

DANIEL DEBONA

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS EM
PLANTAS DE TRIGO INFECTADAS POR *Pyricularia oryzae***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

D287a
2012
Debona, Daniel, 1987-
Alterações bioquímicas e fisiológicas em plantas de trigo infectadas por *Pyricularia oryzae* / Daniel Debona. – Viçosa, MG, 2012.
x, 61f. : il. ; 29cm.

Orientador: Fabrício Ávila Rodrigues.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Brusone. 2. *Pyricularia oryzae*. 3. Trigo.
4. *Triticum aestivum*. 5. Trigo - Doenças e pragas - Aspectos fisiológicos. 6. Trigo - Doenças e pragas - Aspectos bioquímicos. 7. Fisiologia. 8. Fotossíntese. 9. Enzimas.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 632.456

DANIEL DEBONA

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS EM
PLANTAS DE TRIGO INFECTADAS POR *Pyricularia oryzae***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 14 de fevereiro de 2012.

Fábio Murilo DaMatta

Luis Cláudio Vieira da Cunha

Fabício Ávila Rodrigues
(Orientador)

*Aos meus pais Milton Debona
e Imelda Knob Debona,
meu irmão Darci Debona
minha cunhada Luciana Duarte Nomura Debona
e com carinho a Kelly:
OFEREÇO e DEDICO*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primariamente a Deus por mais esta oportunidade.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Fitopatologia e ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, por proporcionarem condições de realizar este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao Professor Fabrício Ávila Rodrigues pela orientação, amizade, e por seu exemplo de profissionalismo e competência.

Ao Professor Fábio Murilo DaMatta pelo apoio, sugestões e colaboração para a realização deste trabalho.

Aos pesquisadores Dr. Douglas Lau e M.Sc. Márcio Só e Silva da EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Trigo pelo fornecimento das sementes de trigo utilizadas neste trabalho.

Ao Professor Ricardo Silveiro Balardin pela orientação durante minha graduação, que me motivou a seguir a carreira de Fitopatologista.

Ao colega Jonas Alberto Rios, pela amizade, companheirismo e ajuda na execução dos experimentos.

A todas as pessoas do Laboratório de Metabolismo Vegetal, em especial ao Samuel e ao Lucas pelo companheirismo, amizade e ajuda nas análises fisiológicas.

Aos meus pais, Milton e Imelda, ao meu irmão Darci e minha cunhada Luciana pelo apoio incondicional, dedicação e carinho.

A todos os professores que contribuíram para o meu aprendizado e formação profissional.

Aos colegas de mestrado, pelo companheirismo e amizade.

A todos os colegas de trabalho do Laboratório da Interação Planta-Patógeno, pela amizade, apoio e ajuda na execução dos experimentos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia Braz, Bruno, Camilo e Sara.

A Kelly Juliane Telles Nascimento, pela ajuda na determinação das atividades enzimáticas, apoio constante, dedicação e incentivo.

A todas as pessoas que contribuíram para realização desse trabalho.

BIOGRAFIA

Daniel Debona, filho de Milton Debona e Imelda Knob Debona, nasceu em 17 de Abril de 1987, em Sarandi, Estado do Rio Grande do Sul.

Em 2005, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) onde lhe foi conferido o título de Engenheiro Agrônomo. Nesta instituição, foi bolsista de Iniciação Científica em Fitopatologia, atuando no controle de doenças de plantas cultivadas, sob orientação do Prof. Ricardo Silveiro Balardin.

Em Março de 2010, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal Viçosa, sob orientação do Prof. Fabrício Ávila Rodrigues, defendendo dissertação em Fevereiro de 2012.

Em Março de 2012, ingressou no curso de Doutorado em Fitopatologia na Universidade Federal Viçosa, sob orientação do Prof. Fabrício Ávila Rodrigues.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
<i>Capítulo 1: Alterações Bioquímicas em Plantas de Trigo Infectadas por Pyricularia oryzae</i>	1
RESUMO	2
INTRODUÇÃO	4
MATERIAL E MÉTODOS	7
Crescimento das plantas:	7
Inoculação das plantas	7
Avaliação da severidade da brusone.....	8
Determinação da atividade de enzimas do sistema antioxidativo	8
Determinação da concentração de superóxido (O ₂ ⁻)	10
Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	11
Determinação da concentração de aldeído malônico (MDA)	11
Determinação do extravasamento de eletrólitos (EE)	11
Delineamento experimental e análise estatística dos dados	12
RESULTADOS	13
DISCUSSÃO	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
TABELAS E FIGURAS	29
<i>Capítulo 2: Alterações Fisiológicas em Plantas de Trigo Infectadas por Pyricularia oryzae</i>	37
RESUMO	38
INTRODUÇÃO	40
MATERIAL E MÉTODOS	42
Crescimento das plantas:	42
Inoculação das plantas	42
Avaliação da severidade da brusone.....	43
Avaliações das trocas gasosas	43
Delineamento experimental e análise estatística dos dados	43
RESULTADOS	45
DISCUSSÃO	47

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
TABELAS E FIGURAS	56

RESUMO

DEBONA, Daniel, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Alterações bioquímicas e fisiológicas em plantas de trigo infectadas por *Pyricularia oryzae***. Orientador: Fabrício Ávila Rodrigues.

A brusone, causada pelo fungo *Pyricularia oryzae*, constitui a doença mais importante da cultura do trigo no cerrado brasileiro. No entanto, informações na literatura da interação trigo-*P. oryzae* ainda são limitadas. Neste estudo foram investigadas as alterações bioquímicas e fisiológicas em plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229, suscetível e parcialmente resistente à brusone no estágio de planta jovem, respectivamente, durante o processo infeccioso de *P. oryzae*. As variáveis estudadas foram a severidade da brusone, a atividade de enzimas do sistema antioxidativo, as concentrações de superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e aldeído malônico (MDA), e o extravasamento de eletrólitos (EE), bem como os parâmetros de trocas gasosas às 48, 72 e 96 horas após a inoculação (hai) com *P. oryzae*. Adicionalmente, foram determinadas a taxa máxima de carboxilação (V_{cmax}), a taxa máxima de transporte de elétrons usados na regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato (RUBP) (J_{max}), a respiração (R_d) e calculada a relação J_{max}/V_{cmax} com base na resposta da taxa líquida de assimilação de CO_2 (A) a diferentes concentrações internas de CO_2 (C_i) (curva A/C_i). A severidade da brusone foi menor nas plantas da cultivar BRS 229 do que nas plantas da cultivar BR 18. A atividade das enzimas do sistema antioxidativo foi fortemente afetada pela infecção por *P. oryzae* e usualmente maior nas plantas inoculadas do que nas plantas não inoculadas. O aumento na atividade das enzimas superóxido dismutase, peroxidase, peroxidase do ascorbato e glutathione-S-transferase às 96 hai foi mais pronunciado para a cultivar BRS 229 do que para a cultivar BR 18. A atividade da redutase da glutathione (GR) e catalase (CAT) aumentou somente nas plantas inoculadas da cultivar BRS 229 às 96 hai em relação às plantas não inoculadas. Para a cultivar BR 18, a atividade da GR não foi afetada pela inoculação com *P. oryzae* e a atividade da CAT foi menor nas plantas inoculadas do que nas não inoculadas. A atividade da peroxidase da glutathione aumentou nas plantas inoculadas da cultivar BR 18 em relação às plantas não inoculadas às 48 e 72 hai, e não foi afetada pela inoculação com *P. oryzae* nas plantas da cultivar BRS 229. A concentração de O_2^- aumentou em 153

e 72% às 96 hai nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, comparadas com as plantas não inoculadas. A concentração de H_2O_2 foi 59% maior nas plantas inoculadas da cultivar BR 18 em relação às plantas não inoculadas às 96 hai, porém não houve diferença entre plantas inoculadas e não inoculadas na concentração de H_2O_2 para a cultivar BRS 229. A concentração de MDA foi maior nas plantas inoculadas às 48, 72, e 96 hai para a cultivar BR 18 e somente às 48 hai para a cultivar BRS 229, em relação às plantas não inoculadas. O EE aumentou em 323 e 188% às 96 hai nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, comparadas com as plantas não inoculadas. Os parâmetros de trocas gasosas A , condutância estomática e taxa de transpiração, bem como V_{cmax} e J_{max} foram significativamente reduzidos nas plantas de trigo inoculadas das duas cultivares em relação às plantas não inoculadas. Essa redução, no entanto, foi menos pronunciada nas plantas da cultivar BRS 229 do que nas plantas da cultivar BR 18, o que esteve associado com a menor severidade da brusone observada para a cultivar BRS 229. C_i aumentou em 32 e 14% às 96 hai nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente. A relação J_{max}/V_{cmax} aumentou nas plantas inoculadas das duas cultivares em relação às plantas não inoculadas. R_d aumentou 208% nas plantas inoculadas da cultivar BR 18 em relação às plantas não inoculadas às 96 hai, porém não houve diferença em R_d entre plantas inoculadas e não inoculadas para a cultivar BRS 229. Os resultados do presente estudo demonstraram a importância de um sistema antioxidativo eficiente para remover o excesso de espécies reativas de oxigênio gerado durante a infecção de plantas de trigo por *P. oryzae*, limitando o dano celular causado pelo fungo. Adicionalmente, esse sistema antioxidativo mais eficiente parece contribuir para uma maior resistência do trigo à brusone. As avaliações fisiológicas demonstraram que a fotossíntese de plantas de trigo foi significativamente reduzida pela infecção por *P. oryzae*, a qual esteve associada principalmente à menor atividade aparente da Rubisco, seguido pela menor regeneração de RuBP. O conhecimento das alterações bioquímicas e fisiológicas de plantas de trigo infectadas por *P. oryzae* é de suma importância para o desenvolvimento de estratégias de controle eficientes da brusone.

