO125 |
| 6 | CONCLUSÕES161 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS163 |
| 8 | APÊNDICES186 |

RELAÇÃO DE TABELAS

| | Página |
|---|--------|
| 1. Tecnologias baseadas no sequenciamento de DNA (Morozova & Marra, 2008)..... | 38 |
| 2. <i>Primers</i> projetados para genes envolvidos no metabolismo secundário e estresse oxidativo de <i>A. sativa</i> e testados na interação com <i>P. coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> | 63 |
| 3. Características dos <i>primers</i> constitutivos testados | 64 |

RELAÇÃO DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| 1. Diferenciação temporal das estruturas de infecção de <i>Uromyces fabae</i> Pers. Adaptado de http://www.botany.ubc.ca/bakkeren/rust%20infection%20process.htm | 12 |
| 2. Representação esquemática do princípio da plataforma Illumina. O cDNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a adaptadores A e B em ambas as extremidades (A). As moléculas de cDNA fita simples são aderidas por afinidade ao suporte sólido onde estão também aderidos em alta densidade oligonucleotídeos complementares aos adaptadores A e B (B). Durante a etapa de pareamento (C), no primeiro ciclo de amplificação da PCR em fase sólida, o adaptador da extremidade livre da molécula aderida ao suporte encontra seu oligonucleotídeo complementar no suporte, formando uma estrutura em ponte. Uma vez fornecidos os reagentes necessários, a PCR é iniciada utilizando a extremidade 3' livre do oligonucleotídeo como <i>primer</i> (C e D). Na etapa de desnaturação (E), a “ponte” é desfeita mediante elevação de temperatura. Repete-se a etapa de pareamento (F), formando novas estruturas em ponte e iniciando um novo ciclo de amplificação. Após uma série de ciclos, serão obtidos <i>clusters</i> de moléculas idênticas ligadas ao suporte (G). Com a incorporação de nucleotídeos terminadores marcados e excitação a laser (H), é gerado sinal, o qual é captado por dispositivo de leitura e interpretado como um dos quatro possíveis nucleotídeos componentes da cadeia (I). O processo de incorporação de nucleotídeo marcado, excitação e leitura, é repetido para cada nucleotídeo componente da sequência (J, K). A leitura é feita de forma sequencial, permitindo a montagem da sequência completa de cada <i>cluster</i> (L) (Carvalho & Silva 2010)..... | 44 |
| 3. Fluxograma dos experimentos realizados..... | 46 |
| 4. Esquema representativo da síntese de cDNA a partir do kit <i>SMARTer</i> | 59 |
| 5. Otimização dos ciclos de PCR para a síntese da dupla fita de cDNA..... | 61 |

6. Amostras da cultivar URS 21 enviadas para o RNA-seq: F1, F2 e F3. Repetições de amostras inoculadas com *P. coronata* f. sp. *avenae* e coletadas 12 hai; C1, C2 e C3. Repetições de amostras não inoculadas com o fungo e coletadas 12 hai.66
7. Compostos fenólicos totais em aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 6, 24, 48, 72 e 120 horas após a inoculação (hai); A. Plântula; B. Planta adulta. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....70
8. Saponinas esteroidais em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).71
9. Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em plântulas de aveia parcialmente resistente (URS 21), suscetível (URS 22), resistente (Leggett) e suscetível (Clinland 64) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....72
10. Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) em plântulas de aveia parcialmente resistente (URS 21), suscetível (URS 22), resistente (Leggett) e suscetível (Clinland 64) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).73
11. Atividade da enzima catalase (CAT) em plântulas de aveia parcialmente resistente (URS 21), suscetível (URS 22), resistente (Leggett) e suscetível (Clinland 64) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....74
12. Atividade da enzima glutaciona redutase (GR) em plântulas de aveia parcialmente resistente (URS 21), suscetível (URS 22), resistente (Leggett) e suscetível (Clinland 64) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas

- comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)..... 75
13. Conteúdo de clorofila total em plântulas de aveia parcialmente resistente (URS 21), suscetível (URS 22), resistente (Leggett) e suscetível (Clinland 64) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 76
14. Conteúdo de carotenoides em plântulas de aveia parcialmente resistente (URS 21), suscetível (URS 22), resistente (Leggett) e suscetível (Clinland 64) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 77
15. Histolocalização de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos feixes vasculares de diferentes genótipos de aveia devido à coloração DAB. A. URS 21 (parcialmente resistente). B. URS 22 (suscetível). C. Leggett (resistente total). D. Clinland 64 (suscetível). A= 100x..... 78
16. Histolocalização de peróxido de hidrogênio no mesófilo de plântulas de aveia inoculadas com ferrugem da folha. A. Genótipo URS 21 (parcialmente resistente). B. URS 22 (suscetível). C. Leggett (resistente total). D. Clinland 64 (suscetível). Análise realizada 24 horas após a inoculação. A= 400x..... 79
17. Histolocalização de peróxido de hidrogênio na epiderme de plântulas de aveia da cultivar URS 21 (parcialmente resistente), inoculadas com ferrugem da folha. A. 0 hai (horas após a inoculação). B. 24 hai. C. 120 hai A= 400x. 80
18. Histolocalização de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) nos feixes vasculares de plântulas de diferentes genótipos de aveia evidenciada pela coloração azul. A. URS 21 (parcialmente resistente). B. URS 22 (suscetível). C. Leggett (resistente total). D. Clinland 64 (suscetível). A= 100x..... 81
19. Histolocalização de superóxido em diferentes genótipos de aveia, em resposta à *Puccinia coronata* f.sp. *avenae*. A. URS 21 (parcialmente resistente). B. URS 22 (suscetível). C. Leggett (resistente total). D. Clinland 64 (suscetível). Análise realizada 6 horas após a inoculação. ASE= apressório sobre estômato. A= 400x... 81
20. Produção de compostos autofluorescentes por diferentes genótipos de aveia, em resposta à *Puccinia coronata* f.sp. *avenae*. A-C. Genótipo URS 21 (resistência parcial), 0, 24 e 48 hai, respectivamente. D-F. Genótipo URS 22 (suscetível), 0, 24 e 48 hai, respectivamente. G-I. Genótipo Leggett (resistente), 0, 24 e 48 hai,

- respectivamente. J-L. Clinland 64 (suscetível), 0, 24 e 48 hai, respectivamente. Setas indicam a autofluorescência. A= 200x. 82
21. Otimização dos ciclos de PCR, ciclo ótimo observado foi 24 menos 1 ciclo: M. marcador de peso molecular 1 kb *plus ladder*; T1. Amostra teste 1; T2. Amostra teste 2; T3. Amostra teste 3; C. Controle do kit. 83
22. Expressão relativa de *antranilato sintase (AS)* em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 85
23. Expressão relativa de *hidroxiantranilato hidrocicinamioltransferase 1 (AsHHT1)* em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 86
24. Expressão relativa de *cafeoil-CoA3-O-metiltransferase (CCoAOMT)* em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 87
25. Expressão relativa de *cilcoatenol sintase (AsCS)* em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 88
26. Expressão relativa de *Celulase sintese (Celsyn)* em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 89
27. Expressão relativa de Lipoxigenase (*Lox*) em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio

- padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)..... 90
28. Expressão relativa de *peroxidase (Pox)* em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação . Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)..... 90
29. Expressão relativa de *Ascorbato peroxidase (APX)* em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)..... 91
30. Expressão relativa de *Catalase (CAT)* em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)..... 92
31. Expressão relativa de *Glutathione peroxidase (GP)* em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)..... 93
32. Fluxograma indicando os dados obtidos através da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial) de aveia inoculado com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. 94
33. Nível de expressão obtido para sequências NBS-LLR que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene..... 96
34. Nível de expressão obtido para sequências com homologia a proteínas quinase dependentes de cálcio (*calcium dependent membrane targeting domain containing protein*) que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS

- 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi superexpressa em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene. 97
35. Nível de expressão obtidos para sequências de transportadores ABC que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene. 99
36. Nível de expressão obtidos para sequências de fatores de transcrição do tipo WRKY que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene. 100
37. Nível de expressão obtidos para sequências do gene MACPF (*Membrane Attack Complex Perforin*) que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene. 101
38. Nível de expressão obtidos para sequências de elementos transponíveis que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene. 102
39. Nível de expressão obtidos para Argonauta (*AGO*) que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene. 103
40. Nível de expressão obtidos para Dicer (*DC*) que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene. 104
41. Nível de expressão obtidos para sequências do gene *PAL* (fenilalanina amônia liase) que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene. 105

42. Nível de expressão obtidos para sequências de 4-cumarato-CoA-ligase que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene. 106
43. Nível de expressão obtidos para sequências de chacona sintase (*CHS*) que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene. 107
44. Nível de expressão obtidos para sequências de triptofano sintase que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*..... 108
45. Nível de expressão obtidos para sequências de antranilato sintase (*AS*), hidroxiantranilato hidroxicinamoil transferase, antranilato isomerase e fosforibosil antranilato transferase, que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene..... 109
46. Nível de expressão obtidos para sequências de *CCoAMT* (cafeoil-CoA3-O-metiltransferase) que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene. 110
47. Nível de expressão obtidos para sequências de geranil difosfato sintase e geranilgeranil difosfato sintase, que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene..... 112
48. Nível de expressão obtidos para sequências de esqualeno sintase, *AsCS* (cilcoatenol sintase) e β -amirin sintase, que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene..... 113

49. Nível de expressão obtidos para sequências de *Celsyn* (celulose sintase), que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene..... 114
50. Nível de expressão obtidos para sequências de calose sintase, que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene..... 115
51. Nível de expressão obtidos para sequências de *APX* (ascorbato peroxidase), que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva o indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene..... 117
52. Nível de expressão obtidos para sequências de *CAT* (catalase), que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*..... 118
53. Nível de expressão obtidos para sequências de glutathiona redutase (*GR*), glutathiona-S-transferase, glutathiona sintase e glutathiona dehidrogenase, que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene..... 119
54. Nível de expressão obtidos para sequências de peroxidase (*Pox*), que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene. 120
55. Nível de expressão obtidos para sequências de lipoxigenase (*Lox*), que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene. 121
56. Nível de expressão obtidos para sequências de proteínas relacionadas à patogênese (*PR*), que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do

| | |
|---|-----|
| genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> | 123 |
| 57. Nível de expressão obtidos para sequências de quitinase, que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> e valores negativos indicam uma repressão do gene..... | 124 |

1 INTRODUÇÃO

A aveia (*Avena sativa* L.), espécie pertencente à família Poaceae, destaca-se por suas propriedades nutricionais, apresentando 16-21 % de proteína no grão. O farelo e a farinha de aveia diminuem os níveis séricos de colesterol total, devido à presença da fibra solúvel β -glucana. Além disso, a utilização da aveia na alimentação humana permite melhoria na digestão, redução da pressão sanguínea, de doenças do coração e câncer de intestino. A aveia também é uma fonte de antioxidantes, que atuam na remoção de radicais livres do organismo.

A aveia cultivada é importante tanto para a alimentação humana como animal, também pode ser utilizada como pastagem de inverno ou adubo verde, com efeito recuperador do solo. Cultivada em várias regiões do mundo, apresenta cerca de 14 milhões de hectares em área plantada e uma produção anual de 30 milhões de toneladas, representando 1,6% da produção mundial total de grãos. Porém, a produção de aveia tem sido reduzida mundialmente devido a diversos fatores.

A ferrugem da folha é a principal doença da aveia em nível mundial. No Brasil, esta doença ocorre anualmente e apresenta alta severidade, diminuindo tanto a quantidade como a qualidade dos grãos de aveia.

A principal forma de controle de doenças fúngicas em aveia tem sido através da resistência genética. No Brasil, esse controle tem quase sempre sido complementado com o uso de fungicidas, especialmente no caso de ferrugem da folha, para a qual a resistência genética não tem sido durável, de modo geral, levando a um aumento do custo de produção.

O tipo de resistência mais utilizada é a conferida por genes de efeitos maiores no fenótipo, que conferem resistência específica à raça. Entretanto, esta tem se mantido efetiva por um período de tempo muito curto, devido à alta pressão de seleção existente sobre o patógeno, levando à rápida superação da resistência. A utilização de resistência parcial, que geralmente é conferida por genes de efeitos menores no fenótipo, é uma alternativa para esse problema, pois permite a sobrevivência do patógeno, interferindo negativamente na sua taxa de desenvolvimento e reprodução, reduzindo a seleção de raças mais virulentas.

A melhor perspectiva do melhoramento para o controle da ferrugem da folha consiste em empregar combinações de genes, independente de terem efeito maior ou menor no fenótipo. Desta forma, torna-se importante o entendimento dos mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos na resistência parcial. A identificação de genes responsáveis pela resistência parcial, além de possibilitar o entendimento dos mecanismos envolvidos na interação planta-patógeno, possibilitará uma aplicação direta no melhoramento genético, seja para o desenvolvimento de marcadores funcionais ou para o desenvolvimento de novas cultivares com resistência não específica à raça de ferrugem da folha e, provavelmente, mais durável.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Determinar os mecanismos envolvidos na resistência parcial à ferrugem da folha da cultivar URS 21 de aveia, genótipo amplamente cultivado no Brasil há mais de 10 anos e que apresenta uma boa proteção contra raças do fungo.

1.1.2 Objetivos específicos

- Analisar temporalmente a produção de compostos fenólicos e saponinas esteroidais, visando investigar o seu envolvimento nos mecanismos de resistência parcial em resposta à ferrugem da folha.
- Analisar ao longo do tempo o estresse oxidativo em resposta à infecção de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* em aveia.
- Investigar mecanismos histológicos envolvidos na resistência parcial em resposta à infecção de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* em aveia.
- Avaliar a expressão de genes envolvidos na produção de metabólitos secundários em resposta à infecção com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*, a partir de sequências depositadas em banco de dados.
- Avaliar a expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo em resposta à infecção com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*, a partir de sequências depositadas em banco de dados.
- Caracterizar os mecanismos moleculares da resistência parcial à ferrugem da folha em aveia através do RNA-sequenciamento.
- Caracterizar *in silico* as sequências obtidas através do RNA-sequenciamento, envolvidas na resistência parcial, em resposta à infecção de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* em aveia.

1.2 Hipóteses

- Existe diferença temporal e espacial na produção de metabólitos secundários entre genótipos de aveia parcialmente resistentes e suscetíveis à ferrugem da folha.
- O metabolismo oxidativo em resposta à ferrugem da folha é diferenciado temporalmente e espacialmente entre genótipos resistentes e suscetíveis de aveia branca.
- Há diferença na expressão gênica de plantas suscetíveis e parcialmente resistentes à ferrugem da folha em aveia após infecção.
- Através do RNA-sequenciamento é possível identificar sequências importantes e envolvidas na resistência parcial à ferrugem da folha em aveia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aveia

A aveia branca (*Avena sativa* L.) pertence à família Poaceae, tribo Avenae. Espécie anual, autógama, alohexaplóide com número cromossômico $2n=6x=42$, sendo o conjunto básico de cromossomos igual a sete, combinando os genomas AACDD de três espécies ancestrais diplóides (Thomas, 1992). Trabalhos indicam que os genomas A e D são mais relacionados que o terceiro genoma C (Murphy & Jallen, 2000). Além disso, a aveia se caracteriza por possuir o maior genoma entre as gramíneas cultivadas (Thomas, 1992). Estas características permitem que a aveia torne-se uma espécie adaptada aos mais diversos tipos de solo e clima (Leggett, 1992).

O centro de origem da aveia branca situa-se na Ásia e Mediterrâneo. Inicialmente a espécie desenvolveu-se como invasora nas culturas de cevada e trigo, até sua domesticação no continente Europeu (Gutkoski & Pedó, 2000). Este cereal apresenta uma ampla adaptação, sendo cultivado em diferentes partes do mundo. Sua maior distribuição e cultivo concentram-se em áreas de clima temperado e úmido, na América do Norte, Europa e Rússia (Murphy & Hoffman, 1992). Em 2009, o país com maior produção mundial foi à Rússia, seguida do Canadá, Polônia e Estados Unidos com produções de 5,4, 2,8, 1,4 e 1,25 milhões de toneladas, respectivamente (FAOSTAT, 2011). Na América Latina, Brasil e Argentina são os maiores produtores, sendo sua introdução atribuída aos imigrantes europeus. Pelos dados da FAO, em 2009,

o Brasil ocupava a vigésima posição mundial, com uma produção de cerca de 240 mil toneladas, quantidade que cresceu significativamente desde 1995 (FAOSTAT, 2011). Segundo a CONAB (2011) para as safras 2010 e 2011, a produção de aveia no Brasil aumentou para 369 mil toneladas, embora o país já tenha chegado a produzir 516,5 mil toneladas em 2005; sendo o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor, seguido pelo Paraná.

A aveia é uma espécie anual cujo ciclo de vida varia de 120 dias a cerca de 200 dias, dependendo da cultivar e das condições edafoclimáticas da região de cultivo (Gutkoski & Pedó, 2000). Possui hábito de crescimento cespitoso, podendo atingir uma estatura de 0,70 a 2,00 m. Apesar da grande diversidade quanto ao fotoperíodo, a aveia é considerada uma planta de dias longos, que devido ao intenso melhoramento genético e a variabilidade existente está adaptada a vários ambientes, podendo ser amplamente cultivada (Shands & Cisar, 1988).

Até o final da década de 1970 as variedades cultivadas no Brasil eram provenientes dos EUA e Argentina. Esses materiais em condições brasileiras de cultivo apresentavam ciclo de vida longo, de aproximadamente 150 dias, estatura elevada (150 cm), o que proporcionava acamamento, baixa adaptação, reduzida produtividade e qualidade insatisfatória de grãos. Assim, a aveia foi preterida por outras culturas de inverno e o Brasil passou a ser importador do grão da Argentina e Uruguai (Federizzi & Pacheco, 2009).

Em 1974, deu-se início na Universidade Federal do Rio Grande do Sul o Programa de Melhoramento Genético da Aveia, com o objetivo principal de transformar a aveia branca de uma planta produtora de forragem em produtora de grãos de alta qualidade. Desta forma, foram introduzidas dos EUA populações segregantes e, posteriormente, foram realizados cruzamentos intraespecíficos. Os caracteres que

receberam maior atenção foram altura de planta, dias para florescimento e ciclo até a maturação, rendimento de grãos, tolerância ao alumínio, uniformidade e qualidade dos grãos e resistência a doenças (Federizzi & Pacheco, 2009).

Atualmente a aveia é um dos principais cultivos durante o período do inverno no sul do Brasil, sendo uma excelente alternativa no sistema de rotação com o trigo. A importância desta cultura é devido à sua versatilidade, pois além de servir como alternativa para o sistema de rotação de culturas pode ser utilizada para a produção de forragem verde, feno, silagem ou grãos e cobertura verde ou morta do solo (Floss, 2002; Federizzi & Mundstock, 2004). O uso da aveia no sistema de plantio direto é bastante interessante devido a sua elevada relação C/N, proporcionando uma menor velocidade de decomposição da palha; assim, o solo fica coberto por um maior período de tempo. Além disso, outra razão para o uso da aveia no plantio direto é a quebra do ciclo de vida de alguns patógenos do trigo e cevada, tais como *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* e *Pyrenophora teres*. Desta forma, a rotação com aveia apresenta-se como um método de controle cultural desses patógenos (Federizzi, 2002).

No Brasil, a aveia é atualmente cultivada em cerca de 150.000 ha, concentrados quase que totalmente na Região sul do país. Entretanto, o rendimento médio das lavouras de aveia no país ainda é considerado baixo, em torno de 2,5 t.ha⁻¹ (FAOSTAT, 2011). Um dos fatores responsáveis por esta baixa produtividade é a ocorrência de doenças, sendo portanto, a resistência genética um dos principais objetivos dos programas de melhoramento em nível mundial (Ohm & Shaner, 1992, Federizzi, 2000; Oates, 2000).

2.2 Ferrugem da folha

A principal doença da aveia em nível mundial é a ferrugem da folha e os danos causados a cultura são resultantes das modificações fisiológicas causadas pelo

desenvolvimento do fungo. Desta forma, é verificada uma correlação negativa entre o rendimento de linhagens de aveia e a severidade da ferrugem da folha (Martinelli *et al.*, 1994; Caierão *et al.*, 2001; Chaves *et al.*, 2004). Em cultivares suscetíveis, sob infecção natural e em condições de campo, níveis de até 90 % de severidade da doença com redução no rendimento de até 80 % foram observados no sul do Brasil (Martinelli *et al.*, 1994; Chaves *et al.*, 2002) A maior redução observada do rendimento de grãos devido à ferrugem da folha foi de 95 % na cultivar UPF 16 (Martinelli & Buss, 1999). Estas perdas são consequência da agressividade da população do patógeno, a carência de genes efetivos de resistência e as condições favoráveis do ambiente, por longos períodos, para o desenvolvimento do patógeno (Chaves *et al.*, 2008). Portanto, cultivares suscetíveis têm seus rendimentos severamente afetados, necessitando do uso de fungicidas, o que pode proporcionar menores danos à produção (Simons & Murphy, 1961; Forcelini & Reis, 1997).

O patógeno prejudica a fotossíntese das plantas, o que ocasiona a diminuição do rendimento, além de provocar um menor peso de grãos e maior taxa de quebra de grãos durante o descascamento, acarretando a redução na qualidade industrial, nutricional e no valor do produto (Simons, 1985; Cruz *et al.*, 1999; Doehlert & McMullen, 2000; Doehlert *et al.*, 2001).

Doença mais importante da cultura, a ferrugem da folha é encontrada em todas as regiões de cultivo da aveia no mundo, sendo mais severa em áreas úmidas (período de molhamento foliar mínimo de 6 horas) e temperatura média entre 16 e 20 °C (Rooney *et al.*, 1994; Matzembacher, 1999). O agente causal da ferrugem da folha em aveia é o fungo biotrófico *Puccinia coronata* Corda f. sp. *avenae* Eriksson, pertencente ao filo Basidiomycota, classe Urediniomycetes, ordem Uredinales, família Pucciniacea. Este se caracteriza por ser um parasita obrigatório e apresentar uma alta especialização

fisiológica. Na fase assexua, o fungo é disseminado através de uredósporos, que podem percorrer até 2.000 km de distância pelo vento (McDonald & Linde, 2002). Os uredósporos germinam em temperaturas que variam de 2 a 33 °C, sendo as temperaturas ótimas entre 18 e 22 °C, e umidade relativa de 100 % (Forcelini & Reis, 1997). Assim como os demais patógenos responsáveis pelas ferrugens em hospedeiros da família Poaceae, *P. coronata* f. sp. *avenae*, se caracteriza por ser heteroécio (necessita de duas espécies hospedeiras para completar seu ciclo) e policíclico (vários ciclos secundários), completando cada ciclo entre 7 e 10 dias (Roelfs *et al.*, 1992; Agrios, 2005; Webster & Weber, 2007). Cada fase é marcada por propriedades fisiológicas e morfológicas únicas. Sendo que este fungo pode apresentar até cinco estádios em seu ciclo de vida (Harder & Haber, 1992; Heath, 1997). A ferrugem da folha é especialmente destrutiva quando o inverno é ameno e a primavera é úmida. Ataca as espécies de aveia branca (*A. sativa*) e preta (*Avena strigosa*), sendo que algumas raças também ocorrem em azevém (Forcelini, 2002).

O desenvolvimento da ferrugem ocorre durante a fase uredial do fungo, após a deposição dos uredósporos no hospedeiro e sua germinação (Leonard & Szabo, 2005). Esta germinação ocorre em condições de alta umidade, quando um filme de água, geralmente proveniente de orvalho, cobre a superfície da folha (Harder & Haber, 1992; Heath, 1997), porém existem evidências que a presença de alguns íons e mudanças de pH também podem estimular a germinação dos esporos (Couey & Smith, 1961).

A germinação do uredósporo resulta na formação do tubo germinativo. Os tubos germinativos de *P. coronata* f. sp. *avenae* penetram através dos estômatos, localizando-se internamente na câmara subestomática (Harder & Haber, 1992). Quanto maior a quantidade de energia gasta no crescimento do tubo germinativo menores são as chances de se estabelecer uma colônia vigorosa, uma vez que, até a formação de

haustórios, todo crescimento fúngico depende somente das reservas presentes no esporo (Niks, 1990; Read *et al.*, 1992).

Os tubos germinativos de *Puccinia* spp. possuem grande capacidade de perceber sinais físicos na superfície foliar dos hospedeiros (Allen *et al.*, 1991; Read *et al.*, 1992). De 91 a 99 % dos tubos germinativos formados por *P. graminis* e *P. hordei* formam apressórios ao encontrar o estômato da planta. Read *et al.* (1997) ao testar um substrato artificial demonstraram que 83 a 86 % dos tubos germinativos formados por estas espécies são induzidos a formar apressórios somente através de sinais topográficos. Sugere-se que o tubo germinativo seja capaz de perceber as características topográficas do complexo estomático, como a posição e o espaçamento das células adjacentes aos estômatos, bem como a forma e tamanho destes nos diferentes cereais e, assim, induzir a formação de apressórios (Collins & Read, 1997; Staples, 2000; O'Connell & Panstruga, 2006).

Além dos sinais físicos, sinais químicos da folha, como ceras epicuticulares, gradiente de pH ao redor do estômato e compostos voláteis liberados pelos estômatos, influenciam na formação de apressórios. Collins *et al.* (2001) ao isolarem estímulos físicos através da indução em substratos artificiais e químicos via aplicação de compostos voláteis liberados pelos estômatos na indução da formação de apressórios de *P. graminis* f. sp. *tritici*, relataram uma taxa de formação de cerca de 60%, 12 h após a inoculação (hai). Quando avaliaram o efeito combinado dos sinais, este valor aumentou para cerca de 90 %, demonstrando a importância de ambos na diferenciação dos apressórios.

A formação tanto de uredósporos como de tubo germinativo ocorre à noite em presença de um filme de água na superfície da folha. Estudos com *P. graminis* indicam que o desenvolvimento é paralisado após a formação do apressório até a próxima

manhã, quando o crescimento é restabelecido através do estímulo de luz. A luz estimula os processos fotossintéticos, que reduzem a taxa interna de CO₂, permitindo o desenvolvimento do apressório. A penetração do apressório de *P. graminis* não foi observada em plantas de trigo estioladas, submetidas a ambiente com altas taxas de CO₂ (Yirgou & Caldwell, 1963; Leonard & Szabo, 2005). Além disso, para *P. striiformis* foi verificado que a intensidade luminosa incrementa a taxa de penetração, entretanto, a penetração através dos estômatos também ocorre em períodos de ausência de luz, sugerindo que outros fenômenos controlados pela luz estão envolvidos neste processo (Vallavieille-Pope *et al.*, 2002).

Após a penetração do fungo na câmara subestomática, forma-se uma vesícula subestomatal e hifas infectivas. Em trigo, este processo ocorre cerca de 6 h após a inoculação com *P. triticina* (Hu & Rijkedaberg, 1998). As hifas infectivas, ao entrarem em contato com a parede celular de células do mesófilo da planta diferenciam-se em células mãe do haustório, cerca de 12 h após a inoculação. Estas formam um grampo estreito e penetram a parede celular hospedeira, provavelmente por dissolução enzimática e pressão. No espaço periplasmático, uma célula especializada expande-se formando o haustório, cerca de 24 h após inoculação (Figura 1). Após este período inicia-se o crescimento de hifas intercelulares, até que uma colônia fúngica forme-se dentro do tecido hospedeiro. Sugere-se que a hifa infectiva é capaz de absorver nutrientes antes da formação do primeiro haustório, esta absorção limita-se a alguns aminoácidos. A absorção de carboidratos é feita somente pelos haustórios, que repassam os carboidratos para a hifa celular (Heath, 1981; Harder & Haber, 1992; Heath, 1997; Hu & Rijkedaberg, 1998; Struck *et al.*, 2002; Leonard & Szabo, 2005).

Os haustórios desenvolvem-se dentro do lúmen, mas permanecem fora da membrana plasmática da célula do hospedeiro. A interface formada entre planta e

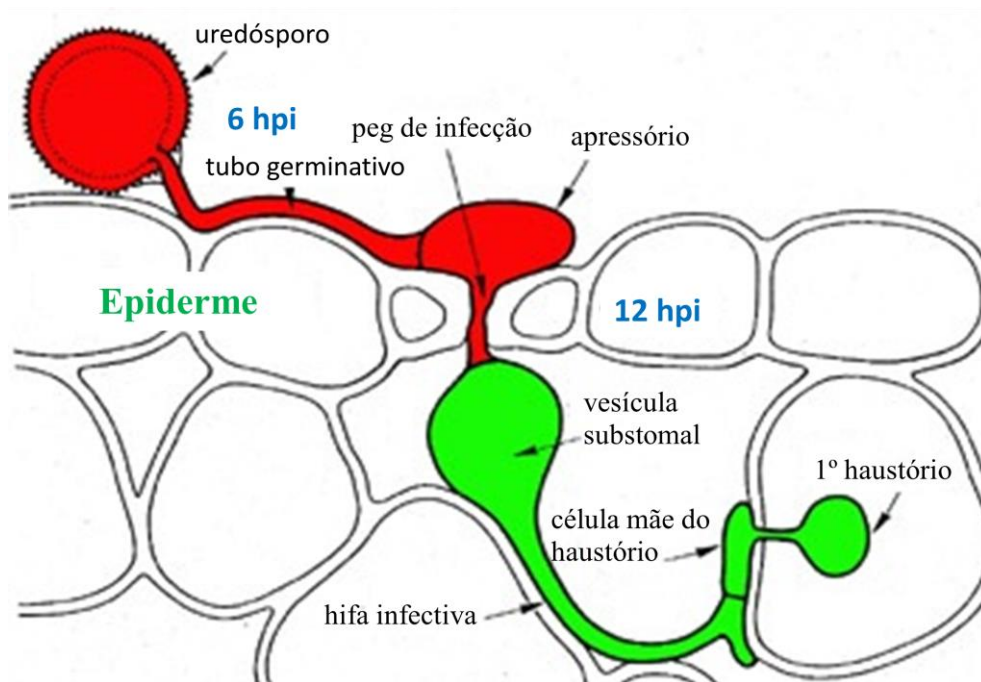


FIGURA 1. Diferenciação temporal das estruturas de infecção de *Uromyces fabae* Pers.
Adaptado de <http://www.botany.ubc.ca/bakkeren/rust%20infection%20process.htm>.

patógeno compreende a membrana plasmática da planta e a parede celular do fungo, uma membrana interfacial derivada da planta (membrana extra-haustorial) e uma matriz interfacial (matriz extra-haustorial) que separa a membrana interfacial da parede celular do fungo (O'Connell & Panstruga, 2006).

A formação de haustórios é um elemento chave para manutenção da vida dos organismos biotróficos, facilitando sua interação com a célula hospedeira. Estes desempenham função não só na aquisição de nutrientes, mas também nas vias biossintéticas, supressão de defesas do hospedeiro e redirecionamento de metabólitos da planta (Voegelé *et al.*, 2001; Voegelé & Mendgen, 2003). Assim, a interface entre a célula hospedeira e o haustório media uma interação dinâmica envolvendo extensivo tráfico de nutrientes e moléculas de sinalização. Proteínas efetoras secretadas pelo patógeno podem entrar no citoplasma hospedeiro, alterar o metabolismo hospedeiro e rotas de defesa. Desta forma as correspondentes proteínas de resistência (R) da planta podem reconhecer as proteínas efetoras do patógeno que são denominadas de proteínas

Avr (Dodds *et al.*, 2007). Após a formação do primeiro haustório, a hifa infectiva desenvolve outras células mãe do haustório. Sendo a energia para produção dos primeiros haustórios proveniente de reservas presentes nos uredósporos e o desenvolvimento de haustórios subsequentes dependentes do estabelecimento de uma interação compatível de parasitismo (Szabo & Bushnell, 2001; Panstruga, 2003; Leonard & Szabo, 2005).

Em interações compatíveis, ou seja, que há o desenvolvimento da doença, a formação de colônias está associada à formação de tecido esporogênico, um tecido altamente vacuolizado e rico em lipídios que dará origem aos uredósporos (Harder, 1976). A colonização pode ser facilitada pela produção de fitotoxinas e compostos semelhantes a hormônios vegetais pelo patógeno (Harder & Haber, 1992; Harder & Haber, 1995; Heath, 1997).

As pústulas desenvolvem-se principalmente em ambas as superfícies da lâmina foliar, podendo também aparecer nas bainhas, panículas e colmos. Estas se caracterizam por serem pequenas, ovais, isoladas e expõem uma massa alaranjada de uredósporos (Forcelini & Reis, 1997). Os uredósporos são dicáricos, espessos, cobertos por espinhos e esféricos, com aproximadamente 30 μm de diâmetro (Harder & Haber, 1992). À medida que o ciclo da cultura avança (final da estação), é cessada a formação de uredósporos e inicia-se a formação de teliósporos. As pústulas tornam-se de coloração pardo-escuras ou negras e permanecem recobertas pela epiderme (Harder & Haber, 1992; Harder & Haber, 1995). Dentro destas pústulas, desenvolvem-se os teliósporos que possuem projeções em forma de coroa nas células apicais, razão pela qual a doença é também conhecida como ferrugem da coroa (Forcelini & Reis, 1997). A ontogenia dos teliósporos é a mesma dos uredósporos, porém, os teliósporos permanecem sésseis (Harder & Haber, 1992; Harder & Haber, 1995). Estes esporos também são formados

durante condições adversas de temperatura, como seca, umidade excessiva ou temperaturas muito altas, mas não são fonte de inóculo para novas infecções nas condições brasileiras, pois os hospedeiros intermediários suscetíveis não são encontrados no Brasil.

A germinação dos teliósporos e a meiose no basídio resultam na formação de esporos haplóides (basidiósporos), que são dispersos pelo vento. Estes por sua vez, na presença de hospedeiro alternativo, germinam e penetram sob a epiderme do hospedeiro, formando uma colônia haplóide (Harder & Haber, 1995; Marshall & Sutton, 1995). Nesta formam-se pícneas (corpos de frutificação) na superfície adaxial da folha. Os picniósporos são exsudados como uma espécie de néctar, assim, os insetos ou forças físicas transportam-os entre pícneas de diferentes tipos, onde a fusão com a hifa respectiva dará início a fase aecial (Shriver & Munkvold, 2011).

A fase aecial caracteriza-se pela dicarionização, que ocorre após a união de diferentes pícneas, resultando na formação de aécias. Os aécios produzem aeciósporos, que são disseminados pelo vento, infectando cultivares suscetíveis de aveia. Os aeciósporos diferem geneticamente dos picniósporos ou hifa receptiva. Esta troca de material genético resulta na formação de novas raças do patógeno (Malvick, 2011). Assim, cada aeciósporo dá origem a uma urédia, completando o ciclo de vida do patógeno (Marshall & Sutton, 1995).

P. coronata f.sp. *avenae* possui como hospedeiros intermediários principais *Rhamnus cathartica* e *Rhamnus palastina*, onde sua fase sexual é completada. Entretanto, estes hospedeiros não existem no hemisfério sul, sendo no Brasil a ferrugem da folha da aveia autoécia, ou seja, não apresenta fase sexual, pela ausência de hospedeiro alternativo, desenvolvendo-se em apenas um hospedeiro durante seu ciclo de vida. Os teliósporos, esporos de descanso, são encontrados em tecidos senescidos,

porém, não constituem inóculo aos cereais de inverno, somente ao hospedeiro alternativo (Martinelli, 2000; Reis *et al.*, 2001). Deste modo, somente a fase assexual ocorre no Brasil, sendo a variabilidade patogênica existente no país devido principalmente a: 1) mutações; 2) ao cultivo de aveia durante todo o ano no Cone Sul, sem barreiras físicas para impedir a disseminação dos esporos; e, 3) às condições de ambiente que permitem inúmeros ciclos de infecção (Vieira *et al.*, 2006a).

O elevado fluxo, através dos esporos carregados pelo vento a longas distâncias (até 2.000 km), e a existência de grandes populações, em associação a uma alta taxa de mutação (1:500 a 1:3000), possibilita ao patógeno grandes chances de sucesso na superação da resistência, podendo ocorrer a seleção de novas raças em intervalos de 4 a 6 anos (McDonald & Linde, 2002).

A estrutura populacional do patógeno no sul do Brasil é considerada complexa e extremamente diversificada, fundamentalmente constituída por super-raças, as quais possuem de 8 a 27 genes de virulência por raça (Martinelli, 2000; Leonard & Martinelli, 2005). O espectro de virulência das raças encontradas neste ambiente é tão complexo quanto o observado em outros países, incluindo Israel, considerado o centro de origem do patógeno. Em locais com grande pressão de inóculo do patógeno, como a América do Sul, a superação da resistência observada é favorecida pelo grande tamanho da população do patógeno, a alta taxa de mutação, ao longo período com condições favoráveis à doença, e ao fluxo contínuo de raças entre as regiões produtoras de aveia do Brasil, da Argentina e do Uruguai, devido ao modelo cíclico de distribuição de ventos (Martinelli, 2004; Leonard & Martinelli, 2005).

Assim como para outros patógenos que produzem propágulos, *P. coronata* f. sp. *avenae* apresenta um alto potencial de dispersão a longas distâncias e tende a apresentar maior diversidade genética, já que pode haver troca de material genético entre diferentes

regiões. Os propágulos assexuais apresentam maior risco de superar genes de resistência do que propágulos sexuais, já que propágulos assexuais representam um “pacote fechado” de alelos adaptados já selecionados. Estes genótipos recombinados podem sofrer pressão de seleção em diferentes condições ambientais, com a presença de genes de resistência e fungicidas. As combinações de alelos mais adaptadas são mantidas unidas por reprodução assexual e podem aumentar de frequência em clones selecionados. A distribuição espacial e temporal dos clones ou linhagens clonais, dentro, ou entre populações, irá depender basicamente do potencial de dispersão dos propágulos assexuais. Se o propágulo assexual for capaz de mover-se a longas distâncias, os clones com maior adaptação podem se distribuir em uma ampla área, causando epidemias (McDonald & Lindle, 2002). Segundo os autores, de acordo com o modelo de risco do potencial evolucionário, patógenos com altas taxas de mutação possuem maior risco de superar genes de resistência do que patógenos com baixas taxas de mutação. Isto ocorre pelo fato de que altas taxas de mutação aumentam a probabilidade de ocorrer mutação de um gene de avirulência para virulência, ou de uma menor patogenicidade, para uma alta patogenicidade, em dada população.

2.3 Resistência a doenças

Entre as estratégias de controle de doenças em plantas, o uso da resistência genética é considerada a mais eficiente, pela sua economicidade e por ser ambientalmente segura (Priestley & Bayles, 1988; Harder & Haber, 1992). Além disso, a resistência genética tem proporcionado uma boa proteção à cultura da aveia, assegurando a expressão do potencial de rendimento dos genótipos (Federizzi, 2000; Cruz *et al.*, 2001; Pink, 2002; Martinelli, 2004). Apesar da resistência se apresentar como regra e a suscetibilidade como exceção, devido à constante pressão de seleção

entre patógeno e hospedeiro, há uma constante coevolução, o que torna a durabilidade da resistência transitória (Parlevliet, 2002).

Parlevliet (1997) define a resistência de plantas como a habilidade do hospedeiro em paralisar ou reduzir o desenvolvimento do patógeno. Sendo, na maioria dos patossistemas *Puccinia* x Poaceae a herança da resistência dominante e a suscetibilidade recessiva (Dinnor *et al.*, 1988).

As populações hospedeiras de fungos como ferrugens vêm sendo classificadas como resistentes, moderadamente resistentes, suscetíveis e moderadamente suscetíveis (McIntosh *et al.*, 1995). Existem vários conceitos que descrevem a resistência embora existam muitas derivações quanto a essa classificação e muitas das definições se sobrepõem. Quanto ao seu mecanismo pode ser de hipersensibilidade ou não, pré ou pós-haustorial; quanto ao modo de herança, esta pode ser monogênica, oligogênica, poligênica, de genes de efeito maior ou menor no fenótipo; com base na especificidade das relações entre patógeno e hospedeiro é considerada específica à raça ou não específica à raça; quanto à presença ou ausência de reações no hospedeiro, ativa ou passiva; com base na expressão da resistência é total, parcial, residual, de campo, de plântula, de planta adulta ou geral; quanto à distribuição de classes fenotípicas é qualitativa ou quantitativa (Nelson, 1973; Heath, 1981; Parlevliet, 1997; Vale *et al.*, 2001).

De forma geral, a resistência conferida por mecanismos de hipersensibilidade apresenta-se efêmera no controle das ferrugens dos cereais, no entanto, é um mecanismo muito eficiente para o controle de doenças causadas por procariotos ou vírus (Niks & Rubiales, 2002). Por outro lado, mecanismos de resistência pré-haustoriais são particularmente eficientes contra patógenos biotróficos (Graichen, 2009).

Mecanismos pré-haustoriais podem ser definidos como aqueles desencadeados antes da formação do primeiro haustório, sendo observados principalmente em resistência tipo não hospedeiro. Em diversos casos há uma redução da penetração do fungo no tecido hospedeiro resultante da inviabilização de processos do desenvolvimento do patógeno. A germinação de uredósporos é alta até mesmo em não hospedeiros, porém, há uma dificuldade do tubo germinativo em localizar e reconhecer o estômato (Heath, 1981). Em aveia existem evidências de baixas taxas de tubos germinativos que encontram estômatos e também há diferentes taxas para diferentes cultivares (Kochman & Brown, 1975).

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

Na maioria dos casos a resistência pré-haustorial não está associada com eventos de necrose celular, mas sim com a formação de papila nas paredes celulares. Esta papila pode ser formada como uma barreira à penetração, ou mesmo uma resposta de reparo à parede celular perfurada pela tentativa de invasão do fungo (Jørgensen, 1992).

A resistência pós-haustorial é desencadeada após a formação do primeiro haustório e envolve processos muito complexos. Os mecanismos desencadeados nesse tipo de resistência estão envolvidos na redução do desenvolvimento do fungo, e não na morte deste organismo (Heath, 1981). A morte celular no hospedeiro é a forma mais comum de resistência pós-haustorial. Este fenômeno não é uniforme e difere

ultraestruturalmente em cada interação patógeno-hospedeiro, sugerindo também que haja diferenças bioquímicas para cada interação.

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

Outra forma de classificar a resistência é com base na especificidade das relações entre patógeno e hospedeiro. A resistência específica à raça, também conhecida como resistência total, é geralmente conferida por genes de grande efeito sobre o fenótipo (genes maiores), comumente monogênica ou oligogênica, que determinam ao hospedeiro resistência às raças específicas do patógeno. Neste tipo de resistência há a interação cultivar x raça (Matiello *et al.*, 1997; Parlevliet, 1997; Ribeiro do Vale *et al.*, 2001), e o mecanismo de ação desta resistência atua de acordo com o modelo de interação gene-a-gene (Flor, 1956). Esta teoria preconiza que para cada gene de resistência na planta existe um complementar de avirulência no patógeno. Nas interações planta-patógeno incompatíveis, o reconhecimento do produto de um gene de avirulência (*AVR*) codificado pelo microrganismo é dado através do produto de um gene de resistência (*R*) do hospedeiro, o que desencadeia a morte celular localizada nas células da planta infectada, conhecida como resposta de hipersensibilidade, além de desencadear outras respostas de defesa que previnem o crescimento futuro do patógeno. Na ausência do gene *R* ou de seu correspondente gene *Avr*, uma interação compatível ocorre, sendo então o patógeno hábil para proliferar e causar doença (Skamnioti & Ridout, 2005). Esta relação genética entre hospedeiro e patógeno, nomeada interação

gene-a-gene, está envolvida na resistência de uma ampla gama de patógenos biotróficos. O escape do reconhecimento do hospedeiro é possível devido alterações que podem ocorrer na estrutura proteica, através de substituição de códons não sinônimos, mutações, ou deleções completas ou parciais de genes *Avr* (Stukenbrock & McDonald, 2007).

A resistência total, específica à raça é o tipo de resistência mais utilizada pelos programas de melhoramento. Isto se deve ao fato de estar baseada na reação de hipersensibilidade (HR), que consiste na morte celular localizada no local da infecção, após a percepção da violação da parede celular e tentativa de formar haustórios (Ellis, 2006). Além disso, a variação da resistência está geralmente controlada pela segregação de um único ou poucos genes de resistência (Heath, 2000). Estas características tornam este tipo de resistência atrativa por ser mais facilmente identificada e transmitida para progênie, tornando-se menos laboriosa à seleção. Entretanto, a resistência total exerce uma forte pressão de seleção sobre a população patogênica. Não são raros os casos em que quando uma variedade é lançada, já existem na população patogênica combinações de virulência capazes de superar esta resistência (Graichen, 2009).

Apesar da maior facilidade no uso deste tipo de resistência para o melhoramento vegetal, a resistência total possui a desvantagem de ser, geralmente, pouco durável. Esta pouca durabilidade deve-se principalmente a grande habilidade dos patógenos em adaptar-se geneticamente aos hospedeiros, sendo a resistência superada em pouco tempo (cerca de 2 a 4 anos). Como consequência, há o rápido surgimento de novas raças altamente virulentas (aproximadamente três novas raças ao ano) (Niks & Rubiales, 2002). Deste modo, é necessário o constante desenvolvimento e lançamento de novas cultivares resistentes (Barbosa *et al.*, 2002).

Na resistência não específica à raça, todas as raças do patógeno provocam resposta similar em determinado genótipo hospedeiro, ou seja, a resistência é efetiva contra todas as raças conhecidas do patógeno, sem a interação cultivar x raça. Além disso, se caracteriza por ser comumente poligênica (Roelfs & McVey, 1979; Harder & Haber, 1992). Contudo, é praticamente impossível testar contra todas as raças de um determinado patógeno, tornando a definição relativa ao universo de raças testadas. Esta resistência é bastante promissora, pois, devido as suas características, impõe menor pressão de seleção sobre a população patogênica do que a resistência específica à raça (Chaves *et al.*, 2004).

A resistência também pode ser classificada através da distribuição das classes fenotípicas, podendo ser qualitativa ou quantitativa. Quando a resistência é qualitativa observam-se classes fenotípicas distintas e marcadamente diferentes, como níveis muito altos e muitos baixos da moléstia, ou mesmo completa ausência de sintomas, com clara distinção entre genótipos resistentes e suscetíveis (Ribeiro *et al.*, 2001). A resistência específica à raça geralmente produz resistência qualitativa, embora a interação com o ambiente possa mascarar as diferenças entre as classes, produzindo uma variação não discreta (Geiger & Heun, 1989).

A resistência quantitativa, entretanto, é aquela que é expressa em uma escala contínua de variação, não formando classes fenotípicas discretas (Geiger & Heun, 1989). Este tipo de resistência geralmente está associada à resistência tipo raça não específica (Johnson, 1984).

A resistência não específica ou resistência parcial é atrativa, pois não ocasiona uma forte pressão de seleção sobre o patógeno (Hoffman *et al.*, 2006). Plantas com resistência parcial são aquelas suscetíveis que expressam uma redução nos componentes da doença, mas não todos, quando comparadas com plantas altamente suscetíveis

(Brake & Irwin, 1992). A resistência parcial é quantitativa e baseada em genes de pequeno efeito no fenótipo (Parlevliet & Zadoks, 1977), embora possa, em alguns casos, ser controlada por genes de maior efeito e dominantes (Thomé *et al.*, 1999). Este tipo de resistência se caracteriza por apresentar um progresso lento da doença, pois atua reduzindo a taxa de progresso e conseqüentemente o número de ciclos da doença. Isso ocorre devido à redução dos componentes da resistência tais como: menor frequência de infecção, maior período latente, menor produção de esporos por pústulas e redução no período infeccioso, sendo que estes componentes podem atuar isoladamente ou em conjunto na redução da doença. De maneira oposta, a resistência conferida por genes maiores e específica à raça é expressa pela redução do inóculo inicial. Assim, na presença de raças avirulentas do patógeno não há o desenvolvimento da doença, o que ocasiona uma forte pressão de seleção sob a população patogênica.

Embora a resistência parcial geralmente apresente herança quantitativa, existem alguns casos onde pode ser conferida por poucos genes de maior efeito fenotípico. Um exemplo de herança monogênica da resistência parcial é o gene *Lr46* em trigo que confere resistência à ferrugem da folha. A resistência conferida por este gene afeta dois dos componentes da resistência, aumentando o período latente e reduzindo a taxa de infecção. Outro exemplo de gene que confere resistência a raças não específicas do patógeno e monogênico é o *mlo* de cevada que vem conferindo uma resistência durável a oídio em cevada (Jørgensen, 1992).

A resistência parcial não está baseada no modelo gene-a-gene, com reconhecimento efetor-receptor e age de forma muito semelhante contra todas as raças do patógeno. Sua genética está baseada em vários genes, que podem estar ligados ou não, e geralmente apresentam efeitos iguais e aditivos. Isto quer dizer que estes genes, de forma isolada, produzem um efeito de forma pouco pronunciada sobre o fenótipo.

Desta forma, para a proteção durável das cultivares, onde o objetivo não é eliminar totalmente o patógeno, mas sim evitar que alcance níveis prejudiciais à cultura hospedeira (Thomé *et al.*, 1999), a resistência parcial é uma estratégia que vem sendo sugerida como solução para o problema das doenças em plantas.

Considerando-se um único patossistema, alguns fatores podem afetar a expressão da resistência parcial, dentre os quais se destaca o genótipo, o estágio de desenvolvimento da planta, a idade e a posição da folha na planta. Assim, em uma avaliação dos componentes da resistência, estes fatores devem ser considerados (Parlevliet, 1979).

Para *Puccinia sorghi* no milho e *Puccinia triticina* no trigo, o período latente avaliado em cultivares suscetíveis foi pouco influenciado pelo estágio de desenvolvimento da planta (Pataky, 1986; Pretorius *et al.*, 1988). Entretanto, o período latente foi afetado pela posição da folha e pelo genótipo hospedeiro (Pretorius *et al.*, 1988). Broers (1989) encontrou resultados semelhantes ao estudar *P. triticina* em trigo, evidenciando que o aumento na resistência com o aumento da idade da planta pode ser dividido em duas categorias: aumento da resistência causado por diferenças no tecido foliar e aumento da resistência por causa dos genes da resistência parcial, que talvez não se expressem em plântulas ou que se expressem melhor em plantas adultas. Segundo Broers (1989), testes com plântulas, apesar de requererem menos tempo e espaço do que testes com plantas adultas, e de não sofrerem problemas relacionados a diferenças de crescimento, podem não fornecer resultados precisos. De acordo com Parlevliet (1975) e Parlevliet & Kievit (1986), há uma correlação entre período latente de plântulas e de plantas adultas, mas deve-se ter cautela ao se considerar a avaliação feita em plântulas, principalmente em cultivares mais resistentes.

Ao comparar folhas de diferentes estágios de desenvolvimento, foi observado um aumento do período latente de *Puccinia hordei*, em cevada, em direção às folhas mais jovens (Parlevliet, 1975; Parlevliet, 1976; Parlevliet, 1979). Portanto, existem duas tendências em relação ao período latente: um aumento nesse período à medida que a planta se desenvolve e uma diminuição em razão do envelhecimento da folha, sendo a resistência parcial, nesse patossistema, altamente correlacionada com a duração do período latente na folha bandeira.

De acordo com Johnson (1984), a resistência é considerada durável quando permanece efetiva por longo período de tempo, em um genótipo extensamente cultivado e que esteja exposto ao patógeno. Dentre os tipos de resistência considerados mais duráveis, destaca-se a resistência parcial, que permite o desenvolvimento restrito do patógeno através da redução da infecção, patogênese e esporulação, quantitativamente (Parlevliet, 1975).

Porém, a avaliação da resistência parcial é mais trabalhosa e desafiadora para o melhorista, em comparação com a seleção para a resistência total. Os principais métodos utilizados para avaliação da resistência parcial envolvem a quantificação de lesões, em número e tamanho, do período de latência, da produção de esporos e da densidade de urédias (Brake & Irwin, 1992). Outras metodologias bastante eficientes são a determinação da Área Sob a Curva de Progresso da Doença (ASCPD) e a taxa de desenvolvimento da doença (Wilcoxson, 1981).

Na seleção para resistência total, os genes são facilmente identificados pela presença ou ausência de doença no hospedeiro, permitindo aos melhoristas poucas avaliações. O mesmo não ocorre na seleção para resistência parcial, exigindo avaliações periódicas para permitir sua correta identificação, sobretudo em doenças policíclicas, como é o caso da ferrugem. Além disso, para que seja possível o uso da ASCPD, são

necessárias avaliações com intervalo não superior a três semanas, com mínimo de três avaliações até o fim do ciclo da cultura. Contudo, o ideal seria mais de três avaliações da severidade da doença até o final do ciclo (Thomé *et al.*, 1999).

Em aveia há resistência em fase de plântula e de planta adulta. A que apresenta maior importância é a resistência de planta adulta, pois é nesta fase que ocorre maior desenvolvimento do patógeno, e conseqüentemente, maior prejuízo para a planta. Genótipos do Programa de Melhoramento de Aveia da UFRGS vêm apresentando variabilidade para reação de resistência à ferrugem da folha. Estes apresentam menor tamanho de pústula, capacidade de reduzir a lesão, presença de clorose pronunciada ao redor das pústulas, surgimento precoce da télia e progresso lento da doença. Dentre eles, alguns genótipos foram selecionados como possuidores de resistência parcial, apresentando grande vantagem adaptativa, como a cultivar URS 21 que vem sendo amplamente cultivada no Brasil por mais de 10 anos e apresenta tanto resistência de plântula como de planta adulta (Vieira *et al.*, 2006b; Martinelli, comunicação pessoal; Graichen, 2009).

2.4 Genética da resistência à ferrugem da folha

Fontes de resistência à ferrugem da folha são encontradas em espécies de aveia diplóide, tetraplóide e hexaplóides, sendo a *A. sterilis* uma das maiores fontes de genes de resistência (Harder & Haber, 1995). A maior parte dos genes de resistência raça específica à ferrugem da folha foi transferida para aveia cultivada de *A. sterilis*, de acessos coletados em Israel e outros países da região do mediterrâneo durante as décadas de 1960 e 1970 (Leonard *et al.*, 2004). Entretanto, a base genética para resistência à ferrugem da folha é bastante limitada, não existindo genes efetivos contra todas as raças do patógeno (Chaves *et al.*, 2008).

Em aveia, a maior parte dos genes de resistência à ferrugem da folha que foram identificados, são genes específicos à raça e denominados “Pc” (*Pc1* ao *Pc96* e *PcX*), sendo cada número corresponde a um *locus* específico. Em diversos casos designa-se diferentes números para genes que possivelmente são alelos de um *locus*. A grande maioria dos genes confere resistência a plântulas, os quais tendem a ser expressos em infecções de tipo baixo, e persistem por toda a vida da planta. Outros genes são expressos somente no estágio de planta adulta (Marshall & Shaner, 1992). Além destes, outros genes também são descritos, porém ainda não foram completamente caracterizados e tampouco denominados (Chaves *et al.*, 2008).

Plantas com genótipos Pc frequentemente respondem a *P. coronata* através do desenvolvimento de reação de hipersensibilidade (HR), com morte celular no local da infecção. Dois *loci* têm sido evidenciados controlar a morte celular: *Rds* que suprime a HR, mas não a resistência, mediada pelo gene de resistência *Pc82*. Por outro lado, o *locus Rih* confere HR tanto para plantas resistentes, como para plantas suscetíveis. Dados mostram que o *locus Rds* não está ligado ao *cluster Pca*, enquanto que o *locus Rih* está fisicamente ligado ao *cluster Pca*. Isto indica que muitas variáveis afetam o desenvolvimento da HR, sugerindo que HR pode não ser essencial para a resistência à ferrugem da folha em aveia (Xin You *et al.*, 2001; Yao *et al.* 2002).

Apesar do grande número de genes conhecidos para resistência específica à raça, somente alguns apresentam um bom potencial de uso nos programas de melhoramento. Para todos os genes de resistência específicos à raça conhecidos já foram relatadas raças virulentas de *P. coronata* f.sp. *avenae*. No entanto, o fato que reduz a possibilidade de utilização de determinado gene em programas de melhoramento é a alta frequência de virulência para este gene na população do patógeno, ou estar fortemente ligado a um alelo que confira um fenótipo indesejado (Graichen, 2009). Dentre os genes específicos

à raça que ainda apresentam um bom potencial para utilização em programas de melhoramento, podem-se destacar os genes *Pc50*, *Pc91*, (Park, 1999), *Pc94* (Van Niekerk *et al.*, 2001) e *Pc68* (Park, 1999; Van Niekerk *et al.*, 2001; Leonard & Martinelli, 2005). Suas indicações como genes com potencial de uso não está relacionada a uma completa imunidade ao patógeno, mas sim a baixa frequência de virulência de raças para estes genes na população de *P. coronata* (Chaves *et al.*, 2008).

Atualmente, diversas fontes de resistência parcial, não específica à raça a ferrugem da folha, tal como a proveniente do genótipo MN841801 de *A. sativa* proveniente do Programa de Melhoramento da Universidade de Minnesota, EUA, têm sido identificadas (Chaves *et al.*, 2008). No Brasil, o Programa de Melhoramento Genético da Aveia da UFRGS também tem identificado diversas fontes com resistência parcial à ferrugem da folha.

Em aveia, apesar de se conhecer mais de uma centena de genes maiores que conferem resistência específica à raça à ferrugem da folha, não se conhece o mecanismo de ação destes genes. Em outras interações patógeno-hospedeiro já são elucidados alguns mecanismos de resistência (Graichen, 2009).

Assim, quanto maior o número de genes de resistência em uma cultivar, maior será o número de mutações requeridas para que o patógeno supere a resistência. Portanto, o conhecimento de novos genes para resistência de uma nova cultivar é de extrema valia para os programas de melhoramento genético, pois permite que seja mantida uma proteção consistente contra o fungo (Silva, 2006).

2.5 Interação planta-patógeno

Os mecanismos moleculares da interação planta-patógeno estão bem estabelecidos para a resistência total, entretanto, pouco se sabe sobre a resistência parcial. Na resistência total pode haver uma resposta basal, que se inicia com o

reconhecimento de componentes dos patógenos altamente conservados entre os microrganismos, como a flagelina em bactérias e a quitina em fungos, denominados de MAMP's (*Microbe Associated Molecular Patterns*), (Chisholm *et al.*, 2006; Schwessinger & Zipfel, 2008). Estas moléculas podem ser reconhecidas através de receptores específicos, presentes na superfície das células vegetais, desencadeando uma série de alterações em cascata no hospedeiro, o que envolve a sinalização por fitormônios, transcrição de genes relacionados à defesa e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Chisholm *et al.*, 2006; Bent & Mackey, 2007; Schwessinger & Zipfel, 2008). Os patógenos para suprimirem esta defesa, produzem moléculas efetoras responsáveis por impedir a defesa basal do hospedeiro (Chisholm *et al.*, 2006; Bent & Mackey, 2007; Ma & Guttman, 2008).

Em resposta às moléculas efetoras, que são produtos diretos ou indiretos dos genes *Avr*, os hospedeiros possuem genes de resistência, denominados genes *R*, cujos produtos são responsáveis pelo reconhecimento direto ou indireto da presença de efetores na celular vegetal. Uma vez que estes efetores sejam detectados, ocorre uma segunda resposta de defesa no hospedeiro, a qual é específica entre determinadas espécies de patógenos e de hospedeiros (Bent & Mackey, 2007; Schwessinger & Zipfel, 2008). O modo de reconhecimento ocorre de maneira distinta para efetores bacterianos e fúngicos (Ma & Guttman, 2008). Para fungos, geralmente, há o reconhecimento direto dos efetores pelas proteínas codificadas pelos genes *R*, entretanto, em bactérias, existe um monitoramento indireto através da detecção de alterações em proteínas vegetais alvo de efetores bacterianos (Ma & Guttman, 2008). Caso ocorra uma alteração estrutural dos efetores, sem que ocorra a perda da virulência, o patógeno passa a não ser reconhecido pelo hospedeiro, superando a resistência conferida pelos genes *R* e

desencadeando o processo de doença (Chisholm *et al.*, 2006; Bent & Mackey, 2007; Schwessinger & Zipfel, 2008).

Uma exceção à resistência mediada por genes *R* tem sido observada no patossistema *Stagonospora nodorum* x trigo (Chu *et al.*, 2010). Nesta interação, o patógeno produz uma toxina seletiva ao hospedeiro (HST), o reconhecimento desta toxina pelo gene dominante do hospedeiro é requerido para interação de compatibilidade, levando ao desencadeamento da doença. Ao contrário, quando a toxina ou o alelo dominante do hospedeiro não está presente, ocasiona a interação incompatível, ou seja, ocorre a resposta de defesa da planta. Os resultados deste trabalho podem indicar que para patógenos necrotróficos o reconhecimento de toxinas produzidas pelo patógeno leva à suscetibilidade e não a resistência, sugerindo que estes microrganismos exploram os mecanismos de resistência a patógenos biotróficos, como uma forma de desencadear a doença. Assim, para biotróficos geralmente o reconhecimento do produto do gene *Avr* dominante do patógeno, pelo produto do gene *R* dominante do hospedeiro desencadeia a resposta de defesa, já para necrotróficos a suscetibilidade.

Na última década o conhecimento genético da resistência de plantas tem sido amplamente elucidado. Atualmente considera-se que resistência e suscetibilidade possam ser duas faces da mesma moeda. Esta nova visão deve-se ao fato de que foram identificados diversos genes em plantas que quando dominantes conferem suscetibilidade, estes genes têm sido denominados de genes-*S*. Os genes-*S* codificam alvos de efetores do patógeno, que atuam como reguladores negativos da resposta de defesa. A mutação ou perda destes genes ocasionariam uma resistência durável e de amplo espectro (Pavan *et al.*, 2010).

A perda de função dos genes-*S*, que codificam fatores de suscetibilidade, não alteram o desenvolvimento normal das plantas. Entretanto, tem sido observado que estes genes apresentam ação pleiotrópica (Pavan, 2010). O primeiro gene-*S* identificado foi o *PMR6*, que quando dominante confere suscetibilidade ao oídio em *Arabidopsis Col-0*. Este gene quando dominante codifica uma pectatoliase e destrói a parede celular da planta hospedeira quando atacada pelo fungo. Já quando suscetível confere resistência ao oídio (Eckardt, 2002).

O alelo mutante (*mlo*) do locus *Mlo* é um exemplo de gene-*S*. Este gene, além de quando recessivo conferir resistência não específica à raça ao oídio em cevada, tem conferido uma resistência bastante durável (Jorgensen, 1992). A resistência se manifesta devido à incapacidade do fungo em penetrar a parede celular de células da epiderme, pela reestruturação e fortalecimento da parede celular (Huckelhoven *et al.*, 1999). Programas de melhoramento de cevada que se baseiam na resistência do gene *Mlo* tem tido um número considerável de cultivares comercializadas que combinam lesões moderadas com ampla capacidade de rendimento (Jorgensen, 1992). Tem sido verificado que o gene *Mlo* regula negativamente o gene *PEN*, que está associado à resistência ao oídio em cevada.

Diversos outros genes-*S* têm sido identificados, como os genes *Xa5* e *Xa13* de arroz que confere suscetibilidade, quando dominantes, a *Xanthomonas oryzae* e *eIF4G* encontrado em diversas espécies e confere suscetibilidade a *Potyvirus* (Pavan, 2010). Vários genes-*S* vêm sendo utilizados com sucesso, conferindo resistência por perda de função, em diferentes culturas, tais como melão, cevada e arroz (Pavan, 2010). Ao contrário do que é observado para os genes *R*, a perda de função destes genes-*S* conduz uma resistência durável e de amplo espectro. Desta forma, a exploração de alelos de genes-*S*, insensíveis aos efeitos do patógeno é uma alternativa que pode ser utilizada

com êxito no melhoramento de plantas, e é complementar a resistência conferida por genes *R*.

Muitos mecanismos diferentes de defesa em plantas são ativados por vários sinais de transdução onde parece que estão envolvidos ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) (Glazebrook, 2005; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007). Em muitos experimentos têm sido mostrado o antagonismo entre AS e AJ/ET, embora sinergismo também tenha sido observado (Mur *et al.*, 2006). Geralmente, AS é crítico para a defesa contra patógenos (hemi)-biotróficos, enquanto AJ e ET atuam de forma sinérgica na defesa contra patógenos necrotróficos e insetos (Glazebrook, 2005). Duas formas distintas de induzir defesa são dependentes de AS ou AJ/ET. A resposta sistêmica adquirida (SAR) é de longa duração, baseada na resistência que é estabelecida em partes não infectadas da planta após a exposição local ao patógeno (Durrant & Dong, 2004; Vlot *et al.*, 2008). Ao ser induzida a SAR nos locais distais à infecção, têm sido verificado que as mesmas respostas de defesa desencadeadas pela reação de hipersensibilidade ocorrem nestes locais. Assim, a planta se previne de novos ataques de patógenos. Entre estas respostas pode-se destacar a produção de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e indução de compostos secundários (Heil & Ton 2008).

Embora a reação de hipersensibilidade (HR) não seja estritamente necessária para que ocorra a SAR (Cameron *et al.*, 1994; Mishina & Zeier, 2007), a sinalização SAR, geralmente, tem sido observada em tecidos sadios de plantas durante ou após o estabelecimento da resposta localizada de HR. A HR é induzida durante a interação gene-a-gene entre planta e patógeno, após os eliciadores do patógeno, produtos de genes *Avr*, serem reconhecidos de forma direta ou indireta por proteínas receptoras *R* do vegetal (produto de genes *R*), que podem estar localizadas na membrana plasmática ou no citoplasma é ativada. Este reconhecimento induz uma complexa cascata de

sinalização devido a mudanças conformacionais no receptor, culminando com a resposta de defesa. Esses sinais podem envolver quinases, fosfatases e proteínas G, além de fluxo íons, por uma mudança transitória na permeabilidade da membrana plasmática, permitindo entrada de íons Ca^{++} e H^+ e saída de K^+ e Cl^- . A ativação da cascata das MAPQuinases, altera os padrões de fosforilação de proteínas culminando em alterações na expressão de genes de defesa, tal como proteínas relacionadas à patogênese (PR) e de metabólitos secundários (Greedaberg & Yao, 2004).

Alguns estudos têm evidenciado que as proteínas G podem participar da resposta de defesa, provavelmente por se acoplarem ao receptor, alterando sua conformação quando as proteínas Avr são reconhecidas, proporcionando a transdução do sinal *downstream* (Zhao *et al.*, 2005).

Após este reconhecimento, o influxo de Ca^{++} é um dos mais importantes eventos iniciais, pois além de ativar MAPQuinases dependentes de cálcio/calmodulina, ativa fosfatases, enzimas ligadas a membrana plasmática e fatores de transcrição que levam a resposta de defesa. Estes primeiros sinais iônicos influenciam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela ação da NAD(P)H-oxidase localizada na membrana plasmática. Isso leva à peroxidação de lipídios, inativação de enzimas e degradação de ácidos nucleicos. As ROS predominantes produzidas na interação planta-patógeno são o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, estas moléculas podem contribuir para a morte celular como parte da HR ou agir diretamente na morte do patógeno. Além da NAD(P)H-oxidase, existem outras fontes de ROS em plantas, incluindo peroxidases apoplásticas e outras oxidases em cloroplastos, peroxissomos e mitocôndrias (Zhao *et al.*, 2005).

ROS exercem vários efeitos na resposta de defesa de plantas, incluindo fortalecimento de paredes celulares (devido o *cross-linking* de proteínas e polímeros de

lignina), HR, produção de compostos de defesa, além de ativação de proteína de detoxificação de ROS em células adjacentes ao local de infecção (Zhao *et al.*, 2005).

A produção de ROS no local da invasão atua como sinalizador durante a HR em resposta ao ataque de patógenos (Costet *et al.*, 2002; Van Breusegem *et al.*, 2008). Como parte desta sinalização, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem sido demonstrado por ativar a expressão de quinases, como MAPK, e glutathione S-transferase (GST) (Desikan *et al.*, 1999), além de participar da transdução de sinal do ácido abscísico (ABA) (Guan *et al.*, 2000). Entretanto, por serem compostos tóxicos precisam ser detoxificados das células para evitar a peroxidação de lipídios e proteínas, por exemplo. Desta forma, o H_2O_2 pode ser metabolizado diretamente por peroxidases, principalmente nas paredes celulares, e pela catalase (CAT) nos peroxissomos (Azevedo *et al.*, 1998). Em cloroplastos, o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é convertido pela superóxido dismutase (SOD) a H_2O_2 , que é posteriormente detoxificado em H_2O e O_2 via ciclo glutathione/ascorbato, que envolve ascorbato peroxidase (APX), monohidroascorbato redutase/dehidroascorbato redutase e glutathione redutase (GR) (Foyer *et al.*, 1997; Noctor & Foyer, 1998).

A alcalinização do apoplasto é um dos eventos iniciais após o reconhecimento do elicitor, isso se deve a despolarização da membrana plasmática e subsequente influxo de íons. Sendo que a acidificação do citoplasma é requerida como um passo essencial na transdução do sinal, levando ao estresse oxidativo e biossíntese de metabólitos secundários (Zhao *et al.*, 2005).

Atualmente o óxido nítrico (NO) tem sido evidenciado como importante sinalizador. Este juntamente com ROS desencadeia uma explosão oxidativa, o que leva a HR e a transcrição de genes de defesa (Zhao *et al.*, 2005).

Fitoalexinas também são sintetizadas muito rapidamente após a infecção pelo microrganismo. Esses metabólitos secundários quimicamente diversos se acumulam em torno do local de infecção e têm atividade antimicrobiana. Outra resposta de defesa à infecção é a formação de enzimas hidrolíticas que atacam a parede celular do fungo, por exemplo: glucanases, quitinases e outras hidrolases. Essas enzimas pertencem ao grupo das proteínas relacionadas à patogênese (PR). (Zhao *et al.*, 2005).

Após esta sinalização inicial, contra patógenos biotróficos há a produção de AS que além de ativar a resposta de defesa no local da infecção que culmina na HR, é importante também na ativação da resposta sistêmica adquirida (SAR) da planta (Zhao *et al.*, 2005).

Vários sistemas de defesas químicas e físicas são adotados pelas plantas para se protegerem do ataque de patógenos. Como parte do sistema de defesa há um fortalecimento de paredes celulares da planta pela deposição de várias moléculas em resposta a infecção, além de haver o acúmulo de compostos antimicrobianos de baixo peso molecular, fitoalexinas, que são de grande relevância (Ishihara *et al.*, 2008).

O fortalecimento de paredes celulares se dá como uma barreira que separa o patógeno do restante da planta, bloqueando fisicamente sua propagação. Essa resposta ocorre pela síntese de lignina de defesa, de rápida formação, e/ou síntese de calose. Através do estresse oxidativo da célula, peróxidos de hidrogênio podem formar ligações cruzadas (*crosslink*) entre proteínas ricas em prolina da parede celular das células próximas ao local de infecção, aumentando sua resistência à digestão pelo microrganismo (Zhao *et al.*, 2005).

Moléculas que se depositam em paredes celulares incluem glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas, e elementos minerais tais como, cálcio e silício (Agrios, 2005). Além disso, há um acúmulo de compostos fenólicos como, lignina e suberina em

paredes celulares de tecidos infectados (Ishihara *et al.*, 2008). Lignina é um componente integral de paredes celulares, e tem sido implicada na HR, por formar uma barreira contra patógenos tanto em Liliopsidas como em Magnoliopsidas (Beardmore *et al.*, 1983; Nicholson & Hammerschmidt, 1992; Koike *et al.*, 2001). Os compostos fenólicos envolvidos no fortalecimento de paredes celulares são exclusivamente derivados de fenilalanina (Phe), via a rota dos fenilpropanóides. Phe também é o precursor de diversos compostos tóxicos com papel relevante no sistema de defesa química e física de plantas (Dixon & Paiva, 1995).

A rota do triptofano (Trp) produz metabólitos tóxicos em comum com a rota da Phe e que estão envolvidos na defesa contra patógenos. Diversos compostos tóxicos derivados do Trp são encontrados em plantas e, em particular, possuem um papel relevante em plantas da família Poaceae, tal como, a produção de avenantramidas em aveia (Ishihara *et al.*, 2008).

Avenantramidas, uma série de amidas de ácido hidroxicinâmico com antranilato, têm sido identificadas como fitoalexinas. Um significativo acúmulo de avenantramidas tem sido observado na interação entre cultivares de aveia e raças do fungo causador de ferrugem da folha (Mayama *et al.*, 1981).

Apesar das amidas atuarem como fitoalexinas devido a sua atividade antimicrobiana, esta função não tem sido detectada em milho e cevada, sugerindo uma função alternativa para estes compostos. Uma possível função das amidas é no fortalecimento de paredes celulares sob condições de estresse. Em batata e fumo, amidas têm sido identificadas por serem incorporadas às paredes celulares em tecidos com ferimentos. Similarmente, a incorporação de amidas na parede celular também pode ter um importante papel em plantas da família Poaceae (Okazaki *et al.*, 2004).

Estudos com quitina como elicitor em aveia mostram que há uma competição entre CAT e peroxidase pelo consumo de H₂O₂, ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e sódio L-ascorbato (ASA). Há inibição da atividade de peroxidase e maior diminuição da concentração de avenantramidas do tipo B em relação a outros tipos de avenantramidas, indicando que este processo metabólico possui alta especificidade para avenantramidas B (Okazaki *et al.*, 2004).

A incorporação de avenantramidas em paredes celulares faz parte da reação de defesa em aveia quando elicitada com quitina (Okazaki *et al.*, 2004). Estudos mostram um incremento de ácido diferúlico na estrutura das paredes celulares de folhas de aveias infectadas com *P. coronata* f. sp. *avenae* em paralelo com o incremento da atividade de peroxidase. Sendo que a estrutura do ácido diferúlico pode ser diretamente formada de avenantramida B (Ikegawa *et al.*, 1996).

Embora se saiba que para genes de resistência de maior efeito a ativação ocorra em apenas uma hora após a inoculação, não se sabe se o mesmo é válido para a resistência parcial. Além disso, devido ao grande tamanho do genoma da aveia branca, cerca de 12.600 Mb (Carels & Bernardi, 2000), e a grande redundância do mesmo, a identificação de genes via mapeamento torna-se uma prática laboriosa e demorada, sendo este problema agravado devido às diferenças de translocação entre as linhagens parentais (O' Donoghue *et al.*, 2000).

Sugere-se que os principais mecanismos de resistência à *P. coronata* f. sp. *avenae* em plantas resistentes de aveia são de hipersensibilidade e produção de compostos fenólicos, mas estes podem variar ao longo do tempo. Esta variação temporal na expressão de hipersensibilidade e produção de compostos fenólicos reflete no nível de resistência destes genótipos no campo (Graichen *et al.*, 2011).

Apesar de existir muita pesquisa a respeito da resistência a ferrugens, ainda há uma variedade de mecanismos de resistência inexplorados e a combinação daqueles que agem em diferentes fases do processo de infecção pode ocasionar diversas barreiras ao patógeno (Rubiales & Niks, 2000). Pesquisas detalhadas de germoplasmas podem resultar na descoberta de alternativas, mais duráveis, e de mecanismos de defesa não associados à hipersensibilidade (Niks & Rubiales, 2002). Assim, novas tecnologias e estudos bioquímicos e moleculares podem auxiliar num melhor entendimento dos mecanismos da resistência parcial.

2.6 Sequenciamento de nova geração

Em 1977, Frederick Sanger e Alan Coulson publicaram dois trabalhos onde reportavam métodos eficazes para a determinação da sequência de DNA de organismos, abrindo as portas para uma completa revolução na biologia com o desvendamento da sequência completa de genes e genomas (Sanger *et al.*, 1977). Em um desses trabalhos, o genoma completo do fago phi X174 era apresentado; tendo sido este o primeiro genoma de um organismo a ser completamente desvendado. Estes trabalhos renderam a Sanger seu segundo prêmio Nobel em química, entregue no ano de 1980.

Anos após, exatamente quando parecia haver passado o auge da era do sequenciamento, os avanços tecnológicos geraram ferramentas com enorme potencial que vêm transformando as pesquisas biológicas (Marguerat *et al.*, 2008). Desde 2005, estas novas tecnologias, que são coletivamente mais comumente referidas como “Sequenciamento de Nova Geração”, têm gerado um grande impacto nas pesquisas genômicas (Morozova & Marra, 2008) e estão baseadas em princípios diferentes do clássico método baseado em Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

As novas tecnologias de sequenciamento geram um grande número de fragmentos de DNA em uma reduzida escala de tempo e com um baixo custo por

nucleotídeo, gerando um grande incremento na relação custo benefício (Holt & Jones, 2008; Mardis, 2008). Esta tecnologia tem sido utilizada tanto para aplicações padrões de sequenciamento, tal como sequenciamento genômico e re-sequenciamento, como para novas aplicações previamente não exploradas pelo sequenciamento Sanger (Morozova & Marra, 2008). As tecnologias de nova geração comercialmente disponíveis incluem: 454 GS20 baseado em piro sequenciamento (*Roche Applied Science*), Solexa 1G (Illumina, Inc.), SOLiD (*Applied Biosystems*), e Heliscope de (Helicos, Inc.). Entretanto, a plataforma Heliscope não tem sido utilizada para genômica funcional. As demais tecnologias, bem como a plataforma de sequenciamento de Sanger são sumarizadas na Tabela 1 (Morozova & Marra, 2008).

TABELA 1. Tecnologias baseadas no sequenciamento de DNA (Morozova & Marra, 2008).

| Tecnologia | Baseado em | Tamanho do fragmento | Pb por corrida |
|-------------------------------|--|----------------------|----------------|
| Sequenciamento Sanger | Síntese na presença de terminadores corados | Acima de 900 pb | 96 kb |
| ABI373xl 454/Roche FLX System | Pirosequenciamento em suporte sólido | 200-300 pb | 80-120 Mb |
| Illumina/Solexa | Sequenciamento por síntese com terminadores reversos | 30-40 pb | 1Gb |
| ABI/SOLiD | Sequenciamento por ligação | 35 pb | 1-3 Gb |

Estas tecnologias aplicam diferentes princípios, resultando em diferenças em tamanho de sequências e número, provendo distintas vantagens e desvantagens quanto à aplicação. Entretanto, têm em comum a geração de sequências em alta escala, sem o requerimento da clonagem de DNA, e com um menor custo do que o tradicional sequenciamento, que são as características básicas da revolução atual (Marguerat *et al.*, 2008).

O Sequenciamento de Nova Geração tem possibilitado a obtenção de milhares de bases de DNA em questão de dias (Marioni *et al.*, 2008). Algumas tecnologias, incluindo as desenvolvidas por *454 Life Sciences* (Roche) (Margulies *et al.*, 2005) e Illumina (Sequenciamento Solexa) (Bennett *et al.*, 2005), estão atualmente disponíveis e têm sido usadas para investigar variações gênicas (Korbel *et al.*, 2007), rearranjos genômicos (Chen *et al.*, 2008), sítios de ligação a fatores de transcrição (Chip-Seq) (Mikkelsen *et al.*, 2007; Wederell *et al.*, 2008), metilação de DNA (Cokus *et al.*, 2008), mapeamento de um grande número de sequências de forma mais eficiente (Li *et al.*, 2008), bem como para o sequenciamento de novos genomas (Sundquist *et al.*, 2007; Warren *et al.*, 2007). Esta tecnologia também tem sido aplicado para sequenciar cDNAs mais que DNA genômico, para catalogar microRNAs (Bar *et al.*, 2008; Glazov *et al.*, 2008) ou realizar análise transcricional de inúmeros genomas eucarióticos: esta tecnologia vem sendo denominada como RNA-sequenciamento (RNA-seq) (Lister *et al.*, 2008).

2.6.1 RNA-sequenciamento

O transcriptoma é um completo conjunto de transcritos nas células, tanto em termos de tipo, como em quantidade. O transcriptoma de eucariotos é muito complexo, envolvendo sobreposição de transcritos, transcrição de regiões intergênicas e abundantes RNAs não codificantes. Nas últimas décadas, a complexidade transcricional de genomas tem sido analisada principalmente através de hibridizações baseadas em *microarray* (Yamada *et al.*, 2003; Bertone *et al.*, 2004; David *et al.*, 2006). Entretanto, recentemente o advento de tecnologias de alto rendimento de sequenciamento tem revolucionado a forma que complexos transcriptomas podem ser analisados (Morozova & Marra, 2008). O desenvolvimento de métodos de RNA-seq faz uso de tecnologias de sequenciamento que proporciona o direto sequenciamento de sequências

complementares de DNAs geradas a partir do mRNA alvo. RNA-seq gera uma abrangente visão tanto da estrutura transcricional, assim como do nível de expressão dos transcritos (Nagalakshmi *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009).

Por envolver o direto sequenciamento de DNAs complementares (cDNAs), RNA-seq permite o mapeamento das sequências lidas do genoma. Isto possibilita um maior entendimento sobre a complexidade do transcriptoma eucarioto, permitindo a identificação de éxons e íntrons, o mapeamento dos seus extremos, e a identificação de regiões terminais 5' e 3' de genes (Nagalakshmi *et al.*, 2010). Esta tecnologia também permite a identificação sítios iniciais de transcrição (Tsuchihara *et al.*, 2009), a identificação de novas variantes de *splicing*, e o monitoramento da expressão de alelos. Finalmente, isto permite uma precisa quantificação da expressão de éxons (Cloonan *et al.*, 2008; Marguerat *et al.*, 2008; Morin *et al.*, 2008; Mortazavi *et al.*, 2008; Nagalakshmi *et al.*, 2008; Shendure, 2008; Wilhelm *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009).

RNA-seq é altamente reproduzível, promovendo uma alta correlação entre replicatas biológicas (Cloonan *et al.*, 2008; Mortazavi *et al.*, 2008; Nagalakshmi *et al.*, 2008). Esta técnica pode detectar e mensurar raras e mesmo assim fisiologicamente importantes espécies de transcritos, mesmo que estejam em baixas concentrações nas células, como 1 a 10 moléculas de RNA por célula (Mortazavi *et al.*, 2008). Atualmente esta técnica é bastante onerosa, mas é esperado um grande declínio dos preços nos próximos anos.

O RNA-seq tem sido utilizado com grande sucesso em um número de organismos incluindo *Saccharomyces cerevisiae* (Nagalakshmi *et al.*, 2008), *Schizosaccharomyces pombe* (Wilhelm *et al.*, 2008), *Mus musculus* (Cloonan *et al.*, 2008; Mortazavi *et al.*, 2008), *Homo sapiens* (Marioni, *et al.*, 2008), *Arabidopsis thaliana* (Lister *et al.*, 2008), e *Caenorhabditis elegans* (Ladeana *et al.*, 2009).

Aplicações para mensurar o nível de expressão de mRNA têm sido mais lentas, principalmente por dificuldades em desenvolver apropriados protocolos experimentais, mas também porque os estudos visam identificar expressão (talvez sutil), quantitativas diferenças entre as amostras, enquanto outros aplicativos têm, até agora, focados em detectar a presença ou ausência de um evento, como por exemplo, um fator de transcrição (Marioni *et al.*, 2008).

A tecnologia de RNA-seq combina as vantagens de outros métodos de análise de RNA por permitir o monitoramento do transcriptoma de genomas inteiros, com um baixo custo, sem a necessidade de arranjos, e tem a vantagem adicional de prover informações da estrutura transcripcional (éxon-éxon *boundaries*), como o EST sequenciamento tipo Sanger faz em longa escala, mas sem a necessidade de clones. Além disso, devido ao fato do grande número de sequências que pode ser obtido facilmente, RNA-seq é sensível o suficiente para detectar a transcrição de genes com baixo nível de expressão, que são geralmente perdidos pela análise de EST (Marioni *et al.*, 2008; Mortazavi *et al.*, 2008; Wilhelm *et al.*, 2008)

Em estudos recentes, o RNA-seq tem sido usado principalmente para quantificar o nível de expressão de *loci* já anotados, identificar genes expressos diferencialmente, e analisar a expressão fora destes *loci* (em regiões intrônicas ou intergênicas) (Cloonan *et al.*, 2008; Sultan *et al.*, 2008; Wilhelm *et al.*, 2008;). Além disso, informações estruturais têm sido usadas para detectar já conhecidas formas de *splice* alternativo (Mortazavi *et al.*, 2008; Nagalakshmi *et al.*, 2008), identificar novos eventos transcripcionais em relação a *loci* conhecidos (*splicing* alternativo, 5' final) (Cloonan *et al.*, 2008; Sultan *et al.*, 2008), e refinar anotações estruturais de genes ou propor modelos gênicos novos (Mortazavi *et al.*, 2008; Wilhelm *et al.*, 2008). Entretanto, tentativas não têm sido feitas para conectar informações dos dados de RNA-seq para

construir modelo de genes novos, devido à ausência de um *set* de genes conhecidos e ou eventos de *splicing* (Denoeud *et al.*, 2008).

2.6.2 Plataforma solexa

O sequenciamento na plataforma Solexa, assim como o sequenciamento de Sanger, é realizado por síntese usando DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos. A inovação dessa plataforma consiste na clonagem *in vitro* dos fragmentos em uma plataforma sólida de vidro, processo também conhecido como PCR de fase sólida (Fedurco *et al.*, 2006; Turcatti *et al.*, 2008). A superfície de clonagem (*flow cells*) é dividida em oito linhas que podem ser utilizadas para o sequenciamento de até oito bibliotecas. Em cada linha, adaptadores são fixados à superfície pela extremidade 5', deixando a extremidade 3' livre para servir na iniciação da reação de sequenciamento dos fragmentos imobilizados no suporte por hibridização (Carvalho & Silva, 2010) (Figura 2).

Os fragmentos de DNA da amostra são também ligados aos adaptadores em ambas as extremidades, o que permite sua fixação ao suporte de sequenciamento por hibridização a um dos adaptadores fixados (Figura 2). No primeiro ciclo de amplificação, nucleotídeos não marcados são fornecidos para que haja a síntese da segunda fita do fragmento imobilizado no suporte. A alta densidade de adaptadores no suporte facilita a hibridização do adaptador livre dos fragmentos imobilizados a sua sequência complementar fixa perto do clone inicial durante o ciclo de pareamento. Após o ciclo de pareamento, o fragmento forma uma estrutura em “ponte” na superfície de sequenciamento e a extensão ocorre, formando a fita complementar também em “ponte”. No ciclo de desnaturação, as fitas são separadas e linearizadas. Esses ciclos são repetidos 35 vezes e assim as cerca de mil cópias geradas de cada fragmento nessa PCR de fase sólida permanecem próximas umas das outras, formando um *cluster* de

sequenciamento. Etapas de desnaturação são necessárias para a separação dos duplex formados e, nos próximos ciclos de amplificação, nucleotídeos terminadores marcados são fornecidos para as reações de sequenciamento que ocorrem dentro de cada *cluster* (Carvalho & Silva, 2010).

A alta densidade dos *clusters* de sequenciamento possibilita que o sinal de fluorescência gerado com a incorporação de cada um dos nucleotídeos terminadores tenha uma intensidade suficiente para garantir sua detecção exata. Até 50 milhões de *clusters* podem ser produzidos por linha, correspondendo a uma representação satisfatória da biblioteca. Após a incorporação de cada nucleotídeo no fragmento em síntese, a leitura do sinal de fluorescência é realizada (Carvalho & Silva, 2010).

Em seguida, ocorre uma etapa de lavagem para remoção dos reagentes excedentes e remoção do terminal 3' bloqueado e do fluoróforo do nucleotídeo incorporado no ciclo anterior para que a reação de sequenciamento prossiga. A leitura das bases é feita pela análise sequencial das imagens capturadas em cada ciclo de sequenciamento. Em geral, leituras de 25-35 bases são obtidas de cada *cluster* (Shendure & Ji, 2008).

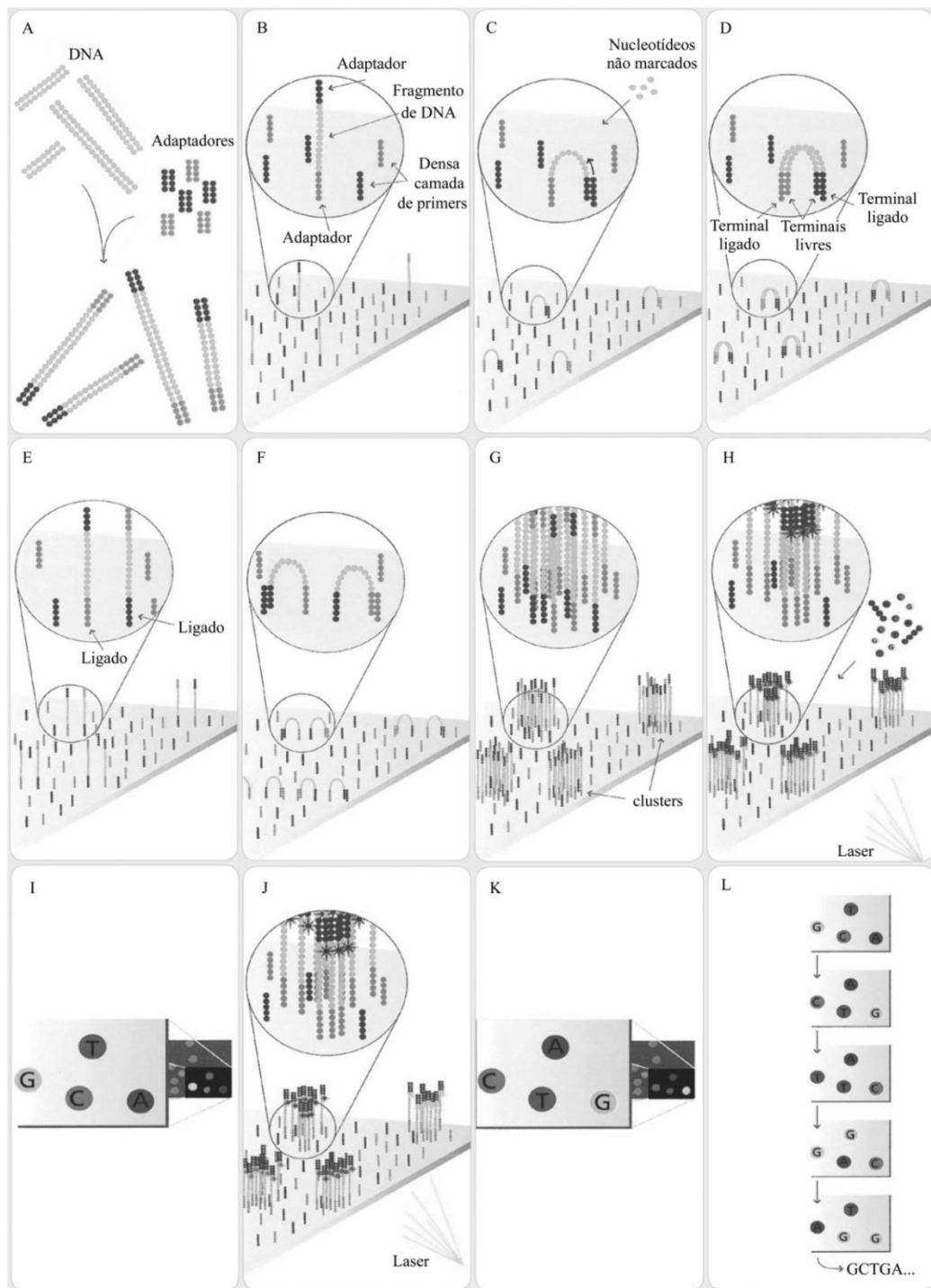


FIGURA 2. Representação do princípio da plataforma Illumina. O cDNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a adaptadores A e B em ambas as extremidades (A). As moléculas de cDNA fita simples são aderidas por afinidade ao suporte sólido onde estão também aderidos em alta densidade oligonucleotídeos complementares aos adaptadores A e B (B). Durante a etapa de pareamento (C), no primeiro ciclo de amplificação da PCR em fase sólida, o adaptador da extremidade livre da molécula aderida ao suporte encontra seu oligonucleotídeo complementar no suporte, formando uma estrutura em ponte. Uma vez fornecidos os reagentes necessários, a PCR é iniciada utilizando a extremidade 3' livre do oligonucleotídeo como *primer* (C e D). Na etapa de desnaturação (E), a “ponte” é desfeita mediante elevação de temperatura. Repete-se a etapa de pareamento (F),

formando novas estruturas em ponte e iniciando um novo ciclo de amplificação. Após uma série de ciclos, serão obtidos *clusters* de moléculas idênticas ligadas ao suporte (G). Com a incorporação de nucleotídeos terminadores marcados e excitação a laser (H), é gerado sinal, o qual é captado por dispositivo de leitura e interpretado como um dos quatro possíveis nucleotídeos componentes da cadeia (I). O processo de incorporação de nucleotídeo marcado, excitação e leitura, é repetido para cada nucleotídeo componente da sequência (J, K). A leitura é feita de forma sequencial, permitindo a montagem da sequência completa de cada *cluster* (L) (Carvalho & Silva 2010).

Dentro da genômica funcional, a metabolômica surge como uma abordagem mais robusta para a predição de funções gênicas, que a transcriptômica e a proteômica. Estudos do transcriptoma e proteoma mostram que nem sempre a predição gênica é correlacionada com o nível de mRNA e de proteínas (Gygi *et al.*, 1999). Frequentemente, a formação da proteína não está correlacionada com o metaboloma, uma vez que a proteína sintetizada pode ou não ser ativa, devido a mudanças no controle alostérico (Allwood *et al.*, 2008). Desta forma, além do estudo da expressão de genes, o estudo dos constituintes do metabolismo secundário se faz necessário para uma melhor compreensão do seu significado fisiológico durante a interação planta-patógeno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram realizados em câmara de crescimento de plantas do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS e também no *Seed Technology Laboratory*, na *South Dakota State University* (SDSU). Todas as análises moleculares e bioquímicas foram realizadas em laboratórios pertencentes ao Departamento de *Plant Science* (SDSU). Para as análises histopatológicas o material foi coletado e preparado no *Seed Technology Laboratory* (SDSU), entretanto o material foi analisado no laboratório do Departamento de Plantas de Lavoura e Doenças de Cereais de Inverno do Departamento de Fitossanidade da UFRGS (Figura 3).

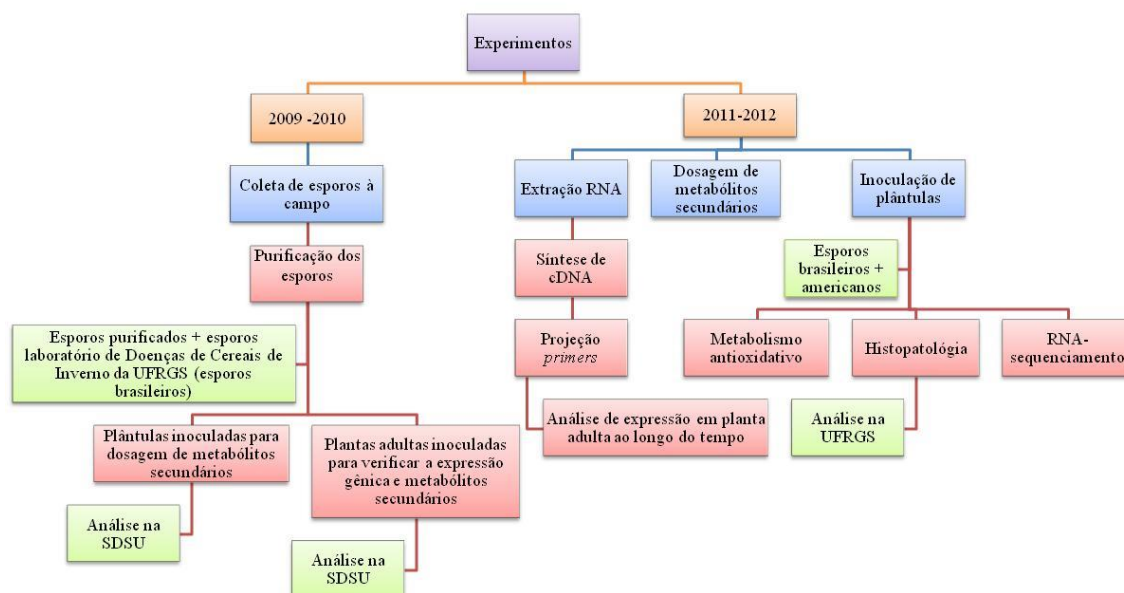


FIGURA 3. Fluxograma dos experimentos realizados.

3.1 Obtenção e multiplicação dos uredósporos

Folhas de plantas de aveia de diferentes cultivares oriundas do Programa de Melhoramento da aveia UFRGS e EUA e com a presença de pústulas características de ferrugem da folha foram coletadas na Estação Experimental Agronômica (EEA) da UFRGS nos anos de 2009 e 2010. Estas folhas foram levadas para o Laboratório de Plantas de Lavoura da UFRGS e os uredósporos foram coletados em *bulk* com auxílio de bomba a vácuo. Além disso, foram utilizados *bulk* de esporos cedidos pelo laboratório de Doenças de Cereais da UFRGS; e para os experimentos montados na SDSU (EUA), este *bulk* de esporos foi acrescido de esporos coletados em regiões produtoras de aveia nos EUA nos anos de 2010 e 2011. Os esporos foram purificados e multiplicados em condições controladas sobre plântulas da cultivar suscetível (URS 22) à *P. coronata* f. sp. *avenae*. As inoculações por aspersão foram realizadas com uma suspensão de uredósporos em óleo mineral (Soltrol), na concentração de 10^5 uredósporos. mL⁻¹. Após a inoculação as plântulas foram mantidas cerca de 30 min a temperatura ambiente, para que o óleo secasse. Posteriormente, as plântulas foram encubadas no escuro, em condição de câmara úmida por 15 h a 20 °C. Após este período, as plântulas foram transferidas para câmara de crescimento com condições controladas (temperatura 20 ± 2 °C e luminosidade 12 h luz) e mantidas até o aparecimento dos sintomas da doença. Cerca de 10 dias após a inoculação, os esporos foram coletados e armazenados em cápsulas de gelatina dentro de desumidificadores contendo sílica gel e mantidos a 4 °C ou liofilizados a -40 °C (Liofilizador L101 da marca Liotop) e mantidos a 4 °C ou em ultrafreezer.

3.2 Genótipos de aveia utilizados

Para análise da expressão de genes e metabólitos secundários foram utilizadas plantas dos genótipos de aveia com resistência parcial (URS 21) (*pedigree*: UFRGS 10/CTC 84B993) e suscetível (URS 22) (*pedigree*: UFRGS 841110/UFRGS 884021-1)

à *P. coronata* f. sp. *avenae*, oriundos do Programa de Melhoramento Genético da Aveia da Faculdade de Agronomia da UFRGS. A escolha destes genótipos está baseada no conhecimento prévio da resposta a campo. Para análise do metabolismo antioxidativo e histopatologia, além de plântulas dos genótipos brasileiros URS 21 e URS22, foram utilizados os genótipos americanos com resistência total e suscetível, Leggett (*pedigree*: OT294/Pc94) e Clintland 64 (*pedigree*: unnamed_6497/unnamed_9222), respectivamente. Estes genótipos foram incluídos como controle dos experimentos devido à utilização de uma mistura de esporos americanos e brasileiros nos experimentos executados na SDSU. Para a o RNA-sequenciamento foram utilizadas plântulas da cultivar URS 21.

Para o ensaio com plântulas, sementes das diferentes cultivares foram plantadas em copos ou vasos plásticos de 200 mL, contendo o substrato *Germina Plant* da Empresa Florestal S.A. para os experimentos realizados no Brasil e o substrato *Pro-Mix BX Mycorrhizae* para os experimentos realizados nos EUA e mantidos em câmara de crescimento, sob condições controladas de temperatura (20 ± 2 °C), luminosidade (12 h de luz) e umidade relativa do ar de 70 %. Posteriormente foram mantidas seis plântulas por recipiente e, quando as plântulas das diferentes cultivares apresentaram a primeira folha completamente expandida (dez dias após a semeadura), estas foram inoculadas com a mistura de uredósporos purificados em óleo mineral (Soltrol).

Para a verificação da expressão de resistência de planta adulta, sementes foram plantadas em 14 vasos plásticos para cada cultivar, contendo o substrato (*Germina Plant* da Empresa Florestal S.A.) e mantidos em câmara de crescimento, sob condições controladas de temperatura (20 ± 2 °C), luminosidade (12 h de luz) e umidade relativa do ar (70 %). No estágio de cinco folhas, fez-se a aplicação de uréia na dose recomendada (equivalente a 230 kg.ha^{-1}) para o bom desenvolvimento nutricional das

plantas. Em cada vaso foram mantidas seis plantas, e quando estas atingiram a fase de antese, foram inoculadas com a mistura de uredósporos em óleo mineral (Soltrol).

3.3 Inoculação

Plântulas e plantas adultas de aveia das diferentes cultivares estudadas foram inoculadas com uma suspensão de uredósporos em óleo mineral (Soltrol), na concentração de 10^5 uredósporos. mL⁻¹ e inoculadas conforme descrito no item 3.1.

3.4 Amostragem

As coletas de folhas de plântulas e folhas bandeiras das plantas adultas foram realizadas nos intervalos de 0, 6, 24, 48, 72 e 120 h após a inoculação (hai) com o fungo (0 hai corresponde o momento imediatamente anterior à inoculação). Para o RNA-seq as amostras de plântulas inoculadas e não inoculadas com o fungo foram coletadas 12 hai e para a análise de saponinas esteroidais em 0, 24, 48 e 72 hai. Em 120 hai as saponinas esteroidais também foram dosadas, mas somente na cultivar URS 21, devido à pequena quantidade de material de URS 22 no mesmo período. Para a análise de expressão gênica e metabólitos secundários, as amostras de cada tratamento, após coletadas, foram imediatamente transferidas para nitrogênio líquido, maceradas e armazenadas em freezer a -20 °C. Posteriormente o material foi liofilizado a -40 °C (Liofilizador L101 da marca Liotop) para que pudessem ser pesadas e transportadas sem haver qualquer tipo de alteração na composição de RNA e metabólitos. Para as demais análises as amostras coletadas foram armazenadas em freezer a -20°C até a análise, exceto para dosagem de clorofila-carotenóides e análises histopatológicas, onde foi utilizado material fresco.

Além disso, plântulas e plantas adultas inoculadas com a suspensão de uredósporo foram mantidas sem serem amostradas para verificar a eficiência da inoculação e para acompanhamento do desenvolvimento da doença.

3.5 Extração e Análise de Metabólitos Secundários

Dois grupos principais de metabólitos secundários foram avaliados, os compostos fenólicos totais e saponinas esteroidais, devido à importância em aveia e evidências de estarem envolvidos na resistência à ferrugem da folha.

3.5.1 Compostos fenólicos totais

Amostras de aveia das cultivares URS 21 e URS 22 inoculadas com *P. coronata* f. sp. *avenae* foram coletadas nos tempos 0, 6, 24, 48, 72, 120 hai, tanto de plântula como de planta adulta e liofilizadas. Estas amostras foram maceradas em solução aquosa de metanol 80 % (v/v) na proporção 1:10 (p/v). Após, os extratos foram filtrados, centrifugados a 1.000 g durante 10 min e congelados até a análise. Os compostos fenólicos totais foram então analisados pelo método Folin-Ciocalteu; para tanto, utilizou-se 50 µL da amostra, 1,55 mL de água destilada e 100 µL do reagente Folin. As amostras foram então agitadas e após 2 min, adicionado 300 µL de carbonato de sódio 20 %. Após a adição do carbonato de sódio as amostras foram agitadas e mantidas no escuro durante 30 min à 25 °C. A leitura da absorbância se deu a 765 nm através de espectrofotometria (*Genesys 20 Thermo Scientific*). O ácido gálico foi utilizado como padrão (Arnaldos *et al.*, 2001). Como branco foi utilizada a reação sem a adição do extrato vegetal.

3.5.2 Saponinas esteroidais

Amostras de 100 mg de plantas adultas liofilizadas de aveia, dos genótipos URS 21 e URS 22, infectadas com o fungo foram utilizadas para a quantificação de saponinas esteroidais, determinadas através do método Hiai *et al.* (1976) com modificações.

Para a extração das saponinas foram utilizadas amostras coletadas nos tempos 0, 24, 48, 72 e 120 hai (o período 120 hai foi utilizado somente para URS 21). As amostras

foram primeiramente dissolvidas em 10 mL solução aquosa de metanol 50 % (v/v) e mantidas em agitação *overnight* a temperatura ambiente. Após este período o material foi centrifugado a 3000 g durante 10 min e o sobrenadante coletado. O mesmo procedimento foi realizado duas vezes. Posteriormente, o primeiro sobrenadante foi combinado com o segundo. O material foi filtrado e o metanol evaporado através de evaporador de nitrogênio a 40 °C. O volume restante, cerca de 5 mL, foi então centrifugado a 3.000 g por 10 min para remover da água materiais insolúveis. Após, à fase aquosa foi adicionado igual volume de clorofórmio por duas vezes para a remoção de pigmentos, reservando a fase aquosa com os restos celulares. À saponina concentrada na solução aquosa foi adicionado igual volume de n-butanol (duas vezes) e todo solvente evaporado a temperaturas não superiores a 40- 45 °C através de evaporador de nitrogênio. A fração seca contendo a saponina foi então dissolvida em 5 mL de água destilada e transferida pra tubos previamente pesados. As amostras foram liofilizadas e calculada a porcentagem de saponina recuperada.

Para a determinação das saponinas as amostras secas foram dissolvidas em solução aquosa de metanol 80 % (v/v) e 20 µL aquecidos a 100 °C para a remoção do álcool. Após esfriar, 2 mL de etil acetato foi adicionado a 1 mL reagente A (0,5 mL de anisaldeído + 99,5 mL de etil acetato) e 1 mL reagente B (50 mL de ácido sulfúrico P.A. + 50 mL de etil acetato). Os tubos foram agitados e após 30 min a determinação das saponinas esteroidais foi efetuada através de espectrofotometria (*Genesys 20 Thermo Scientific*) a 430 nm, utilizando a diosgenina como padrão. Como branco foi utilizada a reação sem a adição do extrato vegetal.

3.6 Metabolismo antioxidativo

Plântulas de aveia das cultivares URS 21, URS 22, Leggett e Clintland 64, inoculadas com o fungo, foram maceradas nos tempos 0, 6, 24, 48, 72 e 120 hai e

homogeneizadas a 4 °C com 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5), contendo 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 3 mM de DL-ditioneol e 5 % de PVPP insolúvel (2:1 volume de tampão/massa fresca). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g durante 30 min e o sobrenadante estocado em alíquotas separadas a -80 °C até determinação da concentração de proteínas totais e a análise da atividade enzimática de catalase (CAT), glutathione redutase (GR) e ascorbato peroxidase (APX).

3.6.1 Extração de proteína

A concentração de proteína foi determinada através do kit *Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific)*. A absorbância foi determinada através do *Synergy 2 Multi-detection Microplate Reader (BioTek)*, a 590 nm.

3.6.2 Ensaios enzimáticos

3.6.2.1 Catalase

A atividade foi determinada a 240 nm durante 1 min e 30 s a cada 15 s através do *Synergy 2 Multi-detection Microplate Reader (BioTek)*, a 25 °C. A reação foi composta de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,5), contendo H₂O₂ a 30 % (v/v), preparado imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição do extrato vegetal e a atividade enzimática determinada pelo monitoramento da degradação de H₂O₂. Como branco foi utilizado o meio de reação sem a adição do extrato vegetal.