ABSTRACT

DEBONA, Daniel, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Biochemical and physiological changes in wheat plants infected with *Pyricularia oryzae***. Adviser: Fabrício Ávila Rodrigues.

Blast, caused by the fungus *Pyricularia oryzae*, is the most important disease of wheat in Brazilian Cerrado. However, information in the literature about wheat-*P. oryzae* interaction is still limited. In this study, it was investigated biochemical and physiological changes in wheat plants from cultivars BR 18 and BRS 229, susceptible and partially resistant to blast at young plant stage, respectively, during the infectious process of *P. oryzae*. The variables studied were: blast severity, activity of antioxidant enzymes and superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and malondialdehyde (MDA) concentrations, and electrolyte leakage (EL), as well as gas exchange parameters at 48, 72 and 96 hours after inoculation (hai) with *P. oryzae*. Additionally, it was determined the maximum rate of carboxylation (V_{cmax}), the maximum rate of electron transport used on ribulose-1,5-bisphosphate (RUBP) regeneration (J_{max}), and respiration (R_d) and calculated the J_{max}/V_{cmax} ratio based on the response of net carbon assimilation rate (A) to different internal CO_2 concentration (C_i) (A/C_i curve). The blast severity was lower in plants from cultivar BRS 229 than in plants from cultivar BR 18. The activity of antioxidant enzymes system was strongly affected by infection with *P. oryzae* and usually higher in inoculated plants than in noninoculated plants. The increase in activity of superoxide dismutase, peroxidase, ascorbate peroxidase and glutathione-S-transferase at 96 hai was more pronounced for cultivar BRS229 than for cultivar BR 18. The activity of glutathione reductase (GR) and catalase (CAT) increased only in inoculated plants from cultivar BRS 229 at 96 hai compared with noninoculated plants. For cultivar BR 18, GR activity was not affected by inoculation with *P. oryzae* and CAT activity was lower in inoculated plants than in noninoculated plants. The activity of glutathione peroxidase increased in inoculated plants from cultivar BR 18 in relation to noninoculated plants at 48 and 72 hai, and it was not affected by inoculation with *P. oryzae* on plants from cultivar BRS 229. O_2^- concentration increased 153 and 72% at 96 hai in inoculated plants from cultivars BR 18 and BRS 229, respectively, compared with noninoculated plants. H_2O_2 concentration was 59% higher in inoculated

plants from cultivar BR 18 in relation to noninoculated plants at 96 hai, but there was no difference between inoculated and noninoculated plants for cultivar BRS 229. MDA concentration was higher in inoculated plants at 48, 72, and 96 hai for cultivar BR 18 and just at 48 hai for cultivar BRS 229, in relation to noninoculated plants. EL increased 323 and 188% at 96 hai in inoculated plants from cultivars BR 18 and BRS 229, respectively, compared with noninoculated plants. The gas exchange parameters A , stomatal conductance and transpiration rate as well as V_{cmax} and J_{max} were significantly reduced in inoculated plants from both wheat cultivars compared with noninoculated plants. This reduction, however, was less pronounced in the plants from cultivar BRS 229 than in the plants from cultivar BR 18, which was associated with lower blast severity observed for BRS 229. C_i increased 32 and 14% at 96 hai in inoculated plants from cultivars BR 18 and BRS 229, respectively. The $J_{\text{max}}/V_{\text{cmax}}$ ratio increased in inoculated plants from both cultivars in relation to noninoculated plants. R_d increased 208% in inoculated plants from cultivar BR 18 in relation to noninoculated plants at 96 hai, but there was no difference in R_d between inoculated and noninoculated plants for cultivar BRS 229. The results of this study demonstrated the importance of an efficient antioxidant system to remove excess of reactive oxygen species generated during infection of wheat plants with *P. oryzae* limiting the cellular damage caused by the fungus. Additionally, the more efficient antioxidant system appears to contribute to a greater resistance to wheat blast. The physiological evaluations showed that the photosynthesis of wheat plants was significantly reduced by infection with *P. oryzae*, what was mainly associated with lower apparent activity of Rubisco, followed by the lower RuBP regeneration. Knowledge of biochemical and physiological changes of wheat plants infected with *P. oryzae* is of great importance to develop effective strategies for control of wheat blast.

Capítulo 1

**Alterações Bioquímicas em Plantas de Trigo Infectadas por
*Pyricularia oryzae***

RESUMO

Neste estudo foi investigada a mudança na atividade das enzimas do sistema antioxidativo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), glutationa-S-transferase (GST), peroxidase do ascorbato (APX), redutase da glutationa (GR) e peroxidase da glutationa (GPX), bem como nas concentrações de superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e aldeído malônico (MDA), e no extravasamento de eletrólitos (EE) em plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 infectadas por *Pyricularia oryzae*, agente causal da brusone, às 48, 72 e 96 horas após a inoculação (hai). A severidade da brusone foi 50% menor nas plantas da cultivar BRS 229 do que nas plantas da cultivar BR 18 às 96 hai. A atividade das enzimas do sistema antioxidativo foi fortemente afetada pela infecção por *P. oryzae* e usualmente maior nas plantas inoculadas do que nas plantas não inoculadas. O aumento na atividade das enzimas SOD, POX, APX e GST às 96 hai foi mais pronunciado para a cultivar BRS 229 do que para a cultivar BR 18. Os aumentos na atividade dessas enzimas foram de 167, 677, 120 e 849%, respectivamente, para a cultivar BRS 229 e de 79, 437, 30 e 61%, respectivamente, para a cultivar BR 18. A atividade da GR e CAT aumentou somente nas plantas inoculadas da cultivar BRS 229 às 96 hai, com incrementos de 51 e 66%, respectivamente, em relação às plantas não inoculadas. Para a cultivar BR 18, a atividade da GR não foi afetada pela inoculação com *P. oryzae*. A atividade da CAT nessa cultivar foi menor nas plantas inoculadas (14% inferior em relação às plantas não inoculadas às 96 hai). A atividade da GPX aumentou nas plantas inoculadas da cultivar BR 18 em relação às plantas não inoculadas às 48 e 72 hai, e não foi afetada pela inoculação com *P. oryzae* nas plantas da cultivar BRS 229. A concentração de O_2^- aumentou em 153 e 72% às 96 hai nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, comparadas com as plantas não inoculadas. A concentração de H_2O_2 aumentou em 59% nas plantas inoculadas da cultivar BR 18 comparadas com as plantas não inoculadas, porém não houve diferença entre plantas inoculadas e não inoculadas na concentração de H_2O_2 para a cultivar BRS 229. Para a concentração de MDA, foi observado aumento de 120% nas plantas inoculadas da cultivar BR 18 comparadas com as plantas não inoculadas às 96 hai. Para a cultivar BRS 229, a concentração de MDA foi maior nas plantas inoculadas do que nas plantas não

inoculadas somente às 48 hai. O EE aumentou em 323 e 188% às 96 hai nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, comparadas com as plantas não inoculadas. Os resultados do presente estudo demonstraram a importância de um sistema antioxidativo eficiente para remover o excesso de espécies reativas de oxigênio gerado durante a infecção de plantas de trigo por *P. oryzae* e para limitar o dano celular causado pelo fungo. Adicionalmente, esse sistema antioxidativo mais eficiente parece contribuir para uma maior resistência do trigo à brusone.

INTRODUÇÃO

A brusone, causada por *Pyricularia oryzae* Cavara (teleomorfo: *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr), constitui a doença mais importante do trigo cultivado no cerrado brasileiro e representa um dos principais fatores limitantes à expansão da cultura nessa região (Goulart et al., 2007). A brusone foi relatada pela primeira vez em 1985 no Estado do Paraná, Brasil (Igarashi et al., 1986). Desse estado, *P. oryzae* se disseminou para praticamente todas as regiões tritícolas do Brasil (Goulart et al., 1990; Igarashi, 1990; Picinini e Fernandes, 1990; Prabhu et al., 1992; Anjos et al., 1996, Goulart et al., 2007). Danos à produtividade superiores a 60% têm sido relatados devido a essa doença (Goulart et al., 2007).

Os sintomas da brusone variam de acordo com o órgão da planta atacado, condições ambientais e resistência da cultivar (Igarashi et al., 1986). Nas folhas, os sintomas iniciam-se como lesões cinza esverdeadas na forma de anasarca, com bordas verdes escuras depois de completamente expandidas (Reis e Casa, 2005). Nas glumas, são observadas lesões elípticas com o centro claro circundadas por bordas de coloração castanho claro a escura (Reis e Casa, 2005). O sintoma da brusone nas espigas é evidenciado pela presença de um ponto negro brilhante na ráquis no local de penetração por *P. oryzae* (Reis e Casa, 2005). A colonização da ráquis por *P. oryzae* interrompe a translocação de fotoassimilados e a espiga apresenta coloração esbranquiçada, normalmente na metade superior, acima do sítio de penetração do fungo (Reis e Casa, 2005).