3.6.2.2 Glutathione redutase

A atividade de GR foi determinada do *Synergy 2 Multi-detection Microplate Reader (BioTek)*, a 25 °C. A mistura de reação foi composta de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), contendo 1 mM de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTDAB), 1 mM de glutathione oxidativa (GSSG) e 0,1 mM de NADPH. A reação foi iniciada pela adição do extrato enzimático. A taxa de redução da GSSG foi monitorada

pelo aumento da absorvância a 412 nm durante 1 min e 30 s a cada 15 s. Como branco foi utilizado o meio de reação sem a adição do extrato vegetal.

3.6.2.3 Ascorbato peroxidase

A atividade da APX foi determinada pelo monitoramento da taxa de oxidação através *Synergy 2 Multi-detection Microplate Reader* (BioTek), a 25 °C. A reação foi composta por tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 7,0), 0,5 mM de ascorbato, 0,1 mM de EDTA, 0,1 mM de H₂O₂ e o extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição do ascorbato. O decréscimo da absorvância foi monitorado a partir de 15 s até 1 min 30 s do início da reação. Para o branco foi utilizado o meio de reação sem a adição do extrato vegetal.

3.6.2.4 Quantificação de peróxido de hidrogênio

Amostras de 0,25 g de folhas de plântulas inoculadas das cultivares URS 21, URS 22, Leggett e Clintland 64, coletadas nos tempos 0, 6, 24, 48, 72 e 120 hai foram trituradas em nitrogênio líquido e posteriormente homogeneizadas em 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1 %. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g por 30 min, a 4 °C, coletando-se o sobrenadante. Alíquotas de 500 µL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 500 µL de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e 1000 µL de iodeto de potássio 1 M, a leitura da absorvância foi determinada a 390 nm. Como branco foi utilizado o meio de reação sem a adição do extrato vegetal. As concentrações de H₂O₂ nas amostras foram estimadas com base na curva de calibração, utilizando H₂O₂ como padrão.

3.6.2.5 Quantificação de clorofila e carotenóides

Amostras de 0,07 g de folhas frescas de aveias das diferentes cultivares estudadas neste trabalho e inoculadas com o fungo foram coletadas nos tempos 0, 6, 24, 48, 72, 120 hai e adicionadas em tubos plásticos graduados, com 5 ml de

dimetilsulfóxido (DMSO) em banho-maria a 65 °C por 30 min até o branqueamento das folhas, os tubos foram vedados para evitar evaporação. Depois de retirados do banho-maria o volume foi completado para 7 ml de DMSO. O sobrenadante transferido para espectrofotômetro e a leitura procedeu-se nos comprimentos de ondas 645, 663 e 471 nm. Os teores de clorofilas e carotenóides foram mensurados a partir das seguintes fórmulas:

$$\text{- Clorofila a (mg/g FW)} = [(11,75 \times A_{663} - 2,35 \times A_{645}) \times 50] / 500$$

$$\text{- Clorofila b (mg/g FW)} = [(18,61 \times A_{645} - 3,96 \times A_{663}) \times 50] / 500$$

$$\text{- Carotenóides (mg/g FW)} = [(1000 \times A_{471} - 2,27 \times \text{Conc. Clor. a} - 81,4 \times \text{Conc. Clor. b}) / 227 \times 50] / 500.$$

Os dados para clorofila foram expressos em termos de clorofila total (clorofila a + clorofila b).

3.7 Análises histopatológicas

Para as análises histopatológicas, três repetições com três segmentos foliares de cerca de 2 cm de folhas de plântulas das cultivares URS 21, URS 22, Leggett e Clintland 64, inoculadas com o fungo, foram coletadas nos tempos 0, 6, 24, 48, 72 e 120 h da região mediana das folhas. As análises foram efetuadas em toda a extensão dos segmentos coletados.

3.7.1 Determinação de compostos autofluorescentes semelhantes a compostos fenólicos

Após a coleta, amostras de 2 cm da região mediana das folhas foram fixadas durante 24 h em 3:1 (v:v) etanol:clorofórmio contendo 0,15 % (p/v) ácido tricloroacético (TCA) e estocadas em glicerol 50 %. Para determinar a autofluorescência, as amostras fixadas foram clareadas em cloral hidratado:água 5:2

(p:v), montadas em lâminas contendo glicerol 50 % e examinadas em microscópio de epifluorescência.

3.7.2 Determinação de peróxido de hidrogênio

Segmentos de 2 cm da região mediana das folhas foram coletadas e infiltrados com uma solução de 3,3-diaminobenzina-4HCl (DAB) 1 mg.mL⁻¹ dissolvida em água destilada acidificada (pH 3-4) com HCl. Os segmentos foram incubados por 5 h no escuro e, após, transferidos para uma solução de clorofórmio (Et:clorofórmio- 3:1) com adição de 15 % de TCA, permanecendo no escuro durante 24 h. Após este período, as amostras foram transferidas para uma solução de glicerol 50 %. Posteriormente as amostras fixadas foram clareadas em cloral hidratado:água 5:2 (p:v), montadas em lâminas contendo glicerol 50 % e examinadas em microscópio óptico.

3.7.3 Determinação de superóxido

Segmentos de 2 cm da região mediana das folhas de folhas foram coletados e infiltrados a vácuo durante 5 min com uma solução de 0,1 % de *nitro blue tetrazolium* (NTB) (p:v) dissolvido em tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,8). Os segmentos infiltrados foram incubados em temperatura ambiente na presença de luz constante durante 15 min. Em seguida, foram transferidos para uma solução de clorofórmio (EtOH:clorofórmio) com adição de 0,15 % de TCA, permanecendo no escuro durante 24 h. Após, as amostras foram transferidas para uma solução de glicerol 50 %. Posteriormente as amostras fixadas foram clareadas em cloral hidratado:água 5:2 (p:v), montadas em lâminas contendo glicerol 50 % e examinadas em microscópio óptico.

3.8 Extração de RNA total para análise de expressão gênica

O RNA total foi isolado de plantas adultas URS21 e URS22, infectadas pelo fungo, nos tempos de 0, 6, 24, 48, 72 e 120 hai.

A extração do RNA total foi realizada através do Kit *RNAqueous* (*Applied Biosystems*), em conjunto com o reagente *Plant RNA Isolation AID* (*Applied Biosystems*), de acordo com as recomendações do fabricante para tecidos moles à média consistência de plantas. Tecidos foliares previamente liofilizados (cerca de 25 mg) dos diferentes tratamentos foram homogeneizados com $10 \mu\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$ de *Lysis/Binding Solution* e 1 volume de *Plant RNA Isolation AID* em tubos de 1,5 mL livres de nucleases (ou tratados com 0,1 % de dietil pirocarbonato (DEPC) por 24 h, lavados com água deionizada livre de nucleases e autoclavados durante 30 min). Posteriormente, foi adicionado aos tubos igual volume de etanol 64 % para que ocorresse a lise celular, e os tubos invertidos algumas vezes para misturar o conteúdo. A mistura originada foi aplicada em *Filter Cartridge* colocados em tubos fornecidos pelo fabricante. As amostras foram centrifugadas em microcentrífuga (Hermle Z 400K- Labnet) a 14.000 rpm durante 1 min a 4 °C para que o lisado se misturasse através do filtro. O material coletado no tubo foi descartado e o *Filter Cartridge* recolocado no tubo. Após 700 μL do *Wash Solution # 1* foi aplicado ao *Filter Cartridge*, as amostras centrifugadas a 14.000 rpm por 1 min a 4 °C, o líquido coletado no tubo foi descartado e o *Filter* colocado novamente no mesmo tubo. A seguir foram realizadas duas lavagens de 500 μL cada com o *Wash Solution # 2/3*, sempre centrifugando, descartando o líquido coletado e recolocando o filtro no tubo já usado. Uma centrifugação adicional de 14.000 rpm durante 30 s a 4 °C foi realizada para remover qualquer traço de reagente do *Filter Cartridge*. Assim o *Filter Cartridge* foi colocado em um novo tubo fornecido pelo fabricante e foram realizadas duas eluições sucessivas com 50 μL de *Elution Solution* a 75 °C, sempre centrifugando após a adição do reagente a 14.000 rpm por 30 s a 20 °C. Às amostras foi adicionado a metade de volume de *LiCl Precipitation Solution* e misturadas bem por inverter o tubo várias vezes. Posteriormente as amostras foram

encubadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por no mínimo 30 min, centrifugadas a 14.000 rpm durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e removido o sobrenadante. Foram realizadas duas lavagens sucessivas com etanol 70 % gelado, sempre recentrifugando e descartando o sobrenadante. Os *pellets* originados foram deixados secar *overnight* e resuspensos em 20 μL de água deionizada e livre de nucleases. As extrações foram feitas em triplicatas para cada amostra.

Após a extração, 1 μL do RNA total foi quantificado em *NanoDrop 1.000 Spectrophotometer (Thermo Scientific)* e a qualidade determinada em gel de agarose 1%.

3.9 Síntese de cDNA para análise da expressão ao longo do tempo

De posse da concentração dos RNAs total, todas as amostras foram diluídas para que os RNAs total tivessem a mesma concentração ($20\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). A partir desta concentração de RNA total foi conduzida a etapa de síntese de cDNA, utilizando, com algumas modificações, o Kit *Smarter™ PCR cDNA Synthesis* (Clontech) no parselho *My Cycler Thermal Cycler* (Bio Rad). Cada tratamento contou com duas repetições biológicas.

O Kit *SMARTer™ PCR cDNA Synthesis* provê um método baseado em PCR para a produção de cDNA de alta qualidade a partir de pequenas quantidades de RNA total. O *Kit SMARTer PCR cDNA Synthesis* é uma versão melhorada do Kit original, *SMART™ PCR cDNA Synthesis*, e inclui SMARTer oligo e *SMARTScribe™ Reverse Transcriptase*; isto provê alta especificidade, baixo *background* e um aumento do rendimento. A partir deste kit é possível sintetizar cDNA de alta qualidade a partir de 2 ng de RNA total.

Todos os métodos habitualmente usados para a síntese de cDNAs são baseados na habilidade da Transcriptase Reversa (RT) em transcrever o mRNA em simples fita de DNA no primeiro passo da reação. Entretanto, devido ao fato da RT não poder

sempre transcrever a sequência inteira de mRNA, a porção 5' final de um gene tende a ser não representativa na população de cDNAs. Na ausência da degradação de RNA, moléculas truncadas de cDNA presentes na biblioteca são frequentes devido a tendência da RT pausar antes da transcrição ser completada. Assim, neste trabalho foi utilizado o *SMARTer method*, que permite o enriquecimento preferencial de cDNAs com comprimento total. Este método utiliza o oligo (dT) primer modificado (3' *SMART CDS Primer II A*), utilizado na síntese da primeira fita (Figura 4). Quando a *SMARTScribe™ RT* atinge a região 5' final do mRNA, a atividade transferase terminal da enzima adiciona alguns nucleotídeos à região 3' final do cDNA. O comprimento resultante do cDNA fita simples contém a região 5' final do mRNA completa, bem como as sequências que são complementárias ao *SMARTer Oligonucleotide*. Em casos que a RT pausar antes do final da fita, a adição de nucleotídeos é muito menos eficiente do que com o comprimento completo do híbrido cDNA-RNA, assim o excesso de base necessária para o emparelhamento com o *SMARTer Oligonucleotide* está ausente. O *SMARTer* utiliza a sequência âncora e a sequência poly A como um sítio universal para os *primers* para amplificação *end-to-end* cDNA. Em contraste, sem esta sequência, como em cDNAs com terminação prematura, DNA genômico contaminante ou cDNA transcrito a partir de poly A- RNA, não é exponencialmente amplificado.

3.9.1 Otimização do número ótimo de ciclos de PCR e síntese de cDNA

De acordo com recomendações do fabricante do Kit *SMARTer™ PCR cDNA Synthesis*, inicialmente foi realizada a escolha do melhor número de ciclos de PCR para garantir que os cDNA dupla fita remanescessem em fase exponencial de amplificação. Isso porque quando o rendimento dos produtos de PCR para de ser incrementado e a reação alcança o platô, há uma sobreciclagem cDNA que pode resultar em uma menor representatividade dos genes; por outro lado, uma baixa ciclagem de cDNA pode

acarretar um rendimento baixo de cDNA. Desta forma foi verificado o número ótimo de ciclos, que geralmente é um ciclo a menos que o ciclo necessário para chegar ao platô.

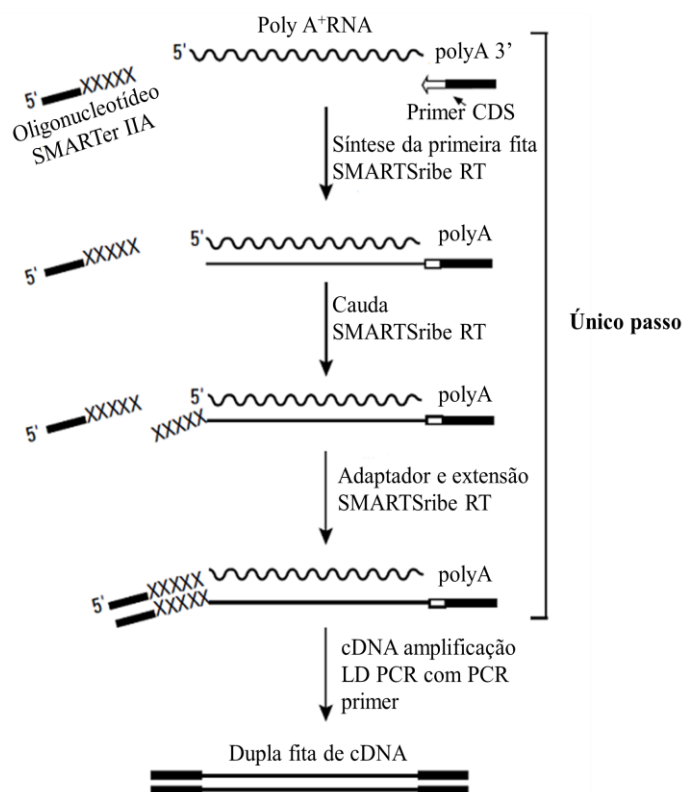


FIGURA 4. Esquema representativo da síntese de cDNA a partir do Kit *SMARTer*.

Assim, foi realizando um teste com três amostras, além da amostra controle de reação do Kit (*Control Mouse Liver Total RNA*) para verificar quantos ciclos seriam usados para a síntese dos cDNAs. Para tanto 1 μL de RNA de cada amostra ($20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) ou do controle de reação ($1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), foi adicionado em tudo de reação de 0,5 mL, além de 1 μL do 3' *SMART CDS Primer II A* ($121 \text{ } \mu\text{M}$) e 2,5 μL de água deionizada. Posteriormente o conteúdo de cada tubo foi misturado e incubado a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ em termociclador do tipo *My Cycler Thermal Cycler* (Bio Rad) durante 3 min; após a temperatura foi reduzida para $42 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 min.

Às amostras foi adicionado 5,5 μL do *Master Mix* por reação, contendo 2 μL *5X First-Strand Buffer*, 0,25 μL *DTT* (100 mM), 1 μL *dNTP Mix* (10 mM), 1 μL *SMARTer*

II A Oligonucleotide (12 μ M), 0,25 μ L *RNase Inhibitor*, 1 μ L *SMARTScribe Reverse Transcriptase* (100 U). O conteúdo dos tubos foi misturado gentilmente por inversão e incubados à 42 °C por 90 min para obtenção de cDNAs com comprimento total. A reação foi finalizada por aquecimento dos tubos à 70 °C durante 10 min. À primeira fita de cDNA foi adicionado 40 μ L de TE buffer (10 mM Tris [pH 8,0], 1 mM Tris).

Para cada reação, alíquotas de 10 μ L do cDNA fita simples diluído em TE Buffer foi adicionado 90 μ L do *PCR Master Mix* contendo 74 μ L água deionizada, 10 μ L *10X Advantage 2 PCR Buffer*, 2 μ L *50X dNTP Mix* (10 mM), 2 μ L *5'PCR Primer II A* (12 μ M), 2 μ L *50X Advantage 2 Polymerase Mix*. Foi utilizado o seguinte programa de PCR no termociclador do tipo *My Cyclyer Thermal Cyclyer* (Bio Rad): 95 °C durante 1 min, 15 ciclos: 95 °C, 15 s; 65 °C, 30 s; 68 °C, 6 min. Todos os tubos foram submetidos a 15 ciclos iniciais, posteriormente o programa foi finalizado, 25 μ L de cada tubo transferidos para ser testado o número de ciclos ótimos de reação e 5 μ L usados para a visualização em gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídeo. Os 70 μ L restantes foram mantidos a 4 °C até que este número ótimo fosse determinado. Foram coletadas alíquotas de 5 μ L a 18, 21, 24 e 27 ciclos (Figura 5) e visualizadas em gel de agarose 1,2 %, coradas com brometo de etídeo.

De posse do número de ciclos ótimos, procedeu-se a amplificação por PCR com os 70 μ L restantes. Após a padronização do número de ciclos ótimos e verificação da eficiência do Kit, foi realizada a síntese de cDNA com as demais amostras.

3.10 Rastreamento de sequência e projeção de *primers*

Foram rastreadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) sequências de aveia, trigo e cevada que estivessem envolvidas na produção dos metabólitos secundários de interesse e estresse oxidativo. Estas sequências foram alinhadas contra sequências codificantes de aveia do banco de dados do USDA (*United*

States Department of Agriculture) e verificada a similaridade para a projeção de *primers*. Os *primers* específicos foram projetados através do programa Primer3, com temperatura de pareamento de 60-62 °C, que pareassem na região 3' do gene e produzissem amplicons de 100-250 pb (Tabela 2).

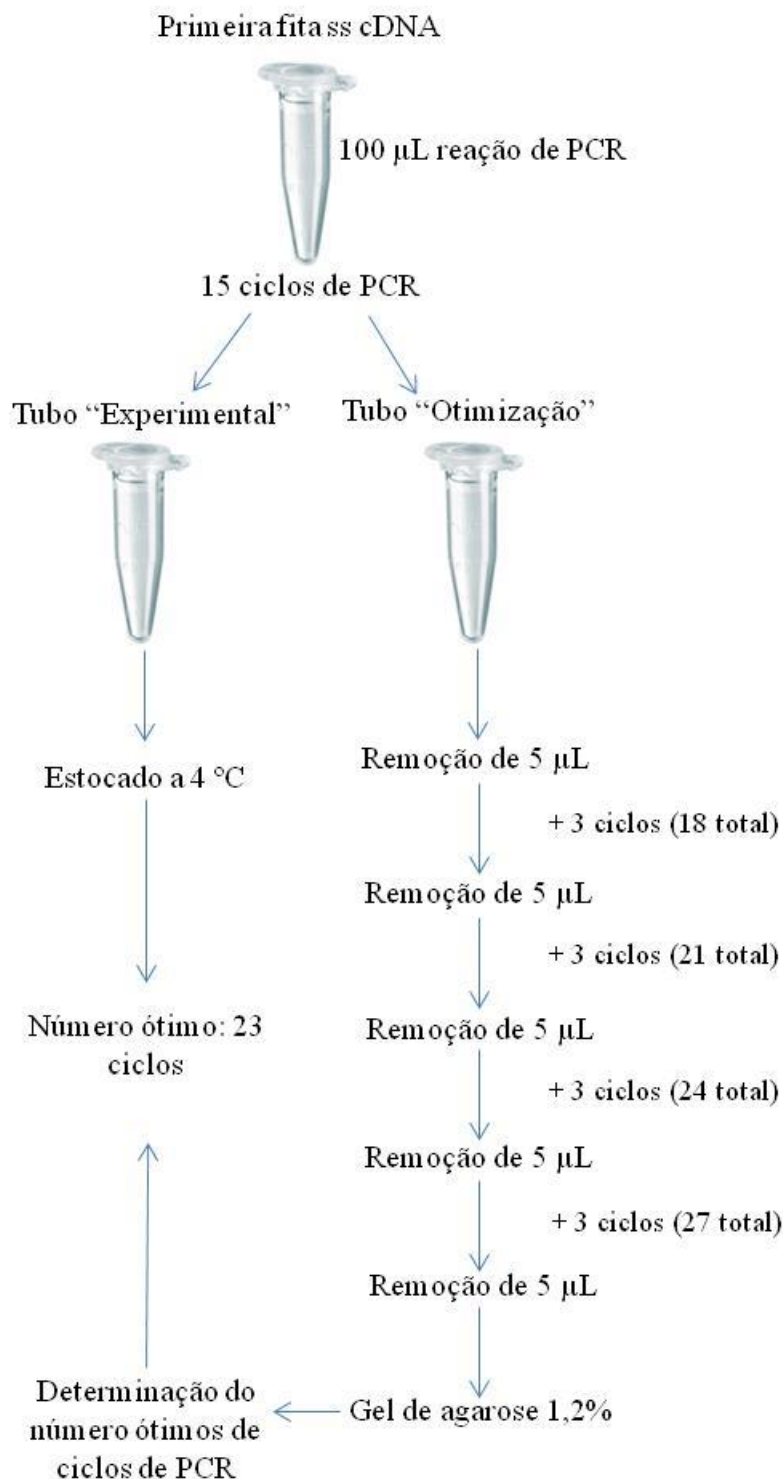


FIGURA 5. Otimização dos ciclos de PCR para a síntese da dupla fita de cDNA.

3.11 Primers Tempo Real

Como controle endógeno da PCR Tempo Real, foram testados os genes constitutivos, *GAPDH*, *TUBA*, *TUBB*, *ELF1A*, *EIF4A* e *18 S rRNA* (Tabela 3).

3.12 PCR Tempo Real

A expressão gênica foi avaliada através de PCR Tempo Real utilizando o equipamento *7900HT Fast Real-Time PCR*, *Applied Biosystems*. As reações foram realizadas em placas de 96 poços *MicroAmp[®] Optical* com selador *MicroAmp Adhesive Film*, ambos da *Applied Biosystems*. As reações foram realizadas com volume final de 20 µL, sendo 10 µL de mix de reação e 10 µL de cDNAs diluídos 1:100. Fizeram parte do mix: Tampão de PCR 1X, cloreto de magnésio ($MgCl_2$) 3 mM, dNTPs 0,25 mM (10 µM de cada nucleotídeo), *primer forward* 0,2 µM, *primer reverse* 0,2 µM, *Taq Platinum[®]* Invitrogen 0,25U e água deionizada autoclavada para completar o volume. As seguintes condições de amplificação foram utilizadas: 50 °C/ 2 min, 95 °C/ 5 min, 40 x (95 °C/ 15 s, 60 a 62 °C/ 15 s, 72 °C/ 30 s).

Os cálculos de expressão relativa foram realizados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Além disso, os fragmentos gerados foram confirmados através da visualização em géis de agarose 1,5 % (p/v).

TABELA 2. *Primers* projetados para genes envolvidos no metabolismo secundário e estresse oxidativo de *A. sativa* e testados na interação com *P. coronata* f. sp. *avenae*.

| Símbolo gene | Nome gene | Primer sequência | Temperatura de pareamento |
|---------------------|---|--|----------------------------------|
| <i>ASa</i> | Antranilato sintase | <i>Forward:</i> G C A G C T T T G C C T G T A G G A A C <i>Reverse:</i> G G C T T G G A G C T G T T G A G A A C | 60 °C |
| <i>AsHHT1</i> | Hidroxiantranilato hidroxicinamoiltransferase 1 | <i>Forward:</i> A C T T C G G C A A C G T C A T C T T C <i>Reverse:</i> C G G C T G C A G C T C T A G G T A G T | 60 °C |
| <i>CCOAOMT</i> | Cafeoil-CoA 3-O-Metiltransferase | <i>Forward:</i> T A G G A T A C G A C A A C A C G C T C T G <i>Reverse:</i> T G T G C A C T C C A T T C A C T T G G | 60 °C |
| <i>PAL</i> | Fenilalanina amônia liase | <i>Forward:</i> T A C C G G T T T G T T C G T G A G G A G C T T <i>Reverse:</i> T T A C T T G A T G T T G A T G G G C A G C G G | 62 °C |
| <i>Lox</i> | Lipoxigenase | <i>Forward:</i> A T C A C C A G C C A G A T C C A G A C <i>Reverse:</i> A C C T T G C T C T C G A T G T C C A C | 62 °C |
| <i>Pxg</i> | Peroxigenase | <i>Forward:</i> G A A C A A T C C T G A A G G G A C C A <i>Reverse:</i> A A G T T G A A T C C C A G C C T C C T | 62 °C |
| <i>AsCS</i> | Cicloartenol sintase | <i>Forward:</i> G G A A T G T A C G T C A G C T G C A A <i>Reverse:</i> G C C T T C A C T C C A A A C C A T G T | 60 °C |
| <i>Pox</i> | Peroxidase | <i>Forward:</i> A G A A C T T C C G G T C G A G G A T T <i>Reverse:</i> T G A A C A G C A C C T G G T C A G A G | 62 °C |
| <i>GP</i> | Glutaciona peroxidase | <i>Forward:</i> A G G T T G A T G T C A A C G G G A A G <i>Reverse:</i> T C A A T G C T C A G A G G G G A A G T | 61 °C |
| <i>Celsyn</i> | Celulose sintase | <i>Forward:</i> T C A A G C T C A C A T C C A A G C T G <i>Reverse:</i> G G A A G A G C A C C C A G A A G T T G | 61 °C |
| <i>APX</i> | Ascorbato peroxidase | <i>Forward:</i> C T G A T G C A A C C A A G G G T T C T <i>Reverse:</i> C A G T C A G C A G G G T T T T G T C A | 61 °C |
| <i>CAT2</i> | Catalase | <i>Forward:</i> C A G C C A T G A A C T C A G G A T C A <i>Reverse:</i> A C A T G G C C T C T G C T T A T T G C | 61 °C |
| <i>CHI</i> | Chalcona isomerase | <i>Forward:</i> G A G C G C A G T A C T C G G A G A A G <i>Reverse:</i> G A G T G G G T G A A G A G G A T G G A | 61 °C |
| <i>CHS</i> | Chalcona sintase | <i>Forward:</i> C C T C C A C A A G G A T G T T C C A T <i>Reverse:</i> C A T G C G C T A G A C A T G T T T C C | 61 °C |

TABELA 3. Características dos *primers* constitutivos testados

| Símbolo gene | Nome gene | Número acesso | Primer sequência | Tamanho amplicon (pb) |
|-----------------|-----------------------------------|---------------|---|-----------------------|
| <i>GAPDH</i> | Gliceraldeído-3-Pdehidrogenase | AK251456 | Forward: TGCCATGCCATGACTGCAA Reverse: CCAGTGCTGCTTGAATGATG | 105 |
| <i>TUBA</i> | Alfa tubulina-2B | AK250165 | Forward: TTCGCCCCGTGGTCATTACA Reverse: GCATTGAAGACAAGGAAGCCC | 113 |
| <i>TUBB</i> | Beta-tubulina | U76897 | Forward: CAAGGAGGTGGACGAGCAGATG Reverse: GACTTGACGTTGTTGGGGATCCA | 84 |
| <i>ELF1A</i> | Fator de alongação -1 alfa | AF479046 | Forward CAGTGCTGGACTGCCACA Reverse: CTCCACCACCATGGGCTT | 164 |
| <i>EIF4A</i> | Fator de iniciação eucariótico 4a | EU850433 | Forward: TTGTGCTGGATGAAGCTGATG Reverse: ACACCAACAGCCACAGTTTGC | 76 |
| <i>18S rRNA</i> | RNA ribossomal 18S | M82356 | Forward: GTGACGGGTGACGGAGAATT Reverse: GACTACTAATGCGCCCGGTAT | 151 |

3.13 RNA-sequenciamento

3.13.1 Extração do RNA total

Amostras de folhas de plântulas de aveia da cultivar URS 21, inoculadas com o fungo ou sem inoculação, foram coletadas 12 hai e imediatamente colocadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer até a extração do RNA. O tempo de análise foi escolhido devido ao conhecimento prévio gerado pelas demais análises deste trabalho.

No momento da extração as amostras de até 100 mg foram maceradas em tubos de microcentrífuga contendo nitrogênio líquido. Após a evaporação total do nitrogênio, o RNA total das amostras foi extraído com o *RNeasy Plant Mini Kit*, Quiagen, com algumas modificações devido ao uso do *RNae-Free DNase Set*, Quiagen. Assim, 450

μL do tampão RLT para um máximo de 100 mg de tecido foi adicionado aos tubos e os mesmos agitados com auxílio de vórtex. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 3 min a 56 °C para ajudar a romper os tecidos. Então o tecido lisado foi transferido para tubos contendo a *QIAshredder spin* coluna e centrifugados por 2 min a velocidade máxima. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga, acrescido de meio volume de etanol P.A. e o conteúdo misturado por pipetagem. As amostras foram transferidas para um novo tubo de microcentrífuga contendo uma *RNeasy spin* coluna e centrifugadas durante 15 s a 10.000 rpm, descartando o conteúdo coletado no tubo. Após, 350 μL do Buffer RW1 foi adicionado às colunas, realizando nova centrifugação de 15 s a 10.000 rpm, descartando o conteúdo coletado no tubo. Foi adicionado 80 μL do mix de DNase I à coluna e incubado por 15 min a 30 °C. O tampão RW1 (350 μL) foi adicionado e o tubo centrifugado durante 15 s a 10.000 rpm, descartando o líquido coletado. O tampão RPE (500 μL) foi adicionado e, procedida a centrifugação e descarte como no passo anterior. Novamente este passo foi realizado, entretanto a centrifugação ocorreu durante 2 min. A coluna foi colocada em um novo tubo e sem a adição de nenhum reagente centrifugada durante 1 min a velocidade máxima para retirar qualquer vestígio de reagente. Esta foi colocada em um novo tubo de microcentrífuga e adicionados 50 μL de água livre de RNase. Foi realizada nova centrifugação por 1 min a 10.000 rpm para eluir o RNA. O passo foi realizado 1 vez mais, entretanto foram adicionados 30 μL de água livre de RNase.

Após a extração, 1 μL do RNA total foi quantificado em *NanoDrop 1.000 Spectrophotometer* (*Thermo Scientific*) e a qualidade determinada em gel de agarose 1% (Figura 6).

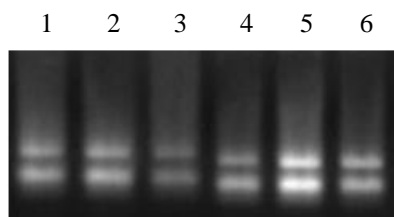


FIGURA 6. Visualização em gel de agarose 1 % do RNA de amostras da cultivar URS 21 enviadas para o RNA-seq: 1, 2 e 3. Repetições de amostras inoculadas com *P. coronata* f. sp. *avenae* e coletadas 12 hai; 4, 5 e 6. Repetições de amostras não inoculadas com o fungo e coletadas 12 hai.

3.13.2 Sequenciamento e edição das sequências

Três repetições biológicas com concentração entre $30\text{-}43 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ para cada tratamento foram enviadas para o sequenciamento no WM Keck Centro de Genômica Comparativa e Funcional, no Centro de Biotecnologia Roy J Carver na Universidade de Illinois em Urbana-Champaign, EUA. Os tratamentos foram plantas de URS 21 inoculadas com ferrugem da folha contra plantas do mesmo genótipo não inoculadas com o fungo, e coletadas 12 hai.

As bibliotecas foram preparadas utilizando *Illumina TruSeq Amostra RNAseq Kit Prep* seguindo as recomendações do fabricante, utilizando fragmentos de cDNA de 250 nucleotídeos em média. As amostras foram sequenciadas através de 100 ciclos, em equipamento Illumina HiSeq2000, usando um kit de sequenciamento TruSeq SBS (v. 3). Os resultados foram coletados pela base de dados *Cassava 1.8 pipeline* e a análise das sequências realizada utilizando o *CLCBio Workbench Genomics 5.1*.

O primeiro passo foi o corte aleatório das sequências baseadas em ambiguidade, qualidade e comprimento. O limite mínimo de qualidade aceitável foi de 0,003 (equivalente a uma qualidade Q de 27), além disso, foi aceito um máximo de 2 nucleotídeos ambíguos e comprimento mínimo de 25 nucleotídeos. A o comprimento médio da sequência após o corte foi 82,6 nucleotídeos.

Após o corte, as sequências remanescentes foram reunidas em *contigs* usando os seguintes parâmetros: 50 % de sequências sobrepostas, 95 % de semelhança na zona de sobreposição, incompatibilidade de 2, deleção/inserção de 3 e um comprimento mínimo do *contig* de 300 bp. Posteriormente, foi usada a opção automática para definir a montagem final.

Os parâmetros de mapeamento para cada amostra biológica foram: fração de comprimento mínimo = 0,5 e similaridade mínima = 0,95. Mais de 80 % das sequências de cada amostra foram mapeadas nos dois sentidos, gerando *contigs* a partir das sequências montadas.

3.14 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental completamente casualizados. Para cada experimento foram utilizadas três repetições biológicas com três replicatas, exceto para a análise de PCR Tempo Real que constou de duas repetições biológicas com quatro replicatas por amostra.

Exceto para a análise do transcriptoma, as demais análises estatísticas dos dados foram realizadas através do programa estatístico SAS (SAS Institute Inc., 1999). Os resultados foram submetidos à análise de variância, e teste de comparação de médias através do teste Tukey, a 5 % de probabilidade.

A análise estatística de RPKM (leitura por quilobases de modelo éxon) foi utilizada para os valores de expressão obtidos pelo RNA-seq. O teste de Barggerley foi utilizado para determinar a expressão diferencial para cada *contig*. Os valores de P foram ajustados usando a correção FDR (taxa de falsa detecção). *Contigs* foram considerados como expresso diferencialmente quando FDR e valores de P eram menores que 0,0001.

4 RESULTADOS

4.1 Mecanismos bioquímicos

4.1.1 Metabólitos secundários

Dois grupos de metabólitos secundários, compostos fenólicos e saponinas, são relatados por conferir resistência a patógenos em aveia (Osbourn, 2003; Osbourn *et al.*, 2003; Soriano *et al.*, 2004). Assim, neste trabalho foi avaliada a concentração ao longo do tempo de compostos fenólicos totais e saponinas esteroidais, e verificado o possível papel destes compostos na resistência parcial à ferrugem da folha em aveia (Figuras 7 e 8).

Na interação entre a cultivar URS 21, com resistência parcial, e *P. coronata* f.sp. *avenae* houve um aumento na síntese dos metabólitos secundários analisados (Figuras 7 e 8). Quando os compostos fenólicos totais foram quantificados, tanto em plântulas como em plantas adultas de aveia do genótipo URS 21, o pico máximo destes compostos foi observado em 24 hai, com concentração de aproximadamente $850 \mu\text{g.g}^{-1}$ em plântulas e $1.700 \mu\text{g.g}^{-1}$ em plantas adultas. Em plantas adultas da mesma cultivar, a concentração do composto se manteve elevada até 72 hai, entretanto, em plântulas, houve decréscimo na concentração dos compostos fenólicos após 24 hai (Figura 7).

Plântulas e plantas adultas de URS 22, suscetíveis à ferrugem da folha, quando inoculadas com o fungo, apresentaram uma diminuição na síntese de compostos fenólicos ao longo do tempo até 72 hai, e um aumento tardio (120 hai) em mesma

concentração ($1.000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), provavelmente relacionado com a colonização do fungo (Figura 7). Contudo em plantas adultas do mesmo genótipo, a concentração obtida em 120 hai foi bastante inferior a obtida em 0 hai. A concentração de compostos fenólicos foi superior em plantas adultas em todos os tempos, para ambas as cultivares, mesmo antes da inoculação (Figura 7A).

Quando saponinas esteroidais foram analisadas em plantas adultas de aveia da cultivar URS 21 inoculada com o fungo, foi observado um incremento na concentração do composto até 72 hai, sendo este o pico máximo (cerca de $350 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Após este período houve um decréscimo na produção de saponinas em URS 21 (Figura 8). Em plantas suscetíveis (URS 22) inoculadas com o fungo houve um incremento na concentração de saponinas em 48 hai, contudo a concentração máxima obtida foi um sétimo da encontrada na cultivar URS 21 (Figura 8).

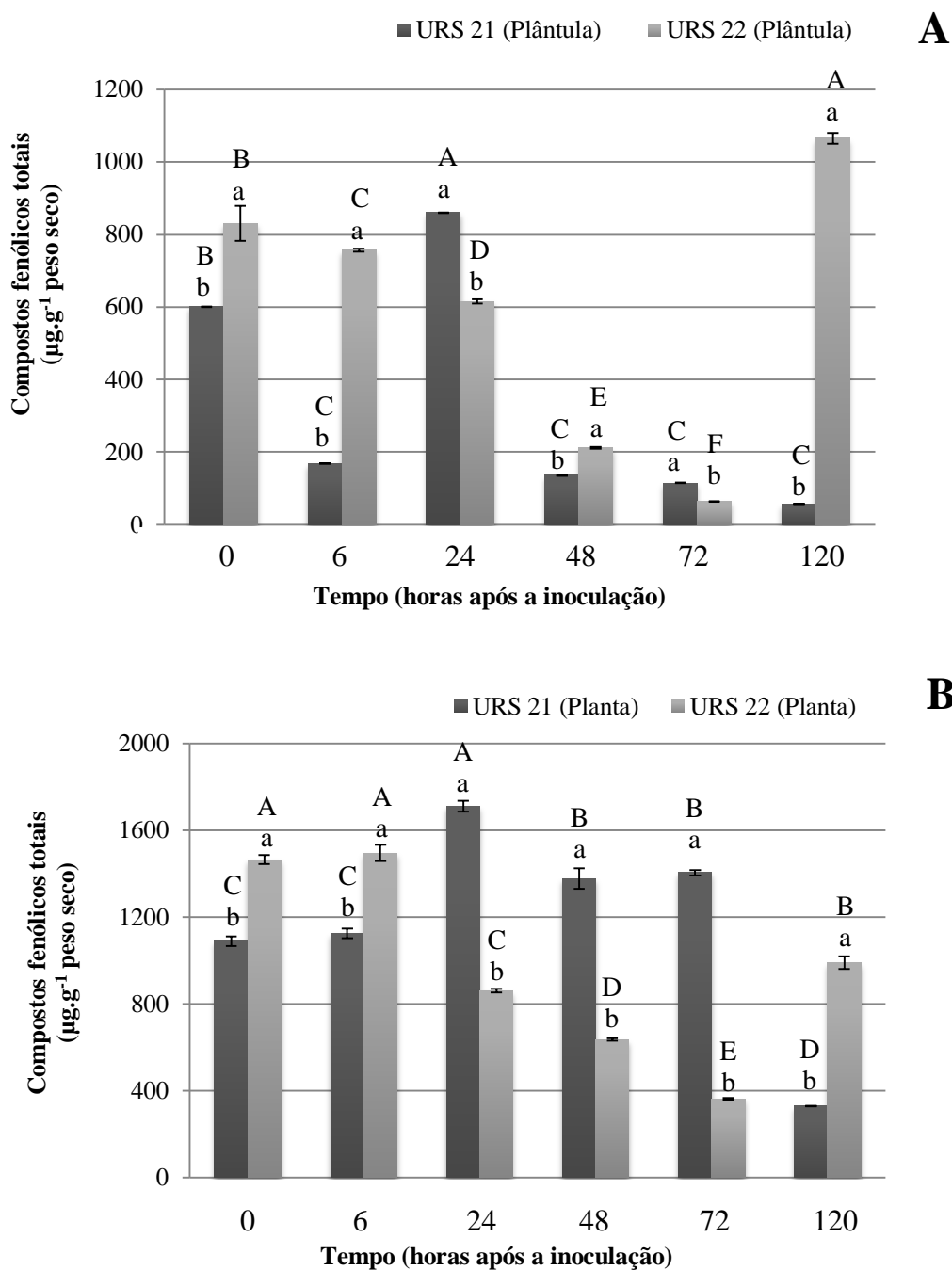


FIGURA 7. Compostos fenólicos totais em aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 6, 24, 48, 72 e 120 horas após a inoculação (hai); **A.** Plântula; **B.** Planta adulta. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

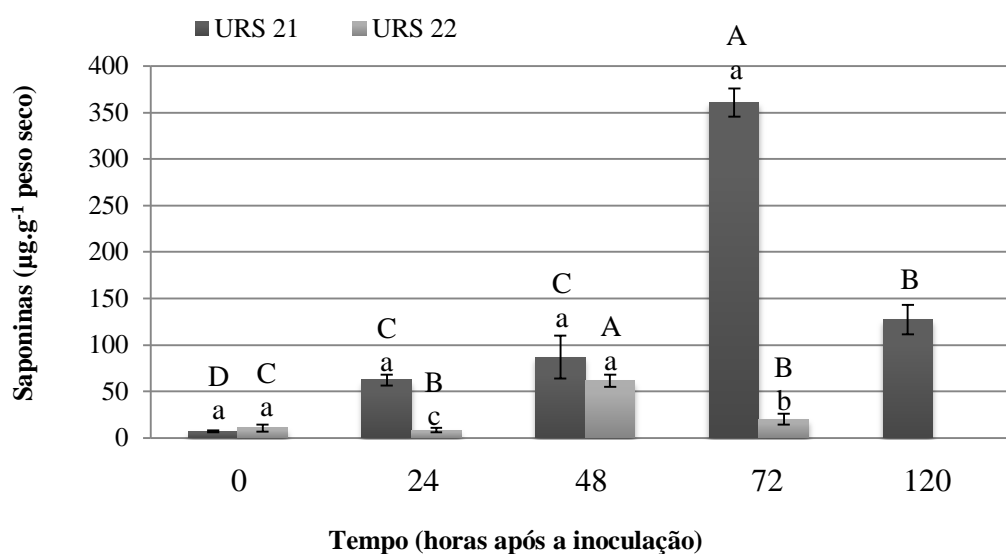


FIGURA 8. Saponinas esteroidais em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.1.2 Estresse oxidativo

Através da quantificação de H_2O_2 em plântulas de aveia das diferentes cultivares testadas (Figura 9), foi possível observar que os níveis do peróxido diminuíram para as cultivares URS 21 e 22 em 48 hai. Para a cultivar resistente Leggett, a produção de peróxido diminuiu após 0 hai e se manteve constante ao longo do tempo. Na cultivar URS 21 houve um decréscimo na produção de H_2O_2 a partir de 24 hai. Níveis inferiores do composto foram observados entre 48 e 72 hai para URS 21, com redução de cerca de 50% em relação ao tempo 0 hai. Para a cultivar suscetível URS 22, os maiores níveis de H_2O_2 ocorreram logo após a inoculação (6 hai). Em Clintland 64 (suscetível) não foi observada diferença no conteúdo de peróxido de hidrogênio com a inoculação (Figura 9).

A exceção de URS 22 que apresentou um acréscimo inicial (6 hai) na produção de H_2O_2 (Figura 9), esta molécula parece não estar envolvida no processo de sinalização

de defesa. Entretanto, não se pode afirmar categoricamente, pois não foram efetuadas análises anteriores a 6 hai. Geralmente em genótipos resistentes, a sinalização ocorre logo após a inoculação.

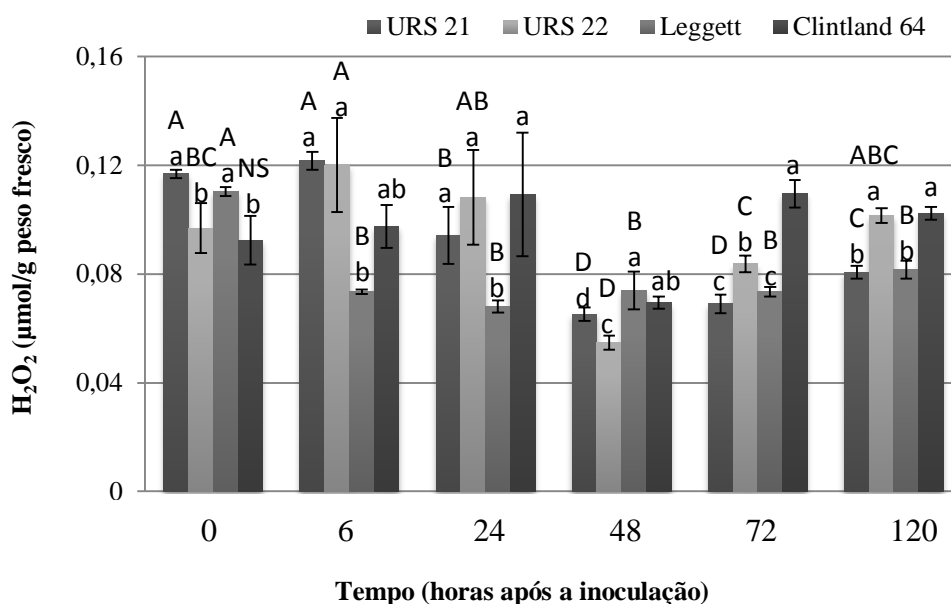


FIGURA 9. Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em plântulas de aveia parcialmente resistente (URS 21), suscetível (URS 22), resistente (Leggett) e suscetível (Clintland 64) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A atividade enzimática da ascorbato peroxidase (APX) sugere estresse oxidativo mínimo em plântulas de aveia da cultivar com resistência parcial, URS 21, submetidas à inoculação com o fungo, pois não houve um estímulo à atividade. Sendo que para esta cultivar, a maior atividade de APX foi observada às 6 hai, quando houve um aumento de aproximadamente 7 % na atividade. Entretanto, a cultivar URS 21, em todos os tempos avaliados, apresentou menores atividades da enzima se comparada com as demais cultivares (Figura 10). A cultivar suscetível, URS 22, também apresentou maior atividade da APX logo após a inoculação (6 hai), porém em níveis superiores a URS 21, incremento de 23 % na atividade. Além disso, a cultivar suscetível Clintland 64 foi a

que apresentou maior atividade de ascorbato peroxidase em todos os tempos analisados, exceto em 24 hai, onde a atividade da enzima aumentou significativamente para a cultivar com resistência total, Leggett (aumento de 21 % em relação ao tempo zero) (Figura 10).

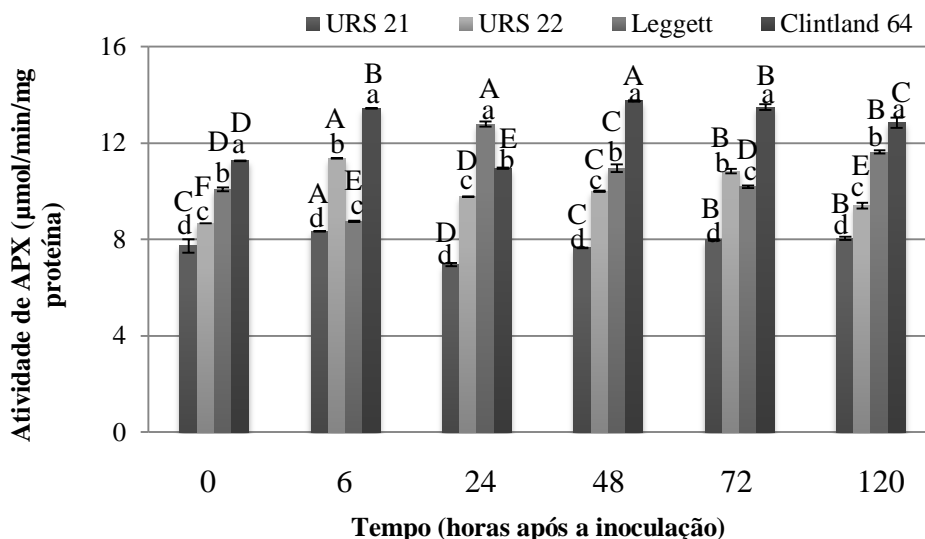


FIGURA 10. Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) em plântulas de aveia parcialmente resistente (URS 21), suscetível (URS 22), resistente (Leggett) e suscetível (Clintland 64) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Na análise da atividade da enzima catalase (CAT) (Figura 11), em plântulas de aveia, foi possível observar que, assim como para APX (Figura 10), o genótipo URS 21 apresentou os menores níveis de atividade da enzima em todos os tempos após a inoculação. Em URS 21, às 24 hai foi o tempo de menor atividade para ambas as enzimas (Figuras 10 e 11). O que pode indicar que em URS 21 não houve estresse oxidativo em resposta à inoculação.

Assim como para APX (Figura 10), a enzima CAT teve um aumento rápido de atividade na cultivar suscetível Clintland 64, com incremento de 22 % e estas taxas se mantiveram elevadas até o final do experimento (Figuras 11). Estes resultados podem

estar relacionados com a produção mais elevada de H_2O_2 nesta cultivar (Figura 9), havendo a necessidade de maior detoxificação pelas enzimas.

Os níveis de atividade de CAT não foram alterados nas cultivar com resistência total (Leggett) e a suscetível (URS 22) em resposta à inoculação, indicando não haver uma resposta ao estresse oxidativo através desta enzima (Figura 11).

Quando a atividade da enzima glutathiona redutase (GR) foi avaliada, foi possível observar que em plântulas de aveia da cultivar URS 21, parcialmente resistente, houve uma diminuição dos níveis da enzima após a inoculação em todos os tempos analisados. Além disso, assim como para as demais enzimas estudadas, no período de 24 há houve a menor atividade da enzima em URS 21 (Figura 12). Estes dados em conjunto indicam que na cultivar URS 21 não houve estresse oxidativo.

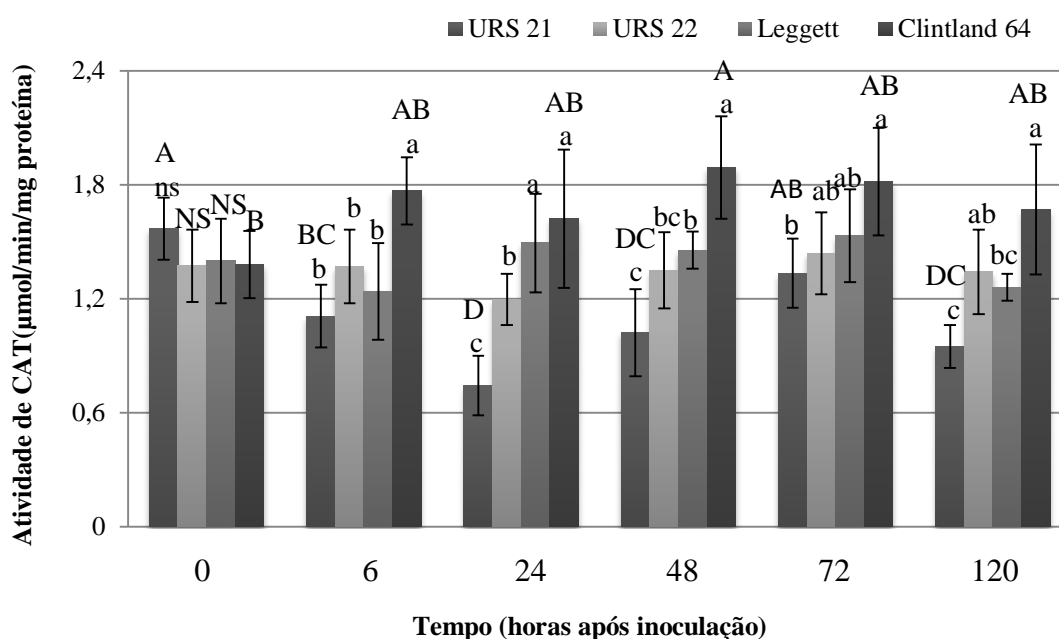


FIGURA 11. Atividade da enzima catalase (CAT) em plântulas de aveia parcialmente resistente (URS 21), suscetível (URS 22), resistente (Leggett) e suscetível (Clintland 64) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A atividade enzimática da GR atingiu seu máximo em 48 h na cultivar URS 22, assim como na cultivar com resistência total, Leggett (Figura 12).

O decréscimo da atividade da enzima GR, após a inoculação com o fungo, observado na URS 21 também foi observado para o genótipo suscetível Clintland 64 (Figura 12). Contudo, em Clintland 64, o estresse oxidativo parece estar presente, pois o incremento na atividade tanto de APX como de CAT sugere que estas são induzidas como parte dos mecanismos de detoxificação de espécies reativas de oxigênio (Figuras 10-11), entretanto a enzima GR parece não estar envolvida neste processo (Figura 12).

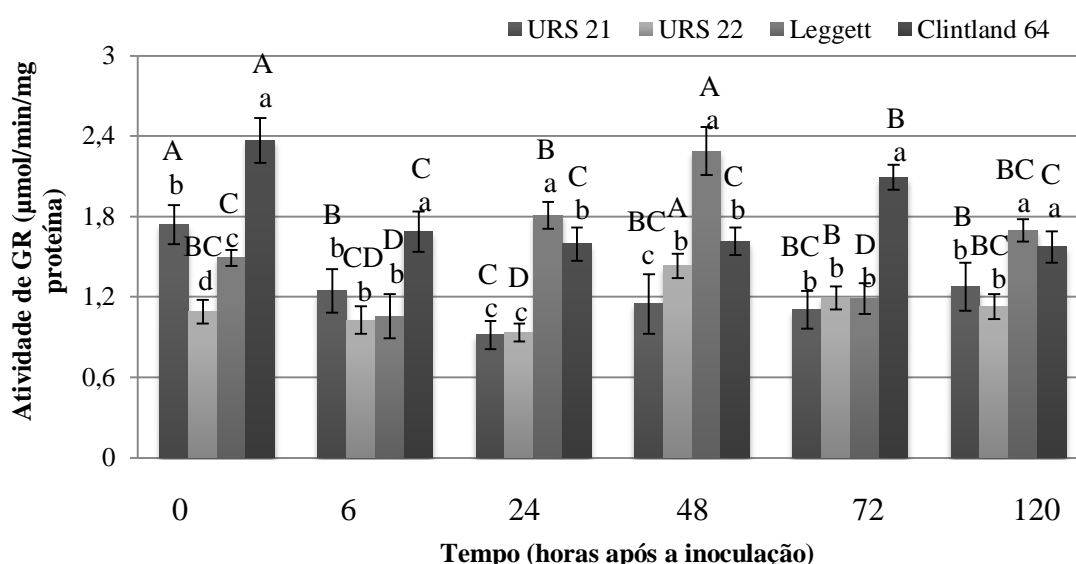


FIGURA 12. Atividade da enzima glutationa redutase (GR) em plântulas de aveia parcialmente resistente (URS 21), suscetível (URS 22), resistente (Leggett) e suscetível (Clintland 64) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.1.3 Pigmentos

Através da dosagem do conteúdo de clorofila total em plântulas de aveia dos diferentes genótipos estudados, foi possível observar que mesmo após a inoculação, o padrão observado para estes pigmentos se manteve. Além disso, em todos os tempos

analisados, o genótipo URS 21 esteve entre os genótipos com a maior quantidade de clorofilas (Figura 13).

Em 240 hai, o genótipo resistente Leggett, teve um grande incremento na quantidade de clorofila total, provavelmente devido à ausência do desenvolvimento fúngico e o estágio de desenvolvimento da planta (Figura 13).

A partir da análise de clorofila total, também foi possível observar que o genótipo Clintland 64, após a inoculação teve o conteúdo de clorofila aumentado. Contudo não houve diferença significativa entre 0 e 240 hai (Figura 13).

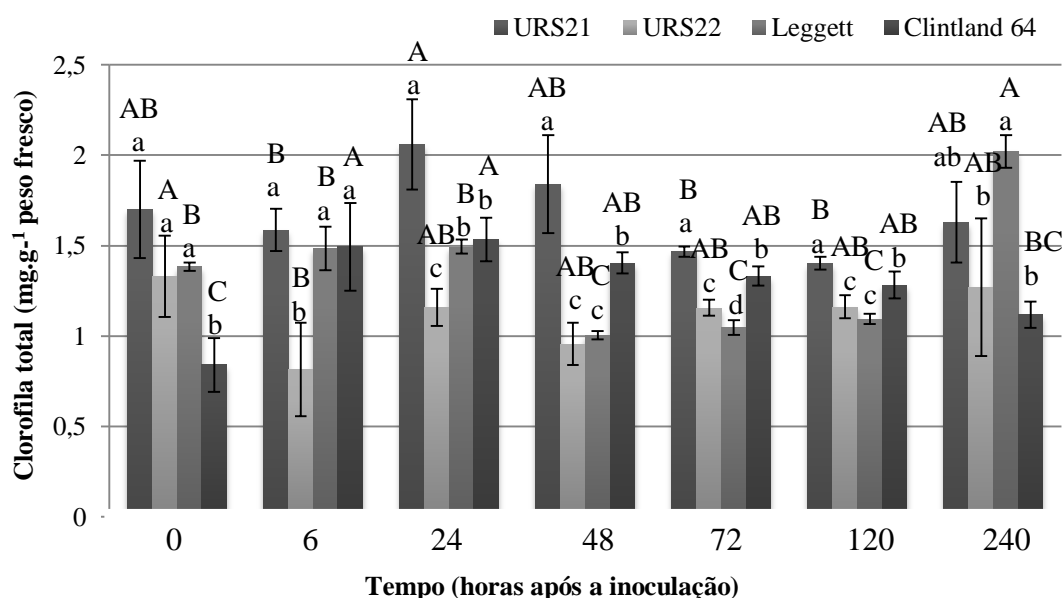


FIGURA 13. Conteúdo de clorofila total em plântulas de aveia parcialmente resistente (URS 21), suscetível (URS 22), resistente (Leggett) e suscetível (Clintland 64) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72, 120 e 240 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Ao analisar o conteúdo de carotenóides nos diferentes genótipos, foi verificado o mesmo padrão encontrado para clorofila total. Além disso, em todos os tempos analisados, o genótipo URS 21 esteve entre os genótipos com o maior nível de carotenóides (Figura 14).

Em 240 hai, a cultivar Leggett apresentou um grande aumento na quantidade de carotenóides. Também foi observado que o genótipo Clintland 64, após a inoculação teve o conteúdo de carotenóides incrementado (Figura 14).

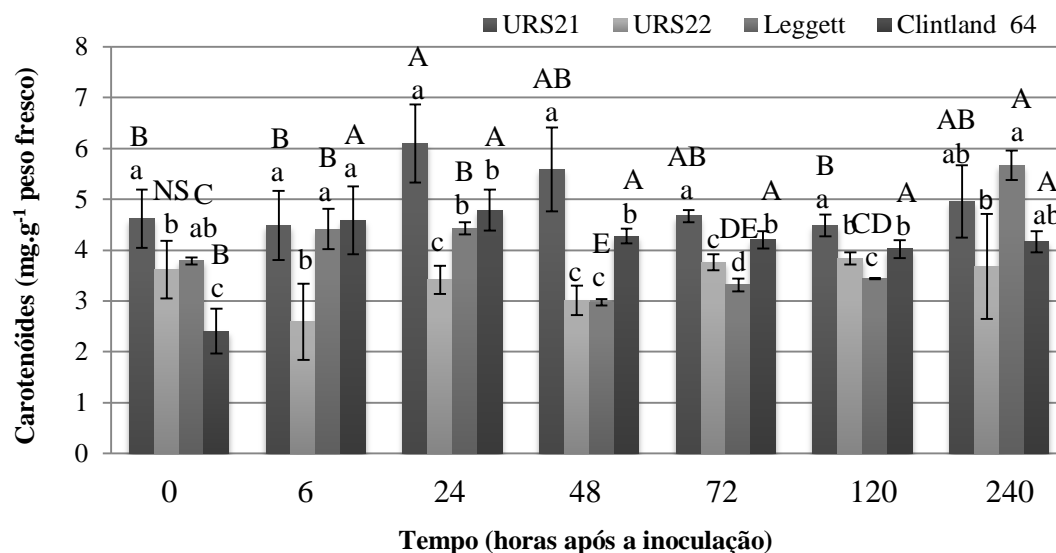


FIGURA 14. Conteúdo de carotenóides em plântulas de aveia parcialmente resistente (URS 21), suscetível (URS 22), resistente (Leggett) e suscetível (Clintland 64) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72, 120 e 240 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.2 Mecanismos histopatológicos

Através das análises histopatológicas de plântulas de aveia foi possível averiguar a produção de H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ e a produção de fluorescência gerada pela presença de compostos fenólicos devido à morte celular. As análises foram realizadas em plântulas dos genótipos URS 21 (resistência parcial), URS 22 (suscetível), Leggett (resistência total) e Clintland 64 (suscetível), nos tempos 0, 6, 24, 48, 72 e 120 hai com *P. coronata* f. sp. *avenae*.

A partir da análise da coloração marrom, gerada pelo tratamento com a solução DAB na presença de peroxidases endógenas, para a histolocalização de H_2O_2 , foi possível evidenciar sua produção em todos os genótipos estudados. A produção de H_2O_2

ocorreu em todos os tempos avaliados, mesmo antes das plantas serem inoculadas com o fungo (0 hai). Esta produção ocorreu principalmente nos feixes vasculares das folhas (Figura 15).

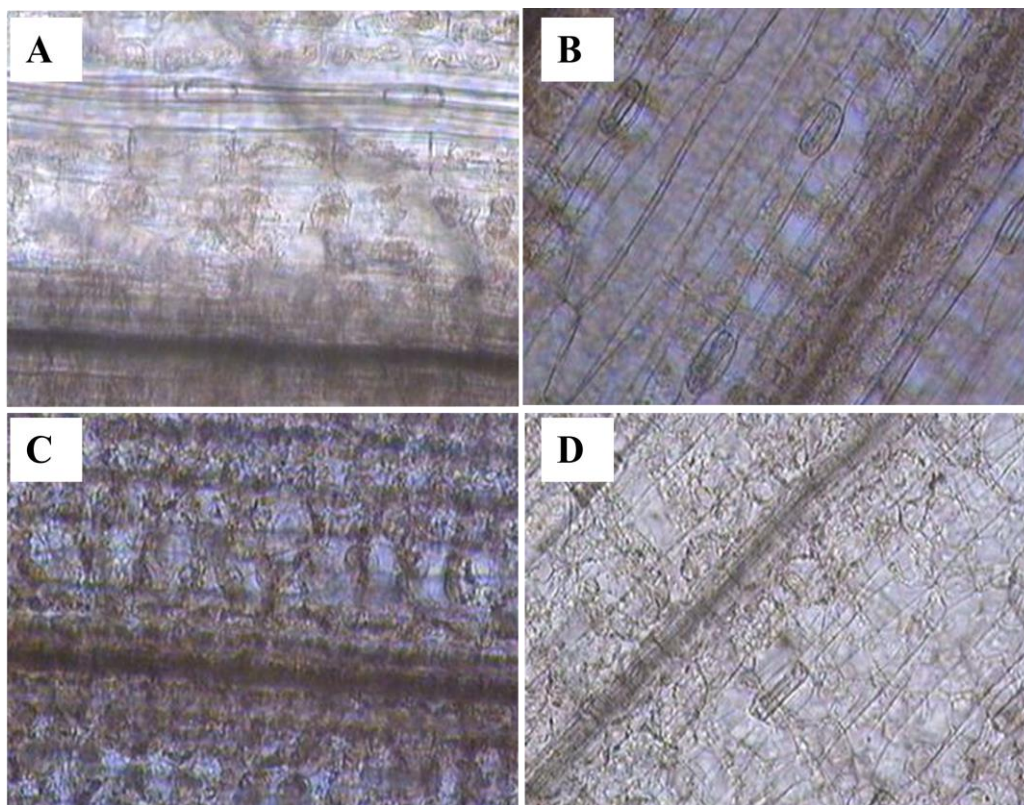


FIGURA 15. Histolocalização de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos feixes vasculares de diferentes genótipos de aveia devido à coloração DAB. A. URS 21 (parcialmente resistente). B. URS 22 (suscetível). C. Leggett (resistente total). D. Clintland 64 (suscetível). A= 100x.

A coloração DAB também permitiu verificar que em todas as cultivares ocorreu a produção de H_2O_2 nas células do mesófilo a partir de 24 hai, entretanto, com coloração mais intensa nos genótipos suscetíveis (URS 22 e Clintland 64) (Figura 16). Isto sugere que a coloração mais intensa nos genótipos suscetíveis seja uma consequência da colonização do fungo.

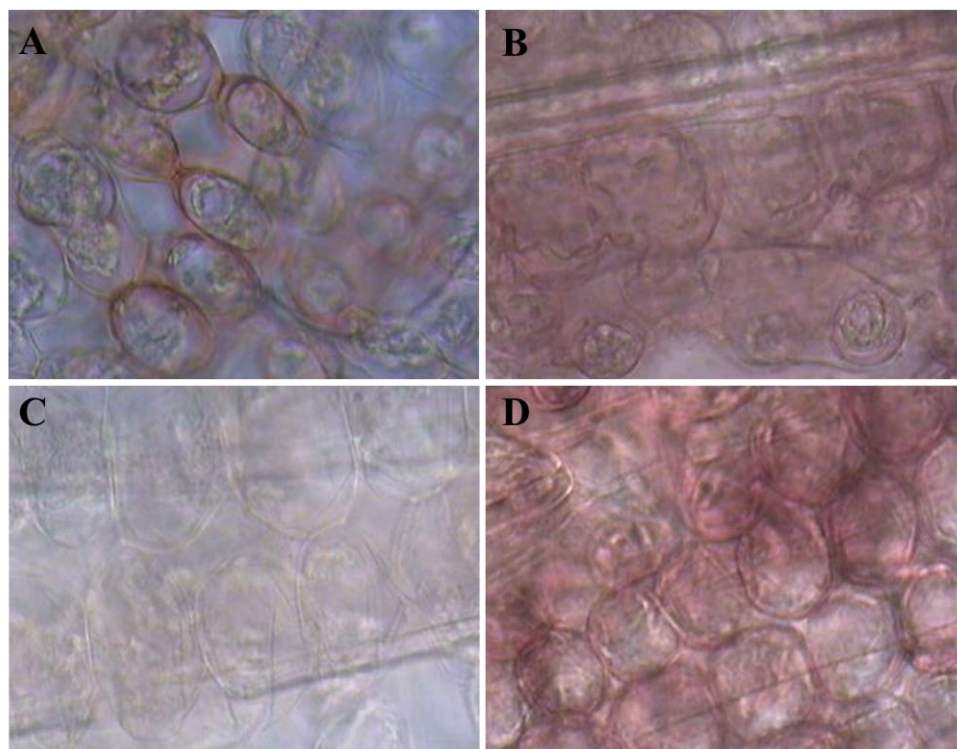


FIGURA 16. Histolocalização de peróxido de hidrogênio no mesófilo de plântulas de aveia inoculadas com ferrugem da folha. A. Genótipo URS 21 (parcialmente resistente). B. URS 22 (suscetível). C. Leggett (resistente total). D. Clintland 64 (suscetível). Análise realizada 24 horas após a inoculação. A= 400x.

Em plântulas do genótipo URS 21 (resistência parcial), além da produção de H_2O_2 nas células do mesófilo, a partir de 24 hai foi possível observar a coloração marrom, indicativo da presença da molécula nas células da epiderme foliar, porém, com coloração mais intensa em 24 hai (Figura 17). Na figura 17 são apresentados apenas os dados de 0, 24 e 120 hai.

A produção de H_2O_2 nas células da epiderme de plântulas do genótipo URS 21 inoculadas com *P. coronata* f. sp. *avenae* em 24 hai (Figura 17), pode estar relacionada com a elevada produção de compostos fenólicos no mesmo período (Figura 7a). Assim, pode-se sugerir que, em URS 21, em 24 hai, grande parte dos compostos fenólicos seriam sintetizados na epiderme e estes poderiam ser do tipo estrutural, como ligninas, que dificultariam a penetração do fungo. Além disso, isto explicaria não haver aumento

da produção de H_2O_2 após a inoculação, estes seriam consumidos na peroxidação de compostos fenólicos, como na lignificação (Figura 9).

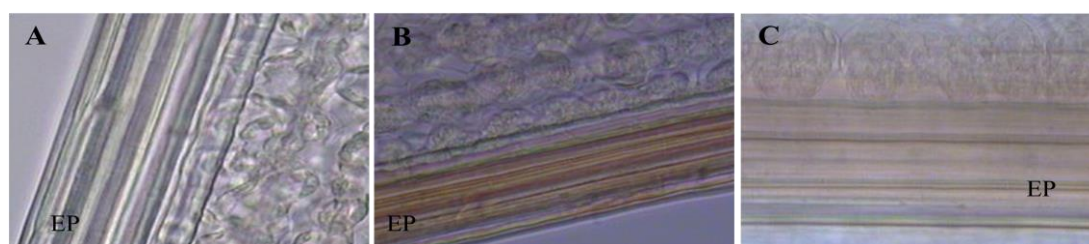


FIGURA 17. Histolocalização de peróxido de hidrogênio na epiderme de plântulas de aveia da cultivar URS 21 (parcialmente resistente), inoculadas com ferrugem da folha. A. 0 hai (horas após a inoculação). B. 24 hai. C. 120 hai A= 400x.

Em plântulas de aveia a partir da formação de precipitado azul na presença de $O_2^{\bullet-}$, devido à coloração com NTB, foi possível verificar em todos os genótipos estudados, independente do tempo, a presença de $O_2^{\bullet-}$ nos feixes vasculares, mesmo antes da inoculação (0 hai) (Figura 18). Além disso, no genótipo suscetível Clintland 64, a partir de 6 hai foi possível evidenciar a coloração azul nos apressórios. Indicando que a produção de $O_2^{\bullet-}$ pelo fungo durante a formação do apressório é um componente importante da suscetibilidade no genótipo Clintland 64 (Figura 19).

Quando a autofluorescência foi observada através de microscópio de epifluorescência, foi verificada fluorescência nos feixes vasculares, estômatos e tricomas de todos os genótipos estudados, possivelmente devido o filtro usado permitir a visualização de lignina. Entretanto, a presença de células autofluorescentes oriundas da presença de compostos fenólicos devido à morte celular, só foi evidenciada nos genótipos resistentes (URS 21 e Leggett), a partir de 48 hai (Figura 20).

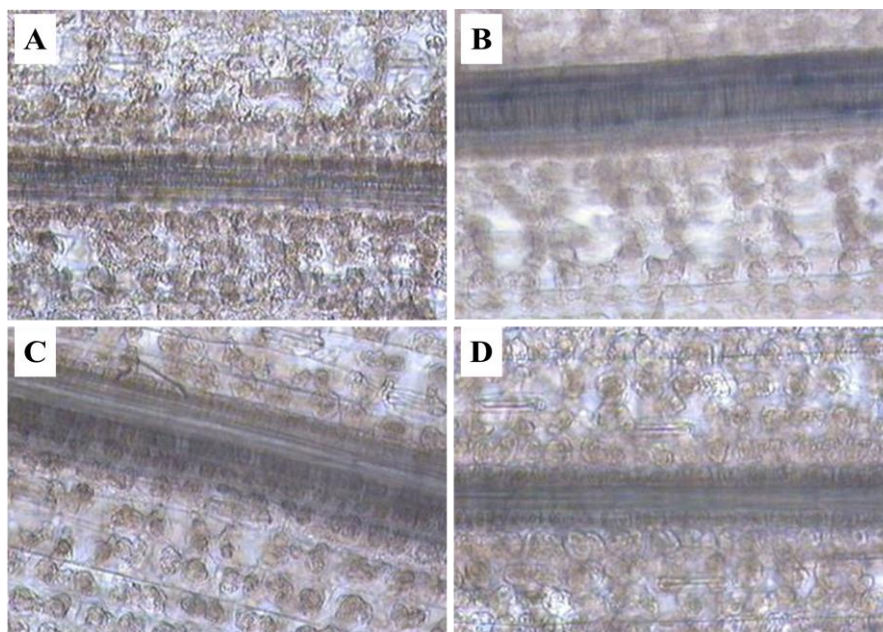


FIGURA 18. Histolocalização de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) nos feixes vasculares de plântulas de diferentes genótipos de aveia evidenciada pela coloração azul. A. URS 21 (parcialmente resistente). B. URS 22 (suscetível). C. Leggett (resistente total). D. Clintland 64 (suscetível). A= 100x.

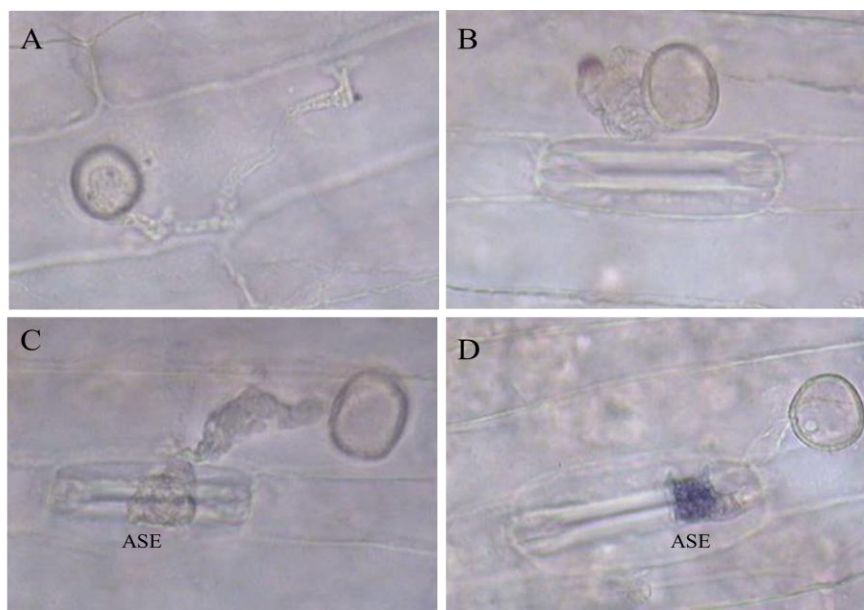


FIGURA 19. Histolocalização de superóxido em plântulas de diferentes genótipos de aveia, em resposta à *Puccinia coronata* f.sp. *avenae*. A. URS 21 (parcialmente resistente). B. URS 22 (suscetível). C. Leggett (resistente total). D. Clintland 64 (suscetível). Análise realizada 6 horas após a inoculação. ASE= apressório sobre estômato. A= 400x.

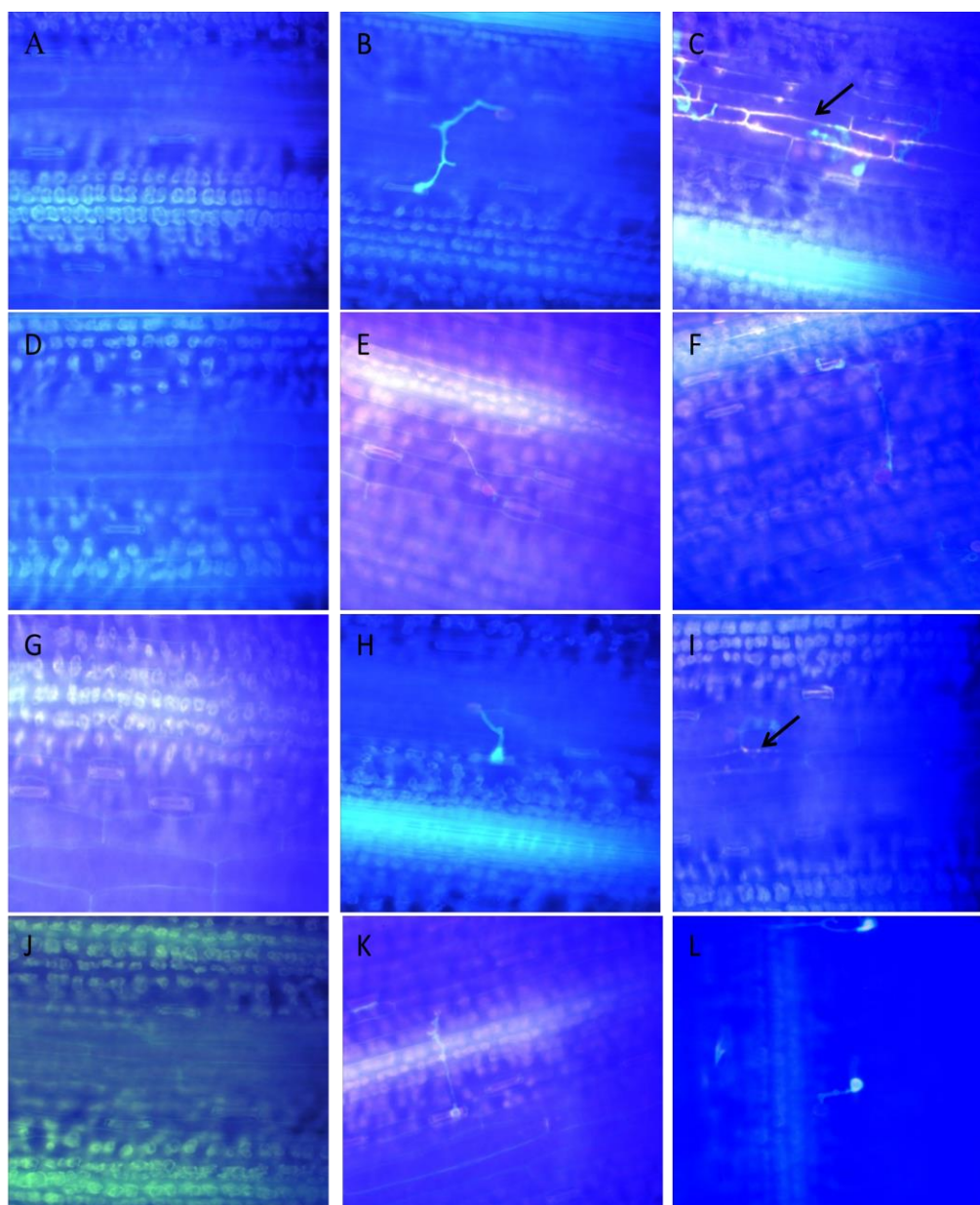


FIGURA 20. Produção de compostos autofluorescentes por diferentes genótipos de aveia, em resposta à *Puccinia coronata* f.sp. *avenae*. A-C. Genótipo URS 21 (resistência parcial), 0, 24 e 48 hai, respectivamente. D-F. Genótipo URS 22 (suscetível), 0, 24 e 48 hai, respectivamente. G-I. Genótipo Leggett (resistente), 0, 24 e 48 hai, respectivamente. J-L. Clintland 64 (suscetível), 0, 24 e 48 hai, respectivamente. Setas indicam a autofluorescência. A= 200x.

4.3 Mecanismos moleculares

4.3.1 Padronização do número de ciclos para a síntese de cDNA dupla fita

Após a extração do RNA se faz necessária a síntese de cDNA para ser utilizado nas reações de PCR Tempo Real. Assim, a escolha do melhor número de ciclos de PCR

para a síntese de cDNA dupla fita foi realizada para garantir que os cDNA remanescessem em fase exponencial de amplificação, podendo assim, serem utilizados de forma fidedigna na análise de expressão gênica. Para tanto, como teste foram utilizadas três amostras, além da amostra controle de reação do Kit (*Control Mouse Liver Total RNA*).

O melhor número de ciclos de amplificação de cDNA foi igual 24 (Figura 21), desta forma, como sempre se deve utilizar menos um ciclo, o número ótimo de ciclos foi 23. De posse desta padronização a síntese de cDNA dupla fita foi efetuada com todas as amostras estudadas.

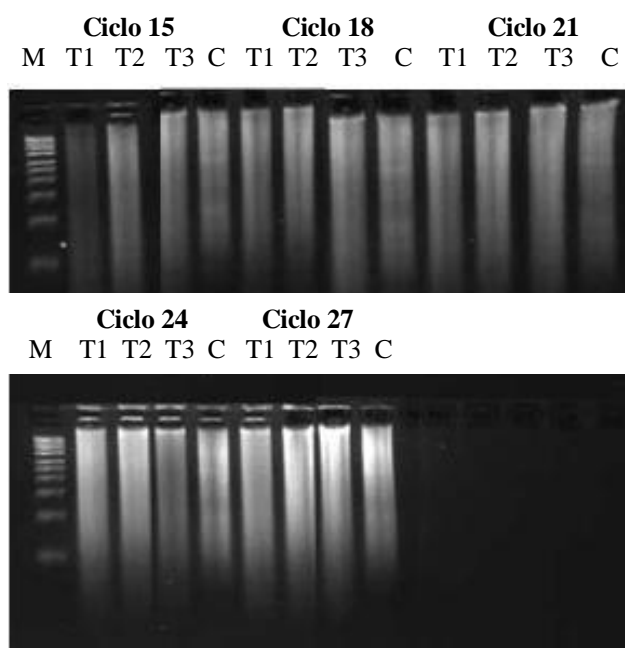


FIGURA 21. Otimização dos ciclos de PCR, ciclo ótimo observado foi 24 menos 1 ciclo: M. marcador de peso molecular 1 kb *plus ladder*; T1. Amostra teste 1; T2. Amostra teste 2; T3. Amostra teste 3; C. Controle do kit.

4.3.2 Expressão gênica

Com o objetivo de avaliar a expressão relativa de genes que possam estar envolvidos na resistência parcial à ferrugem da folha em aveia, genes foram rastreados no banco de dados do NCBI para trigo, cevada e aveia, e comparadas com sequências de aveia do USDA. Assim, foram projetados *primers* para serem utilizados em PCR

Tempo Real e testados em plantas adultas dos genótipos URS 21 (resistência parcial) e URS 22 (suscetível) ao longo do tempo 0, 6, 24, 48, 72 e 120 hai com *P. coronata* f. sp. *avenae*. Além disso, o produto de amplificação foi verificado em gel de agarose 1,5 %.

Contudo, antes de analisar a expressão dos genes de interesse, houve a necessidade de padronizar os genes de referência e escolher qual seria utilizado como controle endógeno dos experimentos, para a normalização dos níveis de expressão obtidos através do PCR Tempo Real. Assim, foram testados *primers* que amplificam os genes *GAPDH*, *TUBA*, *TUBB*, *ELF1A*, *EIF4A* e *18S rRNA*. Após as análises iniciais, optou-se pela utilização do gene *18S rRNA* como controle endógeno dos experimentos, que apresentou curva de amplificação adequada e curva de dissociação com pico único.

Após a padronização do gene a ser utilizado como controle endógeno, os *primers* para a amplificação dos genes de interesse foram testados. Os *primers* para os genes que codificam PAL (fenilalanina amônia liase), P_{xg} (peroxigenase), CHI (chalcona isomerase) e CHS (chalcona sintase) não apresentaram boa curva de dissociação, bem como amplificação em gel de agarose, assim os dados não serão apresentados.

Através do cálculo da expressão relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001) foi possível analisar a expressão dos genes codificadores das proteínas AS (antranilato sintase), AsCS (cicloartenol sintase), AsHHT1 (hidroxiantranilato hidrocicinamioltransferase 1), CCoAOMT (cafeoil-CoA3-O-metil transferase), Celsyn (celulose sintase), Lox (lipoxigenase), Pox (peroxidase), GP (glutationa peroxidase), APX (ascorbato peroxidase) e CAT (catalase) (Figuras 23-32).

AS, CCoAOMT e AsHHT são enzimas chaves na produção de compostos fenólicos específicos, denominados de avenantramidas. Através da expressão relativa destes genes, em plantas dos genótipos URS 21 e URS 22 de aveia submetidos à

infecção com *P. coronata* f.sp. *avenae*, em diferentes tempos, foi possível observar no genótipo URS 22 que o gene para a enzima AS, que atua na conversão de triptofano em antranilato, teve sua expressão aumentada em 120 horas da inoculação. O mesmo não foi verificado para o genótipo URS 21, no qual a expressão do gene não aumentou (Figura 22).

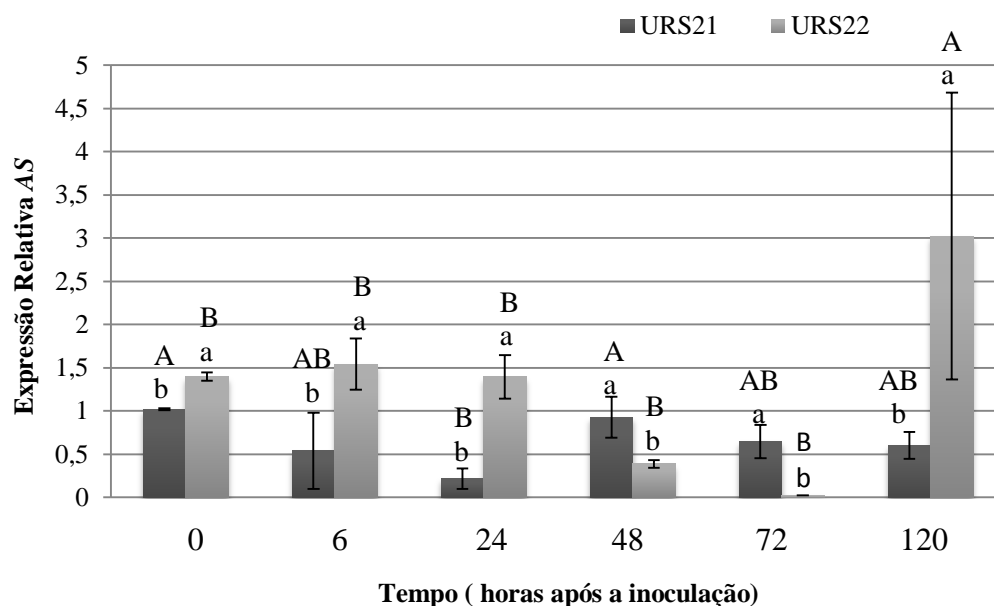


FIGURA 22. Expressão relativa de *antranilato sintase* (AS) em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O gene de *AsHHT1*, que catalisa a N-acilação de hidroxiantranilato com vários hidroxicinamoil-CoA para formar uma série de avenantramidas, teve a sua expressão aumentada significativamente em URS 21 após 24 hai, chegando ao valores máximos nos tempos de 48 a 120 hai. Contudo, para a cultivar suscetível URS 22, a expressão relativa deste gene diminuiu após 6 hai (Figura 23).

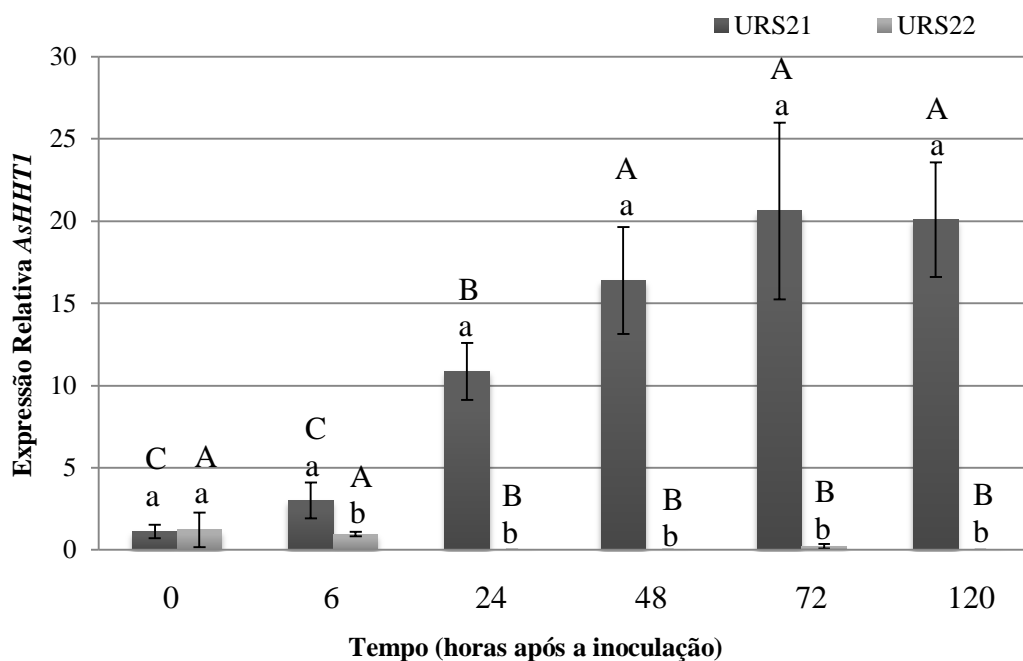


FIGURA 23. Expressão relativa de *hidroxiantranilato hidrocicinamioltransferase 1 (AsHHT1)* em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Quando a expressão relativa de *CCoAOMT*, gene que codifica a enzima responsável por converter cafeoil CoA a feruloil CoA, podendo servir de doador de grupo acil para AsHHT, foi avaliada, um aumento significativo da expressão do gene foi observado 48 e 120 hai para o genótipo URS 21. Porém, na cultivar URS 22, houve uma diminuição da expressão relativa após a inoculação com o fungo. Uma exceção a isto foi o tempo de 120 hai onde a expressão retornou aos valores obtidos antes da inoculação na cultivar URS 22 (Figura 24).

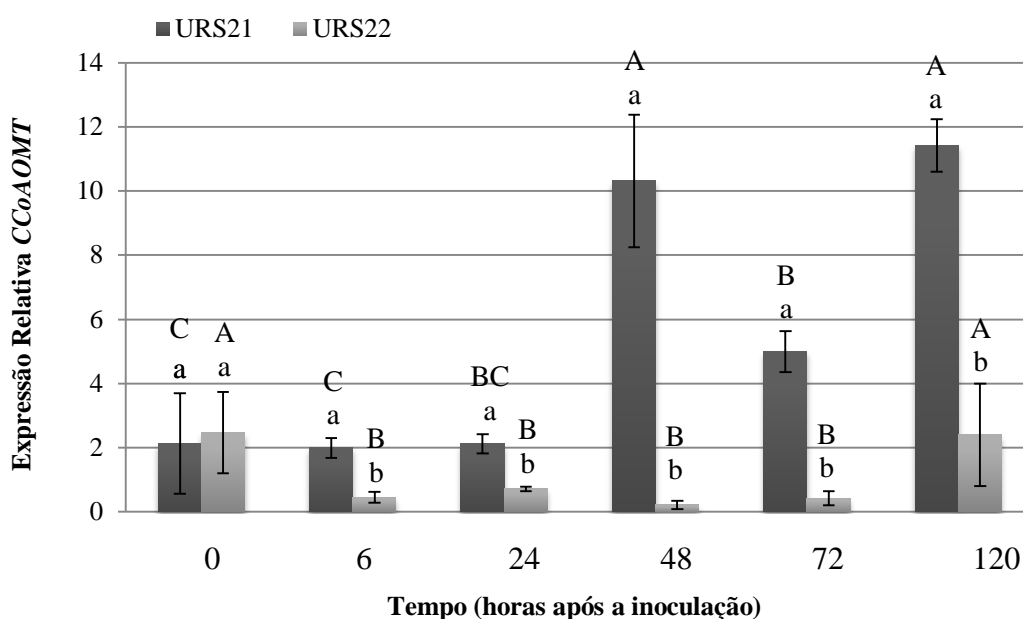


FIGURA 24. Expressão relativa de *cafeoil-CoA3-O-metiltransferase* (CCoAOMT) em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

AsCS é uma enzima chave na produção de avenacosídeos, que são saponinas esteroidais, compostos secundários de grande relevância na interação entre aveia-ferrugem da folha, assim como os compostos fenólicos. Através da análise da expressão relativa do gene *AsCS* foi possível observar um aumento de expressão após a inoculação de URS 21 com o fungo. Em 6 h foi obtida a maior expressão relativa. Após 6 h houve um decréscimo da expressão desse gene ao longo do tempo, porém a expressão manteve-se muito superior a observada antes da inoculação (Figura 25).

A expressão de *AsCS*, em URS 22, também aumentou após a inoculação, entretanto, os valores foram muito inferiores aos encontrados na cultivar com resistência parcial após a inoculação (Figura 25).

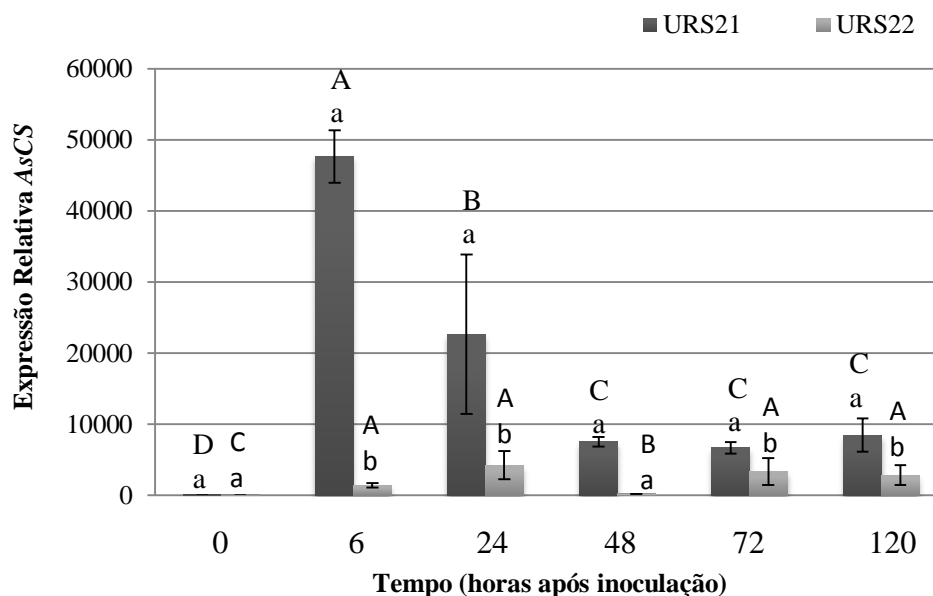


FIGURA 25. Expressão relativa de *cicloartenol sintase* (*AsCS*) em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Assim, através das análises da dosagem dos compostos (Figuras 7 e 8) e expressão relativa através de PCR Tempo Real foi evidenciado neste trabalho que compostos fenólicos e saponinas devem fazer parte dos mecanismos de defesa na resistência à ferrugem da folha em URS 21. Contudo, deve-se considerar a possibilidade de existirem outros fenólicos responsáveis pela resistência, além das avenantramidas, e outras saponinas, além de avenacosídeos, e que não necessariamente atuem no mesmo tempo. Entretanto, será necessária a dosagem destes compostos específicos para se chegar a uma conclusão mais apurada desta relação (Figuras 22 a 25).

Ao testar a expressão relativa do gene *Celsyn*, que codifica enzima responsável pela síntese de celulose e envolvida diretamente na defesa de plantas contra patógenos, os maiores incrementos de expressão foram encontrados 6 h para o genótipo URS 21. Em 24 h estes valores se mantiveram altos, porém, voltaram a níveis basais após este

período. No genótipo URS 22 a expressão relativa do gene não foi alterada ao longo do tempo (Figura 26).

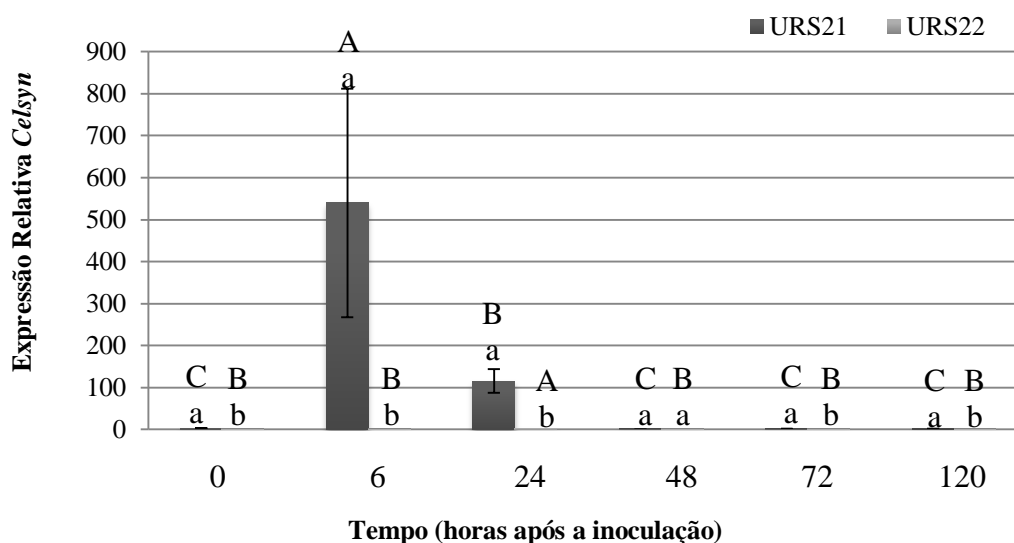


FIGURA 26. Expressão relativa de *celulose sintese* (*Celsyn*) em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Outro gene avaliado foi o que codifica a enzima Lox, envolvida na peroxidação de lipídios. A partir da análise de expressão relativa deste gene, foi observado que para o genótipo URS 22, não houve diferença significativa de expressão, antes e após a inoculação com o fungo. Porém, em URS 21 o gene teve maior expressão relativa em 6 e 48 hai (Figura 27).

A enzima peroxidase (*Pox*) é responsável pela oxidação de moléculas, principalmente de natureza fenólica. Os resultados obtidos a partir da expressão relativa do gene *Pox*, indicam que houve um incremento na expressão deste em URS 21, logo após a inoculação (6 hai), esta expressão se mantém elevada em 24 hai, contudo muito inferior ao observado em 6 hai (6 vezes menor). Após 24 hai a expressão voltou ao nível basal (Figura 28).

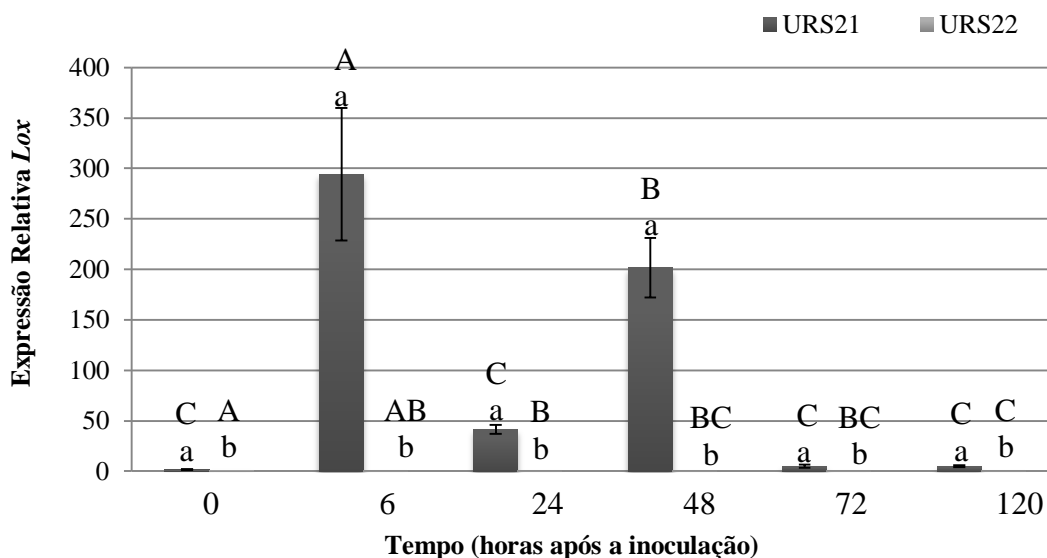


FIGURA 27. Expressão relativa de *lipoxigenase* (*Lox*) em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

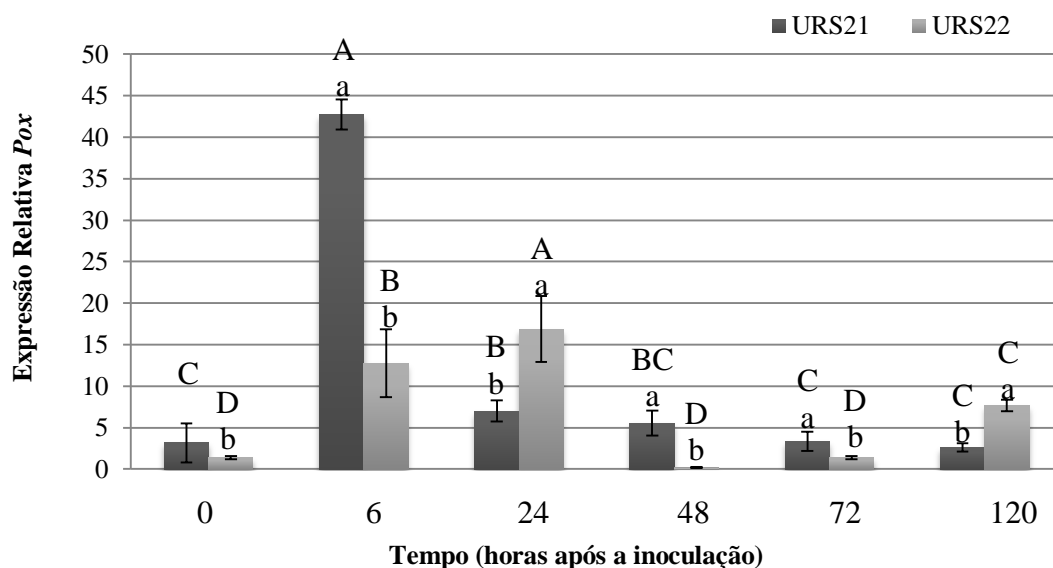


FIGURA 28. Expressão relativa de *peroxidase* (*Pox*) em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os maiores valores da expressão relativa de *Pox* também foram encontrados em 6 e 24 hai para a cultivar suscetível (URS 22). Entretanto, ao contrário de URS 21, às 24 hai a expressão foi ligeiramente mais acentuada do que em 6 hai (Figura 28).

APX, *CAT* e *GP*, são alguns genes que codificam enzimas envolvidas na detoxificação de ROS e responsáveis pelo mecanismo enzimático de destoxificação.

Os resultados da expressão relativa do gene *APX* mostram que a expressão deste gene em URS 21 se manteve baixa em todos os tempos analisados. Em 24 hai houve o maior aumento da expressão relativa para a cultivar URS 21, aproximadamente de 1,45 vezes. Porém, para a cultivar URS 22 a expressão relativa de *APX* foi bastante elevada nos tempos 48 e 72 hai (cerca de 60 % maior que em URS 21). Contudo, houve aumento ainda mais significativo da expressão relativa em 6 hai (Figura 29). Estes resultados estão de acordo com os da atividade da enzima no mesmo período (Figura 10), onde URS 22 apresentou maior atividade de APX que URS 21.

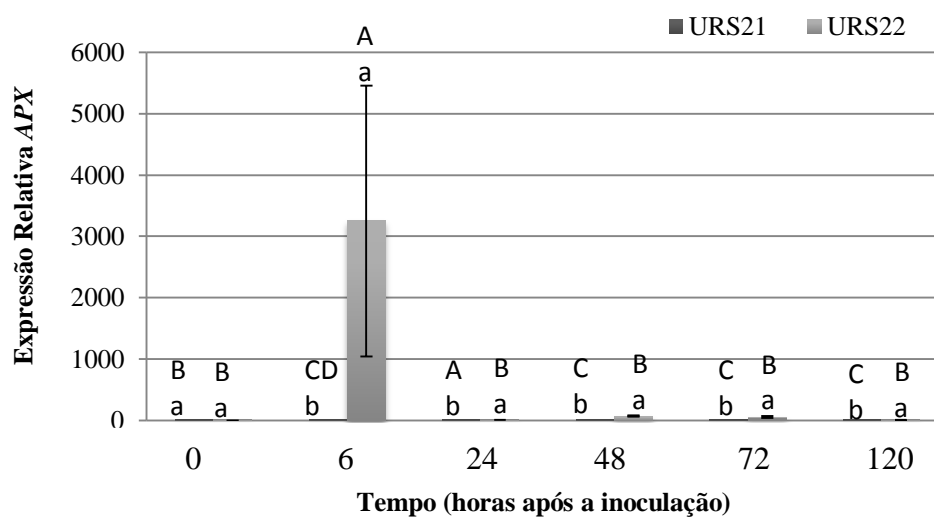


FIGURA 29. Expressão relativa de *ascorbato peroxidase* (*APX*) em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Assim como o gene que codifica a enzima APX, o gene que codifica CAT não apresentou aumento nos níveis de expressão relativa no genótipo com resistência parcial. Contudo, para o genótipo URS 22 a maior expressão foi observada 24 hai (Figura 30). Corroborando os baixos níveis de atividade enzimática da CAT em URS 21 (Figura 11).

Quando foi analisada a expressão de *GP*, foi possível observar maior indução de expressão em URS 21 em 6 hai; entretanto, a expressão foi menos induzida do que no genótipo suscetível (URS 22), no mesmo período (Figura 31).

O gene de *GP* teve seu maior valor de expressão relativa 24 hai em URS 22. Valores elevados também foram verificados 6 e 72 hai, seguido de 120 hai (Figura 31).

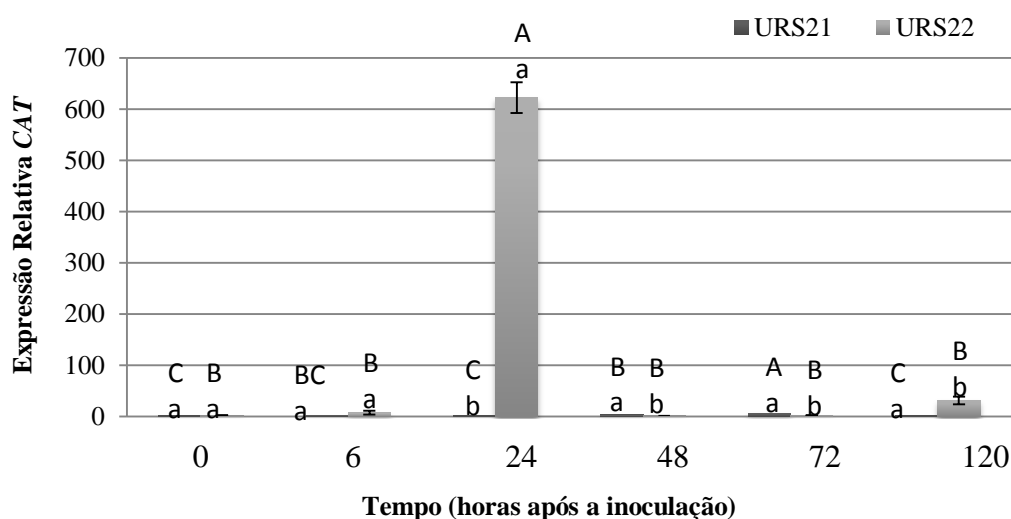


FIGURA 30. Expressão relativa de *catalase* (CAT) em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

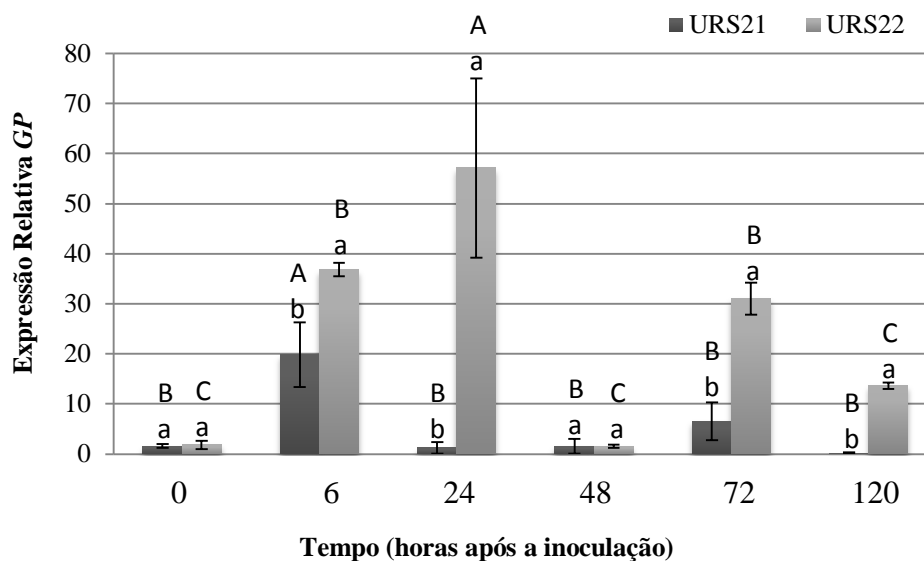


FIGURA 31. Expressão relativa de *glutathione peroxidase* (GP) em plantas adultas de aveia parcialmente resistente (URS 21) e suscetível (URS 22) à ferrugem da folha ao longo do tempo, 0, 24, 48 e 72 e 120 horas após a inoculação. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam cada cultivar ao longo do tempo, letras minúsculas comparam cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.3.3 RNA-sequenciamento

Através da análise de RNA-seq utilizando três repetições biológicas de plântulas de URS 21 inoculadas com ou sem o fungo no tempo 12 hai, foi possível obter 311 milhões sequências de aveia (Apêndice 1). Após a edição restaram 133.010 *contigs*, devido os parâmetros de qualidade, ambiguidade e comprimento das sequências. Dos quais 33.418 apresentaram diferença significativa entre plantas inoculadas e não inoculadas com o fungo, pelo teste de Baggerley ao nível 5 %, valor-e (*e-value*) e valor-p (*p-value*). Estes *contigs* foram então comparados (*blasted*) com sequências de arroz, dos quais, 15.678 *contigs* apresentaram anotação conhecida em arroz e 17.740 não apresentaram homologia a sequências de função conhecida em arroz. Dentro dos *contigs* ortólogos em arroz, 10.410 tiveram expressão aumentada em plântulas do genótipo URS 21, quando inoculadas com o fungo em comparação com plântulas não inoculadas

(Figura 32). O tamanho médio de *contigs* foi de 755 bp. O comprimento total do conjunto foi 100.465.451 pb (Apêndice 2).