A ausência de cultivares resistentes e fungicidas eficientes (Goulart e Paiva, 1992; Goulart e Paiva, 1993; Urashima e Kato, 1994; Goulart et al., 2007; Cruz et al., 2010) torna o controle da brusone bastante difícil. A busca de cultivares de trigo com resistência à brusone tem sido uma das prioridades dos programas de melhoramento de trigo destinados a desenvolver cultivares para o cultivo em locais com histórico de ocorrência dessa doença (Cruz et al., 2010). No entanto, a resistência à brusone tem se mostrado bastante complexa, havendo variação de acordo com o isolado de *P. oryzae* e o estágio de desenvolvimento das plantas (Urashima et al., 2004; Arruda et al., 2005; Cruz et al., 2010). Alguns estudos têm demonstrado a existência de cultivares com resistência parcial à brusone (Urashima et al., 2004; Arruda et al., 2005; Cruz et al., 2010), mas os mecanismos responsáveis pela resistência têm sido pouco estudados.

Condições de estresse, como o ataque por patógenos, induzem aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelas plantas (Magbanua et al., 2007). Entre as ERO, destaca-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que está envolvido na morte direta do patógeno e de células do hospedeiro, bem como em ligações oxidativas cruzadas de proteínas da parede celular, tornando-a mais resistente à degradação por enzimas líticas produzidas pelo patógeno (Mehdy et al., 1996). Embora o H_2O_2 seja essencial na sinalização e defesa das plantas contra patógenos, esse pode reagir com o radical superóxido (O_2^-) ou com íons metálicos para formar o radical hidroxil (HO^\bullet), que é extremamente tóxico e intensifica a toxicidade celular do H_2O_2 (Lin et al., 2009). O estresse oxidativo causa a peroxidação dos lipídeos na membrana plasmática e danos aos pigmentos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (Apel e Hirt, 2004).

Para a remoção do excesso de ERO gerado durante a interação com patógenos, as plantas apresentam sistemas enzimáticos e não enzimáticos (Scandalios, 1993). Entre as enzimas envolvidas na defesa contra o estresse oxidativo, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase (POX), a glutationa-S-transferase (GST), a peroxidase do ascorbato (APX), a redutase da glutaciona (GR) e a peroxidase da glutaciona (GPX) (Noctor e Foyer, 1998; Hiraga et al., 2001; Arora et al., 2002; Mittler, 2002; Takesawa et al., 2002; Dixon et al., 2010). A SOD constitui a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo (Bowler et al., 1992), pois está envolvida na dismutação do radical O_2^- em oxigênio molecular e H_2O_2 (Giannopolitis e Ries, 1977). Entre as enzimas envolvidas na remoção do H_2O_2 estão CAT, POX, APX, GST, GPX e GR (Noctor e Foyer, 1998; Hiraga et al., 2001; Arora et al., 2002; Mittler, 2002; Takesawa et al., 2002; Dixon et al., 2010).

A alteração do sistema antioxidativo de plantas infectadas por patógenos tem sido bem documentada na literatura (Kuzniak e Sklodowska, 2005; Díaz-Vivancos et al., 2008, Agrawal et al., 2002a,b). Contudo, poucos trabalhos investigaram a relação dessas mudanças com a resistência das plantas. Não existem informações na literatura sobre as alterações no sistema antioxidativo e a concentração de ERO em plantas de trigo infectadas por *P. oryzae*. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar a atividade de enzimas do sistema antioxidativo, a concentração de ERO, e os danos celulares decorrentes da

infecção do trigo por *P. oryzae* em duas cultivares com diferentes graus de resistência à brusone.

MATERIAL E MÉTODOS

Crescimento das plantas: sementes de trigo das cultivares BR 18 (gentilmente cedidas pelo Dr. Douglas Lau, EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, Passo Fundo - RS) e BRS 229 (gentilmente cedidas pelo M.Sc. Márcio Só e Silva, EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, Passo Fundo - RS) foram semeadas em vasos plásticos na densidade de 12 sementes por vaso contendo 1 kg de substrato. Estudos prévios demonstraram que as cultivares BR 18 e BRS 229 foram suscetível e parcialmente resistente à brusone no estágio de planta jovem, respectivamente (Cruz et al., 2010). Após a emergência das plântulas, realizou-se o desbaste, deixando seis plântulas por vaso. O substrato utilizado foi o Tropstrato HT (Vida Verde, Mogi Mirim - SP), composto de casca de pinus, turfa, vermiculita expandida e enriquecido com macro e micronutrientes. O substrato foi adubado antes da semeadura com 1,63 g de fosfato de cálcio por vaso. Após a emergência das plântulas, aplicaram-se 30 mL de solução nutritiva contendo, em g L⁻¹, 6,4 KCl, 3,48 K₂SO₄, 5,01 MgSO₄.7H₂O, 2,3 (NH₂)₂CO, 0,009 NH₄MO₇O₂₄.4H₂O, 0,054 H₃BO₃, 0,222 ZnSO₄.7H₂O, 0,058 CuSO₄.5H₂O e 0,137 MnCl₂.4H₂O. A solução nutritiva foi aplicada semanalmente. Um volume de 15 mL de uma solução nutritiva contendo 0,27 g FeSO₄.7H₂O e 0,37 g de EDTA bissódico L⁻¹ também foi aplicado após a emergência das plântulas. As plantas foram regadas diariamente.

Inoculação das plantas: o isolado de *P. oryzae* (UFV/DFP Po-01) utilizado neste trabalho foi obtido de espigas de trigo da cultivar BR 18 em Viçosa-MG. Esse isolado foi preservado em papel filtro contido em tubos de microcentrífuga com sílica gel (Dhingra e Sinclair, 1985). O papel filtro, apresentando crescimento micelial do fungo, foi transferido para placas de Petri contendo meio aveia-água. Após o crescimento micelial, discos de meio contendo o fungo foram transferidos para novas placas contendo o mesmo meio. Essas placas foram mantidas em câmara de crescimento de microrganismos tipo BOD com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 24 h, por 10 dias. Após esse período, os conídios do fungo foram cuidadosamente removidos das placas de Petri com pincel de cerdas macias e água contendo gelatina (1%, m/v). A suspensão de conídios foi calibrada em hemacitômetro para se obter uma concentração de 1 × 10⁵ conídios mL⁻¹. A suspensão de conídios foi pulverizada na superfície adaxial das folhas das plantas

de trigo no estágio 19 (Zadoks et al., 1974), utilizando-se um atomizador Aibrush (Paasche Airbrush Co., Chicago, IL). Após a inoculação, as plantas foram mantidas no escuro em câmara úmida, a 25 °C, por 24 h. Em seguida, as plantas foram transferidas para casa de vegetação com umidade relativa de $80 \pm 5\%$ e temperatura de 25 ± 3 °C.

Avaliação da severidade da brusone: a severidade da brusone foi avaliada na quarta e na quinta folha, a partir da base, das plantas das duas cultivares de trigo às 72 e 96 horas após a inoculação (hai) usando a escala proposta pelo IIRI (1996).

Determinação da atividade de enzimas do sistema antioxidativo: amostras da quarta e da quinta folha, a partir da base, das plantas das duas cultivares inoculadas e não inoculadas com *P. oryzae* foram coletadas às 48, 72 e 96 hai. As amostras foliares foram armazenadas individualmente em papel alumínio e mantidas em nitrogênio (N₂) líquido durante as coletas e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer a -80 °C para posterior análise.

Para a obtenção do extrato foliar para determinar a atividade das enzimas SOD, CAT, POX, GST, APX e GPX, 0,3 g de fragmentos de folhas foram macerados com N₂ líquido em almofariz até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8) contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVP) 2% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a $12000 \times g$, por 15 min, a 4 °C e o sobrenadante foi usado como extrato para as determinações enzimáticas.

Para a obtenção do extrato foliar para determinar a atividade da enzima GR, 0,3 g de fragmentos foliares foram macerados conforme descrito acima. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL constituído de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), EDTA 0,1 mM, *DL*-ditioteitol 1 mM, PMSF 1 mM e PVP 2% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado conforme descrito anteriormente.

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 60 µL do extrato foliar em 1,94 mL de mistura de reação constituída de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, azul de *p*-nitro-tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM (Del Longo et al., 1993). A reação ocorreu a 25 °C sob iluminação de lâmpadas de 15 W. Após 10 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotoredução do NBT, foi

medida em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts - EUA), a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977). As amostras controle tiveram suas absorvâncias medidas a 560 nm utilizando-se mistura de reação mantida no escuro por 10 min. Os valores obtidos foram subtraídos das leituras das amostras das repetições dos tratamentos que receberam iluminação. Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