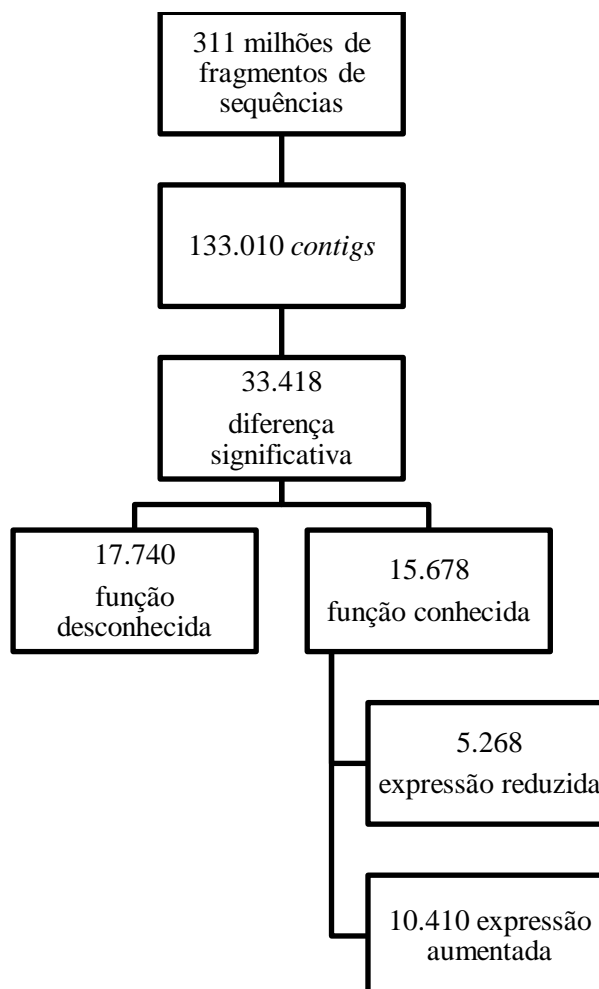


FIGURA 32. Fluxograma indicando os dados obtidos através da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial) de aveia inoculado com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*.

Através desta análise não é possível afirmar que cada *contig* encontrado seja um gene, isto porque muitos *contigs* podem ser derivados do mesmo gene. Através do RNA-seq são gerados muitos fragmentos pequenos e que, muitas vezes, não são possíveis de serem unidos através da edição de *contigs*. Assim, *contigs* com o mesmo aumento do nível de expressão e com mesma função podem ser o mesmo gene, mas não

é possível fazer esta afirmativa. Além disso, aveia é uma espécie hexaplóide, podendo ter várias cópias do mesmo gene, até mesmo em diferentes cromossomos.

Dentro das sequências obtidas em aveia que apresentaram similaridade com sequências depositadas no banco de dados de arroz, existem sequências correspondentes a genes com as mais diversas funções, participando tanto do metabolismo primário, como secundário de URS 21, além de sequências envolvidas no reconhecimento do fungo, sinalização para genes da cascata de defesa da planta, entre outras funções. Também foram encontradas sequências do fungo, com função de patogenicidade, virulência, entre outras.

Através dos dados obtidos foram selecionados alguns grupos de genes que parecem ter significativa importância na reação de resistência do genótipo URS 21 de aveia à ferrugem da folha. Estes foram selecionados de acordo com a função e/ou nível de expressão. Nos gráficos a seguir, barras com nível de expressão superior à zero significa que a sequência teve um aumento de expressão, enquanto nível de expressão inferior à zero indica uma diminuição da expressão do gene.

NBS-LRRs são o tipo mais comum de proteínas R, responsáveis pelo reconhecimento de patógenos. Estas proteínas contêm uma série de sequências ricas em leucina (LRRs), um sítio de ligação a nucleotídeo (NBS), e um domínio de sinalização N-terminal (Bent & Mackey, 2007). A partir da análise do transcriptoma foram obtidas nove sequências com nível de expressão aumentada e três reprimidas para as proteínas NBS-LRR (Figura 33).

Através do RNA-seq foram obtidas sequências com homologia a proteínas quinase dependentes de cálcio (*calcium dependent membrane targeting domain containing protein*), responsáveis pela fosforização e ativação de cascatas metabólicas de defesa. Das 23 sequências encontradas, 20 foram induzidas com nível de expressão

acima de 2 até 28. Somente quatro sequências tiveram a expressão reprimida (Figura 34).

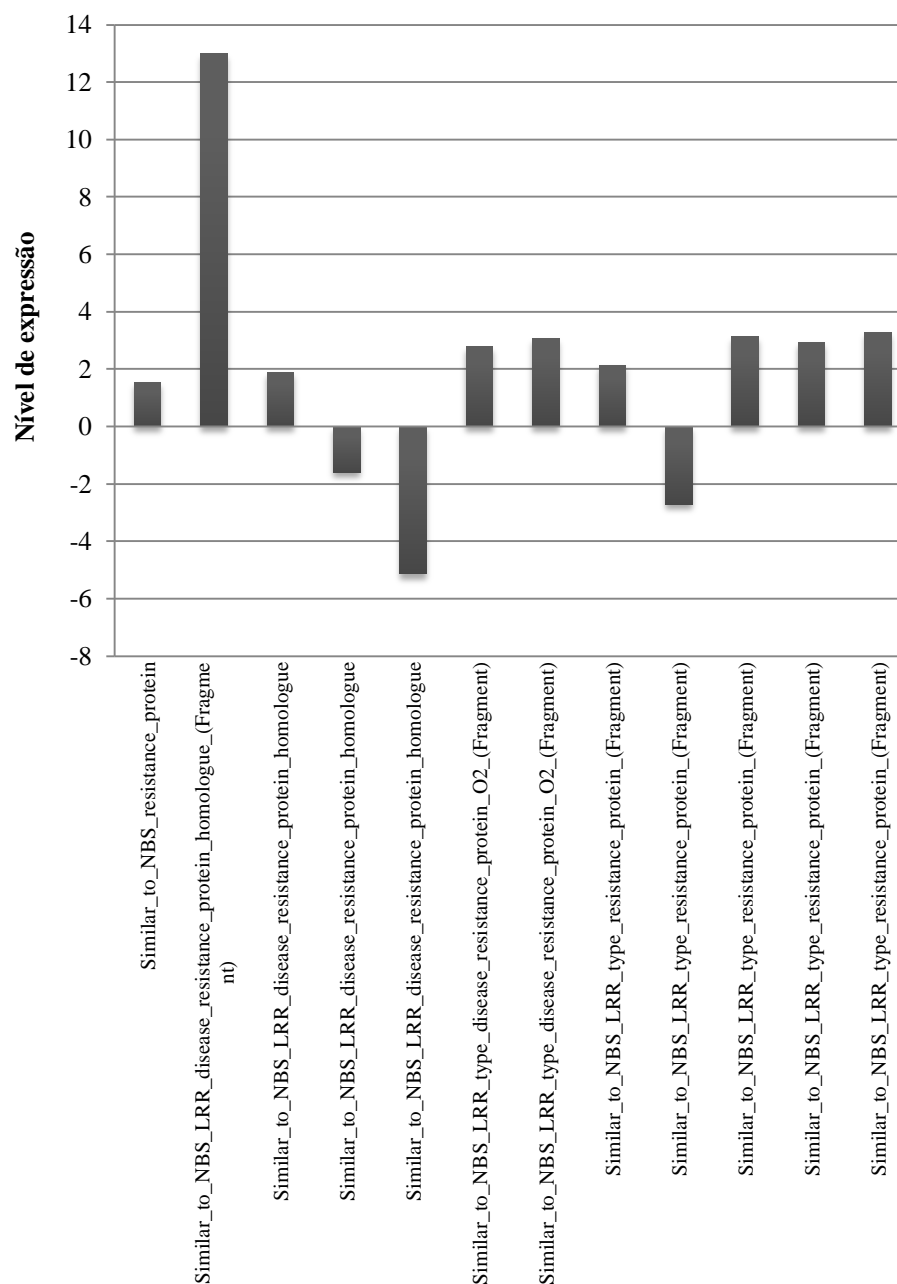


FIGURA 33. Nível de expressão obtido para sequências NBS-LLR que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

Transportadores ABC fazem parte de uma ampla família de transportadores que ocorrem em eucariotos e procariotos. Estes estão envolvidos no transporte através da

membrana de uma ampla gama de compostos, como conjugados de glutathiona, lipídeos, metabólitos secundário e toxinas (Sánchez-Fernández *et al.*, 2001, Martinoia *et al.*, 2002).

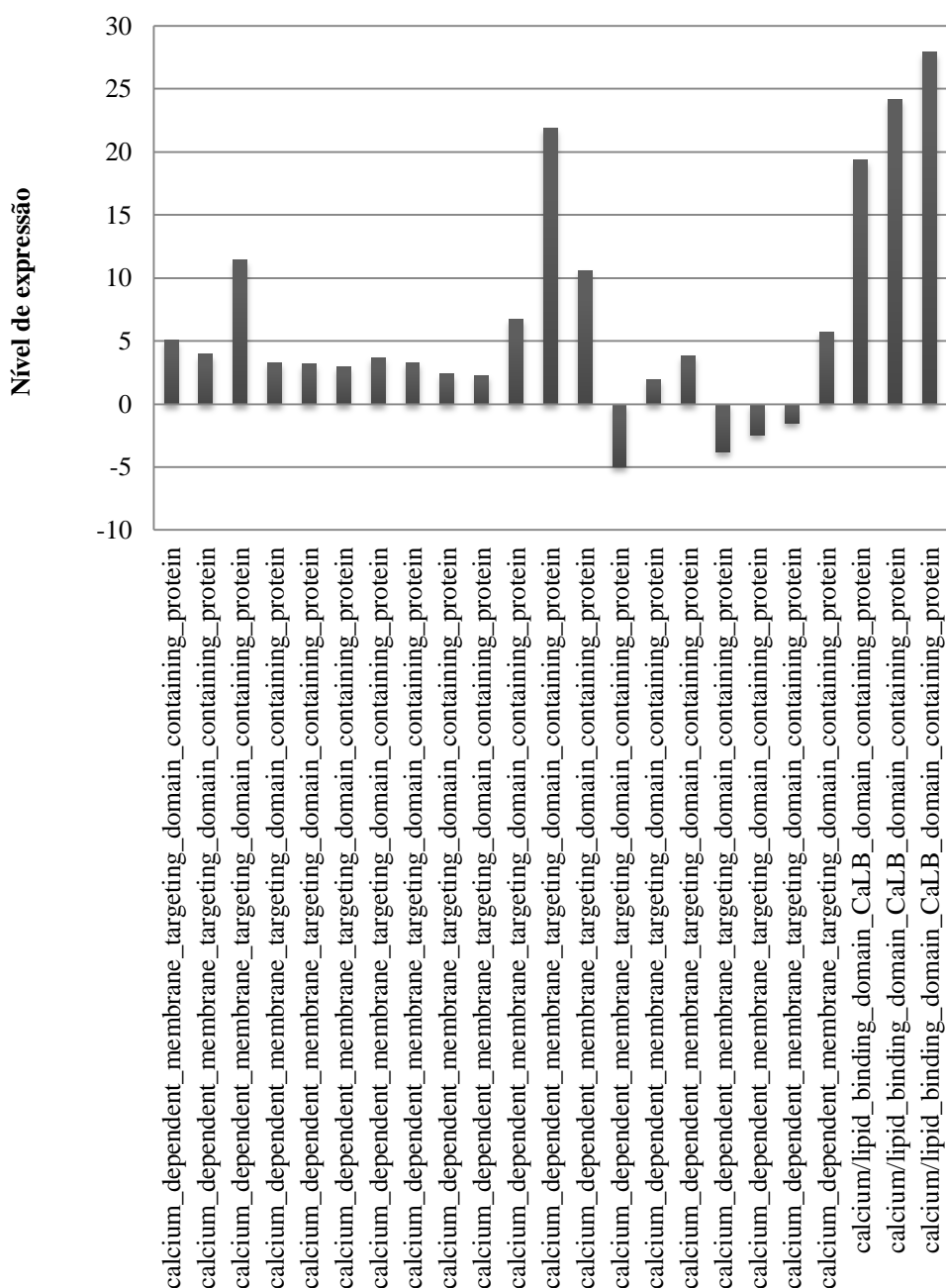


FIGURA 34. Nível de expressão obtido para sequências com homologia a proteínas quinase dependentes de cálcio (*calcium dependent membrane targeting domain containing protein*) que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi superexpressa em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

A partir da análise do transcriptoma de URS 21 foram obtidas 117 sequências para transportadores ABC, sendo que 65 foram induzidas. Para as sequências com nível de expressão aumentada o maior nível foi de 200. Um menor número de sequências foram reprimidas, porém, com maior intensidade. Na figura 35 são apresentadas somente as 36 sequências mais induzidas ou reprimidas, $5 > \text{nível de expressão} < -5$, respectivamente.

WRKY são proteínas identificadas como fatores de transcrição, que reconhecem sequências de DNA TTGAC(C/T), denominadas elementos W-box encontrados em regiões promotoras de um grande número de genes relacionados à defesa (Dong *et al.*, 2003). A partir da análise do transcriptoma, foram obtidas 59 sequências para fatores de transcrição da família WRKY. Apenas cinco destas sequências foram reprimidas, as demais foram induzidas com nível de expressão variando de 1,2 a 56,3 (Figura 36).

Sequências da família gênica MACPF (*Membrane Attack Complex Perforin*) também foram encontradas. Todas as 12 sequências obtidas foram induzidas quando o fungo foi inoculado em URS 21 (Figura 37). Este gene é também encontrado em humanos e está envolvido na liberação das células T, induzindo a apoptose celular, devido à ativação de caspases (Trapani & Smyth, 2002, Lieberman, 2003). Genes que codificam MACPF têm sido encontrados em plantas, insetos e mamíferos, mas não são bem caracterizados em plantas e podem ter possuído um antecessor comum envolvido na rota de sinalização celular. Sugere-se que estas proteínas estejam envolvidas no processo de defesa de plantas e controle negativo da morte celular programada (Morita-Yamamuro *et al.*, 2005).

Transposons são um conjunto de segmentos lineares de DNA, capazes de mudar de posição dentro do genoma, independentemente da homologia entre a região genômica onde se encontram inseridos e o local que se destinam, causando mutações. A

maior parte dos transposons está inativa e pode ser transcricionalmente ativada sob condições de estresse, tanto abiótico como biótico (Ronald, 1998). Através da análise de RNA-seq foram encontradas 13 sequências significativamente expressas, das quais 10 foram induzidas em URS 21 inoculada com o fungo (Figura 38).

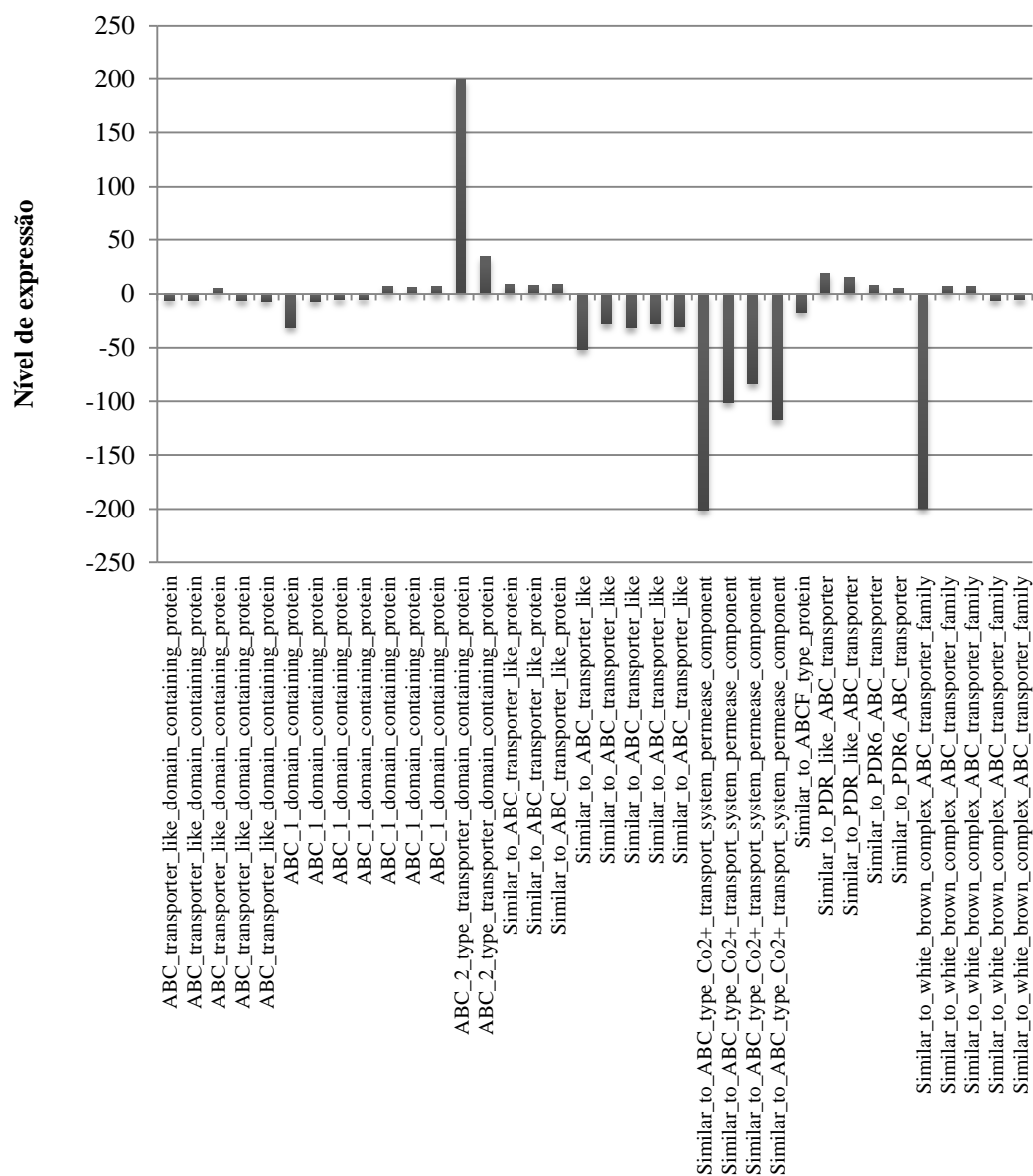


FIGURA 35. Nível de expressão obtido para sequências de transportadores ABC que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

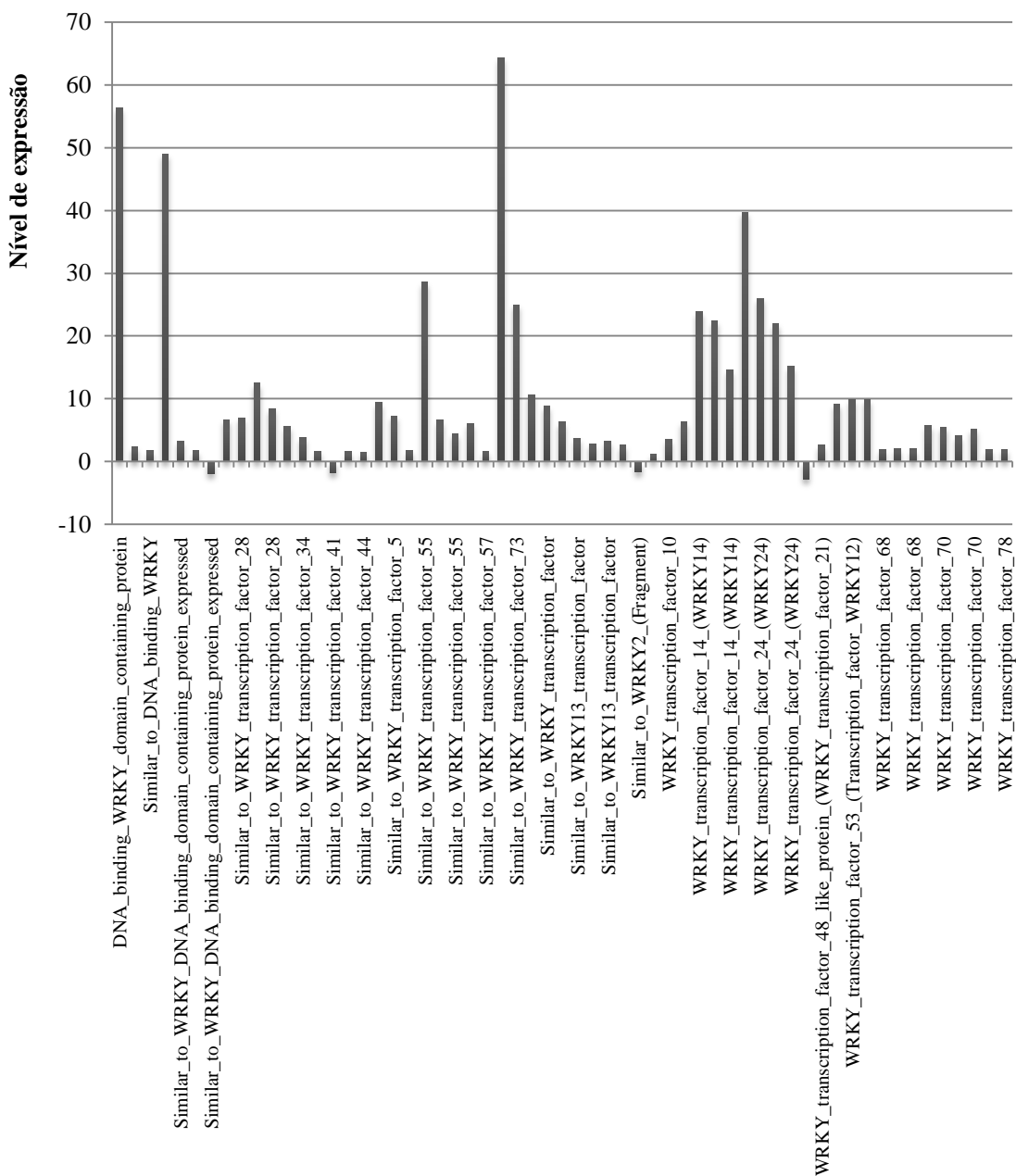


FIGURA 36. Nível de expressão obtido para seqüências de fatores de transcrição do tipo WRKY que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a seqüência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

Além disso, através da análise do transcriptoma, foram obtidas seqüências envolvidas no processamento de microRNAs. MicroRNAs regulam a expressão de genes por mediar a degradação de mRNA, inibir a tradução ou promover modificações

na cromatina. Durante a interação planta-patógeno muitos microRNAs são induzidos ou reprimidos em resposta ao ataque pelo patógeno (Ruiz-Ferrer & Voinnet, 2009).

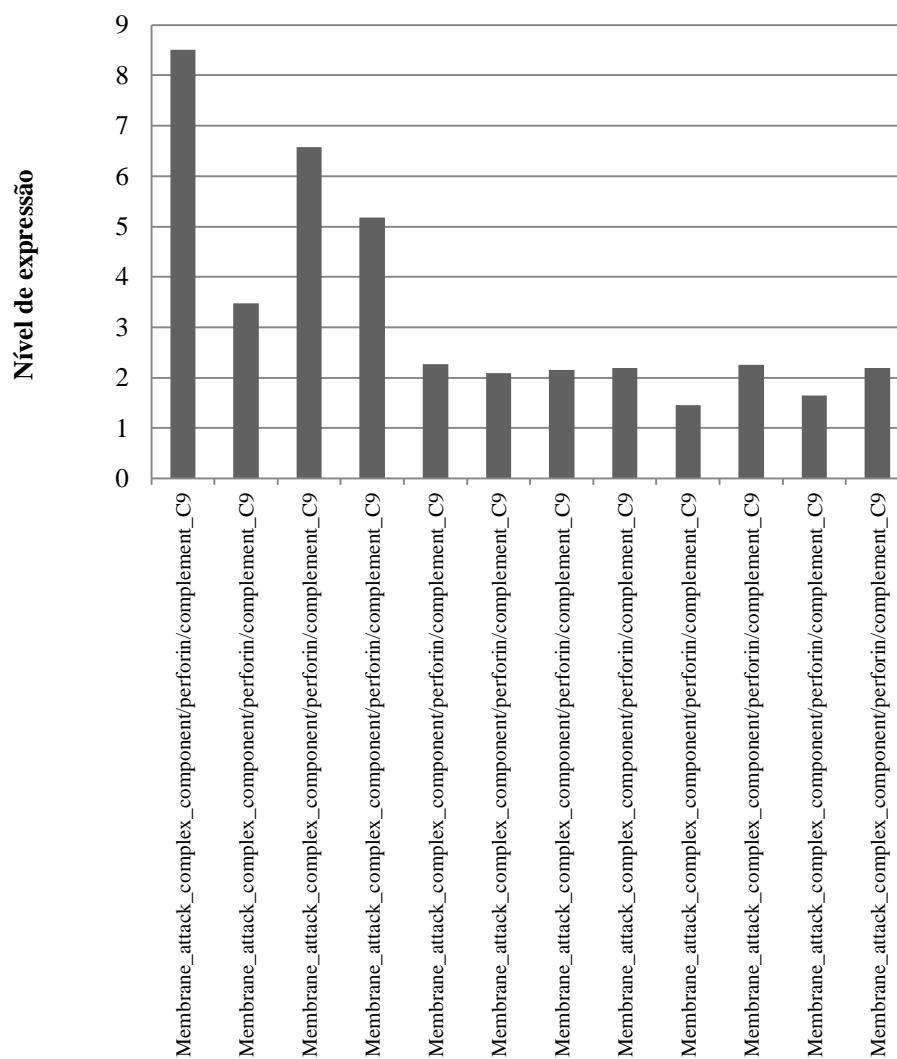


FIGURA 37. Nível de expressão obtido para seqüências do gene MACPF (*Membrane Attack Complex Perforin*) que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a seqüência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

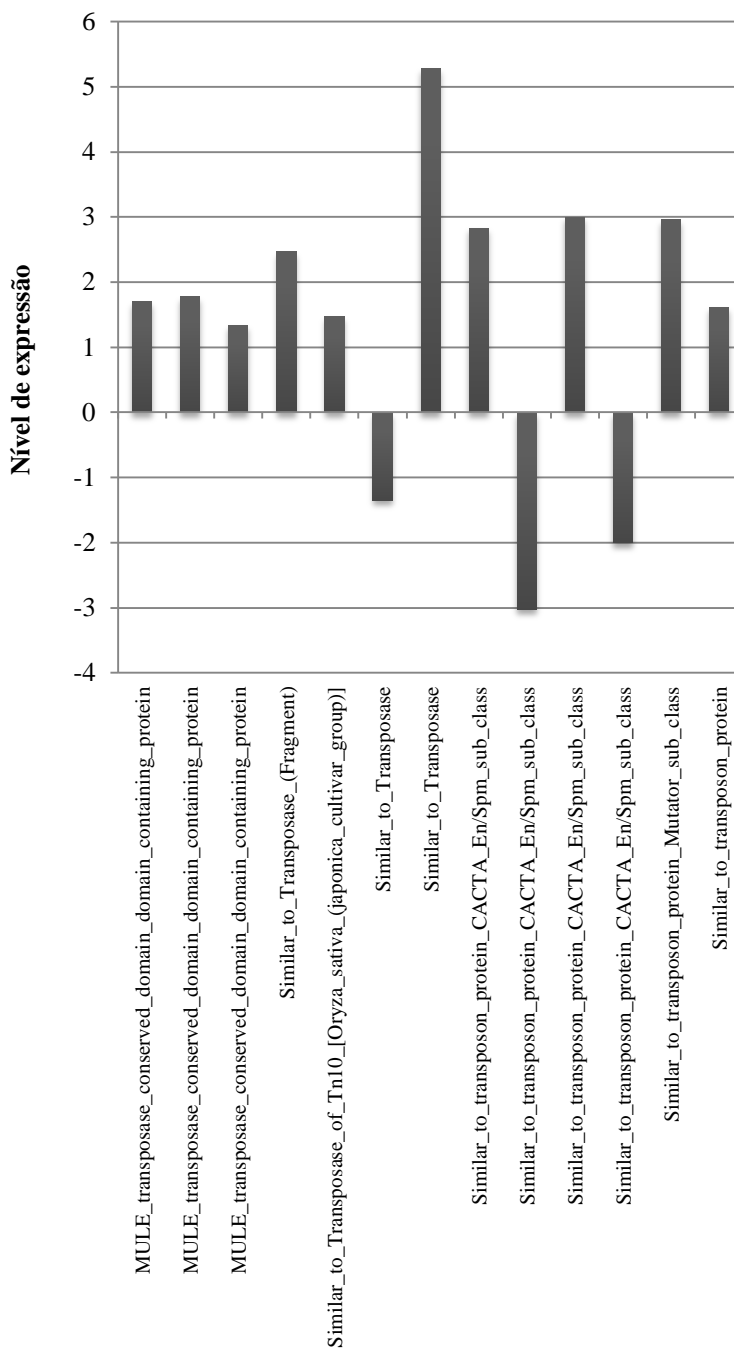


FIGURA 38. Nível de expressão obtido para seqüências de elementos transponíveis que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a seqüência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

Transcritos para duas proteínas importantes destes mecanismos foram encontrados na análise de RNA-seq: argonauta (AGO) e Dicer (DC). Das nove seqüências de genes da família *AGO*, cinco transcritos foram encontrados reprimidos.

Além disso, apresentaram nível de expressão maiores em módulo, cerca de -2 a -8, que as sequências induzidas. Das quatro sequências que foram induzidas, todas apresentaram nível de expressão menores que 2 (Figura 39).

Na análise, também foram obtidas cinco sequências com homologia a *DC*, das quais quatro foram reprimidas (Figura 40).

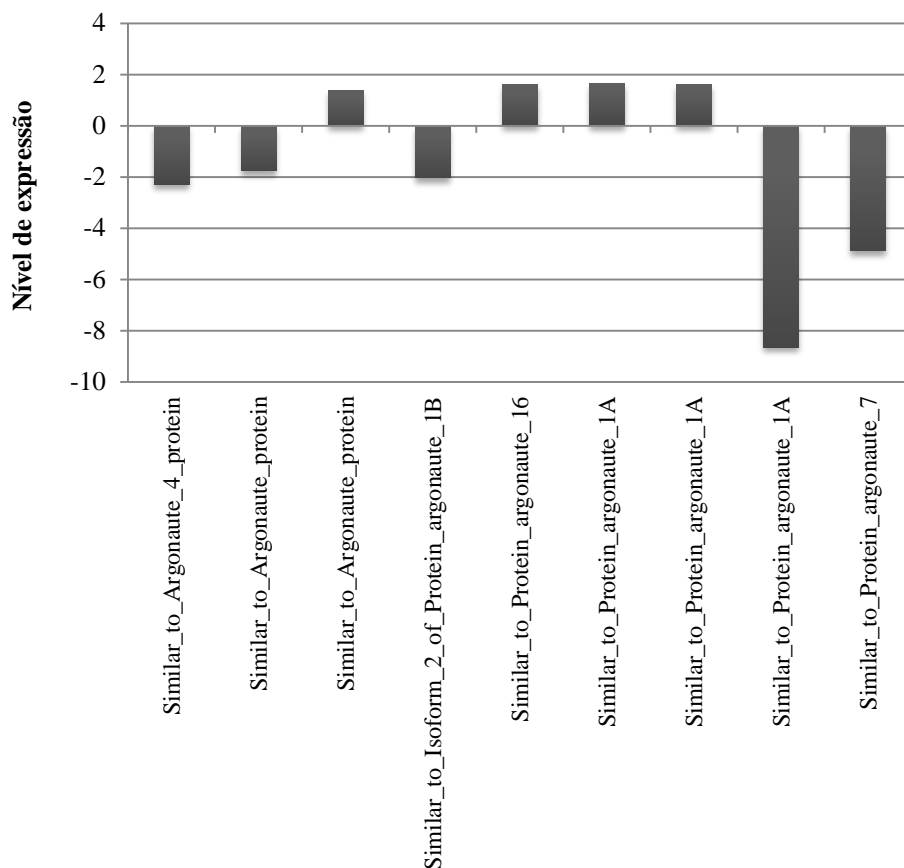


FIGURA 39. Nível de expressão obtido para ArgonAUTA (*AGO*) que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

Diversas sequências com funções biossintéticas também foram encontradas. Dentre estas sequências, algumas são responsáveis pela síntese de compostos fenólicos e outras de saponinas.

A partir da rota do chiquimato, que dá origem ao corismato, pode haver a formação dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, que dão origem a compostos fenólicos (Taiz & Zeiger, 2005).

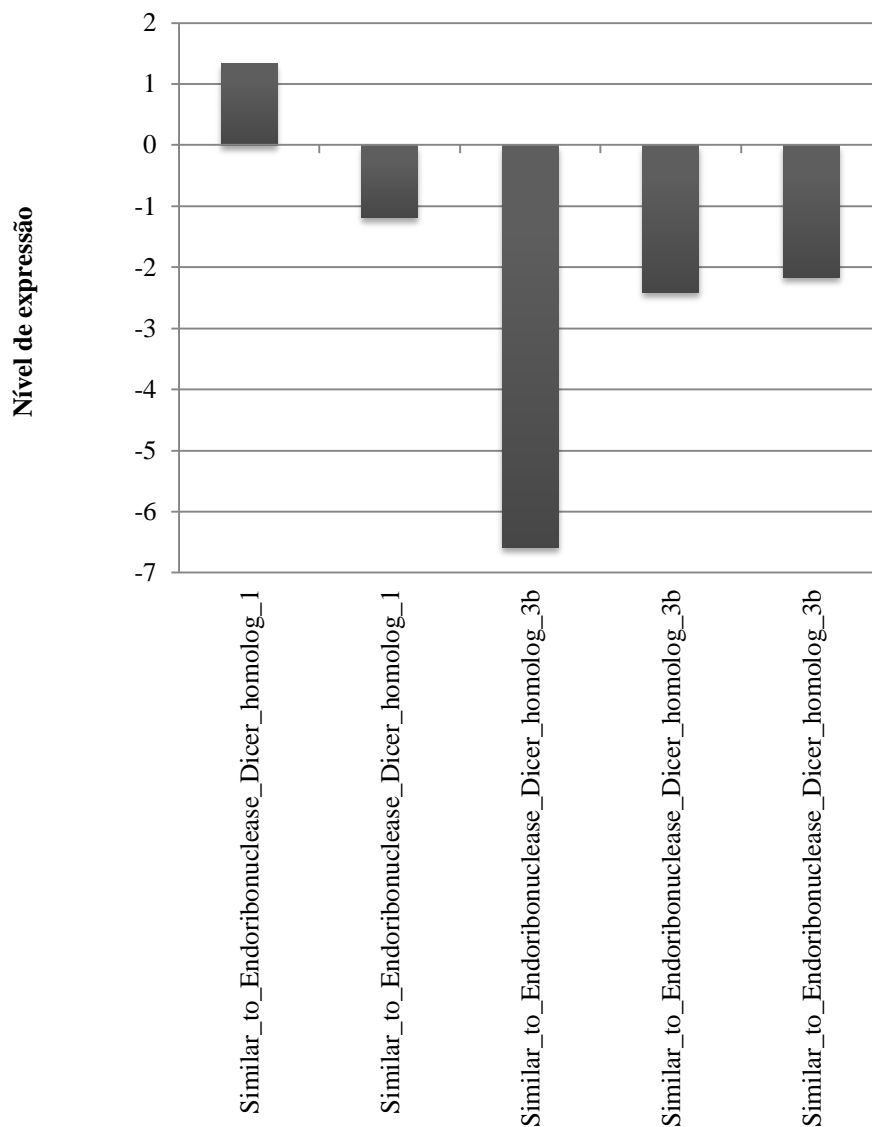


FIGURA 40. Nível de expressão obtido para Dicer (DC) que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

Através da análise do transcriptoma foram encontrados genes envolvidos na via da fenilalanina, tirosina (PAL, 4-cumarato CoA ligase e chalcona), na via to triptofano (triptofano sintase, AS e fosforribosil antranilato transferase), além de enzimas que participam de rota comum a fenilalanina e triptofano na formação de compostos

fenólicos (hydroxiantranilato hidroxicinamoil transferase e CCoAOMT). Duas sequências do gene fenilalanina amônia liase (PAL) foram obtidas. Estas foram induzidas quando plântulas de URS 21 foram inoculadas com *P. coronata* f. sp. *avenae* (Figura 41).

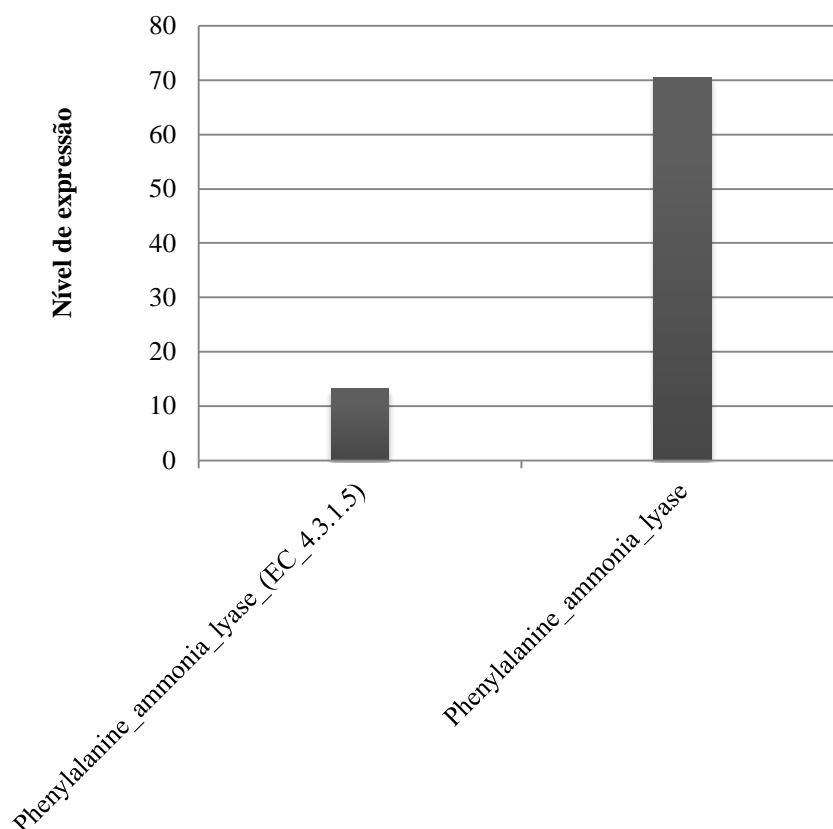


FIGURA 41. Nível de expressão obtido para sequências do gene *PAL* (fenilalanina amônia liase) que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

Das cinco sequências para 4-cumarato-CoA-ligase encontradas, quatro foram induzidas quando as plântulas foram inoculadas com o fungo e uma reprimida nas mesmas condições (Figura 42). Além disso, das sete sequências obtidas para chalcona sintase, cinco foram induzidas nas mesmas condições. Duas das quais tiveram um nível de expressão maior que 150 (Figura 43).

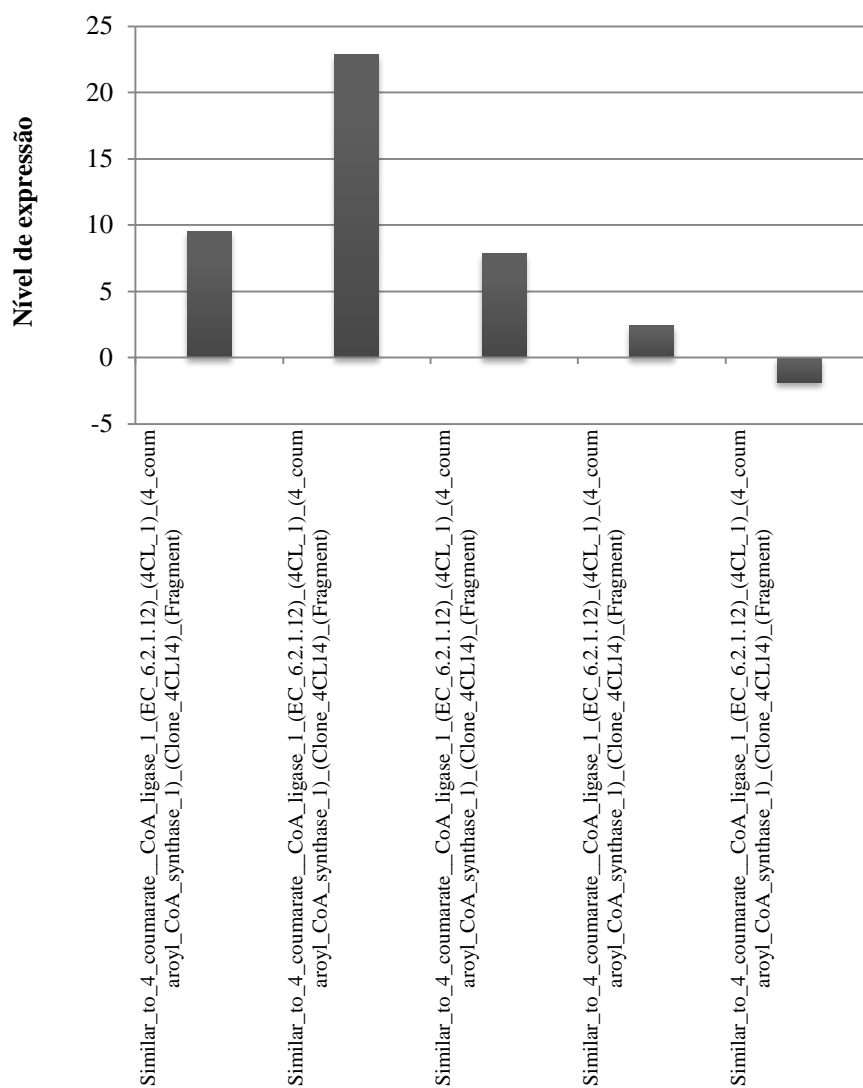


FIGURA 42. Nível de expressão obtido para seqüências de 4-cumarato-CoA-ligase que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a seqüência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

Duas seqüências de triptofano sintase foram superexpressas, indicando haver uma indução de compostos fenólicos específicos para síntese de avenantramidas em resposta à infecção com o agente causal da ferrugem da folha, em plântulas do genótipo

URS 21 (Figura 44). Pois, avenantramidas são compostos fenólicos formados tanto pela via da fenilalanina, como do triptofano.

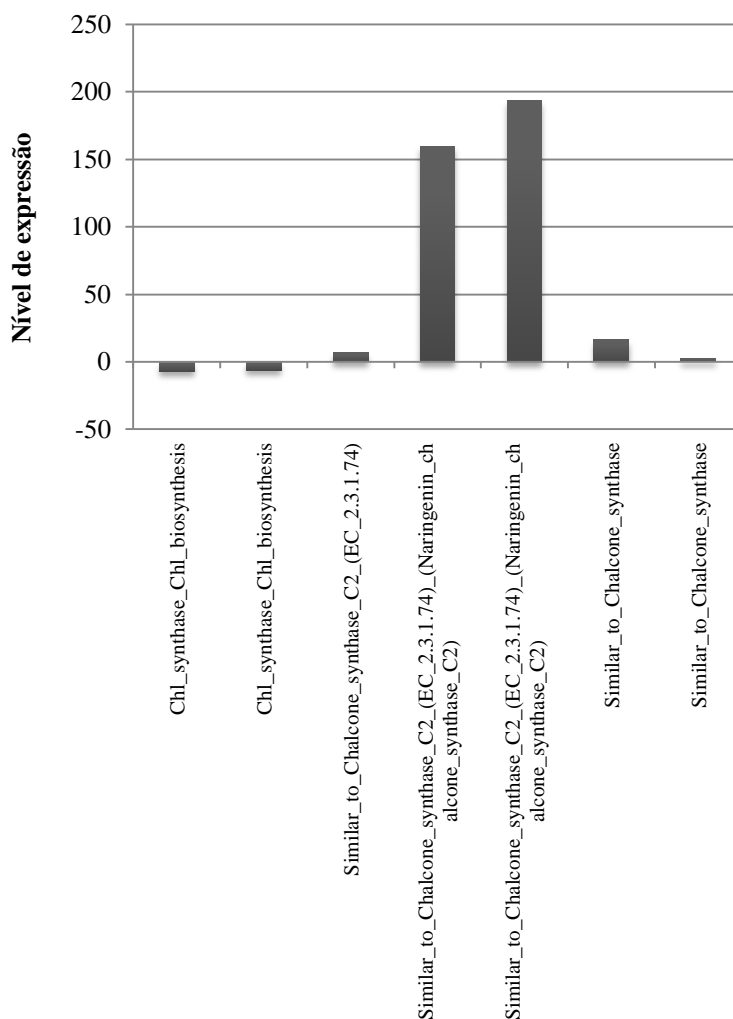


FIGURA 43. Nível de expressão obtido para sequências de chalcona sintase (*CHS*) que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

Assim como na análise de expressão através de PCR Tempo Real em plantas adultas de aveia (Figura 22), através do RNA-seq de plântulas de URS 21 também foi possível verificar o aumento da expressão do gene que sintetiza a enzima AS (Antranilato Sintase), primeiro passo na síntese de avenantramidas (Figura 45). Contudo, através da análise da expressão relativa, a expressão deste gene foi inferior no

genótipo URS 21 (resistência parcial) se comparado com o genótipo URS 22 (suscetível), a exceção dos tempos 48 e 72 hai (Figura 22).

Além do gene *AS*, foram obtidas três sequências para hidroxiantranilato hidroxicinamoil transferase (*AsHHT3*), uma para antranilato isomerase e duas para fosforribosil antranilato transferase. Porém, somente as sequências para fosforribosil antranilatotransferase foram reprimidas em plântulas de URS 21 inoculadas (Figura 45).

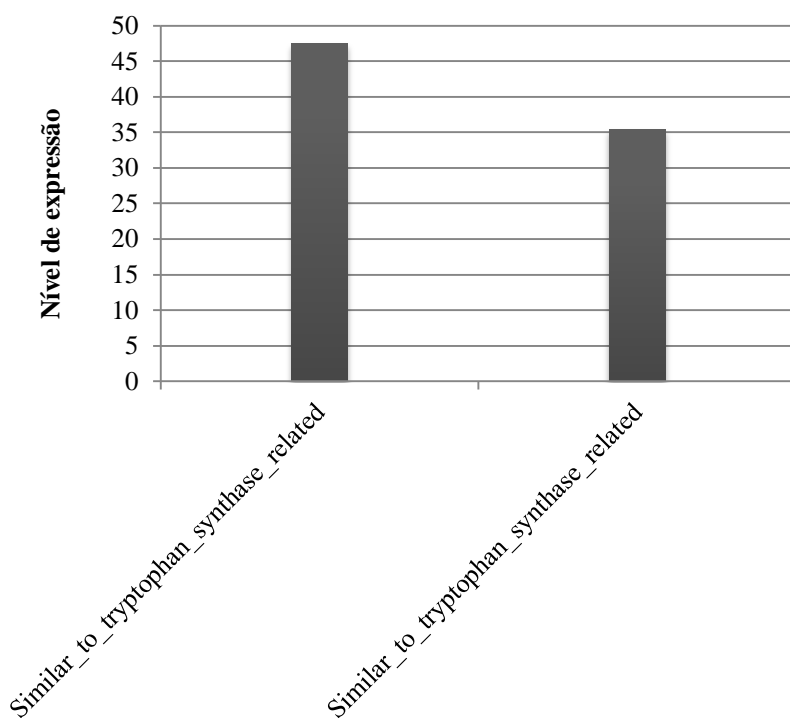


FIGURA 44. Nível de expressão obtido para sequências de triptofano sintase que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*

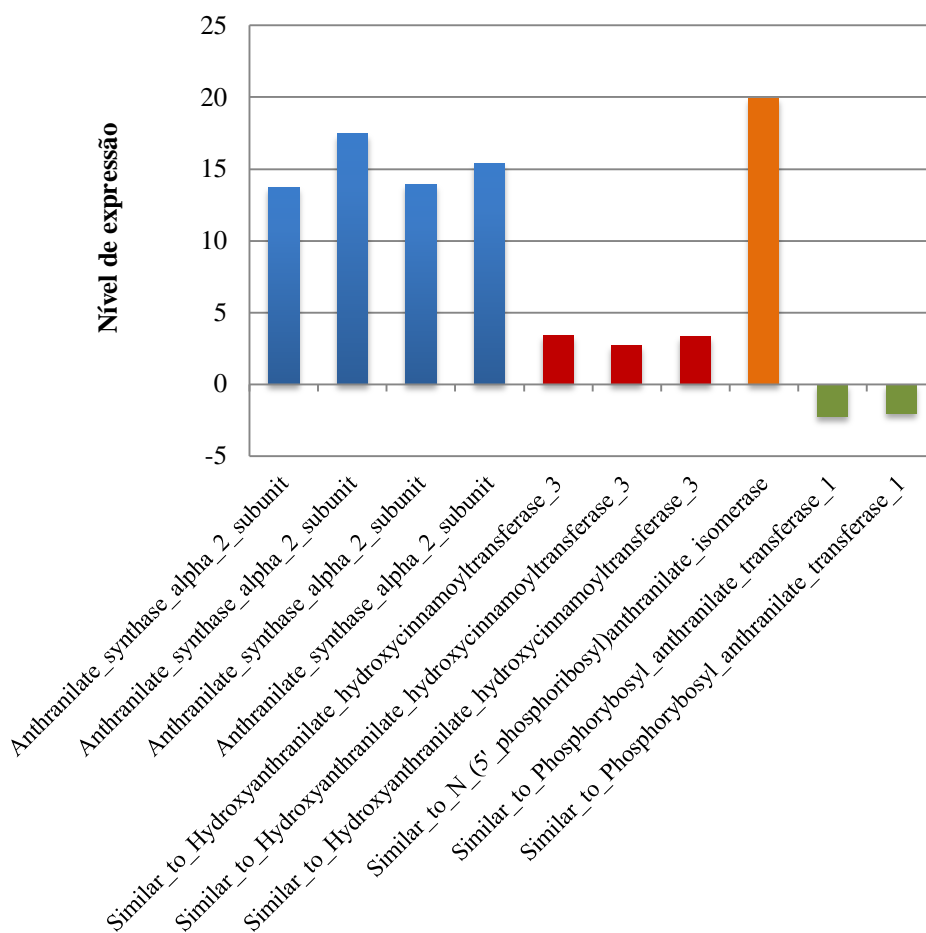


FIGURA 45. Nível de expressão obtido para seqüências de antranilato sintase (AS) (barras azuis), hidroxiantranilato hidroxicinamoil transferase (barras vermelhas), antranilato isomerase (barra laranja) e fosforribosil antranilato transferase (barras verdes), que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a seqüência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

O gene *CCoAOMT* (cafeoil-CoA3-O-metiltransferase) foi outro gene envolvido na expressão de avenantramidas encontrado na análise de RNA-seq. Das cinco seqüências obtidas somente uma foi reprimida e duas foram induzidas com um nível de expressão acima de 40 (Figura 46). Resultados que corroboram os encontrados na avaliação da expressão relativa de *CCoAOMT* através de PCR Tempo Real em plantas adultas de URS 21, onde foi detectado aumento da expressão as 48, 72 e 120 hai, em

relação as plantas não inoculadas (Figura 24). Contudo, quando a expressão relativa foi avaliada não houve diferença significativa em plantas não inoculadas (0 hai) e nos tempos 6 e 24 hai.

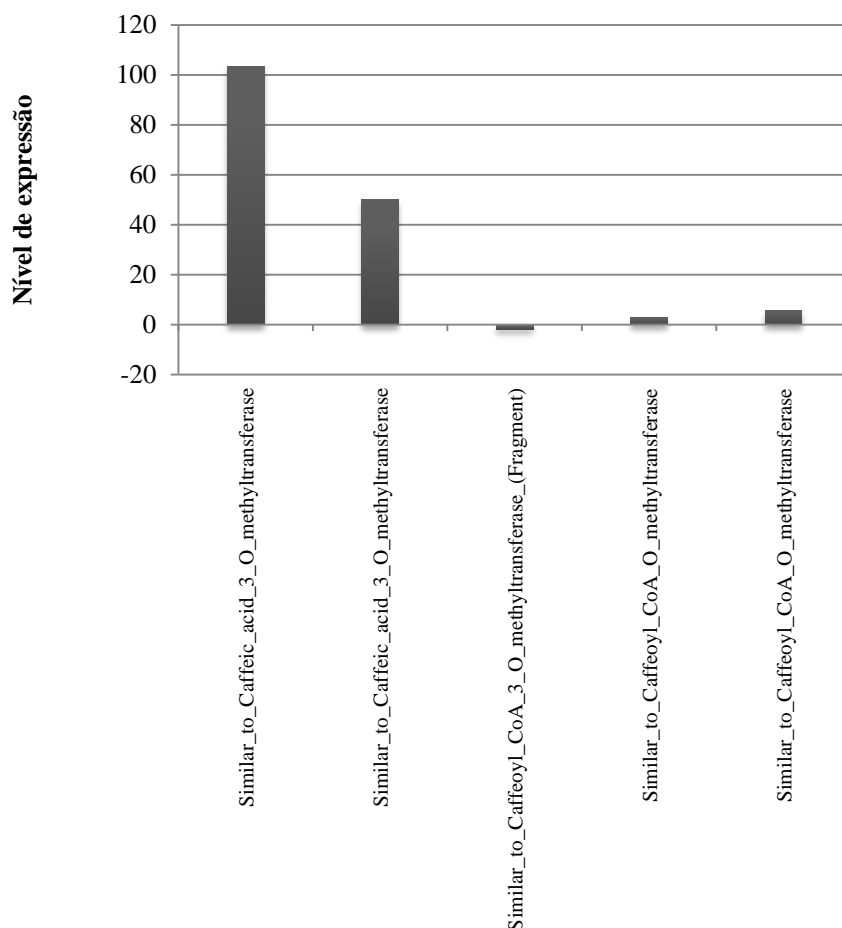


FIGURA 46. Nível de expressão obtido para sequências de *CCoAMT* (cafeoil-CoA3-O-metiltransferase) que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

Através do RNA-seq cinco diferentes sequências envolvidos na via do mevalonato foram encontrados: geranyl difosfato sintase, geranylgeranyl difosfato sintase, esqualeno sintase, AsCS (cicloartenol sintase) e β -amirin sintase (Figuras 47 e 48). Geranyl difosfato sintase dá origem a sesquiterpenos e triterpenos, e geranylgeranyl

difosfato sintase dá origem a politerpenóides. Após a formação do 2,3-oxidosqualeno (triterpeno), pela squaleno sintase, este pode ser substrato tanto para as enzimas AsCS como para β -amirin sintase, que sintetizam saponinas esteroidais e terpenóides, respectivamente

Em plântulas do genótipo URS 21, quando inoculadas com ferrugem da folha da aveia, foram obtidas cinco sequências induzidas de geranyl difosfato sintase. Além disso, foram obtidas três sequências de geranylgeranyl difosfato sintase que foram reprimidas nas mesmas condições. Estes resultados indicam um bloqueio da rota de formação de politerpenóides, e um acúmulo de sesque e ou triterpenos (Figura 47).

A partir deste experimento também foi possível observar três sequências de squaleno sintase. As três sequências para este gene foram induzidas quando as plântulas foram inoculadas com o fungo. O que concorda com os indícios de que haveria um bloqueio da rota de formação de politerpenóides, e um acúmulo de triterpenos, no caso o 2,3-oxidosqualeno (Figura 48).

Além disso, das seis sequências obtidas para AsCS envolvidos na síntese de saponinas esteroidais, cinco foram induzidas em plântulas inoculadas com o fungo. Contudo, o gene β -amirin sintase, envolvido na síntese de saponinas terpenóides foi reprimido, indicando que avenacosides são induzidas em aveia em resposta a resistência à ferrugem da folha, havendo uma competição entre as duas rotas. Estes resultados estão de acordo com a dosagem de saponinas esteroidais (Figura 8) e com a expressão relativa de AsCS (Figura 25) mesmo tendo sido realizados com plantas e não plântulas como na análise do RNA-seq (Figura 48). Indicando que a síntese de saponinas esteroidais é um mecanismo de resistência comum em plântulas e plantas adultas do genótipo com resistência parcial, URS 21.

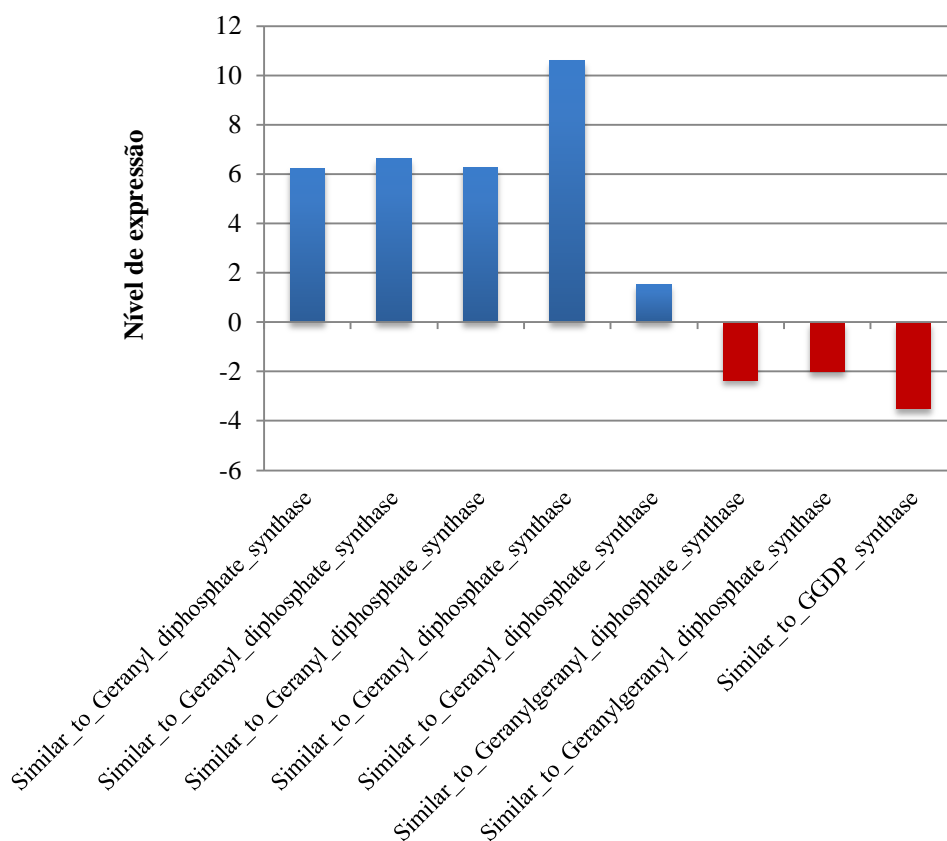


FIGURA 47. Nível de expressão obtido para seqüências de geranyl difosfato sintase (barras azuis) e geranylgeranyl difosfato sintase (barras vermelhas), que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a seqüência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

Na análise da expressão relativa realizada em plantas adultas de URS 21 (Figura 26), foi verificado um aumento de expressão do gene de *Celsyn* (celulose sintase) 6 hai, a expressão também foi elevada em 24 hai, contudo menor que em 6hai. Após 24 hai a expressão deste gene voltou ao nível basal. Contudo, através da análise de transcriptômica realizada em plântulas de URS 21 foi verificada a repressão de genes

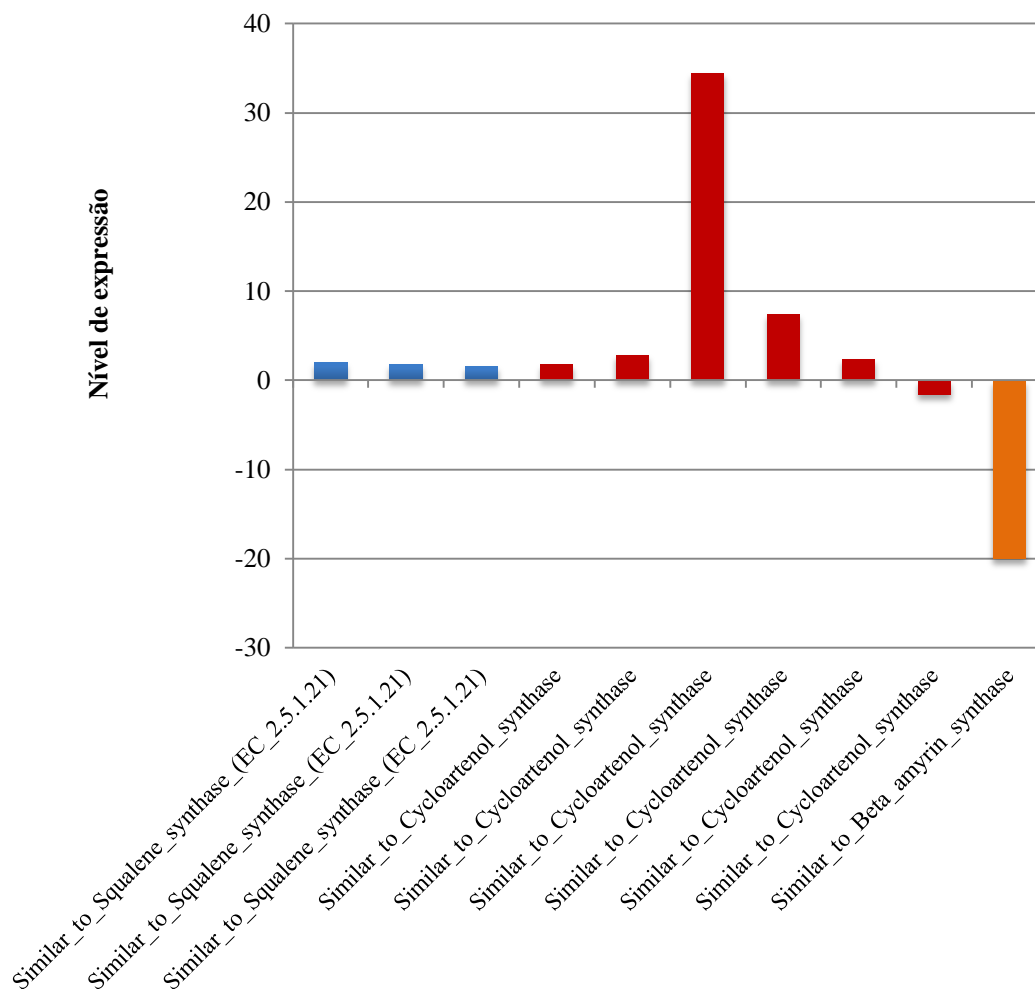


FIGURA 48. Nível de expressão obtido para sequências de esqualeno sintase (barras azuis), AsCS (cicloartenol sintase) (barras vermelhas) e β -amirín sintase (barra laranja), que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

para *Celsyn*, envolvidos na síntese de celulose. Entretanto, algumas das sequências foram induzidas, mas em menor número e com nível de expressão não superiores a 10. O que poderia explicar o aumento de expressão relativa do gene *Celsyn* em 24 hai. Entretanto, isto não pode ser afirmado, pois a análise do transcriptoma foi realizada em plântulas e não em plantas como no experimento com PCR Tempo Real, além disso o

tempo de análise não foi o mesmo. Ao mesmo tempo, as sequências reprimidas além de serem em maior número, cinco chegaram a ser menores ou igual a -10 (Figura 49).

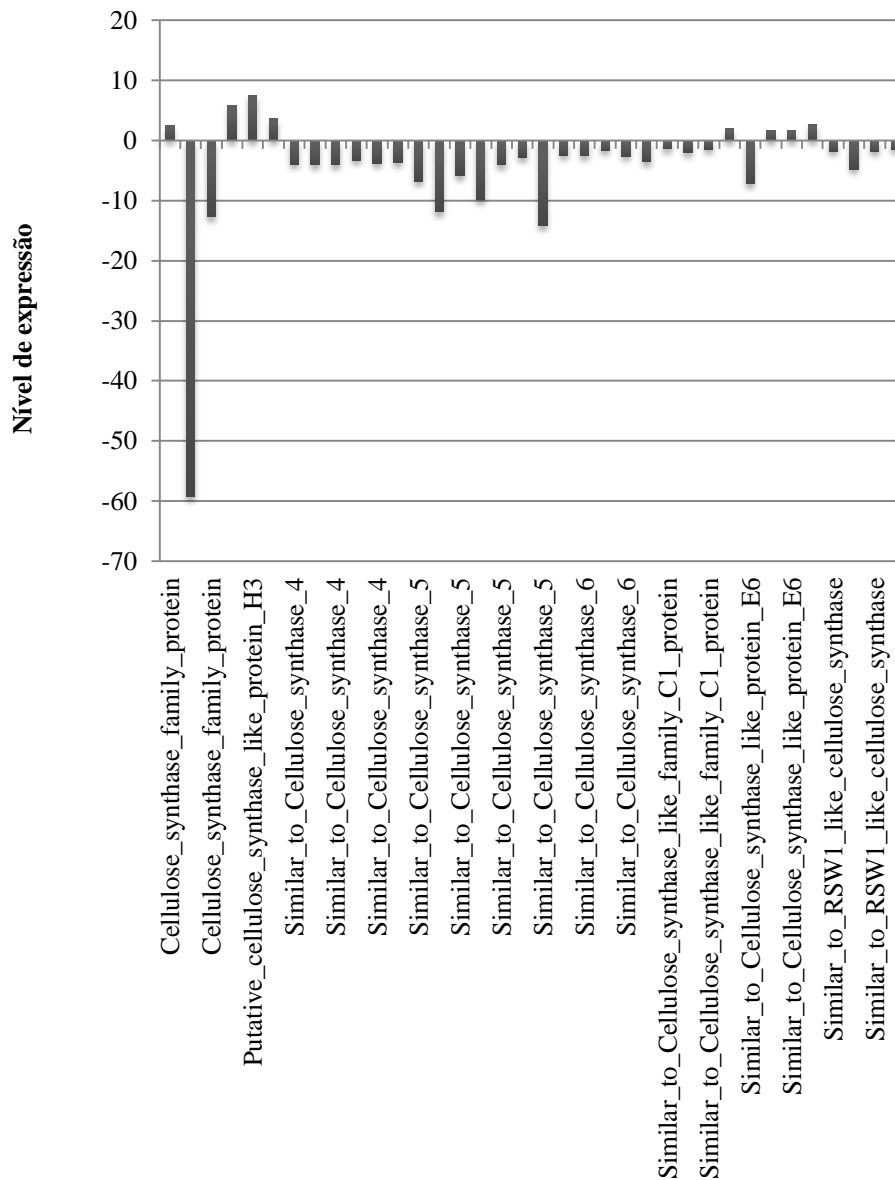


FIGURA 49. Nível de expressão obtido para sequências de *Celsyn* (celulose sintase), que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

Plantas atacadas por patógenos geralmente depositam calose no sítio de infecção para o fortalecimento das paredes celulares. Através do sequenciamento do

transcriptoma foram obtidas algumas sequências envolvidas na produção de calose. Três destas sequências foram induzidas e três reprimidas (Figura 50).

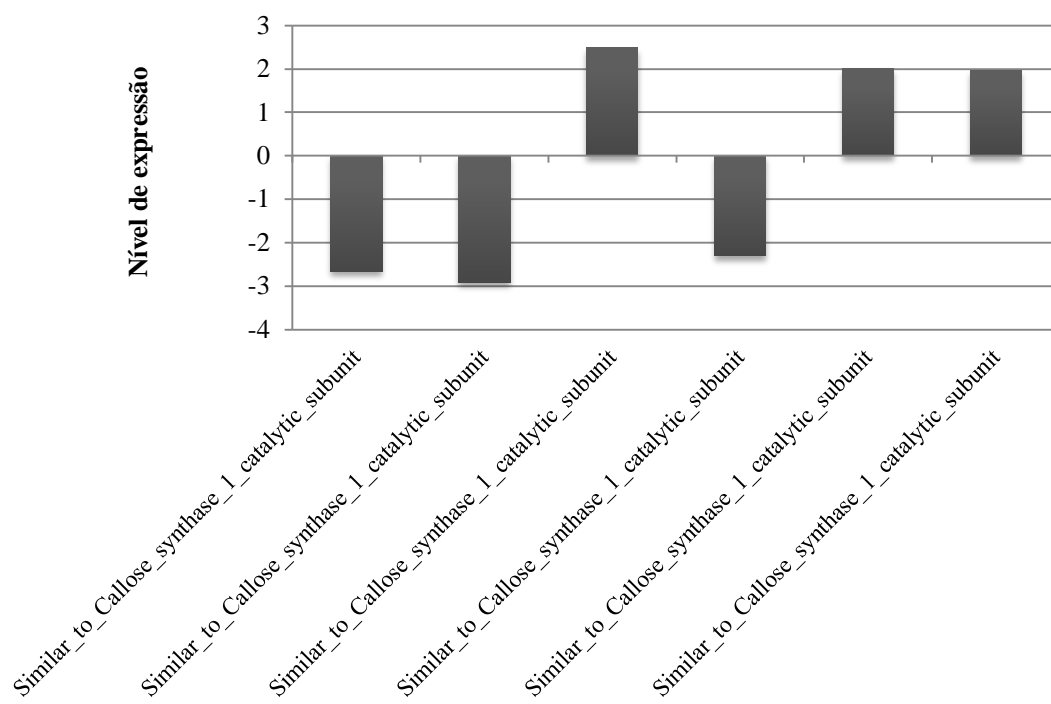


FIGURA 50. Nível de expressão obtido para sequências de calose sintase, que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

Através da análise do transcriptoma foram obtidas diferentes sequências gênicas que codificam enzimas envolvidas no estresse oxidativo. Das oito sequências encontradas para o gene *APX* (ascorbato peroxidase), todas foram reprimidas em plântulas de aveia quando inoculadas com ferrugem da folha, com uma variação de nível de expressão de -1,8 a -658 (Figura 51). Apesar destas análises terem sido realizadas em diferentes períodos, estes resultados vêm ao encontro com os da atividade

desta enzima verificada em plântulas (Figura 10) e da avaliação da expressão relativa em plantas adultas (Figura 29).

Embora quando avaliada a expressão relativa do gene *CAT* (catalase) através de PCR Tempo Real e, também, a atividade desta enzima, em plantas e plântulas de URS 21, respectivamente, inoculada com ferrugem da folha, os resultados tenham indicado não haver uma resposta oxidativa através desta enzima (Figuras 30 e 11), na análise de transcriptoma, oito sequências foram obtidas induzidas. O nível de expressão variou de 1,8 a 28 (Figura 52).

Um número elevado de sequências foi obtido para genes de glutathione, 61. Entretanto, foram selecionadas sequências com nível de expressão maiores ou menores que 5 ou -5 para representar no gráfico (Figura 53). Nove sequências de GR induzidas foram obtidas. Entretanto somente duas foram representadas no gráfico (nível de expressão de 5, 2 e 6,8), as demais apresentaram nível de expressão baixo de 4 (Figura 53). Contudo, quando a atividade desta enzima foi avaliada houve um decréscimo da atividade da enzima após a inoculação (Figura 12), indicando a presença de diferentes isoformas de GR em aveia ou até mesmo um controle pós-transcricional.

Grande parte das sequências de glutathione foram de glutathione S transferase (*GST*), 37. Das quais somente sete foram reprimidas, e três com nível de expressão menor que -5. O nível de expressão menor foi de -44. As demais sequências para este gene foram induzidas, sendo 17 com nível de expressão maior que cinco. O maior nível de expressão foi de 62 (Figura 53). Cinco sequências para glutathione sintase foram obtidas, das quais quatro foram induzidas, mas somente uma com nível de expressão maior que 5 (8,36). A sequência reprimida obteve um nível de expressão de 8,66 (Figura 53).

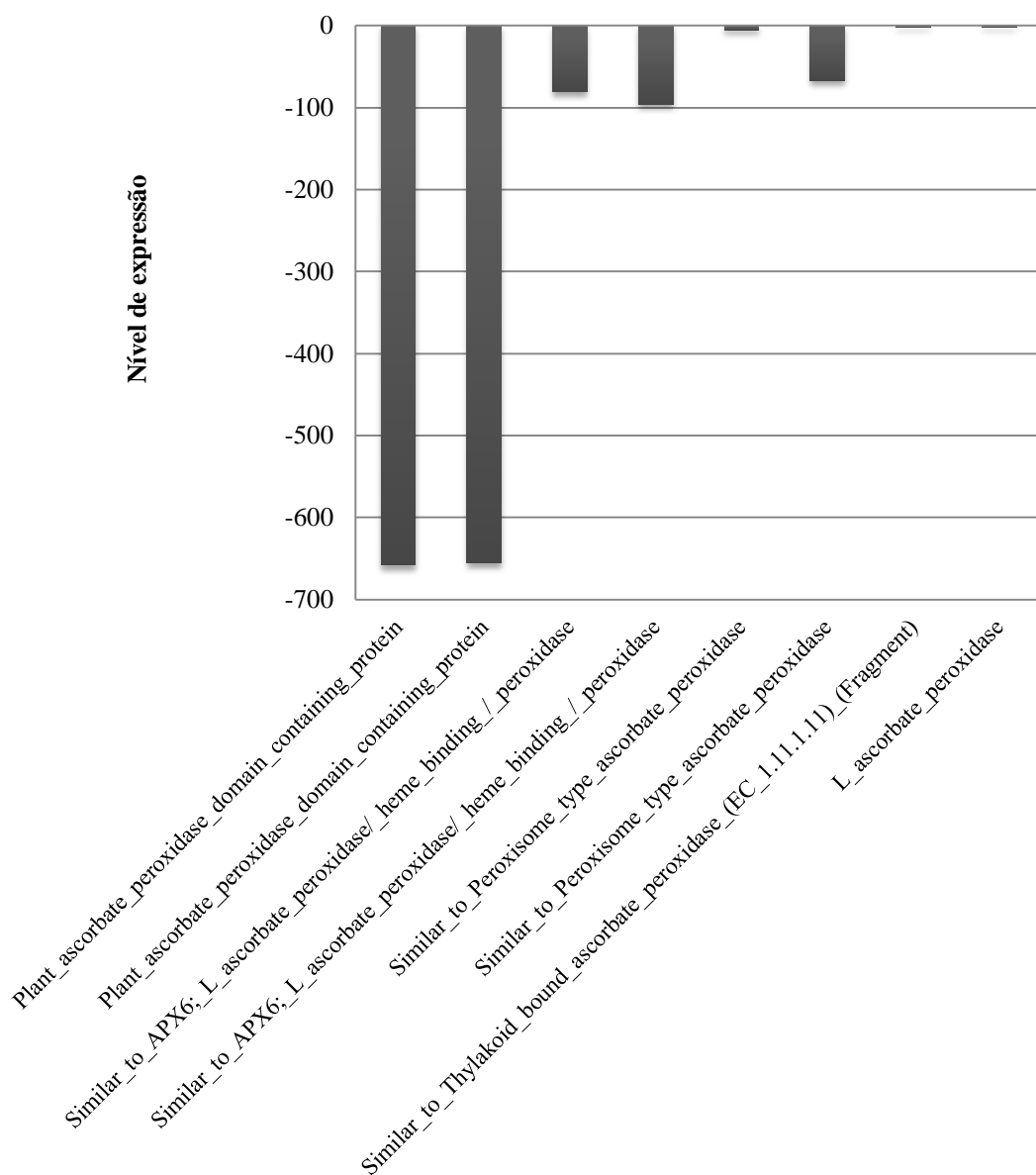


FIGURA 51. Nível de expressão obtido para sequências de APX (ascorbato peroxidase), que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

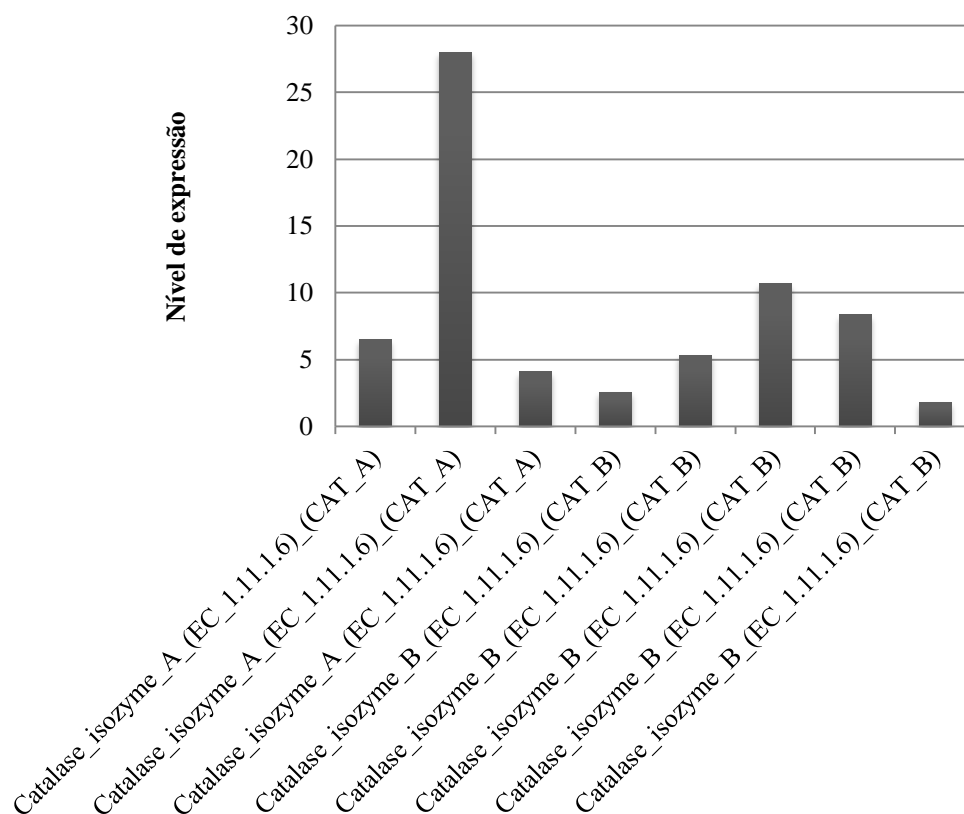


FIGURA 52. Nível de expressão obtido para sequências de *CAT* (catalase), que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*.

Uma única sequência de glutatona desidrogenase foi obtida e induzida. Duas sequências *GP* foram encontradas, mas não aparecem no gráfico devido ao nível de expressão menor que cinco (Figura 53). Além disso, quando a expressão relativa de *GP* em plantas de URS 21 foi avaliada, em 6 hai a expressão foi aumentada, mas após 24 hai a expressão deste gene foi mantida estatisticamente igual a 0 hai (Figura 31). O que evidencia uma expressão pelo menos em tempos iniciais tanto em plântulas, como em plantas de URS 21 inoculadas com *P. coronata* f. sp. *avenae*.

As peroxidases (Pox) são enzimas que oxidam moléculas de natureza fenólica. Foram obtidas 41 sequências com esta função, das quais 14 foram reprimidas, a mais

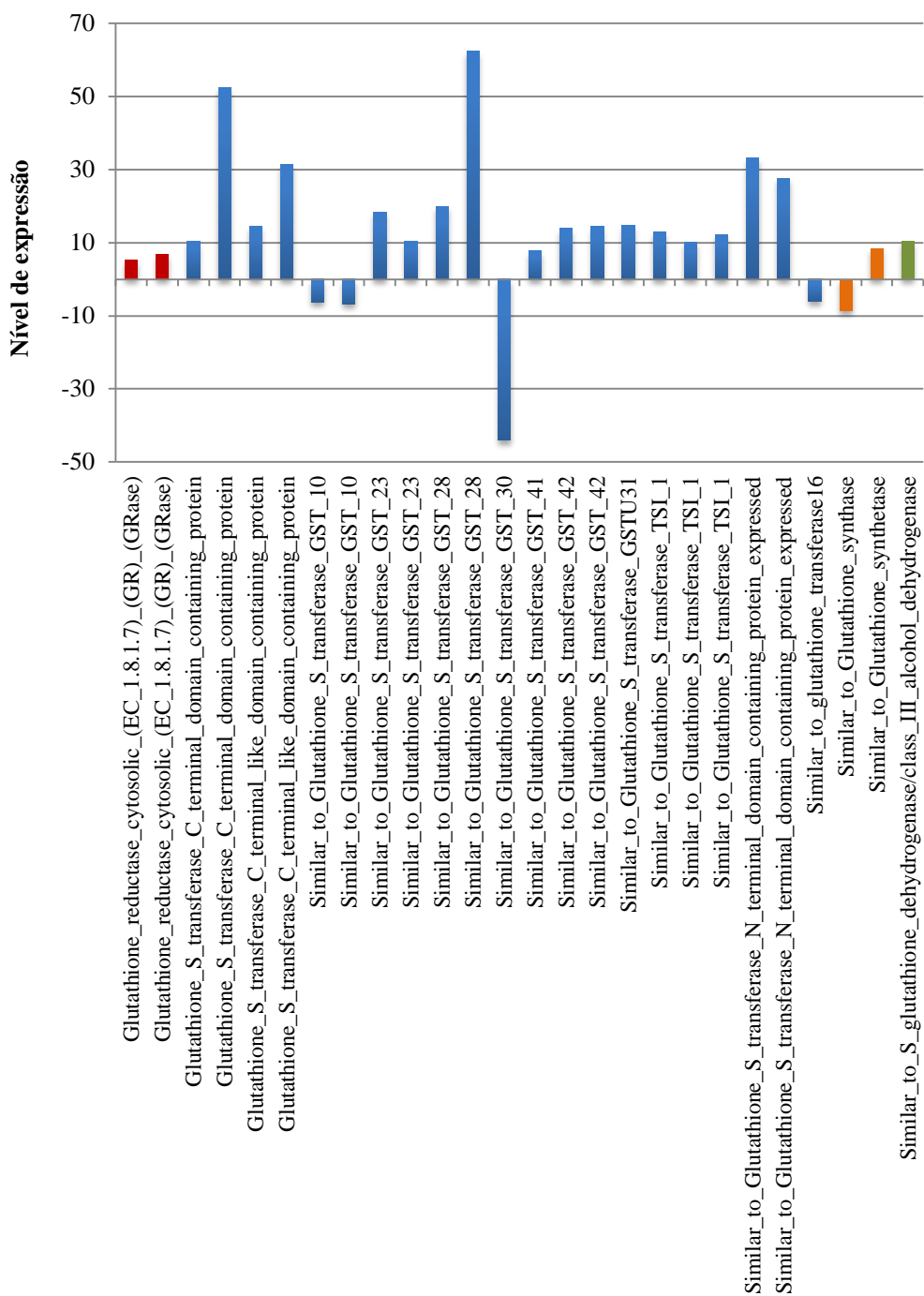


FIGURA 53. Nível de expressão obtido para seqüências de glutathione redutase (GR) (barras vermelhas), glutathione-S-transferase (barras azuis), glutathione sintase (barras laranja) e glutathione dehidrogenase (barra verde), que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a seqüência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

reprimida teve um nível de expressão de -67.6184 . Apesar de várias sequências terem sido induzidas, uma delas teve nível de expressão muito elevado (1.722) (Figura 54). Estes resultados vêm ao encontro dos obtidos para a análise de expressão relativa de *Pox*, onde em URS 21 em 6 e 24 hai a expressão foi maior que em plantas não inoculadas (0 hai) (Figura 28).

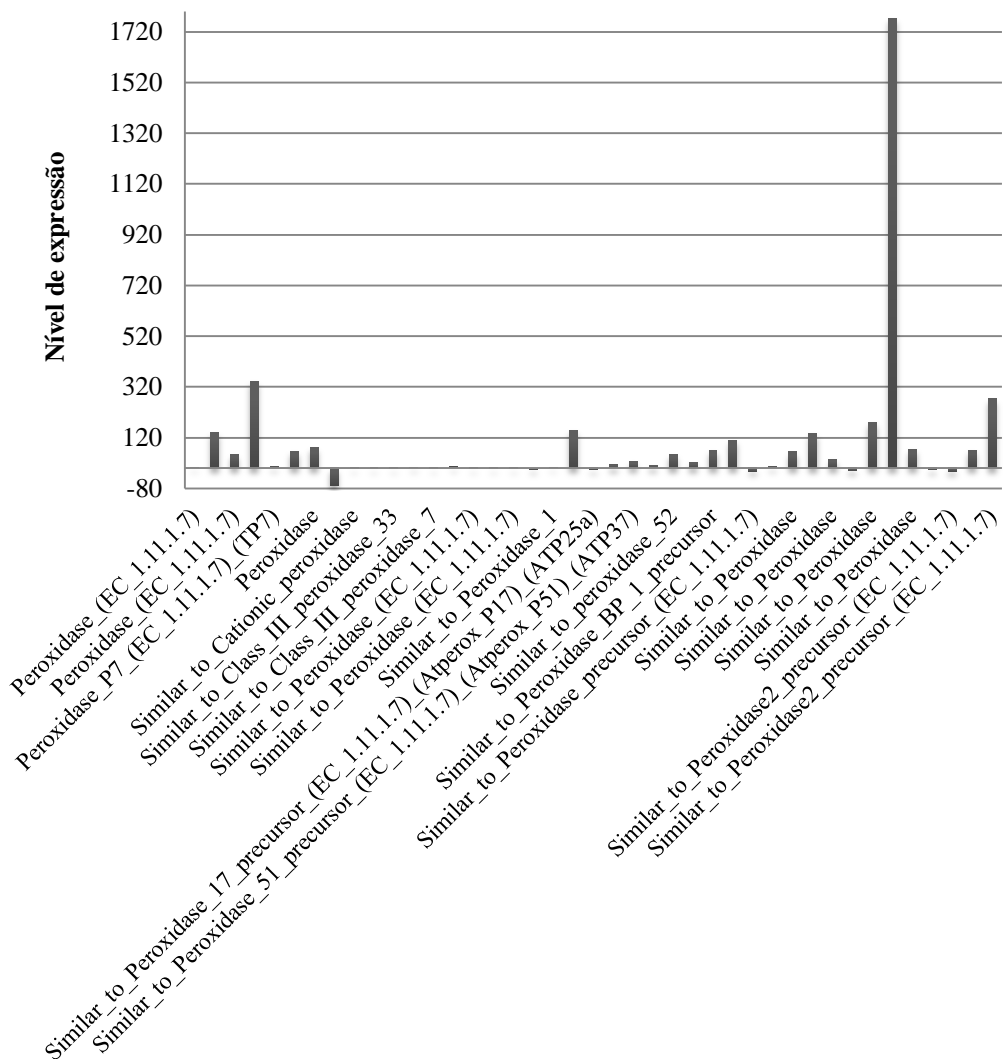


FIGURA 54. Nível de expressão obtido para sequências de peroxidase (*Pox*), que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

Lipoxigenases (Lox) são envolvidas na peroxidação de lipídios. Através da análise de RNA-seq, em plântulas de URS 21, foram encontradas 12 sequências que codificam esta enzima, e todas reprimidas quando URS 21 foi inoculada com *P. coronata* f. sp. *avenae* (Figura 55). Embora quando realizada a análise em PCR Tempo Real em plantas adultas do mesmo genótipo a expressão relativa deste gene tenha aumentado em 6 e 48 hai (Figura 27). Podendo esta diferença de resultados ser devido o tempo de análise ou até mesmo o estágio fenológico.

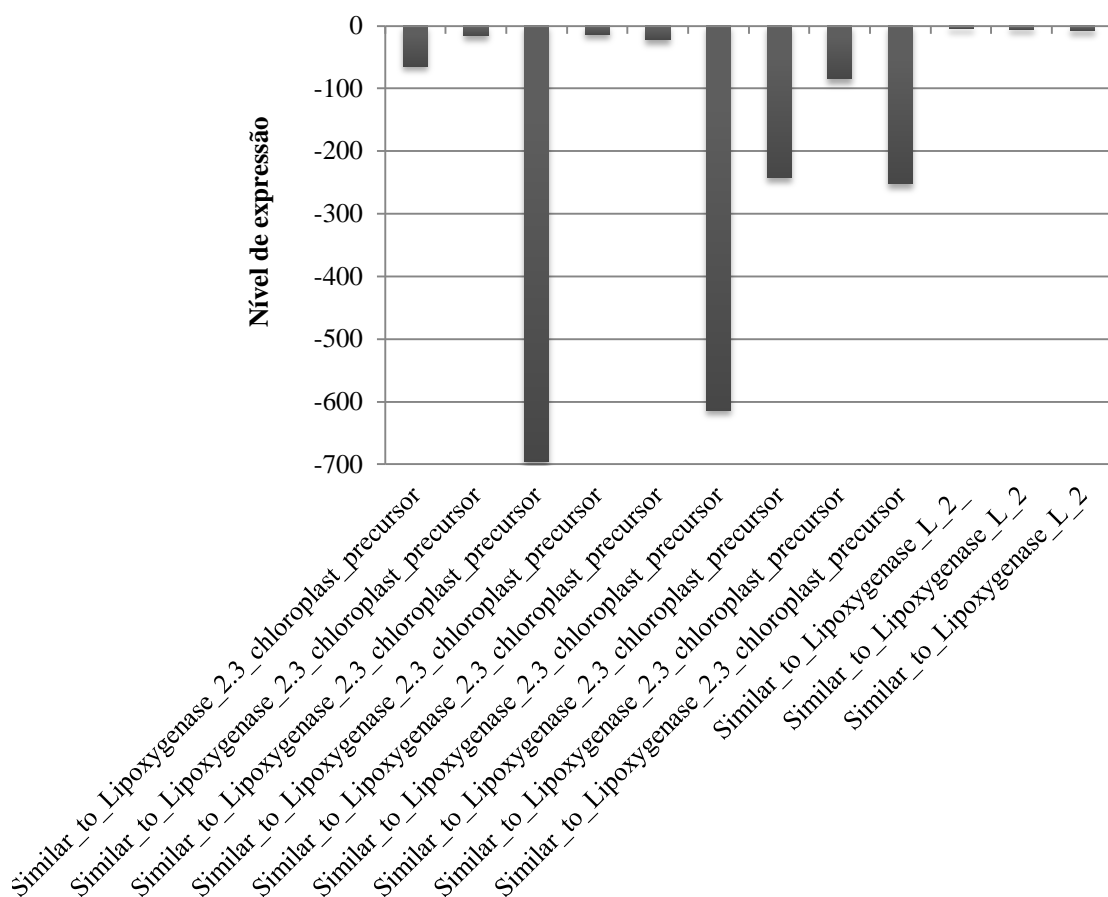


FIGURA 55. Nível de expressão obtido para sequências de lipoxigenase (*Lox*), que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

Proteínas relacionadas à patogênese (PR) fazem parte do mecanismo de defesa dependente de ácido salicílico. No transcriptoma foi possível verificar a indução de 17 sequências para estas proteínas. Grande parte destas sequências, 13, com um nível de expressão acima de 50, em relação a plantas não inoculadas (Figura 56).

Quitinases, um tipo de proteínas PR, são enzimas que degradam quitina, presente nas paredes celulares dos fungos e apresentam atividade antifúngica. No RNA-seq foram obtidas 19 sequências para quitinases. Dentre estas sequências somente cinco foram reprimidas, as demais foram induzidas e em geral com um nível de expressão maior em módulo que as reprimidas. A sequência induzida com maior nível de expressão foi acerca de 120 (Figura 57).

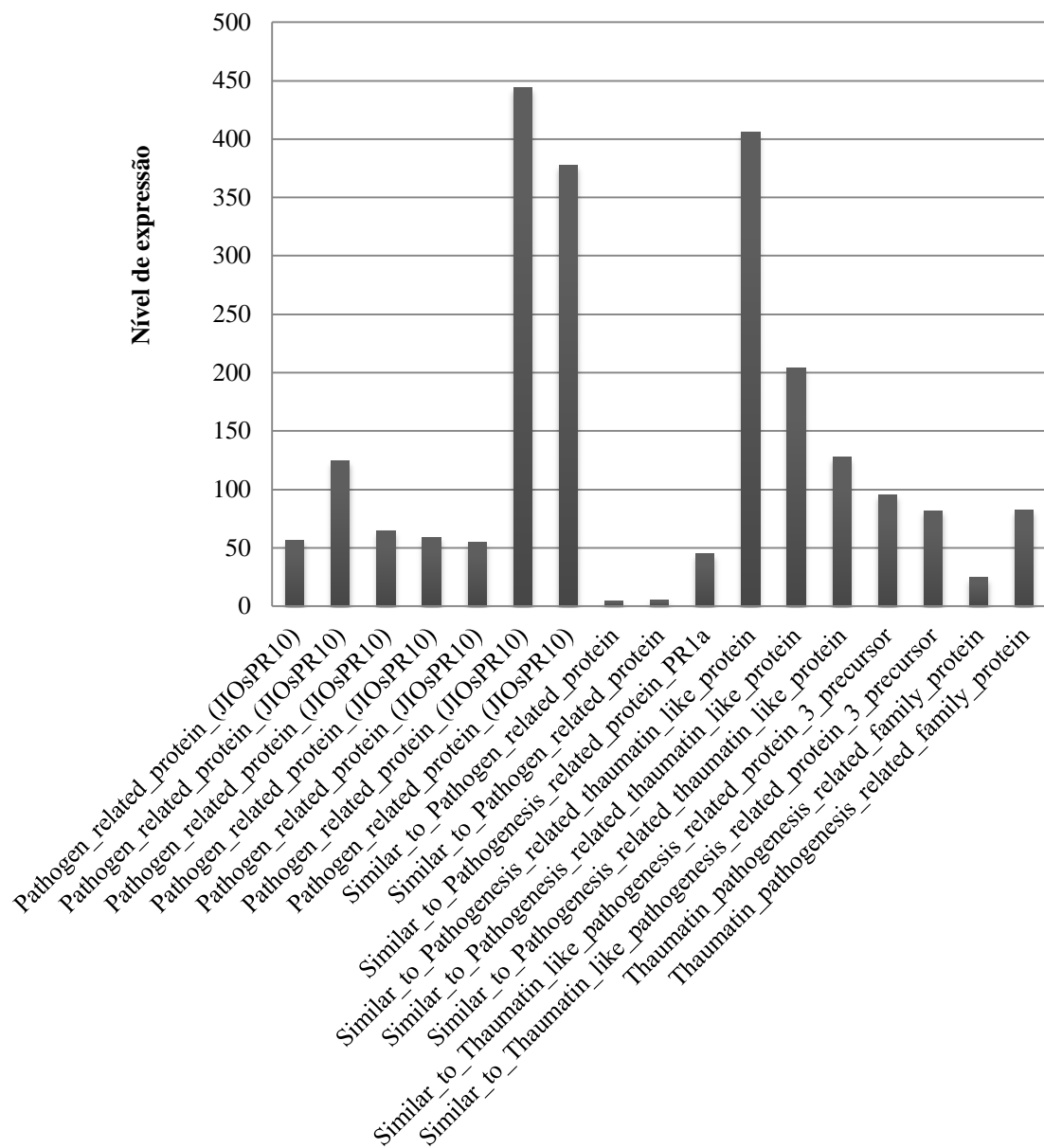


FIGURA 56. Nível de expressão obtido para seqüências de proteínas relacionadas à patogênese (PR), que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a seqüência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*.

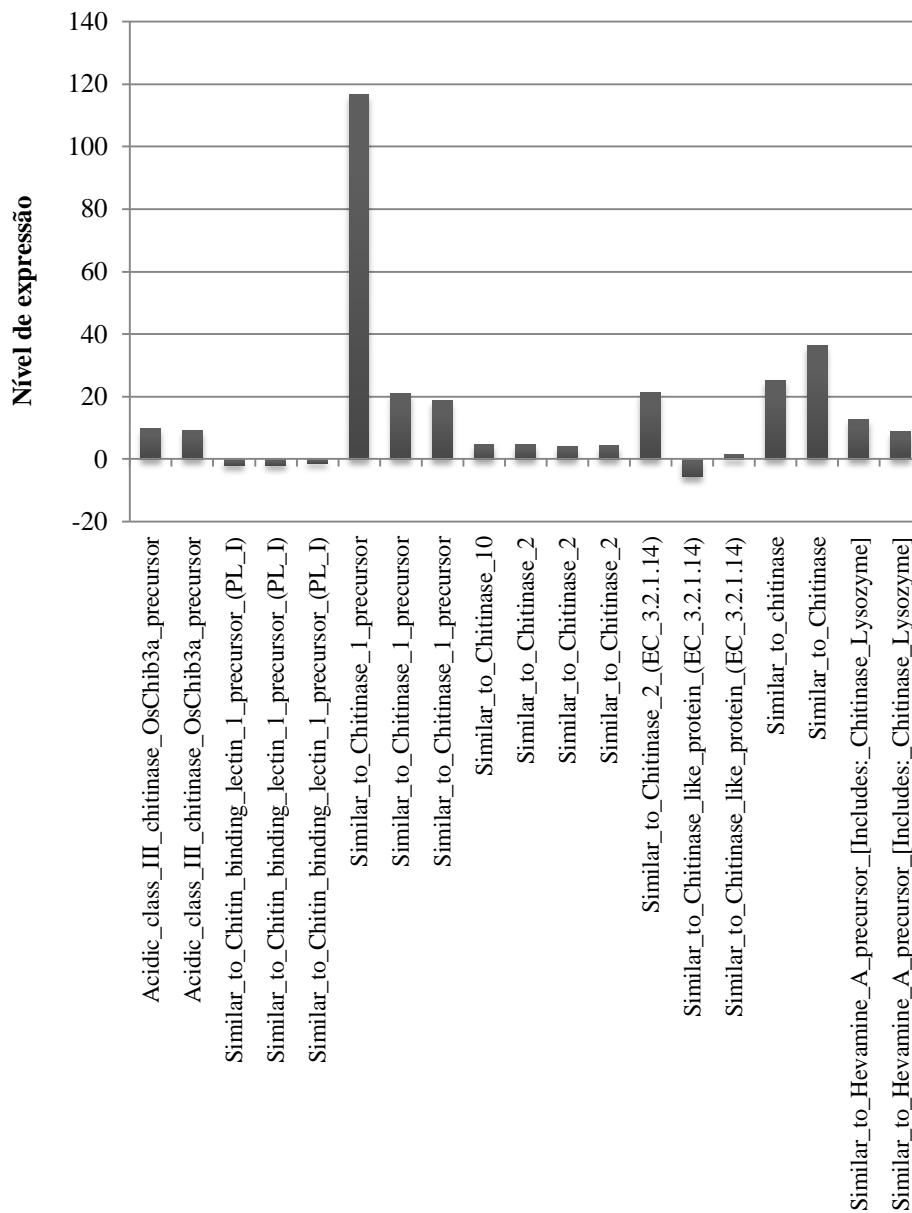


FIGURA 57. Nível de expressão obtido para sequências de quitinase, que foram geradas a partir da análise do transcriptoma do genótipo URS 21 (resistência parcial). Expressão positiva indica que a sequência foi induzida em plantas de URS 21 inoculadas com *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e valores negativos indicam uma repressão do gene.

5 DISCUSSÃO

O Programa de melhoramento genético da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) desenvolve genótipos de aveia adaptados às condições do sul do Brasil desde 1974. Até o ano de 2012 foram lançadas comercialmente 33 cultivares de aveia branca. Desde seu princípio, um dos principais objetivos do programa foi desenvolver genótipos resistentes a doenças, principalmente à ferrugem da folha da aveia, além de selecionar para ciclo adequado à estação de cultivo, qualidade de grãos, elevado potencial de rendimento de grãos, outros caracteres de importância agrônômica. A resistência à ferrugem da folha é condição fundamental para que uma cultivar de aveia expresse seu potencial produtivo e de qualidade de grãos, nos ambientes do sul do Brasil, além de contribuir para maior estabilidade de desempenho.

A cultivar URS 21, modelo de estudo deste trabalho, foi lançada comercialmente no ano de 2000, quando apresentava resistência completa. Após a superação desta resistência, detectada no ano de 2005, demonstrou apresentar resistência parcial à ferrugem da folha. Até o momento, esta cultivar vem apresentando um padrão estável de resistência parcial e durável. Estudos recentes têm investigado as características genéticas da resistência parcial (Santos, 2009; Zambonato, 2011) e os mecanismos histopatológicos que conferem este tipo de resistência (Graichen, 2011). No presente trabalho foram estudados aspectos

bioquímicos e moleculares envolvidos na resistência parcial à ferrugem da folha em aveia branca.

Estudos em genótipos de aveia suscetíveis e resistentes à ferrugem da folha revelaram que a formação de apressórios de *P. coronata* f.sp. *avenae* ocorre a partir de 12 hai, assim como a produção de vesículas subestomatais. Para a maior parte dos genótipos estudados a formação de hifas infectivas se deu 18 hai. Na URS 21, a formação de hifas infectivas ocorreu mais tardiamente, 24 hai, porém nesta avaliação as proporções de vesículas subestomatais com hifas infectivas já era superior a 80 % em URS 21 (Graichen, 2009). Apesar da formação destes dois grupos quanto ao tempo de formação de hifas infectivas, estes eram formados tanto por genótipos resistentes quanto suscetíveis, não permitindo a diferenciação das classes resistentes e suscetíveis. Além disso, em 24 hai foi observada a presença de células mãe do haustório e haustórios tanto em genótipos resistentes, como em suscetíveis (Graichen, 2009). Assim, com base neste e em outros dados obtidos por Graichen, 2009, foram escolhidos os tempos de análise do presente trabalho.

Plantas produzem um diverso arranjo de compostos naturais. Estes compostos possuem importantes funções ecológicas, por exemplo, prover proteção contra patógenos e herbívoros (Dixon, 2001). Compostos fenólicos apresentam papel importante na resistência a doenças em aveia (Osbourn, 2003; Osbourn *et al.*, 2003; Soriano *et al.*, 2004). Aveia contém uma ampla gama de compostos fenólicos, que se encontram na forma livre ou formando barreiras. Geralmente os compostos fenólicos livres são ácido cinâmico e seus derivados, enquanto os compostos fenólicos de barreira são principalmente dímeros oxidativamente acoplados, de ácido *p*-coumárico e ácido ferúlico, que são ésteres ligados a polímeros da parede celular. Avenantramidas, que são amidas de ácido antranílico e ácidos derivados do cinâmico

ou avenalumínico (5-fenil-penta-2,4-dienóico), são somente relatadas em aveia, e têm sido isoladas de grãos e folhas (Ishihara *et al.*, 1999a). Nas folhas, as principais avenantramidas são 2p e 2f (Ishihara *et al.*, 1999b). Mais recentemente, estruturas diméricas de avenantramidas têm sido identificadas em tecidos de folhas (Okazaki *et al.*, 2004; Okazaki *et al.*, 2007). Além disso, há evidências que a síntese de avenantramidas ocorre no mesófilo das plantas infectadas, mais precisamente nos cloroplastos (Izumi *et al.*, 2009).

Assim neste trabalho, foi analisada a produção de compostos fenólicos totais ao longo do tempo, em plântulas e plantas de aveia das cultivares URS 21 e URS 22 inoculadas com *P. coronata* f. sp. *avenae*. O padrão de produção de compostos fenólicos (Figura 7) foi diferente entre plântulas e plantas de URS 21, assim como da cultivar suscetível URS 22. Enquanto em plântulas de URS 22 o aumento da produção de compostos fenólicos ocorreu tardiamente as 120 hai, provavelmente relacionado com a colonização do fungo (Figura 7). Em plântulas de URS 21 houve aumento da produção de composto fenólicos em 24 hai. Porém, as concentrações foram inferiores à condição não inoculada em tempos posteriores a 24 hai.

Analisando a produção de compostos fenólicos em plântulas e plantas de URS 21, parece que a produção destes compostos não é tão decisiva em determinar reações de defesa à ferrugem da folha em plântulas desse genótipo, comparado às plantas adultas; isto porque após 24 hai em plântulas houve decréscimo da produção de fenólicos totais. Entretanto, em plantas adultas a produção de compostos fenólicos manteve-se elevada de 24 a 72 hai, sugerindo que elevada concentração de compostos fenólicos e também de saponinas esteroidais (Figura 8) é determinante em permitir a formação da reação de resistência parcial em plantas adultas de URS 21. Saponinas esteroidais mostraram aumento de 350 vezes em plantas inoculadas de

URS 21 em 72 hai. Uma vez que há indícios que os mecanismos de resistência de plântula e planta adulta de URS 21 possam ser diferentes, a questão a ser formulada é se a resistência parcial de URS 21 é somente do tipo planta adulta. Mas esse não deve ser o caso, uma vez que URS 21 também é resistente em plântula, conforme demonstrado por Graichen *et al.* (2011). Assim, o acúmulo de compostos fenólicos em 24 hai em plântulas do genótipo URS 21 parece fazer parte do mecanismo de defesa inicial nesse estágio fenológico. Acúmulo rápido de compostos fenólicos totais também foi verificado em plantas de trigo resistentes à mancha marrom, inoculadas com o agente causal da moléstia (Patil *et al.*, 2011).

Entre os genes associados à produção de compostos fenólicos, cuja expressão foi estudada em diferentes tempos após a inoculação com ferrugem da folha em plantas adultas de URS 21 e URS 22, *antranilato sintase (AS)*, que atua na conversão de triptofano em antranilato, passo inicial na rota do triptofano para a síntese de avenantramidas, parece não aumentar expressão após a inoculação com o fungo para que ocorra a indução de avenantramidas em URS 21; uma vez que a sua expressão não aumentou em plantas de URS 21 inoculadas com ferrugem da folha, comparadas as não inoculadas. Contudo, foi verificada indução da expressão de sequências de RNA, obtidas através da análise do transcriptoma, similares à subunidade α -2 de antranilato sintase de arroz (mais que 13 vezes de aumento) em plântulas de URS 21 às 12 hai (Figura 45). O que indica que a análise da expressão de sequências de mRNA pode levar a conclusões equivocadas, quando tomadas isoladamente, ou quando se extrapola a modificação na expressão de genes para a produção de compostos. Contudo, apesar das duas análises terem sido realizadas em tempos e fenologia diferente em URS 21, outro motivo que pode conduzir para tal diferença nos resultados é a possibilidade de haver distintas isoformas de AS em aveia. Isto

tem sido evidenciado em outras espécies, indicando que AS é formada por duas diferentes isoformas, α e β : $AS\alpha$ converte corismato a antranilato, usando amônia e um amino doador, e media a inibição por *feedback* por Trp. Porém, $AS\beta$ transfere o grupo amino da glutamina para $AS\alpha$. Na maior parte das plantas estudadas tem sido observado que existem no mínimo dois genes que codificam $AS\alpha$ e um que codifica $AS\beta$. Um dos genes de $AS\alpha$ é constitutivamente expresso, enquanto o outro é induzido por estresse como o causado por patógenos (Maeda *et al.*, 20012). Em *arabidopsis* existem duas isoformas de $AS\alpha$ com expressão regulada diferencialmente (Niyogi & Fink, 1992), sendo uma das isoformas responsiva ao estímulo exógeno, por ferimento ou ataque de patógenos. Similarmente, a expressão do gene $As\alpha$ em arroz foi induzida quando culturas de células em suspensão foram tratadas com elicitador (Tozawa *et al.*, 2001). Assim, análises de expressão ao longo do tempo tanto em plantas adultas, como em plântulas dos genótipos URS 21 e URS 22 de aveia deveriam ser efetuadas através de PCR Tempo Real com base em *primers* projetados a partir das sequências obtidas através do RNA-seq para se chegar a uma análise mais apurada e tentar relacionar a expressão do gene AS em plântula e em plantas adultas.