A atividade da CAT foi determinada pelo método de Cakmak e Marschner (1992). A mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8) e de H₂O₂ 20 mM em um volume de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL do extrato foliar e a atividade foi determinada pelo consumo de H₂O₂ a 240 nm, durante 1 min, a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson et al., 1995) foi usado para determinar a atividade das CAT, a qual foi expressa em mmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da POX foi determinada pela oxidação do pirogalol, de acordo com a metodologia proposta por Kar e Mishra (1976). A mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM em um volume de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de 15 µL do extrato foliar e a atividade foi determinada pelo consumo de H₂O₂ a 420 nm, durante 1 min, a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955) foi usado para calcular a atividade da POX, a qual foi expressa em µmol de purpurogalina produzida min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da GST foi determinada utilizando a metodologia proposta por Habig et al. (1974). A mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,5), glutathiona reduzida (GSH) 50 mM e 150 µL do extrato foliar em um volume de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de 500 µL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 30 mM e, em seguida, foi incubada a 25 °C, durante 4 min, e a absorvância foi medida a 340 nm, durante 3 min. O coeficiente de extinção molar de 9,6 mM⁻¹ cm⁻¹ (Habig et al., 1974) foi usado para calcular a atividade da GST, a qual foi expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano e Asada (1981). A mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8), H₂O₂ 1 mM e ascorbato 0,8 mM, em um volume de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL do extrato foliar e a atividade foi medida pela

oxidação do ascorbato a 290 nm, durante 1 min, a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nakano e Asada, 1981) foi usado para calcular a atividade da APX, a qual foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da GPX foi determinada pela adição de 100 μL do extrato foliar ao meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, (pH 7,0), EDTA 1 mM, NaCl 0,114 M, GSH 1 mM, NADPH 0,2 mM, H_2O_2 0,25 mM e 1 unidade de redutase da glutatona (Nagalakshmi e Prasad, 2001). O decréscimo na absorbância foi medido a 340 nm, a 30 °C, durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Anderson e Davis, 2004) e o resultado expresso em $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da GR foi determinada pela adição de 100 μL do extrato foliar a 1,9 mL de uma mistura de reação constituída de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, glutatona oxidada (GSSG) 1 mM e NADPH 0,1 mM preparado em tampão Tris-HCl 0,5 mM (pH 7,5), segundo Carlberg e Mannervik (1985). O decréscimo na absorbância foi medido a 340 nm, a 30 °C, durante o primeiro min de reação. A atividade da GR foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Foyer e Halliwell, 1976) e foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Determinação da concentração de superóxido (O_2^-): amostras de 100 mg de fragmentos de folhas foram incubadas em 2 mL de meio de reação constituído do sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (Na_2EDTA) 100 μM , β -nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida (NADH) 20 μM e tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,8) (Mohammadi e Karr, 2001). Essa mistura foi preparada em tubos de penicilina hermeticamente fechados e a reação foi iniciada pela adição de 100 μL de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N utilizando-se seringa cromatográfica. As amostras foram incubadas a 28 °C, sob agitação, por 5 min. Em seguida, os fragmentos de folhas foram removidos e, a partir do sétimo min, foi iniciada a leitura da absorbância a 480 nm, durante 5 min. O controle foi realizado nas mesmas condições, mas sem tecido vegetal. A produção de O_2^- foi avaliada pela determinação do adenocromo acumulado (Misra e Fridovich, 1971),

utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de $4,0 \times 10^3 \text{ M}$ (Boveris, 1984). O resultado foi expresso em mmol kg^{-1} de massa fresca.

Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2): amostras de 100 mg de tecido foliar foram maceradas em N_2 líquido em almofariz até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,5) e hidroxilamina 1 mM. O homogeneizado foi centrifugado a $10000 \times g$, durante 15 min, a 4°C (Kuo e Kao, 2003). Foram adicionados 100 μL do sobrenadante ao meio de reação constituído de $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)$ 100 μM , ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 μM e sorbitol 100 mM, em um volume de 2 mL (Gay e Gerbicki, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 min e a absorbância determinada a 560 nm. Os controles do reagente e dos extratos foliares foram preparados paralelamente e subtraídos da amostra. A concentração de H_2O_2 , estimada com base em curva padrão de H_2O_2 , foi expressa em $\mu\text{mol kg}^{-1}$ de massa fresca.

Determinação da concentração de aldeído malônico (MDA): os danos celulares foram avaliados por meio da peroxidação de lipídeos através de MDA conforme descrito por Cakmak e Horst (1991). Amostras de 100 mg de tecido foliar foram maceradas em N_2 líquido em almofariz até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL constituído de ácido tricloroacético (TCA) 1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a $12000 \times g$, durante 15 min, a 4°C . Após centrifugação, 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL da solução de ácido tiobarbitúrico 0,5% (m/v) (preparado em 20% (m/v) de TCA) e incubado em banho maria a 95°C , por 30 min. Após esse período, a reação foi parada em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a $9000 \times g$, por 10 min, e a absorbância específica do sobrenadante foi determinada a 532 nm. A absorbância inespecífica foi mensurada a 600 nm e subtraída do valor da absorbância específica. A concentração de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e foi expressa em $\mu\text{mol kg}^{-1}$ de massa fresca (Heath e Packer, 1968).

Determinação do extravasamento de eletrólitos (EE): a quantificação do EE foi determinada conforme metodologia descrita por Lima et al. (2002), com algumas modificações. Foram coletados 22 discos (8 mm de diâmetro) da quarta e da quinta folha, a partir da base, do perfilho principal das plantas de cada tratamento e repetição, às 72 e 96 hai. Os discos foliares obtidos foram lavados duas vezes

em água desionizada imediatamente após as coletas. Em seguida, os discos foliares foram incubados em 60 mL de água desionizada a 25 °C. Após 4 h, foi realizada a primeira leitura da condutividade elétrica (CE1) em condutivímetro (Tecnoyon *mCA-150*; MS Tecnoyon Instrumentação Científica, São Paulo - SP). Posteriormente, as amostras foram incubadas a 90 °C, por 2 h, sendo, então, efetuada a segunda leitura da condutividade elétrica (CE2). O EE, em porcentagem, foi obtido de acordo com a seguinte fórmula: $EE (\%) = (CE1 / CE2) \times 100$.

Delineamento experimental e análise estatística dos dados: o experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×2×3, consistindo de duas cultivares de trigo (BR 18 e BRS 229), plantas inoculadas e não inoculadas com *P. oryzae* e três épocas de coleta (48, 72 e 96 hai), com quatro repetições. Cada unidade experimental foi constituída de um vaso plástico de 1 L com seis plantas. Os dados de todas as variáveis avaliadas foram submetidos à análise de variância e as médias das plantas inoculadas e não inoculadas para cada cultivar dentro de cada época de avaliação foram comparadas pelo teste *t* ($P \leq 0,05$), utilizando-se o software SAS (versão 6.12; SAS Institute, Inc., Cary, NC).

RESULTADOS

Apenas os fatores cultivares e épocas de avaliação foram significativos para a severidade da brusone (Tabela 1). A severidade foi significativamente menor na cultivar BRS 229 do que na cultivar BR 18, independentemente da época de avaliação. Quanto à época de avaliação, aumento significativo na severidade da brusone foi observado das 72 às 96 hai, independentemente da cultivar de trigo analisada. A severidade da brusone aumentou de 10 para 13% na cultivar BRS 229 e de 24 para 32% na cultivar BR 18 das 72 às 96 hai, respectivamente.

Pelo menos um dos fatores estudados, bem como algumas interações entre eles, foi significativo para a atividade das enzimas SOD, CAT, POX, GST, APX, GR e GPX (Tabela 2), para as concentrações de O_2^- , H_2O_2 e MDA (Tabela 3) e para o EE (Tabela 4). Isoladamente, a inoculação das plantas foi o fator mais importante (maiores valores de *F*) para explicar a variação observada em todas as variáveis, com exceção da atividade da CAT, que não foi influenciada por esse fator (Tabela 2). A interação dos fatores cultivares \times inoculação \times épocas de coleta não foi significativa apenas para a atividade da CAT e GR (Tabela 2), bem como para concentração de H_2O_2 (Tabela 3).

A atividade da SOD foi significativamente maior nas plantas inoculadas em relação às das plantas não inoculadas às 48, 72 e 96 hai (Figura 1). A atividade da SOD aumentou em 40 e 28% às 48 hai, em 44 e 53% às 72 hai, e em 79 e 167% às 96 hai nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, em relação às plantas não inoculadas.

A atividade da CAT decresceu significativamente nas plantas inoculadas da cultivar BR 18 em relação às plantas não inoculadas às 72 e 96 hai (Figura 2). Na cultivar BRS 229, a atividade da CAT aumentou significativamente nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas às 48 e 96 hai.

A atividade da POX foi significativamente maior nas plantas inoculadas das duas cultivares do que nas plantas não inoculadas às 48, 72 e 96 hai (Figura 3). Os aumentos na atividade da POX nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, comparados aos das plantas não inoculadas foram de 239 e 189% às 48 hai, de 400 e 368% às 72 hai e de 437 e 678% às 96 hai.

As plantas inoculadas das duas cultivares apresentaram aumento significativo na atividade da GST em relação às das plantas não inoculadas às 48,

72 e 96 hai (Figura 4). A atividade da GST aumentou em 92 e 102% às 48 hai, em 50 e 140% às 72 hai, e em 61 e 849% às 96 hai nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, em relação à das plantas não inoculadas.

A atividade da APX foi significativamente maior nas plantas inoculadas das duas cultivares do que nas plantas não inoculadas às 48, 72 e 96 hai (Figura 5). A atividade da APX aumentou em 70 e 44% às 48 hai, em 29 e 79% às 72 hai, e em 30 e 120% às 96 hai nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, comparada à das plantas não inoculadas.

A atividade da GR não foi afetada pela inoculação com *P. oryzae* às 48, 72 e 96 hai para a cultivar BR 18 e às 72 hai para a cultivar BRS 229 (Figura 6). Para essa cultivar, a atividade das GR foi significativamente maior nas plantas inoculadas do que nas plantas não inoculadas às 48 e 96 hai.

Para a cultivar BR 18, diferenças na atividade da GPX entre plantas inoculadas e não inoculadas ocorreram às 48 e 72 hai, com os maiores valores ocorrendo nas primeiras (Figura 7). Na cultivar BRS 229, no entanto, a inoculação das plantas com *P. oryzae* não influenciou a atividade da GPX às 48, 72 e 96 hai.

Diferenças na concentração de O_2^- entre plantas inoculadas e não inoculadas foram encontradas às 72 e 96 hai para a cultivar BR 18, e somente às 96 hai para a cultivar BRS 229, com maior concentração de O_2^- ocorrendo nas plantas inoculadas do que nas plantas não inoculadas (Figura 8). A concentração de O_2^- aumentou em 153 e 72% às 96 hai nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, comparadas com as plantas não inoculadas.

Diferenças na concentração de H_2O_2 entre plantas inoculadas e não inoculadas foram observadas apenas para a cultivar BR 18 às 72 e 96 hai (Figura 9), sendo maior nas plantas não inoculadas e inoculadas, respectivamente.

Diferenças na concentração de MDA entre plantas inoculadas e não inoculadas foram observadas às 48, 72 e 96 hai para a cultivar BR 18 e somente às 48 hai para a cultivar BRS 229 (Figura 10). Para ambas as cultivares, a concentração de MDA foi significativamente maior nas plantas inoculadas comparadas às plantas não inoculadas.

As plantas inoculadas das duas cultivares apresentaram aumento significativo no EE em relação às plantas não inoculadas às 72 e 96 hai (Figura 11). O EE aumentou em 124 e 87% às 72 hai e em 323 e 188% às 96 hai nas

plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, comparadas às não inoculadas.

DISCUSSÃO

Os dados de severidade deste trabalho estão de acordo com a variação na resistência das cultivares observada em estudos prévios. A severidade da brusone foi 50% menor na cultivar BRS 229 do que na cultivar BR 18 às 96 hai, corroborando os resultados obtidos por Cruz et al. (2010), os quais demonstraram que a cultivar BRS 229 foi parcialmente resistente à brusone e a cultivar BR 18 suscetível no estágio de planta jovem. Em concordância com esses resultados, este é o primeiro trabalho que fornece evidências de que um sistema antioxidativo mais eficiente diminui o dano celular causado pelas ERO produzidas durante a interação trigo-*P. oryzae*, contribuindo para a resistência do trigo à brusone.

A produção de ERO é uma importante resposta de defesa das plantas contra o ataque de patógenos (Magbanua et al., 2007). No entanto, o acúmulo de ERO, causado pelo desbalanço entre a produção de ERO e os mecanismos de defesa do hospedeiro em favor do primeiro, resulta em estresse oxidativo que pode danificar os tecidos das plantas (Lima et al., 2002). Dessa forma, as plantas apresentam sistemas enzimáticos para manter os níveis de ERO constantes no interior das células (Scandalios, 1993).

Este estudo mostrou que a atividade da SOD aumentou nas plantas inoculadas com *P. oryzae*, ao contrário do que foi observado para as plantas não inoculadas. Diversos trabalhos relataram o aumento na atividade das SODs em resposta à infecção por patógenos. Em tomateiro, por exemplo, foi demonstrado que a atividade da SOD peroxissomal foi induzida na fase inicial da infecção por *Botrytis cinerea* (Kuzniak e Sklodowska, 2005). Contudo, foi observado decréscimo na atividade da SOD com o desenvolvimento das lesões necróticas (Kuzniak e Sklodowska, 2005). Essa observação é discordante do observado no presente estudo, no qual houve aumento na atividade da SOD nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas com o progresso da brusone. Embora a atividade da SOD tenha aumentado nas plantas inoculadas das duas cultivares, a cultivar BRS 229 apresentou aumento mais acentuado na atividade dessa enzima resultando em menores concentrações de O_2^- . Em morangueiro infectado por *Mycosphaerella fragariae* também houve aumento na atividade da SOD, o qual foi mais pronunciado nas cultivares resistentes do que na suscetível (Ehsani-Moghaddam et al., 2006), o que está de acordo com os resultados

observados no presente estudo. Alguns fungos podem se beneficiar do aumento nos níveis de ERO gerado pelas células das plantas na defesa contra patógenos (Govrin e Levine, 2000). Desse modo, a maior atividade da SOD observada nas cultivares resistentes pode ser uma estratégia da planta para restringir o desenvolvimento do patógeno por remover o excesso de ERO (Ehsani-Moghaddam et al., 2006).

Entre as enzimas envolvidas na remoção do excesso de H_2O_2 , gerado espontaneamente ou pela dismutação do radical O_2^- pela SOD, a CAT está entre as mais importantes (Mittler, 2002). Neste estudo, o aumento na concentração de H_2O_2 nas plantas inoculadas da cultivar BR 18 em relação às plantas não inoculadas às 96 hai foi associado com redução na atividade da CAT, corroborando relatos para outros patossistemas. Na interação ervilha-*Plum pox virus*, plantas suscetíveis ao vírus apresentaram decréscimo na atividade da CAT e concomitante aumento na concentração de H_2O_2 apenas a partir do desenvolvimento dos sintomas (Díaz-Vivancos et al., 2008). Essa observação é suportada pelos resultados encontrados no presente estudo, em que se demonstrou que a atividade da CAT não aumentou nas plantas inoculadas da cultivar BR 18 durante o período no qual os sintomas da brusone ainda não eram evidentes. Plantas de tomateiro infectadas por *B. cinerea* apresentaram aumento na atividade da CAT no início da infecção pelo fungo, porém a atividade dessa enzima decresceu com o desenvolvimento das lesões necróticas (Kuzniak e Sklodowska, 2005). A redução na atividade da CAT pode ser consequência do aumento na proteólise causada por endopeptidases peroxissomais que são induzidas pelo estresse oxidativo (Palma et al., 2002). Isso pode explicar a redução na atividade da CAT nas plantas de trigo da cultivar BR 18 às 72 e 96 hai.

Embora a atividade da CAT tenha decrescido com o progresso da brusone nas plantas da cultivar BR 18, isso não ocorreu para a cultivar BRS 229. Nesse caso, a atividade da CAT foi maior nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas às 48 e 96 hai. Este aumento na atividade da CAT nas plantas inoculadas da cultivar BRS 229 permitiu que as concentrações de H_2O_2 não fossem alteradas em relação às plantas não inoculadas. Dessa forma, a diferença na atividade da CAT observada no presente trabalho sugere existir uma associação entre a atividade dessa enzima e a resistência das plantas de trigo à brusone. Estes resultados concordam com os dados obtidos por Magbanua et al. (2007), os quais

demonstraram que a atividade da CAT em linhagens de milho resistentes a *Aspergillus flavus* foi maior do que nas linhagens suscetíveis. Entretanto, a redução da atividade da CAT geralmente resulta em plantas mais resistentes ao ataque de patógenos (Magbanua et al., 2007), visto que essas plantas conseguem manter altas concentrações de H₂O₂. Dessa forma, o papel da CAT na interação planta-patógeno parece ser mais complexo do que em estresses abióticos (Kuzniak e Sklodowska, 2005), em que geralmente existe uma relação entre a atividade dessa enzima e a tolerância das plantas (Willekens et al., 1995; Miyagawa et al., 2000; Oksanen, et al. 2003).

Nas plantas inoculadas das duas cultivares houve aumento acentuado na atividade das enzimas POX, GST e APX durante o processo infeccioso de *P. oryzae*. Contudo, a diferença na atividade dessas enzimas entre plantas inoculadas e plantas não inoculadas às 96 h foi maior na cultivar BRS 229 do que cultivar na BR 18, sugerindo que, além da CAT, aquelas enzimas também foram importantes para manter as concentrações de H₂O₂ constantes nas plantas inoculadas da cultivar BRS 229.

Além do envolvimento da POX na remoção de H₂O₂, essa enzima também apresenta importante papel na defesa das plantas contra patógenos devido à sua participação na biossíntese da lignina (Rauyaree et al., 2001). Hong-xia et al. (2011) estudaram a atividade das enzimas POX, GST, CAT e SOD em cultivares de trigo resistentes e suscetíveis a *Rhizoctonia cerealis* e concluíram que a atividade da POX esteve associada com a maior resistência das plantas. Na interação trigo-*P. oryzae*, a maior atividade da POX no estágio final da infecção pelo fungo também foi importante na resistência do trigo à brusone (Xavier Filha et al., 2011). Esses relatos concordam com os resultados do presente estudo onde houve aumento na atividade da POX, principalmente nas plantas da cultivar BRS 229 infectadas por *P. oryzae* nos estágios finais da infecção.

A GST constitui um amplo e diversificado grupo de enzimas que catalisam a conjugação da glutatona reduzida (GSH) a uma variedade de substratos hidrofóbicos, eletrofílicos, e usualmente citotóxicos (Pickett e Lu, 1989; Dixon et al., 2010). Essa enzima é capaz de reduzir H₂O₂ e hidroperóxidos fosfolipídicos (Eshdat et al., 1997). A expressão da GST em plantas é altamente respondente a estresses bióticos e abióticos, sugerindo sua importância na defesa das plantas contra estresses (Marrs, 1996; Droog, 1997). Embora seja conhecido que o

aumento na atividade da GST confere maior tolerância das plantas a estresses abióticos (Takesawa et al., 2002), poucos trabalhos têm estudado a sua atividade em plantas infectadas por patógenos. A maior atividade da GST às 96 hai nas plantas da cultivar BRS 229 do que nas plantas da cultivar BR 18, ressalta a sua importância na remoção de ERO, bem como na resistência do trigo à brusone.