Em plantas de URS 22 o nível de expressão de AS foi reduzindo em 24, 48 e 72 hai (Figura 22), coincidindo com a queda da concentração de compostos fenólicos, embora a redução de expressão de AS só tenha sido significativa em 48 e 72 hai (Figura 7-B). Ainda, as plantas de URS 22 mostraram um aumento na produção de compostos fenólicos em 120 hai, coincidindo com o aumento da expressão de AS no mesmo tempo pós-inoculação (Figura 7-B). Portanto, o gene *antranilato sintase* pode estar envolvido na reação de URS 22 à colonização com ferrugem da folha, embora não em URS 21. Trabalhos com culturas de células em

suspensão de arroz, tratadas com elicitor, evidenciam a indução da expressão do gene *AS*, sugerindo que a rota do triptofano possui um papel defensivo em plantas (Tozawa *et al.*, 2001).

A produção de compostos tóxicos derivados do triptofano (Trp) é encontrada em plantas, principalmente da família Poaceae. Sendo as avenantramidas compostos fenólicos mistos, derivados tanto da rota do Trp, como da fenilalanina (Phe) (Kang *et al.*, 2007). Neste trabalho, através da análise de RNA-seq realizado em plântulas de URS 21 foram obtidas duas sequências similares a sequências de arroz relacionadas à triptofano sintase, quando inoculadas com esporos de ferrugem da folha, e ambas as sequências foram induzidas (Figura 44). Estes resultados indicam que é necessário um aumento de produção de Trp quando plântulas de URS 21 são submetidas a *P. coronata* f. sp. *avenae* e que, mesmo havendo a síntese deste aminoácido pela triptofano sintase, não há uma inibição das isoformas de *AS α* induzidas, também encontradas na análise de RNA-seq (Figura 45). Confirmando a hipótese de que existem diferentes isoformas de *AS α* em aveia, já que a síntese de triptofano não inibiu a atividade de *AS α* através do controle de *feedback* por Trp. Além disso, estes dados em conjunto evidenciam a importância da síntese de compostos tóxicos via a rota do triptofano na resposta de defesa de URS 21 ao agente causal da ferrugem da folha.

A concentração de compostos fenólicos em plantas adultas de URS 21 foi maior em 24, 48 e 72 hai, comparado com 0 ou 6 hai, coincidindo parcialmente com o aumento na expressão do gene *hidroxiantranilato hidrocicinamioltransferase 1* (*AsHHT1*), que participa da rota de formação de avenantramidas. A expressão desse gene foi aumentando, gradualmente, de 24 a 72 hai, mantendo-se constante em 120 hai. Já em plântulas de URS 21 houve coincidência do aumento da produção de

compostos fenólicos totais em 24 hai (Figura 7-A) com a maior expressão de três sequências similares ao gene *hidroxiantranilato hidroxicinamoil transferase 3* de arroz em 12 hai, comparado ao tratamento não inoculado (Figura 45). Comparações da expressão de genes associados à síntese de compostos fenólicos com a concentração de compostos fenólicos totais em plântulas de URS 21, inoculadas com ferrugem da folha, não são possíveis em tempos superiores a 24 hai. Isto em virtude das análises de RNA-seq terem utilizado somente amostras de plântulas as 12 hai, enquanto a análise de PCR Tempo Real utilizou amostras de tecidos de plantas adultas. Já em plantas adultas de URS 22 não foi, praticamente, detectada a expressão de *AsHHT1* depois de 6 hai (Figura 23). Embora em 0 e 6 hai tenha sido encontrada a maior concentração inicial de compostos fenólicos totais em plantas de URS 22, exatamente quando foi detectada a expressão do gene *AsHHT1*. Porém, em 48 e 72 hai foram encontrados compostos fenólicos nas plantas de URS 22, mas não havia expressão do gene *AsHHT1*. Um argumento possível é que os compostos fenólicos detectados em 48 e 72 hai tenham sido produzidos anteriormente, quando ainda havia a expressão do gene *AsHHT1*, e a redução observada em 48 e 72 hai seria devido a degradação desses compostos fenólicos. Porém, há indícios que esse pode não ser o caso, e que outra rota metabólica seja responsável pela produção de compostos fenólicos em plantas adultas de URS 22, pois a concentração de compostos fenólicos elevou-se acentuadamente em 120 hai, e provavelmente está relacionada com a colonização do fungo e não a uma resposta de defesa da planta (Figura 7-B), não sendo detectada expressão do gene *AsHHT1* (Figura 23). Portanto, o gene *AsHHT1* pode ser importante na produção de compostos fenólicos em URS 21, conseqüentemente participando da formação de seu mecanismo de resistência, mas sem importância na produção de compostos fenólicos em URS 22. Dados com

diferentes genótipos de aveia com variada resistência à ferrugem da folha mostraram que em espiguetas de aveia, os níveis de avenantramidas e de atividade de HHT foram mais elevados em genótipos resistentes ao fungo. Entretanto, os ácidos *p*-cumárico e cafeico foram mais abundantes em genótipos suscetíveis. Quando folhas foram analisadas, avenantramidas não foram associadas com a resistência. Além disso, dois compostos não conhecidos foram correlacionados negativamente com a doença. Fenóis liberados pela hidrólise e atividade de PAL e PPO não foram relacionados à infecção com ferrugem da folha, nem em espiguetas, nem em folhas (Dimberg & Peterson, 2009). Isto indica que há a formação de diferentes grupos de compostos fenólicos, tanto em plantas resistentes como em suscetíveis, explicando a elevada produção de fenólicos totais em URS 22 em 120 hai.

A produção de compostos fenólicos totais em URS 21 pode não refletir a produção de avenantramidas, sendo que não houve medição destes compostos no presente trabalho. De qualquer forma, como escrito acima, a expressão do gene *AsHHT1*, envolvido na produção de avenantramidas, não coincidiu com a maior produção de compostos fenólicos de plantas de URS 21 inoculadas com ferrugem da folha. O papel do gene *AsHHT1* na produção de avenantramidas ocorre, provavelmente, pela catalisação a N-acilação de hidroxiantranilato com vários hidroxicinamoil-CoA para formar avenantramidas, como é observado *in vitro* (Ishihara *et al.*, 1997, Ishihara *et al.*, 1999a).

Yang *et al.*, (2004) através do *screening* de bibliotecas de cDNA de aveia identificaram quatro isoenzimas para o gene *HHT*, denominadas de *HHT1* a *HHT4*. *HHT1* a *HHT3* apresentam cerca de 97% de identidade na região codificante. Entretanto, *HHT4* apresentou uma sequência truncada na região 5' e identidade de 75% com os demais cDNAs, podendo ser outra isoforma da enzima.

O outro gene envolvido na síntese de avenantramidas e cuja expressão foi avaliada em plantas adultas de URS 21 foi *cafeoil-CoA3-O-metiltransferase* (*CCoAOMT*). As avenantramidas são sintetizadas a partir da condensação de antranilato e cinamoil-CoA tioesteres (Ishihara *et al.*, 1997, Ishihara *et al.*, 1999a). O doador acil e hidroxicinamoil-CoA são intermediários na rota dos fenilpropanóides (Dixon & Paiva, 1995; Douglas, 1996). Avenantramida parece ser formada diretamente de N-acilação de 5-hidroxiantranilato com feruloil-CoA, que é doador de acil para a HHT *in vitro* (Ishihara *et al.*, 1997). Sob condições de estresse, feruloil-CoA pode ser formada igualmente pela metilação de cafeoil-CoA catalisada por cafeoil-CoA 3-O-metiltransferase (*CCoAOMT*) (Pakusch *et al.*, 1989; Matern *et al.*, 1995). Assim como para *AsHHT1*, também não foi verificada concordância do aumento da expressão do gene *CCoAOMT* (Figura 24), que ocorreu em 48 e 120 hai, com a maior produção de compostos fenólicos totais de plantas adultas de URS 21 observada entre 24 e 72 hai (Figura 7-B). Por outro lado, o padrão de expressão do gene *CCoAOMT* parece estar associado com o padrão de produção de compostos fenólicos totais de URS 22, em resposta à ferrugem da folha, com redução da expressão desse genes de 6 a 72 hai e aumento em 120 hai (Figura 24), mesmo tempo de aumento da concentração de compostos fenólicos totais em plantas adultas de URS 22 (Figura 7-B).

Investigações prévias têm relatado que a produção de fitoalexinas está correlacionada com a expressão de genes de resistência e é efetiva na prevenção da ferrugem da folha em aveia (Mayama *et al.*, 1982). Durante a interação compatível e incompatível entre aveia e ferrugem da folha, encontrou-se, na interação incompatível, correlação entre o padrão de expressão dos genes *AsHHT1* e *AsCCoAOMT* e o acúmulo de avenantramidas, sugerindo que *AsHHT1* e *AsCCoAOMT* ativam a síntese de

avenantramidas, restringindo o desenvolvimento do fungo (Yang *et al.*, 2004). Entretanto, na interação compatível houve um baixo acúmulo de fitoalexina, embora a expressão dos genes *AsHHT1* e *AsCCoAOMT* tenha sido fortemente induzida após 24 hai. Baseado nos resultados obtidos por Yang *et al.* (2004), pode-se supor que realmente não houve síntese de avenantramidas em URS 22, podendo ser outros compostos fenólicos sintetizados em 120 hai e, que mesmo havendo a expressão de genes envolvidos na síntese de avenantramidas (AS) o acúmulo do composto na interação compatível pode ser bloqueado em um ou mais processos pós-transcricionais, indicando que o acúmulo de fitoalexinas após a infecção não é meramente dependente da ativação transcricional destes genes em aveia.

Células de aveia permanecem vivas até estágios avançados de infecção com parasitas obrigatórios compatíveis, e fitoalexinas podem ser catalisadas por degradação simultânea como uma resposta metabólica para remover compostos tóxicos das células (Yao *et al.*, 2002). Tal mecanismo poderia estar ocorrendo em URS 22 quando inoculada com *P. coronata* f. sp. *avenae*, o que explicaria a produção de compostos fenólicos nesta cultivar não estar relacionada com um mecanismo de defesa e sim com a colonização do fungo.

Fitoalexinas derivadas do antranilato apresentam um importante papel na resistência à ferrugem da folha em aveia. A resistência está relacionada com a toxicidade, local, tempo e concentração de acúmulo da fitoalexina no tecido infectado em relação à restrição do desenvolvimento do fungo (Mayama *et al.*, 1982; Miyagawa *et al.*, 1996; Niemann, 1994). Além disso, a produção de fitoalexinas em folhas de aveia tem sido relatada como diretamente proporcional ao grau de resistência que o genótipo apresenta contra a ferrugem da folha (Mayama *et al.*, 1982; Yang *et al.*, 2004).

Com o auxílio de hibridização *in situ* e técnicas imunológicas, tempos mais precisos e localização de proteínas e expressão dos genes podem ser determinados na planta infectada, levando a um melhor entendimento da função de acúmulo de avenantramidas em plantas com resistência parcial de aveia. Além disso, faz-se necessária a dosagem não somente de compostos fenólicos totais, mas também de avenantramidas. Outra alternativa seria a utilização das sequências obtidas a partir do RNA-seq para a projeção de *primers* e análise da expressão ao longo do tempo tanto em plântulas, como em plantas de URS 21 e URS 22.

Através das análises efetuadas neste trabalho, tanto em plântulas como em plantas do genótipo URS 21, foi possível verificar que compostos fenólicos são um importante mecanismo de resistência à ferrugem da folha em URS 21. Contudo, existe a possibilidade de ocorrência de outros fenólicos responsáveis pela resistência além das avenantramidas.

Pelas análises moleculares foi possível indicar que avenantramidas são importantes na resistência em URS 21, porém o tempo de atuação pode não ser o mesmo que o de outros compostos fenólicos (24 hai) (Figura 7). Isto foi evidenciado a partir das análises moleculares onde genes envolvidos na produção de avenantramidas foram induzidos (*AS*, triptofano sintase, *HHT* e *CCoAMT*) (Figuras 22 a 24 e 45 a 46). Estes dados sugerem que compostos fenólicos estruturais, além de compostos tóxicos ao fungo, façam parte do mecanismo da resistência parcial em aveia. Isto indica que a resistência à ferrugem da folha apresenta uma complexa resposta fisiológica e a síntese de avenantramidas é somente um componente.

Aveia, é uma exceção entre os cereais, pois apresenta compostos antifúngicos pertencentes à classe dos metabólitos secundários conhecidos como saponinas (Takechi *et al.*, 1991). Saponinas são glicosídeos esteroidais ou triterpenóides que apresentam

propriedades antifúngicas, possuindo importante papel na proteção de plantas contra o ataque de patógenos. A atividade antifúngica de saponinas está associada com a sua capacidade para formar complexos com esteróis da membrana de fungos, causando a formação de poros e a perda de integridade de membranas, apresentando capacidade relativamente não específica (Osboum, 1996). Alguns fungos patogênicos produzem enzimas hidrolíticas que detoxificam saponinas pela remoção da molécula de açúcar (Osboum, 1996). Algumas destas enzimas têm sido isoladas e caracterizadas (Osboum *et al.*, 1991; Osboum *et al.*, 1995; Lairini *et al.*, 1996).

Assim, neste trabalho foi analisada a síntese de saponinas esteroidais ao longo do tempo, em plantas adultas de aveia das cultivares URS 21 e URS 22 inoculadas com *P. coronata* f. sp. *avenae*. Foi observado um incremento na concentração do composto até 72 hai em URS 21 (Figura 8), em 120 hai a concentração de saponina se manteve elevada, contudo foi 3,5 vezes menor que a concentração obtida em 72 hai. Em plantas suscetíveis (URS 22) houve um incremento na concentração de saponinas em 48 hai, porém, a concentração máxima obtida foi um sétimo da encontrada na cultivar URS 21 (Figura 8). Estes resultados evidenciam a importância de saponinas esteroidais no mecanismo de resistência parcial à ferrugem da folha em plantas adultas de URS 21.

Um passo-chave para a síntese de esteróis em plantas envolve a ciclização de 2,3-oxidoesqualeno para cicloartenol, mediada pela cicloartenol sintase (AsCS) (Wubben *et al.*, 1996). AsCS é uma enzima chave na produção de saponinas esteroidais, avenacosides, compostos secundários de grande relevância na interação entre aveia-ferrugem da folha, assim como os compostos fenólicos. O gene AsCS apresentou aumento da expressão após a inoculação de plantas de URS 21 com o fungo. Em 6 hai foi obtida a maior expressão relativa. Após 6 hai houve um decréscimo da expressão desse gene ao longo do tempo, porém a expressão manteve-se muito superior a

observada antes da inoculação (Figura 25). Provavelmente um maior aumento inicial da expressão de *AsCS* seja necessário para a ativação de outros genes envolvidos na rota de síntese de avenacosides, o que levaria a um aumento mais tardio deste composto, necessário para a defesa em URS 21. A expressão de *AsCS*, em URS 22, também aumentou após a inoculação, entretanto, a indução foi muito inferior a encontrada na cultivar com resistência parcial após a inoculação (Figura 25), coincidindo com o pequeno aumento de concentração das saponinas esteroidais neste genótipo (Figura 8).

Estes resultados indicam que o aumento na síntese de *AsCS* acarreta um aumento da síntese de saponinas esteroidais e que provavelmente são do tipo avenacoside. O aumento de expressão deste gene em URS 22 foi inferior, mas também elevado, o que pode indicar que somente altas expressões iniciais de *AsCS* acarretam elevada síntese de saponinas esteroidais ou deve haver algum tipo de regulação pós-transcricional ou até mesmo a degradação do composto em URS 22.

Quando foi analisado o transcriptoma de plântulas de URS 21, inoculadas com *P. coronata* f. sp. *avenae*, foi possível encontrar diversas sequências envolvidas com a produção de avenacosides, e repressão de sequências envolvidas na síntese de saponinas terpenóides (avenacinas), sintetizadas nas raízes e relacionadas com a resistência a patógenos de raiz (Figura 48). Estes resultados indicam uma competição na produção dos tipos de compostos. O que corrobora os trabalhos que evidenciam a síntese de avenacinas nas raízes, responsáveis pela inibição de *Gaeumannomyces graminis* em aveia (Turk, 2005), e de saponinas esteroidais do tipo avenacosides A e B em folhas. Estas avenacosides podem ser convertidas aos compostos antifúngicos, 26-desglucoavenacoside A (26-DGA) e 26-desglucoavenacoside B (26-DGB), quando as plantas de aveia são atacadas por patógenos e assim estarem envolvidos no mecanismo de defesa (Wubben *et al.*, 1996).

Assim, com estas sequências obtidas a partir do RNA-seq envolvidas na síntese de saponinas esteroidais e terpenóides pode-se projetar *primers* e analisar a expressão destes genes através de PCR Tempo Real, ao longo do tempo, em plântulas e em plantas de URS 21 e URS 22, possibilitando um melhor entendimento da rota de síntese deste composto. Outra possibilidade seria avaliar o tempo em que avenacosides são convertidas aos compostos antifúngicos, 26-desglucoavenacoside A (26-DGA) e 26-desglucoavenacoside B (26-DGB), obtendo dados mais precisos do momento em que as saponinas esteroidais estão atuando na morte do fungo.

Portanto, através da dosagem de saponinas esteroidais é possível afirmar que este composto possui papel antifúngico na resistência parcial à ferrugem da folha em plantas de URS 21 (Figura 8). Além disso, através da análise de expressão gênica e transcriptômica, é possível indicar que houve síntese de saponinas esteroidais do tipo avenacosides tanto em plântulas, como em plantas de URS 21 (Figuras 24 e 48). A partir destes resultados pode-se sugerir que a produção de saponinas esteroidais é um dos mecanismos centrais envolvidos na resistência parcial à ferrugem da folha em URS 21.

Uma das principais diferenças entre plantas suscetíveis e resistentes é o tempo que levam para reconhecer o patógeno e ativar as respostas de defesa. No caso de plantas resistentes o reconhecimento é rápido e pode ativar uma série de genes de defesa, a fim de impedir a colonização dos tecidos. Nas plantas suscetíveis a resposta é mais lenta e menos intensa, incapaz de restringir o crescimento do patógeno (Manickavelu *et al.*, 2010).

Uma das respostas iniciais de defesa da planta é a produção de ROS, após o reconhecimento do patógeno (Bolwell & Daud, 2009). Duas fases distintas de produção de ROS podem ser identificadas durante as interações patógeno-hospedeiro. A primeira

ocorre logo após o contato do fungo com a planta tanto em plantas resistentes quanto em suscetíveis (Manickavelu *et al.*, 2010). Nesta fase, ROS servem como moléculas sinalizadoras que fazem parte da cascata que resulta da ativação da defesa da planta (Lamb & Dixon, 1997). Contudo, quando foi avaliada a produção de H_2O_2 neste trabalho, a exceção do genótipo URS 22 que apresentou um acréscimo inicial (6 hai) na produção desta, esta molécula parece não estar envolvida no processo de sinalização de defesa (Figura 9). Entretanto, não se pode afirmar categoricamente, pois não foram efetuadas análises anteriores a 6 hai, e, geralmente em genótipos resistentes, a sinalização ocorre logo após a inoculação.

A segunda fase, chamada de explosão oxidativa, ocorre somente em plantas resistentes, algumas horas após o contato com o patógeno (Manickavelu *et al.*, 2010). Esta fase apresenta atividade antimicrobiana, inibindo a germinação dos esporos de muitos fungos fitopatogênicos (Peng & Kuc, 1992). Entretanto, neste trabalho não foi possível afirmar que houve uma explosão oxidativa nos genótipos resistentes nos tempo avaliados, sugerindo que a produção de peróxido não tem uma relação direta com a morte do fungo e a resistência de plântulas de aveia parcialmente ou totalmente resistentes à ferrugem da folha.

Porém, a concentração de ROS resulta de um dinâmico equilíbrio entre taxas de produção e remoção destas moléculas. As plantas apresentam mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de detoxificação de ROS. Superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação de $O_2^{\bullet-}$ para H_2O_2 , catalase (CAT) transforma H_2O_2 em oxigênio e água e ascorbato peroxidase (APX) reduz H_2O_2 a água através da utilização do ascorbato como doador de elétrons. Diferentemente da APX, a peroxidase (POX) não usa ascorbato como doador direto de elétrons, mas oxida moléculas, principalmente de natureza fenólica. O balanço entre SOD, APX ou CAT nas células é crucial para determinar o

nível de ROS nas células (De Gara *et al.*, 2003). O redox dos metabólitos ascorbato e glutathiona também protege as células contra danos induzidos por ROS, pela direta remoção das espécies reativas ou pelo bloqueio das reações oxidativas desencadeadas por ROS (De Gara *et al.*, 2003). Além disso, tem sido proposto que compostos fenólicos, principalmente flavonóis e ácidos hidroxicinâmicos podem ser oxidados por peroxidases que capturam peróxido pelo sistema ácido ascórbico/fenólicos/peroxidase (Takahama, 2004). Alguns fenilpropanóides (hidroxicinamoil alcoóis) são constituintes de ligninas e estes fenólicos são oxidados através de peroxidases durante a formação de lignina (Ralph *et al.*, 2004).

O aumento de peróxido (6 hai) coincidiu com o aumento da atividade enzimática de APX em plântulas suscetíveis de aveia do genótipo URS 22 inoculadas com *P. coronata* f. sp. *avenae* (Figura 10). Neste mesmo tempo, em plantas adultas de URS 22 houve aumento da expressão do gene APX (Figura 29), indicando que APX faz parte do mecanismo de detoxificação de ROS no genótipo URS 22, tanto em plântulas, como em plantas adultas. Em plântulas de URS 22 a enzima GR apresentou sua maior atividade em 48 hai (Figura 12). Na análise de plantas adultas da mesma cultivar houve o aumento de expressão da glutathiona peroxidase (GP) após a inoculação, sobretudo em 24 hai (Figura 31). Indicando que a glutathiona também faz parte do metabolismo de detoxificação de ROS em plântulas e plantas de URS 22. Contudo, a enzima CAT pareceu não estar envolvida neste processo, pois não houve aumento da atividade desta enzima após a inoculação com o fungo (Figura 11). Embora em plantas adultas houve um aumento de expressão relativa do gene que codifica CAT, principalmente em 24 hai (Figura 30). Assim, pode-se sugerir que APX e glutathiona estariam envolvidas no mecanismo de detoxificação de ROS em plântulas e plantas adultas deste genótipo,

porém CAT estaria envolvida somente nos mecanismos de detoxificação de ROS em plantas adultas do genótipo suscetível, URS 22.

Na análise da atividade das enzimas APX, CAT e GR em plântulas de aveia o genótipo URS 21 apresentou os menores níveis de atividade das enzimas em todos os tempos após a inoculação. Em URS 21, as 24 hai foi o tempo de menor atividade para as três enzimas avaliadas. Isto pode indicar que em URS 21 não houve estresse oxidativo em resposta à inoculação (Figuras 10-12).

Em plantas adultas de URS 21 foi verificado baixo nível de expressão relativa do gene que codifica APX (Figura 29). O que está de acordo com os achados para a atividade enzimática de APX, que indicaram não haver indução do estresse oxidativo (Figura 10). Além disso, o transcriptoma de plântulas mostrou repressão deste gene em URS 21 inoculada com *P. coronata* f. sp. *avenae* (Figura 51). Assim, tanto em plântulas como em plantas adultas de URS 21, APX parece não estar envolvida na detoxificação de ROS.

A expressão relativa por PCR Tempo Real em plantas de URS 21, com os *primers* CAT2 projetados a partir de sequências de *H. vulgare*, foi baixa (Figura 30), assim como a de APX (Figura 29), em URS 21. Contudo, para o genótipo URS 22 elevada expressão foi observada 24 hai (Figura 30). A baixa expressão do gene de CAT encontrada concorda com os baixos níveis de atividade enzimática obtidos para esta enzima em URS 21 (Figura 11). No entanto, no RNA-seq foram obtidas oito sequências similares ao gene de CAT, duas isoenzimas foram encontradas, as isoenzimas A e B, e ambas foram induzidas pelo estresse biótico em plântulas do genótipo com resistência parcial (Figura 52). Poderia-se sugerir como explicação para estes resultados contrastantes que o tempo 12 hai utilizado para a análise de transcriptômica não foi utilizado para as outras análises, que o estágio fenológico não foi o mesmo, pois para a

análise de RNA-seq foram utilizadas plântulas ou até mesmo que existem diferentes isoformas para CAT, contudo estes motivos não parecem ser o caso. Em arroz foi demonstrada a presença de diferentes formas da enzima. Foram encontrados três genes de CAT nucleares (*CatA*, *CatB* e *CatC*) que codificam cinco isoformas (Mondal *et al.*, 2007). Contudo, Skamnioti *et al.* (2007) trabalhando com a interação entre arroz e o fungo necrotrófico *Magnaporthe oryzae* verificaram que *CatB* é expresso pelo fungo, sequência que parece ser ortóloga as encontradas através do RNA-seq. O gene *CatB* apresentou um nível de expressão de 600x ao mesmo tempo em que ocorreu a penetração do fungo (Skamnioti *et al.*, 2007). Além disso, estes autores identificaram que o fungo mutante para este gene teve o seu crescimento afetado, sendo menos patogênico. Porém, não foram encontradas evidências que *CatB* está relacionada com a detoxificação de peróxido produzido pelo hospedeiro no sítio de penetração. Entretanto, foi encontrada uma relação com a atividade deste gene e o fortalecimento da parede celular do fungo, importante na penetração do fungo pela parede celular. Em *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, fungo biotrófico, também foi verificada a ação da catalase, coincidindo temporal e espacialmente com a invasão do fungo (Zhang *et al.*, 2004).

Estes resultados encontrados na literatura e acima citados permitem sugerir que as sequências induzidas de *CAT* encontradas na análise de RNA-seq são genes do fungo e são induzidos devido à atividade e invasão do fungo e não da atividade de gene da planta. O que explicaria o porquê não houve indução em resposta à inoculação quando a atividade desta enzima e a expressão relativa foram analisadas.

Estes resultados evidenciam a dificuldade de trabalhar com a interação entre plantas e organismos biotróficos, pois não se consegue isolar com facilidade o efeito do fungo do efeito da planta. O ideal seria além da análise da planta sem inoculação e planta inoculada, o cultivo de fungos em placa para isolar este fator; mas por serem

fungos que necessitam da planta viva para a colonização, é quase impossível através de meios de cultivo suprir todas as necessidades mimetizando o ambiente da planta para que estes se desenvolvam. Até o presente momento, somente um trabalho em trigo foi publicado onde houve sucesso no cultivo de esporos de *P. graminis* f. sp. *tritici*, responsável pela ferrugem do colmo, em meio líquido (Fasters *et al.*, 1993). Assim, uma alternativa para verificar se as sequências obtidas para *CAT* através do RNA-seq são da planta ou do fungo, seria através da projeção de *primers* específicos e análise do DNA da planta não inoculada.

Através da análise de atividade enzimática, GR parece não estar envolvida nos mecanismos de detoxificação de espécies reativas de oxigênio em plântulas de URS 21, pois houve um decréscimo após a inoculação (Figura 12). Porém, no transcriptoma de plântulas de URS 21 foram obtidas 61 sequências para genes de glutathione (Figura 53). Entre estas sequências foram encontradas nove para GR induzidas em URS 21 inoculada com o fungo (Figura 53). O que sugere haver algum tipo de controle pós-transcricional. Entretanto para confirmação, o ideal seria projetar *primers* a partir das sequências obtidas do transcriptoma e avaliar a expressão ao longo do tempo, além de verificar a atividade de diferentes isoformas de GR.

A expressão relativa de GP em plantas adultas de URS 21 aumentou em 6 hai; entretanto, foi menor do que a encontrada no genótipo suscetível (URS 22) no mesmo período. O gene de GP teve seu maior valor de expressão relativa 24 hai em URS 22. Valores elevados também foram verificados em 6 e 72 hai, seguido de 120 hai (Figura 31). Em plantas adultas de URS 21, GP também parece estar envolvida na detoxificação de ROS, pois foram encontradas duas sequências de GP induzidas, que não aparecem na figura 53 devido ao nível de expressão menor que cinco. A glutathione possui um papel central na resposta de defesa em plantas, alterações da glutathione oxidada, glutathione

dissulfeto (GSSG), induziriam o acúmulo de fitoalexinas (Stossel *et al.*, 1984; Guo *et al.*, 1993). Por outro lado, incremento de glutathione tem sido evidenciado em folhas inoculadas com patógenos biotróficos avirulentos (El-Zahaby, *et al.*, 1995; Fodor, *et al.*, 1997; Vanacker, *et al.*, 1999). Entretanto, não ficou evidenciado este papel central da glutathione na resistência à ferrugem da folha em aveia através das análises efetuadas no presente trabalho.

A dificuldade de relacionar as enzimas envolvidas na detoxificação de ROS em aveia com o estresse oxidativo pode ter ocorrido devido aos tempos utilizados para as análises. Além disso, foram usadas folhas inteiras, não somente o local da infecção, onde a resposta de defesa foi ativada, o que pode ter diluído o efeito. Trabalhos com glutathione têm mostrado que isso dificultaria o estabelecimento da glutathione como parte da resposta de defesa local ou se a resposta de defesa ocorre nas células adjacentes, visando limitar o estresse oxidativo. Em soja quando as plantas foram inoculadas com patógenos avirulentos houve um incremento na expressão de glutathione *S*-transferase e GP em células adjacentes à infecção (Levine *et al.*, 1994). Em folhas de cevada de genótipos resistentes inoculadas com oídio, o acúmulo de peróxido e oxidação da glutathione ocorreu em diferentes sítios e em diferentes tempos (Vanacker *et al.*, 2000). Diminuição de glutathione foi observada em tomate infectado com o fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* (Kuzniak & Sklodowska, 1999), assim como em aveia inoculada com fungos necrotróficos (Gonnen & Schlösser, 1993). Nestes casos, a diminuição de uma defesa antioxidante pode promover a penetração e colonização do fungo (Wingate *et al.*, 1988).

Assim, os dados obtidos neste trabalho indicam que em URS 21, APX, CAT e GR não fazem parte do mecanismo de defesa em URS 21. Além disso, não foi possível verificar um estresse oxidativo no mesmo genótipo. Contudo, através do RNA-seq

foram obtidas sequências de glutathione induzidas, o que pode indicar a presença de diferentes isoenzimas em URS 21 para estas enzimas. Desta forma, com os resultados obtidos a partir do transcriptoma de URS 21, novos *primers* podem ser projetados para diferentes tipos de enzimas envolvidas na detoxificação de ROS e verificar o efeito ao longo do tempo, mas não só em folhas inteiras, mas verificar se há diferença quando analisado no local da infecção e em células adjacentes, já que os trabalhos descritos para glutathione sugerem diferença no resultado das análises dependendo da proximidade com o local de infecção. Além disso, o ideal seria avaliar as diferentes isoenzimas de cada enzima estudada.

Lipoxigenases apresentam diversas funções no mecanismo de defesa de plantas, participando da síntese de diferentes compostos com função sinalizadora, antimicrobiana e de HR, através da peroxidação de lipídios (Porta & Rocha-Sosa, 2002). A partir da análise de expressão relativa do gene *Lox*, foi observado que para plantas do genótipo URS 22, não houve diferença significativa de expressão, antes e após a inoculação com o fungo. Porém, em URS 21 o gene teve maior expressão relativa em 6 e 48 hai (Figura 27). Indicando que, em plantas adultas com resistência parcial, URS 21, lipoxigenases participam do mecanismo de defesa à ferrugem da folha. Entretanto, parece que o mesmo mecanismo de defesa não é utilizado por plântulas do mesmo genótipo, pois no transcriptoma foram encontradas sequências *Lox*, contudo, todas as sequências foram reprimidas quando pela inoculação com *P. coronata* f. sp. *avenae* (Figura 55). Estes resultados sugerem este ser um mecanismo de resistência somente encontrado em plantas adultas de URS 21.

Ao contrário de *Lox*, através das diferentes análises realizadas neste trabalho foi possível observar que genes para peroxidase (*Pox*) possuem importante papel em URS 21 e parecem estar relacionados com a elevada concentração de compostos fenólicos

totais verificada em 24 hai nesta cultivar (Figura 7). A expressão relativa de *Pox* em plantas adultas, aumentou em URS 21, logo após a inoculação (6 hai), e manteve-se até 24 hai (Figura 28). Após este período a expressão voltou ao nível basal e a concentração dos compostos fenólicos dosados diminuiu consideravelmente em plântulas (Figura 7-A), mas não em plantas adultas desta cultivar (Figura 7-B). Maiores valores da expressão relativa de *Pox* também foram encontrados em 6 e 24 hai para a cultivar suscetível (URS 22) (Figura 28), também refletindo em elevadas concentrações de fenólicos totais nestes períodos no genótipo suscetível (Figura 7). A ação de peroxidases dificulta a penetração de microrganismos devido ao fortalecimento da parede celular, pela catalisação intra e intermolecular entre componentes estruturais da parede celular e polimerização de ligninas a partir da oxidação de hidroxilas de grupos fenólicos, estando assim envolvida na resistência de plantas (Pascholati & Leite, 1995; Ralph *et al.*, 2004). Atravé do RNA-seq, em plântulas de URS 21, foram encontradas 41 sequências para *Pox*. Destas, 27 foram induzidas pela inoculação com o fungo, tendo uma das sequências o maior valor de nível de expressão encontrado, 1.722 (Figura 54). Assim, através dos resultados obtidos em plântulas e plantas é possível afirmar que peroxidases possuem um relevante papel na resistência parcial de URS 21 na defesa ao fungo *P. coronata* f. sp. *avenae*.

Além disso, foi verificada forte coloração, através do corante DAB, das células da epiderme de plântulas do genótipo URS 21 inoculadas com o agente causal da ferrugem da folha em 24 hai; isto se deve a produção de H_2O_2 , indicativo da ação de peroxidases (Figura 17) e pode estar relacionada com a elevada produção de compostos fenólicos no mesmo período (Figura 7). Assim, pode-se sugerir que, em URS 21, em 24 hai, grande parte dos compostos fenólicos seriam sintetizados na epiderme e estes poderiam ser do tipo estrutural, como ligninas, que dificultariam a penetração do fungo.

Além disso, isto explicaria porquê não houve aumento de H_2O_2 após a inoculação (Figura 9), estes seriam consumidos na peroxidação de compostos fenólicos, como na lignificação e não pela detoxificação através das enzimas APX, CAT e GR (Figura 10-12).

Graichen (2009), através da análise histológica de lignina, verificou a deposição deste composto em células colapsadas de URS 21, mas não dos genótipos suscetíveis. Contudo, neste trabalho não houve visualização de lignina na epiderme das folhas, mas as análises foram realizadas somente nos tempos 48 e 120 hai.

Existem evidências que os compostos fenólicos envolvidos no fortalecimento de paredes celulares são exclusivamente derivados da fenilalanina, via a rota dos fenilpropanóides (Dixon & Paiva, 1995). Assim, o metabolismo gerado a partir deste aminoácido apresenta um papel químico e físico importante no sistema de defesa de plantas (Ishihara *et al.*, 2008), o que explicaria a obtenção no transcriptoma de sequências de fenilalanina amônia liase (PAL) com elevada expressão em plântulas de URS 21 inoculadas com ferrugem da folha. Há também utilização deste aminoácido para a síntese de compostos fenólicos mistos, como as avenantramidas.

Em plântulas suscetíveis (URS 22 e Clintlad 64) e na planta com resistência total (Leggett) não foi observada a coloração marrom (DAB) indicativo da ação de peroxidases nas células da epiderme. Indicando que na cultivar Leggett, o mecanismo de resistência não envolve o fortalecimento de paredes celulares.

A partir de 24 hai em todas as cultivares ocorreu o acúmulo de H_2O_2 nas células do mesófilo, entretanto, com coloração mais intensa nos genótipos suscetíveis (URS 22 e Clintland 64) (Figura 16). Estes resultados evidenciam uma explosão oxidativa localizada nas células do mesófilo, que provavelmente está relacionada com a morte do fungo nas plantas resistentes e com a colonização do fungo nas plantas suscetíveis.

Através da coloração NTB foi possível verificar no genótipo suscetível Clintland 64, a partir de 6 hai a coloração azul nos ASE. Indicando que a produção de $O_2^{\bullet-}$ pelo fungo durante a formação do apressório é um componente importante da suscetibilidade no genótipo Clintland 64 (Figura 19). Além disso, sugere que as sequências de *CatB* induzidas encontradas através do RNA-seq de URS 21 (Figura 52) são mesmo sequências gênicas de *P. coronata* f. sp. *avenae*.

Sequências para outras enzimas envolvidas na detoxificação de ROS, além de *CatB*, podem ter sido sequenciadas, porém não identificadas. Estes resultados em conjunto, indicam que um mecanismo importante de patogenicidade em *P. coronata* f. sp. *avenae* é a produção de ROS e poderia estar relacionada com o fortalecimento da parede celular do fungo e infecção em Clintland 64. Entretanto, nas demais cultivares estudadas, o fortalecimento da parede celular do fungo não foi verificado, devido a resposta de defesa das plantas.

O acúmulo de polímeros fenólicos é histoquimicamente associado com a autofluorescência das paredes celulares (Beardmore *et al.*, 1983; Menden *et al.*, 2007). Estudos em genótipos resistentes de trigo (*Triticum aestivum*) atacados por *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* mostram que a HR é acompanhada do acúmulo de material autofluorescente (Beardmore *et al.*, 1983). A análise do conteúdo de monolignol nas paredes das células indica que o material autofluorescente é rico em lignina do tipo siringil (Menden *et al.*, 2007). Em arroz (*Oryza sativa*), a indução de material autofluorescente como lignina é relacionado com a resistência específica à raça contra *Xanthomonas oryzae* (Reimers & Leach, 1991). Além disso, mudança histoquímica típica detectada imediatamente ao redor da infecção é a deposição de material marrom (Toyoda *et al.*, 1978). Na interação entre arroz e *Magnaporthe grisea*, uma boa correlação tem sido observada entre as taxas de acúmulo de material marrom e a

resistência contra o patógeno (Langcake & Wickins, 1975). A formação desse material também tem sido induzida pela infecção com *X. oryzae*, onde o patógeno foi observado confinado na área marrom necrótica (Kaku & Hori, 1977). Assim, o acúmulo de material marrom tem sido considerado como parte da resposta de defesa em arroz. Embora estes materiais tenham sido geralmente propostos como polímeros fenólicos, sua precisa composição não é clara (Ishihara *et al.*, 2008).

A autofluorescência em células do mesófilo pode estar associada com a morte celular, com a lignificação e com a formação de papilas (Moerschbacher *et al.*, 1990; Rojas-Molina *et al.*, 2007; Bozkurt *et al.*, 2010). Wesp (2011), estudando a interação trigo-ferrugem da folha, verificou alta correlação entre a presença de compostos autofluorescentes e o acúmulo de ROS em plântulas e, entre a presença de compostos autofluorescentes e morte celular em plantas adultas. Graichen (2009) relacionou o acúmulo de compostos fenólicos e morte celular ao impedimento do desenvolvimento de colônias em plântulas da cultivar URS 21, observando uma proporção de colônias com morte celular superior a 60 %. No mesmo trabalho, a avaliação de células autofluorescentes apresentou resultados similares à coloração com *o*-toluidina para compostos fenólicos. Quando a avaliação foi realizada em 48 hai, somente um pequeno número de colônias apresentava células autofluorescentes, com exceção ao genótipo Pc68/5*Starter que possui resistência total, onde cerca de 80 % das colônias apresentavam esta característica. A avaliação em 120 hai indicou que não houve acréscimo na proporção de colônias associadas com o acúmulo de compostos fenólicos no genótipo URS 22 enquanto havia um elevado aumento para URS 21 (Graichen, 2009).

Neste trabalho, a presença de células autofluorescentes oriundas da presença de compostos fenólicos, devido à morte celular, somente foi evidenciada nos genótipos

resistentes (URS 21 e Leggett) a partir de 48 hai. Entretanto, pode-se observar uma grande diferença de fluorescência nos dois genótipos, sendo a fluorescência muito mais intensa em URS 21 (Figura 20). Dois padrões de produção de compostos autofluorescentes podem ser distinguidos relacionados com o acúmulo de compostos fenólicos nas paredes das células ou em toda a célula (Southerton & Deverall, 1990; Tiburzy & Reisener, 1990; Stadnik & Buchenauer, 1999). Através das análises deste trabalho foi verificado que quando houve fluorescência nos genótipos resistentes, esta foi encontrada nas paredes das células. Os genótipos suscetíveis de aveia (URS 22 e Clintland 64) não apresentaram células autofluorescentes quando inoculados com o fungo (Figura 20). Porém, Graichen (2009) demonstrou haver a formação de compostos autofluorescentes em URS 22. Contudo, cerca de um quarto das colônias deste genótipo não apresentou a formação destas células.

Na análise de células autofluorescentes também foi verificada fluorescência nos feixes vasculares, estômatos e tricomas de todos os genótipos estudados (Figura 20). O mesmo ocorreu quando Graichen (2011) avaliou diferentes genótipos suscetíveis e resistentes à ferrugem da folha, onde feixes vasculares, tricomas e células-guarda apresentaram autofluorescência na mesma cor das células autofluorescentes do mesófilo. Os uredósporos de *Puccinia coronata* f.sp. *avenae* depositados sobre as folhas ou produzidos no interior do hospedeiro apresentaram-se autofluorescentes, porém com menor intensidade que as células do hospedeiro. Os tubos germinativos e apressórios foram fracamente fluorescentes.

Wesp (2011) propõe a escolha de horários mais avançados do processo infectivo, posteriores a 24 hai, para a otimização das avaliações histopatológicas. Indicando o tempo de 48 hai para evidenciar reações de resistência como morte celular, acúmulo de compostos autofluorescentes e peróxido de hidrogênio, sendo que avaliações anteriores

a 48 hai poderiam subestimar as reações de resistência. Além disto, neste horário também foi possível avaliar os eventos pré-haustoriais de resistência, que ocorrem nas fases iniciais do processo infectivo.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, foi verificado que a síntese de celulose pode não ser importante nos mecanismos da resistência parcial em plântulas do genótipo URS 21, mas sim nos estágios iniciais de infecção em plantas adultas. Isto foi evidenciado pela elevada expressão relativa do gene que codifica a enzima celulose sintase em plantas adultas de aveia, em 6 hai em URS 21 (Figura 26). A expressão se manteve elevada em 24 hai, mas voltou a níveis basais após este período. Entretanto, no transcriptoma de plântulas de URS 21 foi observada repressão da maior parte dos genes de celulose sintase encontrados (Figura 49).

Clorofilas e carotenóides também parecem não ser afetados nas respostas de resistência parcial, pois não foi possível observar relação direta com a resistência à ferrugem da folha em aveia, pelo menos nos estágios iniciais da infecção. Além disso, não pôde ser relacionado com nenhum outro parâmetro estudado. Entretanto, a partir da dosagem do conteúdo de clorofila total e carotenóides, foi possível verificar que o padrão observado para estes pigmentos se manteve, podendo haver uma tendência dos genótipos resistentes terem um maior conteúdo de pigmentos (Figuras 13 e 14). Provavelmente, nos genótipos suscetíveis o fato de haver o aparecimento das primeiras pústulas em 10 dpi diminui a área fotossintética da planta. Contudo, o menor número de pústulas formadas no genótipo com resistência parcial URS 21, parece não afetar a quantidade de clorofila. Além disso, carotenóides podem ter um papel indireto na defesa, já que são pigmentos antioxidantes.

Estudos da expressão diferencial de genes em interações compatíveis e incompatíveis entre patógenos e hospedeiros têm revelado que a expressão de genes de

defesa nas plantas resistentes ocorre de forma mais rápida e intensa do que em plantas suscetíveis. Muitos genes que são ativos em resposta a estresse biótico também são ativados em resposta a estresse abiótico (Glombitza *et al.*, 2004). Isto sugere que provavelmente a especificidade de resposta pode estar relacionada aos primeiros genes ativados após o contato do patógeno com o hospedeiro, induzindo diferenças nas respostas e no tempo (Li *et al.*, 2006; Rampitsch *et al.*, 2006; Manickavelu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Bischof *et al.*; 2011). Neste trabalho foi mostrado, através da análise de RNA-seq, que diversas sequências obtidas na resistência parcial já foram relatadas na resistência total de plantas, como genes de reconhecimento, sinalização e proteínas PR (Figuras 33-57). Bozkurt *et al.* (2010) compararam os transcritos envolvidos nas respostas de resistência à *P. striiformis* f. sp. *tritici* em trigo mediados pelos genes *Yr1* e *Yr5* (específicos à raças) e *Yr39* (de planta adulta, não específico à raças), verificaram que há baixa frequência de transcritos comuns entre estes genes. Os transcritos comuns restringiram-se aos genes de proteínas PR e genes clássicos relacionados à defesa, evidenciando que as plantas possuem uma variedade de rotas para se defender de patógenos. Nas plantas com resistência parcial, conferida pelos genes *Lr34* e *Yr39*, parece haver a indução de respostas mais amplas do que nos casos de resistência raça específica. Esta maior amplitude de respostas de defesa pode ser a causa da durabilidade da resistência quantitativa (Bolton *et al.*, 2008; Coram *et al.*, 2008). Contudo, neste trabalho não foram efetuadas análises moleculares em plantas de genótipos com resistência total, assim não se pode fazer esta afirmação. Porém, o número de sequências obtidas pelo RNA-seq foi muito grande, foram obtidos 33.418 *contigs* que apresentaram diferença significativa de expressão entre plântulas de URS 21 inoculadas e não inoculadas com o fungo (Figura 32). O que indica que os mecanismos de resistência parcial são bastante complexos.

A montagem do genoma de aveia cultivada é especialmente complicada, pois existe homeologia parcial, numerosos rearranjos cromossômicos e duplicação de sequências em *cis* e *trans* dentro do genoma. Pesquisas em aveia são também prejudicadas pela carência de informação de sequência de DNA. O *GeDABank* possui apenas alguns milhares de ESTs de aveia, a maioria dos quais são de um número limitado de genótipos e tecidos (Oliver *et al.*, 2011a; Oliver *et al.*, 2011b). O advento de métodos baseados em sequenciamento de alto rendimento tem modificado a forma que o transcriptoma tem sido estudado. O RNA-seq envolve o direto sequenciamento de DNAs complementares (cDNAs). Isto possibilita um maior entendimento sobre a complexidade do transcriptoma eucarioto e permite a sua aplicação na seleção de plantas com características agronômicas de interesse (Nagalakshmi *et al.*, 2010).

Até o momento, pouco se sabe sobre a resistência parcial à ferrugem da folha em aveia, e não existem dados publicados onde tenha sido verificada a expressão diferencial de um grande número de genes em resposta à ferrugem da folha. Os mecanismos moleculares da interação planta-patógeno até então vinham sendo principalmente estudados, com exceção de alguns trabalhos em trigo (Kruger *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2005, Bozkurt *et al.*, 2010; Wietholter, *et al.*, 2010), em plantas diplóides e com resistência total. As principais espécies estudadas são arábido, tomate e arroz (Maleck *et al.*, 2000; Bittner-Eddy *et al.*, 2003; Martinez de Ilarduya *et al.*, 2003). Pouco se sabe dos mecanismos envolvidos na resistência de plantas poliplóides, e tampouco os mecanismos envolvidos na resistência parcial.

Desde 1990, vários esforços têm ocorrido na tentativa de desenvolver marcadores genéticos para a resistência à ferrugem da folha em aveia (Chen *et al.*, 2006). Penner *et al.* (1993) foram os primeiros a identificar marcadores moleculares associados com a resistência à ferrugem da folha. Marcadores do tipo RAPD (*Random*

Amplified Polymorphic DNA) foram obtidos para o gene *Pc68* em F3, derivado dos cruzamentos entre as linhagens ‘Makuru’*2//CAV4904/ 2*’SunII’ (com *Pc68*) e ‘Rodney O’ (sem *Pc68*). Outros marcadores como, SCAR (*Characterized Amplified Region*) (Koeyer *et al.* 2000) e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) (Chen *et al.*, 2006) para o gene *Pc68* foram identificados, considerando que *Pc68* é ligado a *Pg9*, um gene de resistência à ferrugem do colmo (Chong *et al.*, 1994). Entretanto, a utilização de marcadores é dependente da existência de polimorfismos entre os genótipos comparados, dificultando o uso de um simples marcador para todos os germoplasmas (Kulcheski *et al.*, 2010).

Além disso, a disponibilidade de marcadores genéticos para aveia é limitada devido ao seu imenso genoma hexaplóide (AACDD), que apresenta extensivas duplicações. Isso aumenta a dificuldade em desenvolver mapas de ligação, devido ao elevado número de famílias de multigenes nos cromossomos homólogos, homeólogos e parálogos, gerando um baixo nível de polimorfismo na população (Portyanko *et al.*, 2001; Wight *et al.*, 2003).

Recentemente, um mapa para a aveia cultivada foi gerado através de marcadores de alto rendimento, os DArT (*Diversity Array Technology*) (Tinker *et al.*, 2009). Entretanto, estes marcadores produzem polimorfismos dominantes que não permitem a discriminação de ambos os alelos em um *locus*. A falta de numerosos marcadores facilmente obtidos, e codominantes continua sendo uma barreira na pesquisa genética de aveia. A descoberta de SNPs no genoma inteiro é, portanto, uma prioridade para o avanço da pesquisa genética deste complexo genoma (Oliver *et al.*, 2011a).

Este trabalho visou conhecer o transcriptoma de URS 21 em resposta à ferrugem da folha, através da técnica de RNA-seq, para o melhor conhecimento deste patossistema. Os resultados obtidos através do RNA-seq possibilitam o estudo

molecular e o melhor conhecimento dos mecanismos de defesa envolvidos na resistência parcial em aveia. Além disso, em um futuro próximo poderá auxiliar na obtenção de marcadores moleculares funcionais específicos baseados em PCR que possibilitem a seleção mais rápida de genótipos de aveia possuidores de resistência parcial à ferrugem da folha. As sequências obtidas através da análise de RNA-seq ainda devem ser estudadas; verificada a função das sequências que não tiveram homologia em arroz. Porém, através dos resultados obtidos até agora, a partir de 311 milhões sequências de URS 21, sabe-se que 10.410 *contigs* foram induzidos em plântulas quando inoculadas com o fungo (Figura 32), evidenciando a complexidade da resistência parcial à ferrugem da folha em URS 21.

Outro trabalho recentemente foi publicado utilizando o RNA-seq em aveia, visando conhecer o polimorfismo entre cultivares. Assim, com base em bibliotecas de cDNA de quatro genótipos de aveia cultivadas, obtidas de embriões maduros, estruturas do pistilo, embriões estiolados, brotos e raízes, aproximadamente 127.000 *contigs* foram montados a partir de cerca de um milhão de sequências obtidas através de RNA-seq. A partir dos contigs gerados, foram selecionados marcadores SNP e utilizados para avaliar a diversidade genética de 34 genótipos de aveia. Portanto, foram descobertos SNPs de alto rendimento e que podem ser utilizados de forma rápida e eficaz para a identificação de alelos polimórficos no genoma de aveia (Oliver *et al.*, 2011b).

Portanto, até então não existiam outros relatos de trabalhos utilizando a técnica de RNA-seq para o estudo da resistência parcial à ferrugem da folha em aveia. Além das sequências envolvidas na produção de metabólitos secundários (Figuras 41 a 48) e estresse oxidativo (Figuras 51 a 55), através do estudo do transcriptoma foram verificadas sequências já relacionadas com a resistência em outros patossistemas, com

função de reconhecimento, transporte, regulação transcricional, morte celular e defesa (Figuras 33-57).

Sequências de *MACPF* (*Membrane Attack Complex Perforin*) foram encontradas no transcriptoma, todas as 12 sequências foram induzidas quando o fungo foi inoculado em URS 21 (Figura 37). Sugere-se que estas proteínas estejam envolvidas no processo de defesa de plantas e levariam a morte celular programada. Através do estudo de mutantes em arabisopsis, *cad1* e *nls1*, evidenciou-se que estes genes atuam no controle da morte celular programada mediada por ácido salicílico; provavelmente o gene *CAD* atue como mediador do reconhecimento do sinal da planta (Morita-Yamamuro *et al.*, 2005). Entretanto, o gene *NLS1* seria um regulador negativo da morte celular programada (Noutoshi, 2006). As proteínas *MACPF* facilitariam o transporte de metabólitos tóxicos, levando a produção de calose e produção de células fluorescentes no local da infecção (Morita-Yamamuro *et al.*, 2005; Noutoshi *et al.*, 2006).