A remoção do excesso de H_2O_2 pela APX é o primeiro passo do ciclo ascorbato-glutationa (Foyer e Halliwell, 1976; Asada, 1994). Esse ciclo compreende uma série de reações redox, envolvendo, além da APX, as enzimas redutase do monodesidroascorbato (MHAR), redutase do desidroascorbato (DHAR) e GR (Foyer e Halliwell, 1976; Nakano e Asada, 1981). A APX é responsável pela remoção de H_2O_2 nos cloroplastos, peroxissomos e mitocôndrias (Quan et al., 2008) utilizando o ascorbato como doador de elétrons específico para reduzir o H_2O_2 a água (Asada, 1992). O aumento no nível dos transcritos do gene da APX e na atividade dessa enzima durante a interação planta-patógeno tem sido bem documentado (El-Zahabi et al., 1995; Hüchelhoven et al., 2001; Sarowar et al., 2005; Harrach et al., 2008). No presente trabalho, a atividade da APX aumentou nas plantas inoculadas comparadas às plantas não inoculadas, porém este aumento foi mais pronunciado nas plantas da cultivar BRS 229 do que nas plantas da cultivar BR 18. Aumento na expressão do gene da APX foi observado em folhas de cevada após a inoculação com *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Hüchelhoven et al., 2001). Harrach et al. (2008) observaram que a atividade da maioria das enzimas antioxidantes tais como POX, APX e GST em folhas de cevada foi similarmente alterada após a inoculação com *B. graminis* f.sp. *hordei*.

A GR constitui um grupo de enzimas dependentes de nicotinamida dinucleotídeo (fosfato) NAD(P)H que catalisam a redução da glutatona oxidada (GSSG), formando duas moléculas de GSH (Schaedle e Bassham, 1977; Carlberg e Mannervik, 1985). Hernández et al. (2001) observaram maior atividade da GR em plantas de uma cultivar resistente de damasco inoculada com *Plum pox virus* em relação às plantas da cultivar suscetível infectada, suportando o resultado encontrado neste estudo, em foi observado aumento na atividade da GR somente nas plantas inoculadas da cultivar BRS 229, que apresentaram menor severidade da brusone, em relação às plantas da cultivar BR 18.

O papel da GR na resistência de plantas a patógenos ainda não está esclarecido, visto que alguns estudos não têm encontrado uma relação entre a

atividade dessa enzima e a resistência. El-Zahabi et al. (1995) não observaram diferença na atividade da GR em folhas de três cultivares de cevada infectadas por *B. graminis* f. sp. *hordei* tanto em interações compatíveis quanto incompatíveis. Diferentemente, raízes de plantas de grão de bico infectadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* apresentaram aumento na atividade da GR apenas para a interação compatível (García-Limones et al., 2002).

A GPX compõe uma família de isoenzimas que usam a glutathiona para reduzir H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos para proteger as células contra o dano oxidativo (Quan et al., 2008). De acordo com Asada (1992), as principais funções da GPX nas plantas são a biossíntese de lignina, degradação do ácido indol-3-acético e resistência a patógenos. No presente trabalho, a atividade da GPX foi maior apenas para as plantas da cultivar BR 18 inoculadas com *P. oryzae* em relação às plantas não inoculadas. Plantas de tomateiro inoculadas com *B. cinerea* também apresentaram maior atividade dessa enzima nos peroxissomos e, semelhantemente ao encontrado no presente trabalho, sua atividade decresceu a partir do aparecimento dos sintomas do mofo cinzento (Kuzniak e Sklodowska, 2005). De acordo com esses autores, o mecanismo antioxidante peroxissomal foi mobilizado no início da infecção e cessou a partir do aparecimento dos sintomas do mofo cinzento.

Este estudo mostrou que o aumento nas concentrações de O_2^- e H_2O_2 nas plantas da cultivar BR 18 infectadas por *P. oryzae* correspondeu à maior concentração de MDA e EE. Em tomateiro, o elevado acúmulo de ERO em plantas infectadas por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* também resultou em maior peroxidação de lipídeos (Mandal et al., 2008). De acordo com esses autores, esse resultado foi associado a um sistema antioxidativo menos eficiente, particularmente com decréscimo na atividade da CAT. Esses resultados estão de acordo com os obtidos no presente estudo, em que a atividade da CAT foi significativamente reduzida apenas nas plantas da cultivar BR 18 infectadas por *P. oryzae*. A extensão do dano celular causado pelo estresse oxidativo relacionado à resposta da planta à infecção por patógenos pode ser estimada pelos produtos da peroxidação dos lipídeos de membrana (Mandal et al., 2008). O MDA produzido durante a peroxidação de lipídeos é um indicador do dano celular que resulta em aumento no EE (Dallagnol et al., 2011). A peroxidação de lipídeos da membrana plasmática por ERO é causada pela ocorrência de qualquer tipo de estresse celular

(Iturbe-Ormaetxe et al., 1998; Fu e Huang, 2001), como toxinas não específicas produzidas por *P. oryzae*, as quais são altamente citotóxicas ao arroz (Ou, 1985). A concentração de MDA foi maior nas plantas inoculadas da cultivar BRS 229 em relação às plantas não inoculadas somente às 48 hai. Como consequência da menor peroxidação de lipídeos, evidenciada pela menor alteração na concentração de MDA nas plantas da cultivar BRS 229, o aumento no EE foi menos pronunciado nas plantas dessa cultivar comparadas com as plantas da cultivar BR 18, devido à menor severidade da brusone. As maiores atividades da SOD, POX, APX, GST e GR nas plantas inoculadas da cultivar BRS 229 em relação às plantas inoculadas da cultivar BR 18 às 96 hai, resultaram em menores concentrações de O_2^- e H_2O_2 , restringindo, assim, os danos celulares causados por *P. oryzae*.

Os resultados do presente estudo demonstraram a importância de um sistema antioxidativo eficiente para remover o excesso de ERO gerado durante o processo infeccioso de *P. oryzae*, o que passa a limitar os danos celulares decorrentes da infecção pelo fungo, contribuindo, assim, para uma maior resistência à brusone.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal GK, Jwa NS, Rakwal R (2002a) A pathogen-induced novel rice (*Oryza sativa* L.) gene encodes a putative protein homologous to type II glutathione S-transferases. *Plant Sci.* **163**:1153-1160.
- Agrawal GK, Rakwal R, Jwa NS, Agrawal VP (2002b) Effects of signaling molecules, protein phosphatase inhibitors and blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) on the mRNA level of a rice (*Oryza sativa* L.) phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (*OsPHGPX*) gene in seedling leaves. *Gene* **283**:227-236.
- Anderson D, Prasad K, Stewart R (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.* **109**:1247-1257.
- Anderson JV, Davis DG (2004) Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. *Physiol. Plant.* **120**:421-433.
- Anjos JRN; Silva DB, Charchar MJD, Rodrigues GC (1996) Ocorrência de brusone (*Pyricularia grisea*) em trigo e centeio na região dos cerrados do Brasil Central. *Pesq. Agropec. Bras.* **31**:79-82.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**:373-399.
- Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.* **82**:1227-1238.
- Arruda MA, Bueno CRNC, Zamprogno KC, Lavorenti NA, Urashima A. (2005) Reação do trigo a *Magnaporthe grisea* nos diferentes estádios de desenvolvimento. *Fitopatol. Bras.* **30**:121-126.
- Asada K (1994) Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer CH, Mullineaux PM (eds) Causes of photooxidative stress and amelioration of defense system in Plants. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 77-103.
- Asada, K (1992). Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* **85**:235-241.
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analyt. Biochem.* **44**:276-287.

- Boveris A (1984) Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol.* **105**:429-435.
- Bowler C, Van Montagu M, Inze D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**:83-116.
- Bradford MN (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**:248-254.
- Cakmak I, Marschner H (1992) Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol.* **98**:1222-1227.
- Cakmak L, Horst WJ (1991) Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxide activity in root tip of soybean (*Glycine max*). *Plant Physiol.* **83**:463-468.
- Carlberg C, Mannervik B (1985) Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* **113**:488-495.
- Chance B, Maehley AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* **2**:764-775.
- Cruz MFA, Prestes AM, Maciel JLN, Scheeren PL (2010) Resistência parcial à brusone de genótipos de trigo comum e sintético nos estádios de planta jovem e de planta adulta. *Trop. Plant. Pathol.* **35**:24-31.
- Dallagnol LJ, Rodrigues FA, DaMatta FM, Mielli MVB, Pereira SC (2011) Deficiency in silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice–*Bipolaris oryzae* interaction. *Phytopathology* **101**:92-104.
- Del Longo, OT, González, CA, Pastori, GM, Trippi, VS (1993) Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiol.* **34**:1023-1028.
- Dhingra O, Sinclair JB (1985) Basic Plant Pathology Methods. Boca Raton: CRC Press Inc. 434 p.
- Díaz-Vivancos P, Clemente-Moreno MJ, Rubio M, Olmos E, García JA, Martínez-Gómez P, Hernández JA (2008) Alteration in the chloroplastic metabolism leads to ROS accumulation in pea plants in response to plum pox virus. *J. Exp. Bot.* **59**:2147-2160.

- Dixon DP, Skipsey M, Edwards R (2010) Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **71**:338-350.
- Droog F (1997) Plant glutathione-S-transferases, a tale of theta and tau. *J. Plant Growth Regul.* **16**:95-107.
- Ehsani-Moghaddam B, Charles MT, Carisse O, Khanizadeh S (2006) Superoxide dismutase responses of strawberry cultivars to infection by *Mycosphaerella fragariae*. *J. Plant Physiol.* **163**:147-153.
- El-Zahabi HM, Gullner G, Királi Z (1995) Effects of powdery mildew infection of barley on the ascorbate-glutathione cycle and other antioxidants in different host-pathogen interactions. *Phytopathology* **85**:1225-1230.
- Eshdat Y, Holland D, Faltin Z, Ben-Hayyim G (1997) Plant glutathione peroxidases. *Physiol. Plant.* **100**:234-240.
- Foyer CH, Halliwell B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**:21-25.
- Fu J, Huang B (2001) Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environ. Exp. Bot.* **45**:105-114.
- García-Limones C, Hervás A, Navas-Cortés JA, Jiménez-Díaz RM, Tena M (2002) Induction of antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **61**:325-337.
- Gay C, Gerbicki JM (2000) A critical evaluation of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. *Analyt. Biochem.* **284**:217-220.
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* **59**:309-314.
- Goulart ACP, Paiva FA (1992). Incidência da brusone (*Pyricularia grisea*) em diferentes cultivares de trigo (*Triticum aestivum*) em condições de campo. *Fitopatol. Bras.* **17**:321-325.
- Goulart ACP, Paiva FA (1993) Avaliação de fungicidas no controle da brusone (*Pyricularia grisea*) do trigo (*Triticum aestivum*). *Fitopatol. Bras.* **18**:167-173.

- Goulart ACP, Paiva FA, Mesquita AN (1990) Ocorrência da brusone (*Pyricularia oryzae*) do trigo (*Triticum aestivum*) em Mato Grosso do Sul. *Fitopatol. Bras.* **15**:112-114.
- Goulart ACP, Sousa PG, Urashima AS (2007) Danos em trigo causados pela infecção de *Pyricularia oryzae*. *Summa Phytopathol.* **33**:358-363.
- Govrin EM, Levine A (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* **10**:751-757.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**:7130-7139.
- Harrach BD, Fodor J, Pogány M, Preuss J, Barna B (2008) Antioxidant, ethylene and membrane leakage responses to powdery mildew infection of near-isogenic barley lines with various types of resistance. *Eur. J. Plant Pathol.* **121**:21-33.
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **125**:189-198.
- Hernández JA, Talavera JM, Martínez-Gómez P, Dicenta F, Sevilla F (2001) Response of antioxidative enzymes to plum pox virus in two apricot cultivars. *Physiol. Plant.* **111**:313-321.
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* **42**:462-468.
- Hong-xia L, Zhi-yong X, Zeng-yan Z (2011) Changes in activities of antioxidant-related enzymes in leaves of resistant and susceptible wheat inoculated with *Rhizoctonia cerealis*. *Agric. Sci. China* **10**:526-533.
- Hückelhoven R, Dechert C, Trujillo M, Kogel KH (2001) Differential expression of putative cell death regulator genes in near-isogenic, resistant and susceptible barley lines during interaction with the powdery mildew fungus. *Plant Mol. Biol.* **47**:739-748.
- Igarashi S (1990) Update on wheat blast (*Pyricularia oryzae*) in Brazil. In: Saunders, D.A. (ed.). Wheat for nontraditional warm areas: a proceedings of the International Conference, Foz do Iguaçu, Brazil. México, DF: CIMMYT, 1991. p.480-483.
- Igarashi S, Utiamada CM, Igarashi IC, Kazuma AH, Lopes RS (1986) *Pyricularia* em trigo. 1. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. *Fitopatol. Bras.* **11**:351-352.

- IRRI (1996) Standard Evaluation System for Rice, 4th Ed. International Rice Research Institute, Manila, Philippines. 52 p.
- Iturbe-Ormaetxe I, Escuredo P, Arrese-Igor C, Becana M (1998) Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiol.* **116**:173-181.
- Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.* **57**:315-319.
- Kuo MC, Kao CH (2003) Aluminium effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activity in rice leaves. *Biol. Plant.* **46**:149-152.
- Kuzniak E, Sklodowska M (2005) Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. *Planta* **222**:192-200.
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ. Exp. Bot.* **47**:239-247.
- Lin CH, Yang SL, Chung KR (2009) The YAP1 homolog-mediated oxidative stress tolerance is crucial for pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria alternata* in citrus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **22**:942-952.
- Magbanua ZV, De Moraes CM, Brooks TD, Williams WP, Luthe DS (2007) Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*? *Mol. Plant Microbe Interact.* **20**:697-706.
- Mandal S, Mitra A, Mallick N. (2008) Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between *Solanum lycopersicum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **72**:56-61.
- Marrs KA (1996) The functions and regulation of glutathione-S-transferases in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**:127-158.
- Mehdy M, Sharma YK, Sathasivan K, Bays NW (1996) The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiol. Plant.* **98**:365-374.
- Misra HP, Fridovich I (1971) The generation of superoxide radical during autoxidation of ferredoxins. *J. Biol. Chem.* **246**:6886-6890.
- Mittler, R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**:405-410.

- Miyagawa Y, Tamoi M, Shigeoka S (2000) Evaluation of defence system in chloroplasts to photooxidative stress caused by paraquat using transgenic tobacco plants expressing catalase from *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* **41**:311-320.
- Mohammadi M, Karr AL (2001) Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. *J. Plant Physiol.* **158**:1023-1029.
- Nagalakshmi N, Prasad, MNV (2001) Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Sci.* **160**:291-299.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **22**:867-880.
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**:249-279.
- Oksanen E, Häikkiö E, Sober J, Karnosky DF (2003) Ozone-induced H₂O₂ accumulation in field-grown aspen and birch is linked to foliar ultrastructure and peroxisomal activity. *New Phytol.* **161**:791-799.
- Ou SH (1985) Rice Diseases, 2nd Ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, U.K.
- Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Romero-Puertas MC, McCarthy I, del Río LA. (2002) Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiol. Biochem.* **40**:521-530.
- Picinini EC, Fernandes JMC (1990) Ocorrência da brusone (*Pyricularia oryzae*) em lavouras comerciais de trigo (*Triticum aestivum*) no Estado do Rio Grande do Sul. *Fitopatol. Bras.* **15**:83-84.
- Pickett CB, Lu AYH (1989) Glutathione-S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annu. Rev. Biochem.* **58**:743-764.
- Prabhu AS, Filippi MC, Castro N (1992) Pathogenic variation among isolate of *Pyricularia oryzae* infecting rice, wheat and grasses in Brazil. *Trop. Pest Manag.* **38**:367-371.
- Quan LJ, Zhang B, Shi WW, Li HY. (2008) Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J. Int. Plant Biol.* **50**:2-18.
- Rauyaree P, Choi W, Fang E, Blackmon B, Dean R (2001) Genes expressed during early stages of rice infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant Pathol.* **2**:347-354.

- Reis EM, Casa RT (2005) Doenças do trigo. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (eds) Manual de Fitopatologia. Doenças de Plantas Cultivadas. v. 2, 4ª Ed. pp.631-638.
- Sarowar S, Kim EN, Kim YJ, Ok SH, Kim KD, Hwang BK, Shin JS (2005) Overexpression of a pepper ascorbate peroxidase-like 1 gene in tobacco plants enhances tolerance to oxidative stress and pathogens. *Plant Sci.* **169**:55-63.
- Scandalios JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* **103**:7-12.
- Schaedle M, Bassham JA (1977) Chloroplast glutathione reductase. *Plant Physiol.* **59**:1011-1012.
- Takesawa T, Ito M, Kanzaki H, Kameya N, Nakamura I (2002) Over-expression of glutathione-S-transferase in transgenic rice enhances germination and growth at low temperature. *Mol. Breed.* **9**:93-101.
- Urashima AS, Kato H (1994) Varietal resistance and chemical control of wheat blast fungus. *Summa Phytopathol.* **20**:107-112.
- Urashima AS, Lavorenti NA, Goulart ACP, Mehta YR (2004) Resistance spectra of wheat cultivars and virulence diversity of *Magnaporthe grisea* isolates in Brazil. *Fitopatol. Bras.* **29**:511-518.
- Willekens H, Inzé D, Van Montagu M, Van Camp W (1995) Catalases in plants. *Mol. Breed.* **1**:207-228.
- Xavier Filha MS, Rodrigues FA, Domiciano GP, Oliveira HV, Silveira PR, Moreira WR (2011) Wheat resistance to leaf blast mediated by silicon. *Australasian Plant Pathol.* **40**:28-38.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* **14**:415-421.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Análise de variância dos efeitos de cultivares e épocas de avaliação na severidade da brusone.

Causas de variação	gl	Valores de F^z
Cultivares (C)	1	162,12*
Épocas de avaliação (EA)	1	34,97*
C × EA	1	1,25 ^{ns}

^z Níveis de probabilidade: ^{ns} = não significativo, * = 0,01.

Tabela 3. Análise de variância dos efeitos de cultivares, inoculação e épocas de coleta na concentração de superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e aldeído malônico (MDA).

Causas de variação	gl	Valores de F^z		
		O_2^-	H_2O_2	MDA
Cultivares (C)	1	3,21 ^{ns}	21,22**	15,27**
Inoculação (I)	1	19,32**	0,36 ^{ns}	51,82**
Épocas de coleta (EC)	2	2,02 ^{ns}	3,80*	39,46**
C × I	1	2,69 ^{ns}	0,74 ^{ns}	30,62**
C × EC	2	4,15*	0,58 ^{ns}	9,17**
I × EC	2	13,63**	4,68*	4,49*
C × I × EC	2	7,11**	0,83 ^{ns}	16,82**

^z Níveis de probabilidade: ^{ns} = não significativo, * = 0,05 e ** = 0,01.

Tabela 4. Análise de variância dos efeitos de cultivares, inoculação e épocas de coleta no extravasamento de eletrólitos.