A morte celular, como um importante mecanismo envolvido na resistência parcial em URS 21, foi observada na análise de células autofluorescentes relacionadas com a produção de fenólicos e morte celular a partir de 48 hai nos genótipos resistentes (Figura 20). Além disso, a morte celular no genótipo com resistência parcial, URS 21, foi mais acentuada se comparada com o genótipo que apresenta resistência total no mesmo período (Leggett). Muitos autores também relatam a ocorrência de morte celular em patossistemas envolvendo ferrugens e genótipos com resistência parcial, sugerindo que a resistência parcial pode apresentar um mecanismo de resistência similar ao da resistência raça específica, ao menos em nível ultraestrutural. As principais diferenças seriam a frequência e intensidade da morte celular. Em genótipos com resistência raça específica a morte celular seria imperceptível a olho nú, manifestando-se somente microscopicamente (Ma & Shang, 2004). Desta forma, sugere-se que as proteínas

MACPF estariam envolvidas neste processo, de transporte de fenólicos para o local de infecção, ocasionando a morte celular e o impedimento do desenvolvimento de *P. coronata* f. sp. *avenae* em URS 21.

Proteínas dependente de cálcio também seriam importantes para desencadear a morte celular programada (Lorrain *et al.*, 2003). Indução de 20 das 23 sequências dependentes de cálcio encontradas foi observada no transcriptoma. Somente quatro sequências tiveram a expressão reprimida em resposta à inoculação (Figura 34).

Em arábido *arabidopsis* as proteínas MACPF estariam envolvidas na produção de calose (Noutoshi *et al.*, 2006), no transcriptoma foi observada a indução de três dos seis genes envolvidos na síntese de calose, que promovem o fortalecimento das paredes celulares no local da infecção (Figura 50), o que indicaria que a formação de calose pode ser um processo envolvido na resistência parcial em URS 21.

Zambonato (2011) através de avaliações de severidade da ferrugem da folha em seis populações do cruzamento entre URS 21 e URS 22, nos anos de 2009 e 2010 e da determinação da área sob a curva de progresso da doença normalizada e corrigida (ASCPDNC), estimou o número de genes envolvidos na expressão do caráter resistência parcial à ferrugem da folha. Foi estimado que cinco *loci* controlam o caráter resistência parcial à ferrugem da folha em aveia (*loci* A, B, C, D e E), sendo que A e B possuem maior efeito e C, D e E menor efeito sobre o fenótipo. Além disso, o *locus* A representa um gene de suscetibilidade, sendo a resistência obtida de forma recessiva e este possui efeito controlador sobre os demais três *loci*.

Assim, o *locus* A recessivo, possivelmente seja um fator de suscetibilidade, e sua forma não funcional condicione a reação de resistência por não permitir que o produto oriundo deste gene seja produzido. Desta forma, o patógeno não conseguiria completar seu ciclo biológico e conduzir processos bioquímicos de maneira eficaz e ocasionar a

doença (Zambonato, 2011). Esses resultados corroboram os obtidos por Graichen (2009), que verificou que não há diferença estatística entre os genótipos resistentes e suscetíveis estudados, para a germinação dos uredósporos, diferenciação do apressório, vesículas subestomatais, hifas infectivas e haustórios, o que resulta no não impedimento do desenvolvimento das colônias. Assim, o impedimento do desenvolvimento do fungo estaria ocorrendo após a infecção do fungo, ou seja, com a não funcionalidade do *locus* A, não ocorreria a síntese de um produto gênico essencial ao ciclo de vida do patógeno, prejudicando o seu desenvolvimento. Por outro lado, quando o *locus* A está na forma heterozigota, apresentaria dominância parcial, dependendo da composição genotípica dos demais *loci*. Além disso, a presença de um alelo funcional permitiria a produção de pequena quantidade da proteína, fazendo com que a planta desenvolva sintomas e sinais da doença (Zambonato, 2011).

Estes resultados podem estar relacionados com a importância dos compostos fenólicos e saponinas na resistência parcial em URS 21, impedindo o desenvolvimento do fungo. Além de estarem envolvidos no mecanismo de morte celular localizada em URS 21. Portanto, sugere-se que as proteínas MACPF apresentem um papel central na resistência parcial à ferrugem da folha em URS 21, contribuindo facilitando o transporte de metabolitos tóxicos, levando a produção de calose e produção de células fluorescentes no local da infecção.

Entre as sequências encontradas no transcriptoma foi possível identificar sequências de genes NBS-LRRs, que codificam o tipo mais comum de proteínas R, responsáveis pelo reconhecimento de patógenos. Dentro das 12 sequências encontradas, três foram reprimidas quando URS 21 foi inoculada com *P. coronata* f. sp. *avenae* (Figura 33), sendo estas sequências reprimidas não responsáveis pelo reconhecimento de *P. coronata* f. sp. *avenae*, provavelmente relacionadas com o reconhecimento de

outro patógeno de aveia e que necessitam estar reprimidas para que haja o reconhecimento do agente causal da ferrugem da folha em URS 21.

Além disso cabe ressaltar a indução de transposons. Através da análise de RNA-seq foram encontradas 13 sequências significativamente expressas, das quais 10 foram induzidas em URS 21 inoculada com o fungo (Figura 38). O retrotransposon *OARE-1* de aveia tem sido bastante estudado e é ativado por infecções com *P. coronata* f.sp. *avenae*, porém somente expresso em interações incompatíveis. Em interações com *Magnaphorte grisea* e *Helminthosporium victoriae*, *OARE-1* foi ativo em interações compatíveis e incompatíveis, mas muito mais extensivamente em compatíveis. A diferença na ativação pode ser relacionada com a natureza destes fungos, *P. coronata* f.sp. *avenae* necessita de células vivas para sua sobrevivência, por isso evita estresse em tecido com interação compatível. Por outro lado, *M. grisea* e *H. victoria* podem crescer mesmo em tecido morto e podem causar estresse durante o curso da infecção (Kimura *et al.*, 2002). Grandbastien *et al.* (1997) argumentam que a possível ativação dos transposons nestas condições pode induzir uma reestruturação genômica na planta para aumentar as respostas a flutuações no ambiente, e para o transposon a ativação durante uma infecção compatível pode significar a possibilidade de sua transmissão horizontal para o patógeno e para um novo hospedeiro.

Graichen (2009) evidenciou que o desenvolvimento do fungo nos genótipos resistentes e suscetíveis analisados é muito similar, não havendo um mecanismo que impeça o desenvolvimento do fungo antes de 120 hai. O menor tamanho de colônias e pústulas nos genótipos resistentes devem ser consequência de eventos gerados posteriormente a esse horário. Entretanto, os dados obtidos neste trabalho não estão de acordo com esta afirmativa, foram evidenciados eventos importantes envolvidos com a resistência parcial à ferrugem da folha em URS 21 anteriores a 120 hai que são ativados

em URS 21 logo após a inoculação, como a produção de compostos fenólicos e saponinas esteroidais e a ativação das proteínas MACPF, que desencadeiam a morte celular e fortalecimento de paredes celulares. Além de peroxidases que parecem ter um papel importante no fortalecimento das paredes celulares da células da epiderme.

Assim, de posse do conhecimento gerado neste trabalho será possível verificar o padrão de expressão ao longo do tempo de um grande número de genes envolvidos na resistência parcial, identificar *loci* de características quantitativas, mas principalmente identificar genes candidatos que contribuam para a superioridade da característica em estudo.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, nas condições avaliadas, chegou-se às seguintes conclusões:

A produção de compostos fenólicos e saponinas são importantes mecanismos de resistência parcial à ferrugem da folha no genótipo URS 21; tendo as análises moleculares indicado a síntese de avenantramidas e avenacosides, compostos fenólicos e saponinas esteroidais, respectivamente.

Além da produção de compostos fenólicos totais, o aumento da expressão da enzima peroxidase e o acúmulo de peróxido na epiderme foliar de URS 21 sugerem a síntese de lignina, compostos fenólicos do tipo estrutural, em resposta à inoculação com *P. coronata* f. sp. *avenae*.

A morte celular em URS 21, em resposta à infecção pelo patógeno, apresentou maior abrangência de células, na região da infecção, do que no genótipo controle com resistência completa, mostrando ser diferente da morte celular observada em reação de hipersensibilidade, típica de resistência completa.

O tipo de resistência parcial de URS 21 parece não estar associado com o estresse oxidativo, uma vez que ascorbato peroxidase, catalase e glutathione redutase não tiveram sua expressão ou atividade aumentadas pela inoculação com o agente causal da ferrugem da folha.

O RNA-sequenciamento gerou milhares de sequências diferencialmente expressas, muitas das quais não se conhece a função. Das sequências com função

conhecida geradas pelo RNA-seq, muitas estão envolvidas nos metabolismo secundário, estresse oxidativo, regulação transcricional, transporte celular, morte celular e defesa. Através da análise do transcriptoma foram gerados dados informativos que podem ser utilizados para o melhor conhecimento do patossistema aveia-ferrugem da folha.

A partir dos dados obtidos pelo RNA-seq, pode-se sugerir que o gene *MACPF* (*Membrane Attack Complex Perforin*) seja um gene importante envolvido na resistência parcial à *P. coronata* f. sp. *avenae* em aveia.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. San Diego: Elsevier Academic, 2005. 922 p.
- ALLEN, E. A. et al. Appressorium formation in response to topographical signals in 27 rust species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, p. 323-331, 1991.
- ALLWOOD, J. W.; ELLIS, D. I.; GOODACRE, R. Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant–host interactions. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 132, p. 117-135, 2008.
- ARNALDOS, T. L. et al. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 113, p. 315-322, 2001.
- AZEVEDO, R. A. et al. Responses of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 280-292, 1998.
- BAR, M. et al. MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries. **Stem Cells**, Dayton, v. 26, p. 2496-2505, 2008.
- BARBOSA, M. M. **Genética e mapeamento molecular da resistência parcial à ferrugem da folha da aveia (*Avena sativa* L.)**. 2002. 113 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2002.
- BEARDMORE, J.; RIDE, J. P.; GRANGER, J. W. Cellular lignifications as a factor in the hypersensitive resistance of wheat to stem rust. **Plant Pathology**, London, v. 22, p. 209-220, 1983.
- BENNETT, S. et al. Toward the 1,000 dollars human genome. **Pharmacogenomics Journal**, London, v. 6, p. 373-382, 2005.
- BENT, A. F.; MACKEY, D. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 399-436, 2007.

BERTONE, P. et al. Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. **Science**, Lancaster, v. 306, p. 2242-2246, 2004.

BISCHOF, M.; EICHMANN, R.; HÜCKELHOVEN, R. Pathogenesis-associated transcriptional patterns in Triticeae. **Journal of Plant Physiology**, Leipzig, v. 168, p. 9-19, 2011.

BITTNER-EDDY, P. et al. Use of suppression subtractive hybridization to identify downy mildew genes expressed during infection of *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 4, p. 501-507, 2003.

BOLTON, M. D. et al. *Lr34*-mediated leaf rust resistance in wheat: transcript profiling reveals a high energetic demand supported by transient recruitment of multiple metabolic pathways. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 21, p. 1515-1527, 2008.

BOLWELL, G. P.; DAUDI, A. Reactive oxygen species in plant-pathogen interactions. In: DEL RÍO, L. A.; PUPPO, A. (Ed.). **Reactive oxygen species in plant signaling, (signaling and communication in plants)**. Berlin: Springer, 2009. p. 113-133.

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

BRAKE, V. M.; IRWIN, J. A. G. Partial resistance of oats to *P. coronata* f. sp. *avenae*. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 43, p. 1217-1227, 1992.

BROERS, L. H. M. Influence of development stage and host genotype on three components of partial resistance to leaf rust in spring wheat. **Euphytica**, Dordrecht, v. 44, n. 3, p. 187-195, 1989.

CAIERÃO, E. et al. Efeito de níveis de severidade e incidência da ferrugem-da-folha e ferrugem-do-colmo no rendimento de linhagens de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 43-53, 2001.

CAMERON, R. K.; DIXON, R. A.; LAMB, C. J. Biologically induced systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, Oxford, v. 5, p. 715-725, 1994.

CARELS, N.; BERNARDI, G. Two classes of genes in plants. **Genetics**, New York, v. 154, p. 1819-1825, 2000.

CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010.

CHAVES, M. S. et al. Efeito da ferrugem da folha sobre o rendimento e qualidade de grãos em genótipos elite de aveia. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA EM AVEIA, 22., 2002, Passo Fundo. **Resultados experimentais...** Passo Fundo, 2002. p. 463-470.

- CHAVES, M. S. et al. The cereal rusts: an overview. **Pest Technology**, Takamatsu, v. 2, n. 2, p. 38-55, 2008.
- CHAVES, M. S.; MARTINELLI, J. A.; FEDERIZZI, L. C. Resistência quantitativa à ferrugem da folha em genótipos de aveia branca: I – caracterização da reação em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 39-46, 2004.
- CHEN, G. et al. Identification of single-nucleotide polymorphisms linked to resistance gene Pc68 to crown rust in cultivated oat. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 28, p. 214–222, 2006.
- CHEN, W. et al. Mapping translocation breakpoints by next-generation sequencing. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v.18, p.1143-1149, 2008.
- CHISHOLM, S. T. et al. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, Cambridge, v. 124, p. 803-814, 2006.
- 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, p. 440-447, 1994.
- CHU, C. G. et al. Genetic analysis of disease susceptibility contributed by the compatible Tsn1–SnToxA and Snn1–SnTox1 interactions in the wheat-*Stagonospora nodorum* pathosystem. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 120, n. 7, p. 1451-1459, 2010.
- CLOONAN, N. et al. Stem cell transcriptome profiling via massive- scale mRNA sequencing. **Nature Methods**, New York, v. 5, p. 585-587, 2008.
- COKUS, S. J. et al. Shotgun bisulphate sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. **Nature**, London, v. 452, p. 215-219, 2008.
- COLLINS, T. J.; MOERSCHBACHER, B. M.; READ, N. D. Synergistic induction of wheat stem rust appressoria by chemical and topographical signals. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 58, p. 259-266, 2001.
- COLLINS, T. J.; READ, N. D. Apressorium induction by topographical signals in six cereal rusts. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 51, p. 169-179, 1997.
- CONAB. **Safras – grãos**: acompanhamento da safra brasileira. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=131>>. Acesso em: 28 jul. 2011.
- CORAM, T. E.; SETTLES, M.; CHEN, X. Transcriptome analysis of high-temperature adult-plant resistance conditioned by Yr39 during the wheat - *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* interaction. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 9, p. 479-493, 2008.

COSTET L. et al. A pharmacological approach to test the diffusible signal activity of reactive oxygen intermediates in elicitor-treated tobacco leaves. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 43, p. 91-98, 2002.

COUEY, H. M.; SMITH, F. G. Effect of cations on germination & germ tube development of *Puccinia coronata* uredospores. **Plant Physiology**, Rockville, v.36, n.1, p. 14-19, 1961.

CRUZ, R. P.; FEDERIZZI, L. C.; MILACH, S. C. Genética da resistência à ferrugem da folha em aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n.9, p. 1127-137, 2001.

CRUZ, R. P.; FEDERIZZI, L. C.; MILACH, S. C. K. Severidade da ferrugem da folha e seus efeitos sobre caracteres da panícula de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 543-551. 1999.

DAVID, L. et al. A high-resolution map of transcription in the yeast genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 5320-5325, 2006.

DE GARA, L.; DE PINTO, M. C.; TOMMASI, F. The antioxidant system vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 41, p. 863-870, 2003.

DENOEUDE, F. et al. Annotating genomes with massive-scale RNA sequencing. **Genome Biology**, London, v. 9, R175-R175.12, 2008.

DESIKAN, R. et al. H₂O₂ activates a MAP kinase-like enzyme in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, p. 1863-1866, 1999.

DIMBERG, L. H.; PETERSON, D. M. Phenols in spikelets and leaves of field-grown oats (*Avena sativa*) with different inherent resistance to crown rust (*Puccinia coronata* f. sp. *avenae*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 89, p. 1815-1824, 2009.

DINNOR, A.; ESHED, N.; NOF, E. *Puccinia coronata*, crown rust of oat and grasses. In: SIDHU, G. S. **Advances in plant pathology**: genetics of plant pathogenic fungi. California: Academic Press, 1988. 566 p.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, London, v. 411, p. 843-847, 2001.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 1085-1097, 1995.

DODDS, P. N. et al. Avirulence proteins of rust fungi: penetrating the host-haustorium barrier. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.58, p.512-517, 2007.

DOEHLERT, D. C.; McMULLEN, M. S. Genotypic and environmental effects on oat milling characteristics and groat hardness. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.77, p. 148-154, 2000.

DOEHLERT, D. C.; McMULLEN, M. S.; HAMMOND J. J. Genotypic and environmental effects on grain yield and quality of oat grown in North Dakota. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 4, p. 1066-1072, 2001.

DONG, J.; CHEN, C.; CHEN, Z. Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 51, n. 1, p. 21-37, 2003.

DOUGLAS, C. J. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. **Trends Plant Science**, Oxford, v. 1, p. 171-178, 1996.

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

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

ELLIS, J. Insights into Nonhost disease resistance: can they assist disease control in agriculture? **The Plant Cell**, Waterbury, v. 18, p. 523-528, 2006.

EL-ZAHABY, H. M.; GULLNER, G.; KIRALY, Z. Effects of powdery mildew infection of barley on the ascorbate–glutathione cycle and other antioxidant in different host-pathogen interactions. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p. 1225-1230, 1995.

FAOSTAT. **Estatísticas da produção vegetal e animal, de uso do solo, do consume de fertilizantes e pesticidas e do maquinário agrícola**. [2011]. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 21 nov. 2011.

FASTERS, M. K.; DANIELS, U.; MOERSCHBACHER, B. M. A simple and reliable method for growing the wheat stem rust fungus, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, in liquid culture. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 42, p. 259-265, 1993.

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

FEDERIZZI, L. C. Processos no melhoramento genético de aveia no Brasil, história, principais resultados e perspectivas futuras. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 22., 2002, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: UPF, 2002. p. 45-63.

FEDERIZZI, L. C.; PACHECO, M. T. Programa de melhoramento genético de aveia da UFRGS: 35 anos de história. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE

PESQUISAS DE AVEIA, 29., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2009. p. 202-205.

FEDERIZZI, L. C.; MILACH, S. C. K.; PACHECO, M. T. Melhoria da aveia. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 131-157.

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

FEDURCO, M. et al. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 1-13, 2006.

FLOR, H. H. The complementary genetic system in flax and flax rust. **Advances Genetics**, San Diego, v. 8, n. 1, p. 29-54, 1956.

FLOSS, E. L. Pesquisa de aveia: do acadêmico ao desenvolvimento. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 22., 2002, Passo Fundo. **Resultados Experimentais...** Passo Fundo: UPF, 2002. p. 27-38.

FODOR, J. et al. Local and systemic responses of antioxidant to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 114, p. 1443-1451, 1997.

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

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

FOYER, C. H. et al. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanism of acclamatory stress tolerance and signaling. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, p. 241-254, 1997.

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

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 205-227, 2005.

GLAZOV, E. A. et al. A microRNA catalog of the developing chicken embryo identified by a deep sequencing approach. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 18, p. 957-964, 2008.

GLOMBITZA, S. et al. Crosstalk and differential response to abiotic and biotic stressors reflect at the transcriptional level of effector genes from secondary metabolism. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 54, p. 1-19, 2004.

GONNEN, M. V.; SCHLÖSSER, E. Oxidative stress in interaction between *Avena sativa* L. and *Drechlera* spp, **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 42, p. 221-234, 1993.

GRAICHEN, F. A. S. **Componentes epidemiológicos e histológicos da resistência à ferrugem da folha em genótipos de aveia**. 2009. 129 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2009.

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

GRANDBASTIEN, M. A. et al. The expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon is linked to plant defense responses. **Genetica**, Dordrecht, v. 100, p. 241-252, 1997.

GREEDABERG, J. T.; YAO, N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 201-211, 2004.

GUAN, L. M.; ZHAO, J.; SCANDALIOS, J. G. Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response. **Plant Journal**, Oxford, v. 22, p. 87-95, 2000.

GUO, Z. J. et al. Effect of intracellular glutathione level on the production of 6-methoxy-mellein in cultured carrot (*Daucus carota*) cells, **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 102, p. 45-51, 1993.

GUTKOSKI, L. C.; PEDÓ, I. **Aveia**: composição química, valor nutricional e processamento. São Paulo: Livraria Varela, 2000. 1991 p.

GYGI, S.P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B.R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 19, p. 1720-1730, 1999.

HARDER, D. E. Electron microscopy of urediospore formation in *Puccinia coronata* f. sp. *avena*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 54, p. 1010-1019, 1976.

HARDER, D. E.; HABER, S. Oat diseases and pathologic techniques. In: MARSHALL, H. G.; SORRELLS, M. E. (Ed.). **Oat science and technology**. Madison: Crop Science Society of American, 1992. p. 307-326.

HARDER, D. E.; HABER, S. Oat diseases and pathologic techniques. In: WELCH, W.R. **The oat crop**. Northern Ireland: Chapman & Hall, 1995. 584 p.

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

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

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

HEIL, M.; TON, J. Long-distance signaling in plant defense. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 13, n. 6, p. 264-272, 2008.

HIAI, S.; OURA, H.; NAKAJIMA, T. Color reaction of some saponins and saponins with vanillin and sulphuric acid. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 29, p. 116-122, 1976.

HOFFMAN, D. L. et al. Characterization and mapping of a crown rust resistance gene complex (*Pc58*) in TAM O-301. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 2630-2635, 2006.

HOLT, R. A.; JONES, S. J. The new paradigm of flow cell sequencing. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 18, p. 839-846, 2008.

HU, G.; RIJKEDABERG, F. H. J. Scanning electron microscopy of early infection structure formation by *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* on and in susceptible and resistance wheat lines. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, p. 391-399, 1998.

HUCKELHOVEN, R. et al. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 119, p. 1251-1260, 1999.

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

ISHIHARA, A. et al. Induction of hydroxycinnamoyl-CoA:hydroxyanthranilate *N*-hydroxycinnamoyl-transferase (HHT) activity in oat leaves by victorin C. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Tübingen, v. 52, p. 756-760, 1997.

ISHIHARA, A. et al. The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. **The Plant Journal**, Oxford, v. 54, p. 481-495, 2008.

ISHIHARA, A.; OHTSU, Y.; IWAMURA, H. Biosynthesis of oat avenanthramide phytoalexins. **Phytochemistry**, New York, v. 50, p. 237-242, 1999a.

ISHIHARA, A.; OHTSU, Y.; IWAMURA, H. Induction of biosynthetic enzymes for avenanthramides in elicitor-treated oat leaves. **Planta**, Berlin, v. 208, p. 512-518, 1999b.

- IZUMI, Y. et al. High-resolution spatial and temporal analysis of phytoalexin production in oats. **Planta**, Berlin, v. 229, p. 931–943, 2009.
- JOHNSON, R. A critical analysis of durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 22, p. 309-330, 1984.
- JØRGENSEN, J. H. Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in Barley. **Euphytica**, Dordrecht, v. 63, p. 141-152, 1992.
- KAKU, H.; HORI, M. Browning reaction in rice plant tissues induced by *Xanthomonas oryzae*. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Asuyama, v. 43, p. 487-490, 1977
- KANG, S.; KANG, K.; LEE, K.; BACK, K. Characterization of tryptamine 5-hydroxylase and serotonin synthesis in rice plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 26, p. 2009-2015, 2007.
- KOCHMAN, J. K.; BROWN, F. J. Development of the stem and crown rust fungi on leaves, sheaths, and peduncles of oat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 65, p. 1404-1408, 1975.
- KOIKE, N. et al. Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungi: lignifications and superoxide generation. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 107, p. 523-533, 2001.
- KOEYER, D. et al. Scar markers linked to the *Pc68* resistance allele are an effective tool for selection. In: CROSS, R. J. (Ed.). **International oats conference**. Christchurch: Institute for Crop and Food Research Limited, 2000. p. 137-140.
- KORBEL, J. et al. Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome. **Science**, Lancaster, v. 318, p. 420–426, 2007.
- KRUGER, W. M.; CARVER, T. L. W.; ZEYEN, R. J. Effects of inhibiting phenolic biosynthesis on penetration resistance of barley isolines containing seven powdery mildew resistance genes or alleles. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 61, p. 41-51, 2002.
- KULCHESKI, R. R. et al. Molecular mapping of *Pc68*, a crown rust resistance gene in *Avena sativa*. **Euphytica**, Wageningen, v. 175, p. 423-432, 2010.
- KUZNIAK, E.; SKLODOWSKA, M. The effect of *Botrytis cinerea* infection on ascorbate glutathione cycle in tomato leaves, **Plant Science**, Limerick, v. 148, p. 69-76, 1999.
- LADEANA, W. H. et al. Massively parallel sequencing of the polyadenylated transcriptome of *C. elegans*. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 19, p. 657-666, 2009.

LAIRINI, K. L. et al. Purification and partial characterization of tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 1604-1609, 1996.

LAMB, C.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance, **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 251-275, 1997.

LANGCAKE, P.; WICKINS, S. G. A. Studies on the action of the dichlorocyclopropanes on the host-parasite relationship in the rice blast disease. **Physiological plant pathology**, London, v. 7, p. 113-126, 1975.

LEGGETT, J. M. Classification and speciation in *Avena*. In: MARSHALL, H. G.; SORRELLS, M. E. (Ed.) **Oat science and technology**. Madison: Crop Science Society of America, 1992. p. 29-52.

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

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

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

LEVINE, A. et al. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, Cambridge, v. 79 p. 583-593, 1994.

LI, C. et al. Tomato defense to the powdery mildew fungus: differences in expression of genes in susceptible, monogenic and polygenic resistance responses are mainly in timing. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 62, p. 127-140, 2006.

LI, H.; RUAN, J.; DURBIN, R. Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 18, p. 1851-1858, 2008.

LI, R. et al. Short oligonucleotide alignment program. **Bioinformatics**, Cambridge, v. 24, p. 713-714, 2008.

LIEBERMAN, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 3, p. 361-370, 2003.

LISTE, R. et al. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis. **Cell**, Cambridge, v. 133, p. 523-536, 2008.

LORRAIN, S. et al. Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 8, p. 263-271, 2003.

LU, Z. X. et al. Identification and characterization of genes differentially expressed in the resistance reaction in wheat infected with *Tilletia tritici*, the common bunt pathogen. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Madison, v. 38, p. 420-431, 2005.

MA, W.; GUTTMAN, D. S. Evolution of prokaryotic and eukaryotic virulence effectors. **Current Opinion in Plant Biology**, Netherlands, v. 11, p. 412-419, 2008.

MA, Q.; SHANG, H. S. Ultrastructural analysis of the interaction between *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* and wheat after thermal induction of resistance. **Journal of Plant Pathology**, London, v. 86, p. 19-26, 2004.

MAEDA, H.; DUDAREVA, N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. **The Annual Review of Plant Biology**, Madison, v. 63, p. 73-105, 2012.

MALECK, K. et al. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. **Nature Genetics**, New York, v. 26, p. 403-410, 2000.

MALVICK, D. K. **Crown rust of oat.** Disponível em: <<http://www.plantpath.iastate.edu/>>. Acesso em: 21 out. 2011.

MANICKAVELU, A. et al. Comparative gene expression analysis of susceptible and resistant near-isogenic lines common wheat infected by *Puccinia triticina*. **DNA Research**, Oxford, v. 17, p. 211-222, 2010.

MARDIS, E.R. Next-generation DNA sequencing methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 9, p. 387-402, 2008.

MARGULIES, M. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, London, v. 43, n. 7057, p. 376-380, 2005.

MARGUERAT, S.; WILHELM, T.; BAHLER, J. Next-generation sequencing: Applications beyond genomes. **Biochemical Society Transactions**, Cambridge, v.36, p.1091-1096, 2008.

MARIONI, J. C. et al. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 18, p. 1509-1517, 2008.

MARSHALL, H. G.; SHANER, G. E. Genetics and inheritance in oat. In: MARSHALL, H. G.; SORRELS, M. E. (Ed.). **Oat science and technology**. Madison: Crop Science Society of America, 1992. p. 756-775.

MARSHALL, D.; SUTTON, R. L. Epidemiology of stripe rust, virulence of *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei* and yield loss in barley. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, p. 732-737, 1995.

MATERN, U.; GRIMMIG, B.; KNEUSEL, R. E. Plant cell wall reinforcement in the disease resistance response: Molecular composition and regulation. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 511-517, 1995.

MARTINOIA, E. et al. Multifunctionality of plant ABC transporters more than just detoxifiers. **Planta**, Berlin, v. 214, p. 345–355, 2002.

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

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

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

MARTINELLI, J. A. Oat diseases and their control. In: SUTTIE, J. M.; REYNOLDS, S. G. (Ed.). **Fodder oats: a world overview**. Roma: FAO, 2004. p. 197–14.

MARTINEZ DE ILARDUYA, O.; XIÉ, Q.; KALOSHIAN, I. Aphid induced defence responses in Mi-1 mediated compatible and incompatible tomato interactions. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 16, p. 699-708, 2003.

MATTIELO, R. R.; BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. Resistência das plantas a moléstias fúngicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, p. 161-168, 1997.

MATZEMBACHER, R. G. (Coord.). **Acultura da aveia no sistema de plantio direto**. Cruz Alta: FUNDACEP/ FECOTRIGO, 1999. 20 p.

MAYAMA, S. et al. The production of phytoalexins by oat (*Avena sativa*) in response to crown rust, *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 19, p. 217–226, 1981.

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

McDONALD, B. C.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 349-379, 2002.

McINTOSH, R. A.; WELLINGS, C. R.; PARK, R. F. **Wheat rusts: an atlas of resistance genes**. Sydney: CSIRO, 1995.

MENDEN, B.; KOHLHOFF, M.; MOERSCHBACHER, B. M. Wheat cells accumulate syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response. **Phytochemistry**, New York, v. 68, p. 513–520, 2007.

MIKKELSEN, T. et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. **Nature**, London, v. 448, p. 553–560, 2007.

MISHINA, T. E.; ZEIER, J. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 50, p. 500–513, 2007.

MIYAGAWA, H. et al. A stress compound in oats induced by victorin, a host-specific toxin from *Helminthosporium victoriae*. **Phytochemistry**, New York, v. 41, p. 1473–1475, 1996.

MONDAL, P. et al. Structural and Functional analysis of rice catalase-b gene promoter: presence of dof and caat binding site. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 25, p. 71–82, 2007.

MOERSCHBACHER, B. M. et al. Hypersensitive lignifications response as the mechanism of non-host resistance of wheat against oat crown rust. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 78, p. 609–615, 1990.

MORIN, R. et al. Pro-filing the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing. **Biotechniques**, Natick, v. 45, p. 81–94, 2008.

MORITA-YAMAMURO, C. et al. The arabidopsis gene *CADI* controls programmed cell death in the plant immune system and encodes a protein containing a MACPF domain. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 46, n. 6, p. 902–912, 2005.

MOROZOVA, O.; MARRA, M. A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, San Diego, v. 92, p. 255–264, 2008.

MORTAZAVI, A. et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, New York, v. 5, p. 621–628, 2008.

MUR, L. A. J. et al. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. **Plant Physiology**, Washington, v. 140, p. 249–262, 2006.

MURPHY, J. P.; HOFFMAN, L. A. Origin, history and production of oat. In: MARSHALL, H.G.; SORRELS, M.E. (Ed.). **Oat Science and Technology**. Madison: Crop Science Society of American, 1992. p. 1–28.

MURPHY, J. P., JELLEN, E. N. Relationships among cultivated hexaploid oat and its progenitor species. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 20., 2000, Pelotas. **Resultados Experimentais...** Pelotas: UFPEL, 2000. p. 16–32.

NAGALAKSHMI, U. et al. The transcriptional landscape of the yeast whole genome defined by RNA sequencing. **Science**, Lancaster, v. 320, p. 1344-1349, 2008.

NAGALAKSHMI, U.; WAERN, K.; SNYDER, M. RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis. **Current Protocols in Molecular Biology**, New York, n. 4.11, s. 89, 2010.

NELSON, R. R. The meaning of disease resistance in plants. In: NELSON, R. R. (Ed.). **Breeding plants for disease resistance - concepts and applications**. London: The Pennsylvania State University Press, 1973. p. 13-25

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 369-389, 1992.

NIEMANN, G. J. A crucial role of phenolic metabolism in resistance of carnations to wilt diseases. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 381, p. 565-571, 1994.

NIKS, R. E. Effect of germ tube length on the fate of sporelings of *Puccinia hordei* in susceptible and resistant barley. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, p. 57-60, 1990.

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

NIYOGI, K. K.; FINK, G. R. Two anthranilate synthase genes in Arabidopsis: defense-related regulation of the tryptophan pathway. **The Plant Cell**, Rockville, v. 4, p. 721-733, 1992.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 249-279, 1998.

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

O'CONNELL, R. J.; PANSTRUGA, R. Tête à tête inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. **New Phytologist**, Cambridge, v. 171, p. 699-718, 2006.

OHM, H. W.; SHANER, G. E. Breeding oats for resistance to diseases. In: MARSHALL, H. G.; SORRELS, M. E. (Ed.). **Oat science and technology**. Madison: Crop Science Society of American, 1992. p. 657-690.

OLIVER, R. E. et al. New Diversity arrays technology (DArT) markers for tetraploid oat (*Avena magna* Murphy et Terrell) provide the first complete oat linkage map and markers linked to domestication genes from hexaploid *A. sativa* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 123, p. 1159-1171, 2011a.

OLIVER, R. E. et al. Model SNP development for complex genomes based on hexaploid oat using high-throughput 454 sequencing technology. **BMC Genomics**, Netherland, v. 12, p. 77, 2011b.

OKAZAKI, Y. et al. Metabolism of oat avenanthramide phytoalexins in oats. **Plant Journal**, Oxford, v. 39, p. 560–572, 2004.

OKAZAKI, Y. et al. New dimeric compounds of avenanthramide phytoalexin in oats. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 72, p. 3830–3839, 2007.

OSBOUM, A. Saponin and plant defense- a soap story. **Trends in Plant science**, Oxford, v. 1, p. 4-9, 1996.

OSBOUM, A. et al. Fungal pathogens oat roots and tomato leaves employ closely related enzymes to detoxify host plant saponinas. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 8, p. 971-978, 1995.

OSBOUM, A. et al. Partial characterization of avenacinase from *Gaeumannomyces graminis* var. *avena*. **Physiology Molecular Plant Pathology**, London, v. 38, p. 301-312, 1991.

OSBOURN A. E. Molecules of interest: saponins in cereals. **Phytochemistry**, New York, v. 62, p. 1-4, 2003.

OSBOURN, A. E. et al. Dissecting plant secondary metabolism – constitutive chemical defenses in cereals. **New Phytologist**, Cambridge, v. 159, p. 101–108, 2003.

PAKUSCH, A. E.; KNEUSEL, R. E.; MATERN, U. *S*-Adenosyl-Lmethionine: *Trans*-caffeoyl-coenzyme A 3-*O*-methyltransferase from elicitor-treated parsley cell suspension cultures. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 271, p. 488-494, 1989.

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

PARK, R. F. Occurrence and pathogenic specialization of *Puccinia coronata* (oat crown rust pathogen) in Australia - 1998 - 1999. **Oat Newsletter**, Winnipeg, v. 46, 2000. Disponível em: <<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/oatnewsletter/v46/>>. Acesso em: 20 jan. 2012.

PARLEVLIET, J. E. Evaluation of the concept of horizontal resistance in the barley/*Puccinia hordei* host-pathogen relationship. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 66, n. 4, p. 494-497, 1976.

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

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

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

PARLEVLIET, J. E. Present concepts in breeding for disease resistance. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 30., 1997, Poços de Caldas. **Palestras...** Viçosa: UFV/SBF, 1997. p. 7-15..

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

PARLEVLIET, J. E.; KIEVIT, C. Development of barley leaf rust, *Puccinia hordei*, infections in barley. I. Effects of partial resistance and plant stage. **Euphytica**, Dordrecht, v. 35, n. 3, p. 953-959, 1986.

PARLEVLIET, J. E.; ZADOKS, J. C. The integrated concept of disease resistance; a new view including horizontal and vertical resistance in plants. **Euphytica**, Dordrecht, v. 26, p. 15-21, 1977.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho A. et al. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 417-453.

PATAKY, J.K. Partial rust resistance in sweet corn hybrid seedlings. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, n. 7, p. 702-707, 1986.

PATIL, L. C. et al. Biochemical relationship in resistant and susceptible cultivars of spot blotch infected tetraploid wheat. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 4, p. 520-522, 2011.

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

PENG, M.; KUC, J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 696-699, 1992.

PENNER, G. A. et al. Identification of a RAPD marker linked to the oat stem rust gene-*Pg3*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, p. 702-705, 1993.

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

PORTA, H.; ROCHA-SOSA, M. Plant lipoxygenases physiological and molecular features. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 130, p. 15-21, 2002.

PORTYANKO, V. A. et al. A linkage map of hexaploid oat based on grass anchor DNA clones and its relationship to other oat maps. **Genome**, Ottawa, v. 44, p. 249-265, 2001.

PRETORIUS, Z. A.; RIJKEDABERG, F. H. J.; WILCOXSON, R. D. Effects of growth stage, leaf position and temperature on adult-plant resistance of wheat infected by *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 37, p. 36-44, 1988.

PRIESTLEY, R. H.; BAYLES, R. A. The contribution and value of resistant cultivars to disease control in cereals. In: CLIFFORD, B. C.; LESTER, E. (Ed.). **Control of plant diseases: costs and benefits**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1988. p. 53-65.

RALPH, J et al. Lignin: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. **Phytochemistry Reviews**, Berlin, v. 3, p. 29-60, 2004.

RAMPITSCH, C. et al. Analysis of the wheat and *Puccinia triticina* (leaf rust) proteoms during a susceptible host-pathogen interaction. **Proteomics**, Dublin, v. 6, p. 1897-1907, 2006.

READ, N. D. et al. Role of topography sensing for infection-structure differentiation in cereal rust fungi. **Planta**, Berlin, v. 202, p. 163-170, 1997.

READ, N. D. et al. Contact sensing during infection by fungal pathogens. In: CALLOW, J. A.; GREEN, JR. (Ed.). **Perspectives in plant cell recognition**. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. p. 137-192.

REIMERS, P. J; LEACH, J. E. Race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* conferred by bacterial blight resistance gene *Xa-10* in rice (*Oryza sativa*) involves accumulation of a lignin-like substance in host tissues. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 38, p. 39-55, 1991.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; MEDEIROS, C. A. **Diagnose, patometria e controle de doenças de cereais de inverno**. Londrina: ES, 2001. 94 p.

RIBEIRO DO VALE, F. X.; PARLEVLIET, J. E.; ZAMBOLIM, L. Concepts in plant disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 577-589, 2001.

ROBERT-SEILANIANTZ, A. et al. Pathological hormone imbalances. **Current Opinion in Plant Biology**, Netherlands, v. 10, p. 372-379, 2007.

ROELFS, A. P.; McVEY, D. V. Low infection types produced by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and wheat lines designated genes for resistance. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 7, p. 722-729, 1979.

ROELFS. A. P.; SINGH, R. P.; SAARI, E. E. **Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management**. Ciudad de México: CIMMYT, 1992. 81 p.

ROJAS-MOLINA, M. et al. Effects of phenylpropanoid and energetic metabolism inhibition on faba bean resistance mechanisms to rust. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, p. 60-65, 2007.

RONALD, P. C. Resistance gene evolution. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, p. 294-298, 1998.

ROONEY, W. L.; RINES, H. W.; PHILLIPS, R. L. Identification of RFLP markers linked to crown rust resistance genes *Pc 91* and *Pc 92* in oat. **Crop Science**, Madison, v. 34, p. 940-944, 1994.

RUBIALES, D.; NIKS, R. E. Combination of mechanisms of resistance to rust fungi as a strategy to increase durability. **Options Mediterraneennes**, Belgrade, v. 40, p. 333-339, 2000.

RUIZ-FERRER, V.; VOINNET, O. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. **The Annual Review of Plant Biology**, Medison, v. 60, p. 485–510, 2009.

SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, R. et al. The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, p. 30231-30244, 2001.

SANGER F. et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature**, London, v. 265, v. 5596, p. 687-695, 1977.

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

SCHWESSINGER, B.; ZIPFEL, C. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, Netherlands, v. 11, p. 389-395, 2008.

SHANDS, H. L.; CISAR, G. L. Avena. In: HEVELY, A.H (Ed.). **CRC handbook of flowering**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 523-535.

SHENDURE, J. The beginning of the end for microarrays? **Nature Methods**, New York, v. 5, p. 585-587, 2008.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature biotechnology**, New York, v. 26, n. 10, p. 1135-1145, 2008.

SHRIVER, J. M.; MUNKVOLD, G. P. **Oats: crown rust and stem rust**. Disponível em: <<http://www.plantpath.iastate.edu/>>. Acesso em: 21 out. 2011.

SKAMNIOTI, P. et al. A novel role for catalase b in the maintenance of fungal cell-wall integrity during host invasion in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, n. 5, p. 568–580, 2007.

SKAMNIOTI, P.; RIDOUT, C. J. Microbial avirulence determinants guided missiles or antigenic flak? **Molecular Plant Pathology**, London, v. 6, n. 5, p. 551-559, 2005.

SILVA, P. R. **Identificação de marcadores e caracterização de mecanismos moleculares associados à ferrugem da folha em trigo**. 2006. 137 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Biologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SIMONS, M. D. Crown rust. In: ROELFS, A. P.; BUSHNELL, W. R. (Ed.). **The cereal rusts: diseases, distribution, epidemiology and control**. New York: Academic Press. 1985. p. 132-172.

SIMONS, M. D.; MURPHY, H. C. Oat diseases. In: COFFMAN, A. A. (Ed.). **Oats and oat improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1961. p. 330-390.

SORIANO, I. R. et al. Inducible flavone in oats (*Avena sativa*) is a novel defense against plant-parasitic nematodes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, p. 1207–1214, 2004.

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

STADNIK, M. J.; BUCHENAUER, H. Accumulation of autofluorogenic compounds at the penetration site of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* is associated with both benzothiadiazole induced and quantitative resistance of wheat. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, p. 615-622, 1999.

STOSSEL, P. Regulation of sulphhydryl groups of glyceollin accumulation in soybean hypocotyls. **Planta**, Berlin, v. 160, p. 314–319, 1984.

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

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

STUKENBROCK, E. H.; MCDONALD, B. A. Geographic variation and positive diversifying selection in the host specific toxin *SnToxA*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 8, p. 321-332, 2007.

SUNDQUIST, A. et al. Whole genome sequencing and assembly with high-throughput, short-read technologies. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 2, n. 5, p. 1- 14, 2007.

SULTAN, M. et al. A global view of gene activity and alternative *splicing* by deep sequencing of the human genome. **Science**, Lancaster, v.321, p.956-960, 2008.

SZABO, L. J. et al. The role of fungal haustoria in parasitism of plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 7654-7655, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2005. 623 p.

TAKAHAMA, U. Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions. **Phytochemistry Reviews**, London, v. 3, p. 207–219, 2004.

TAKECHI, M.; SHIMADA, S.; TANAKA, Y. Structure-activity relationships of the saponins dioscin and dioscinin. **Phytochemistry**, New York, v. 30, p. 3943-3944, 1991.

THOMAS, H. Cytogenetics of avena. In: MARSHALL, H.G.; SORRELLS, M.E. (Ed.). **Oat science and technology**. Madison: Crop Science Society of America, 1992. p. 473–507.

THOMÉ, G. C. H. **Genética e análise molecular da resistência parcial à ferrugem da folha em aveia**. 1999. 126 f. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

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

TINKER, N. A. et al. New DArT markers for oat provide enhanced map coverage and global germplasm characterization. **BMC Genomics**, Netherland, v. 10, p. 39, 2009.

TOYODA, H., MAYAMA, S.; SHISHIYAMA, J. The fluorescent microscopic study on the hypersensitive necrosis in powderymildewed barley leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, p. 125–131, 1978.

TOZAWA, Y. et al. Characterization of rice anthranilate synthase α -subunit genes *OSASA1* and *OASA2*. tryptophan accumulation in transgenic rice expressing a feedback-insensitive mutant of *OASA1*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 126, p. 1493–1506, 2001.

TRAPANI, J. A.; SMYTH, M. J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 2, p. 735–747, 2002.

TSUCHIHARA, K. et al. Massive transcriptional start site analysis of human genes in hypoxia cells. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v.37, p.2249- 2263, 2009.

TURCATTI, G. et al. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, n.4, e25, 2008.

TURK, F. M. Avenacin A-1 content of some local oat genotypes and the *in vitro* effect of avenacins on several soil-borne fungal pathogens of cereals. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Turkey, v. 29, p. 157–164, 2005.

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

VALLAVIEILLE-POPE, C. et al. Pre-inoculation effects of light quantity on infection efficiency of *Puccinia striiformis* and *P. triticina* on wheat seedling. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, p. 1308-1314, 2002.

VANACKER, H.; CARVER, T. L. W.; FOYER, C. H. Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during hypersensitive response in the barley-powdery mildew interaction, **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 123, p. 1289–1300, 2000.

VANACKER, H.; FOYER, C. H.; Carver, T. L. W. Changes in apoplastic antioxidants induced by powdery mildew attack in oat genotypes with race non-specific resistance, **Planta**, Berlin, v. 208, p. 444–452, 1999.

VAN BREUSEGEM, F.; BAILEY-SERRES, J.; MITTLER R. Unraveling the tapestry of networks involving reactive oxygen species in plants. **Plant Pathology**, London, v. 147, p. 978–984, 2008.

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

VIEIRA, E.A. et al. Herança da resistência à ferrugem da folha da aveia (*Puccinia coronata* f. sp. *avena* Fraser & Led.) em genótipos brasileiros de aveia branca. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p.1 35-141, 2006a.

VIEIRA, E. A. et al. Resistance pattern of white oat genotypes to crown rust in the definition of crosses. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 607-614, 2006b.

VLOT, A. C. et al. Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 56, p. 445–456, 2008.

VOEGELE, R. T. et al. The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. **Proceeding of National Academy of Science of United States of America**, Washington, v. 98, p. 8133-8138, 2001.

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

WANG, X. et al. Differential gene expression in incompatible interactions between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. **Plant Biology**, London, v. 10, p. 1-15, 2010.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, London, v.10, p.57-63, 2009.

WARREN, R. L. et al. Assembling millions of short DNA sequences using SSAKE. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, p. 500-501, 2007.

WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to fungi**. 3rd ed. Cambridge, UK: New York: Cambridge University Press, 2007.

WEDERELL, E. D. et al. Global analysis of in vivo Foxa2-binding sites in mouse adult liver using massively parallel sequencing. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, p. 4549-4564, 2008.

WESP, C. L. **Histopatologia das reações de resistência de hospedeiro e de não-hospedeiro em interações *Puccinia triticina* X Poaceae**. 2011. 174 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2011.

WIETHOLTER, P. et al. **Uso da hibridização subtrativa como ferramenta para a identificação de genes envolvidos na resistência à ferrugem da folha em trigo**. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 2010. p. 43-55. 96 v.

WIGHT, C. P.; TINKER, N. A.; KIANIAN, S. F. A molecular marker map in 'Kanota' 9 'Ogle' hexaploid oat (*Avena* spp.) enhanced by additional markers and a robust framework. **Genome**, Ottawa, v. 46, p. 28-47, 2003.

WILCOXSON, R. Genetics of slow rusting in cereals. **The American Phytopathological Society**, Saint Paul, v. 71, n. 9, p. 989-993, 1881.

WILHELM, B. T et al. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. **Nature**, London, v. 453, p. 1239-1243, 2008.

WINGATE, W. P. M.; LAWTON, M. A.; LAMB, C. J. Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes, **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 87, p. 206-210, 1988.

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

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

YAO, N. et al. Apoptotic cell death is a common response to pathogen attack in oats. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, p. 1000-1007, 2002.

YAMADA, K. et al. Empirical analysis of transcriptional activity in the arabidopsis genome. **Science**, Lancaster, v. 302, p. 842-846, 2003.

YANG, Q. et al. analysis of the involvement of hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyltransferase and caffeoyl-coa 3-o-methyltransferase in phytoalexin biosynthesis in oat. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 17, p 81-89, 2004.

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

ZAMBONATO, F. **Caracterização fenotípica e genética da resistência parcial à ferrugem da folha em aveia (*Avena sativa* L.)**. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2011.

ZHANG, Z.; HENDERSON, C.; GURR, S. J. *Blumeria graminis* secretes an extracellular catalase during infection of barley: Potential role in suppression of host defense. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 5, p. 537-547, 2004.

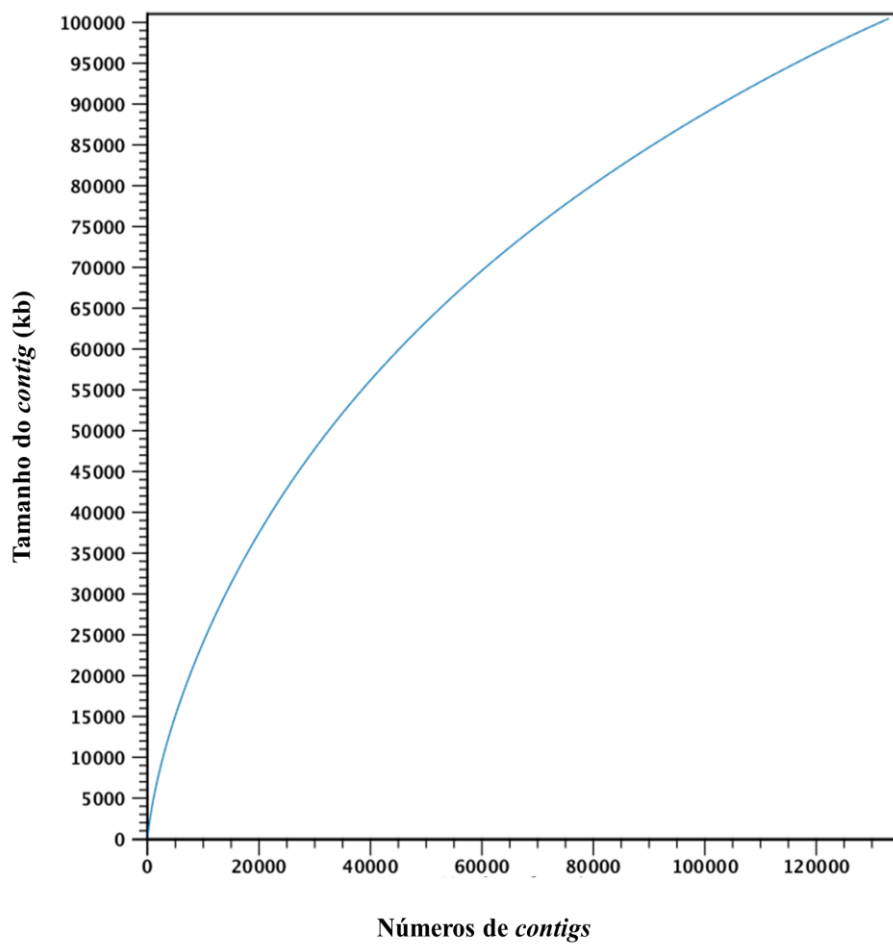
ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, New York, v. 23, p. 283-333, 2005.

8 APÊNDICES

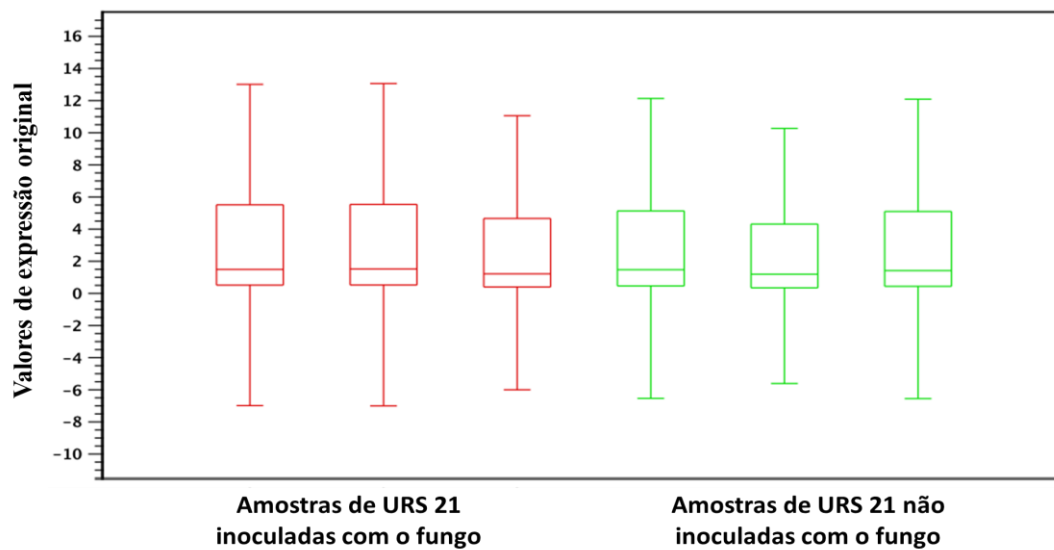
APÊNDICE 1. Número de sequências obtidas para cada amostra submetida ao RNA-sequenciamento.

| Tratamento | Número de sequências |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| URS 21 inoculada 1 | 28,349,477 (R1) 28,349,477 (R2) |
| URS 21 inoculada 2 | 28,194,335 (R1) 28,194,335 (R2) |
| URS 21 inoculada 3 | 27,269,573 (R1) 27,269,573 (R2) |
| URS 21 não inoculada 1 | 23,930,964 (R1) 23,930,964 (R2) |
| URS 21 não inoculada 2 | 24,452,555 (R1) 24,452,555 (R2) |
| URS 21 não inoculada 3 | 23,755,880 (R1) 23,755,880 (R2) |
| Número total de sequências | 311.905.568 |

*R1 e R2 são as repetições de leituras de sequenciamento dentro de cada amostra.



APÊNDICE 2. Tamanho cumulativo de *contigs* gerados através do RNA-sequenciamento.



APÊNDICE 3. O gráfico indica o valor de expressão para cada amostra submetida ao RNA-sequenciamento. Os três primeiros gráficos são de amostras de URS 21 inoculadas com *P. coronata* f. sp. *avenae* (em vermelho) e os três últimos gráficos são de amostras do mesmo genótipo sem a inoculação com o fungo (em verde).