Causas de variação	gl	Valores de F^z
Cultivares (C)	1	13,74**
Inoculação (I)	1	286,49**
Épocas de coleta (EC)	1	98,87**
C × I	1	15,66**
C × EC	1	8,25**
I × EC	1	68,55**
C × I × EC	1	7,13*

^z Níveis de probabilidade: * = 0,05 e ** = 0,01.

- 1 **Tabela 2.** Análise de variância dos efeitos de cultivares, inoculação e épocas de coleta na atividade das enzimas superóxido dismutase
 2 (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), glutaciona-S-transferase (GST), peroxidase do ascorbato (APX), redutase da glutaciona (GR)
 3 e peroxidase da glutaciona (GPX).
 4

Causas de variação	gl	Valores de F ^z						
		SOD	CAT	POX	GST	APX	GR	GPX
Cultivares (C)	1	103,30 ^{**}	0,34 ^{ns}	39,08 ^{**}	39,80 ^{**}	2,73 ^{ns}	2,68 ^{ns}	17,12 ^{**}
Inoculação (I)	1	1649,08 ^{**}	3,93 ^{ns}	3416,66 ^{**}	241,32 ^{**}	150,97 ^{**}	13,08 [*]	29,82 ^{**}
Épocas de coleta (EC)	2	18,61 ^{**}	25,76 ^{**}	206,24 ^{**}	33,08 ^{**}	4,75 [*]	4,31 [*]	1,45 ^{ns}
C × I	1	11,60 ^{**}	115,56 ^{**}	29,20 ^{**}	18,59 ^{**}	7,61 ^{**}	5,17 [*]	23,13 ^{**}
C × EC	2	111,95 ^{**}	3,98 [*]	56,52 ^{**}	13,99 ^{**}	4,62 [*]	5,62 ^{**}	4,87 [*]
I × EC	2	115,78 ^{**}	22,66 ^{**}	212,82 ^{**}	24,52 ^{**}	0,77 ^{ns}	3,85 [*]	1,28 ^{ns}
C × I × EC	2	56,28 ^{**}	1,79 ^{ns}	55,95 ^{**}	26,45 ^{**}	8,33 ^{**}	2,29 ^{ns}	11,90 ^{**}

- 5 ^z Níveis de probabilidade: ^{ns} = não significativo, ^{*} = 0,05 e ^{**} = 0,01.

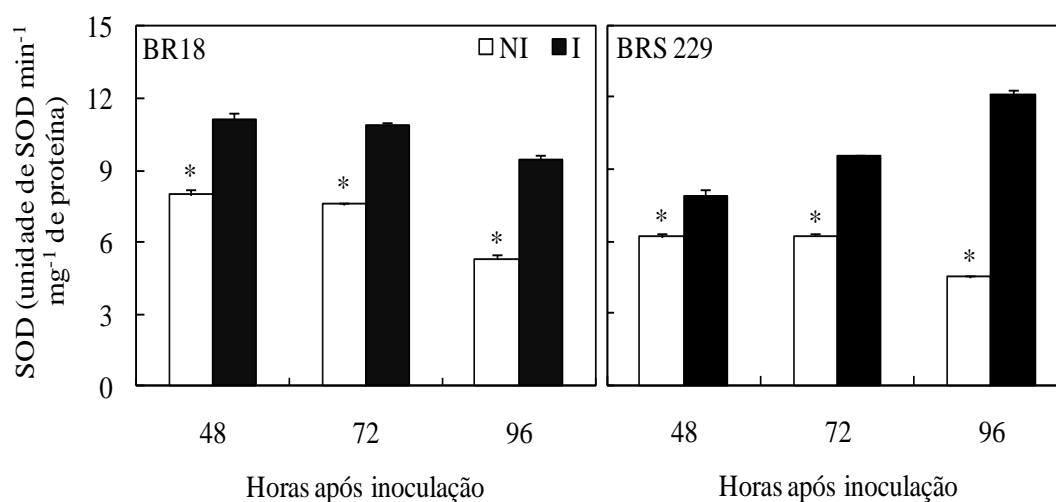


Figura 1. Atividade da superóxido dismutase (SOD) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Pyricularia oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

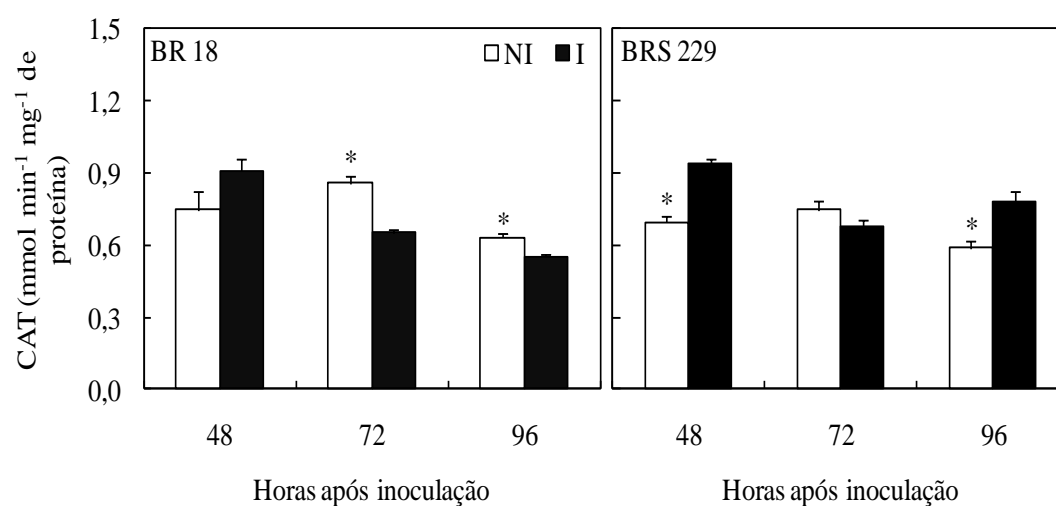


Figura 2. Atividade da catalase (CAT) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Pyricularia oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

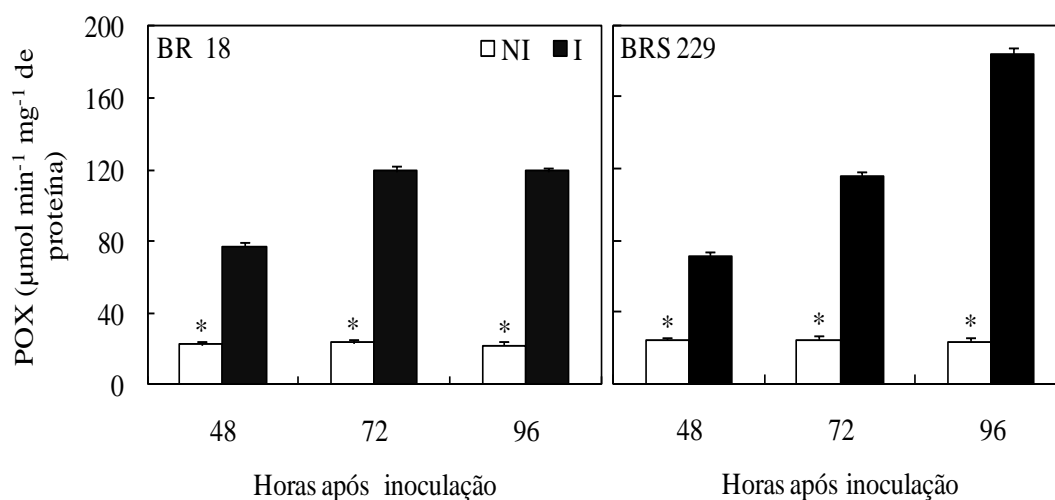


Figura 3. Atividade da peroxidase (POX) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Pyricularia oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

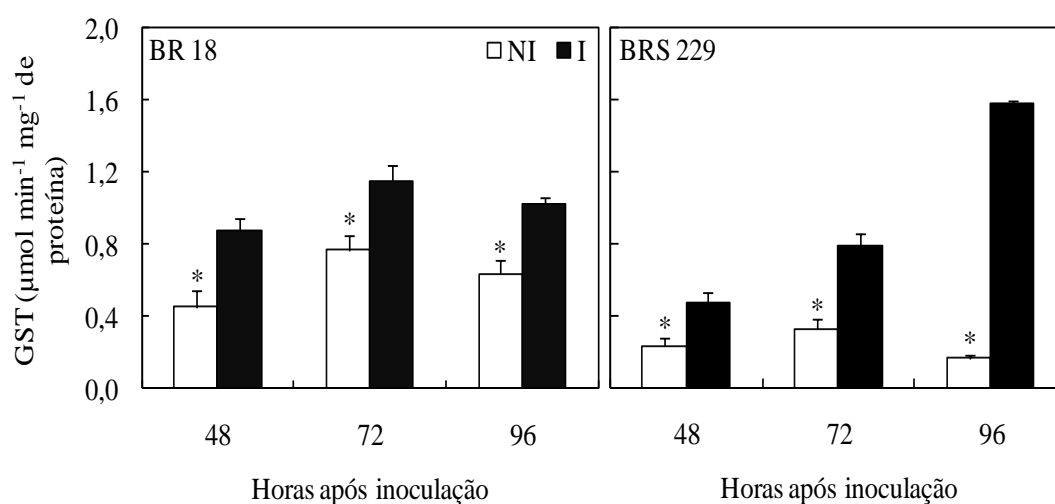


Figura 4. Atividade da glutathione-S-transferase (GST) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Pyricularia oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

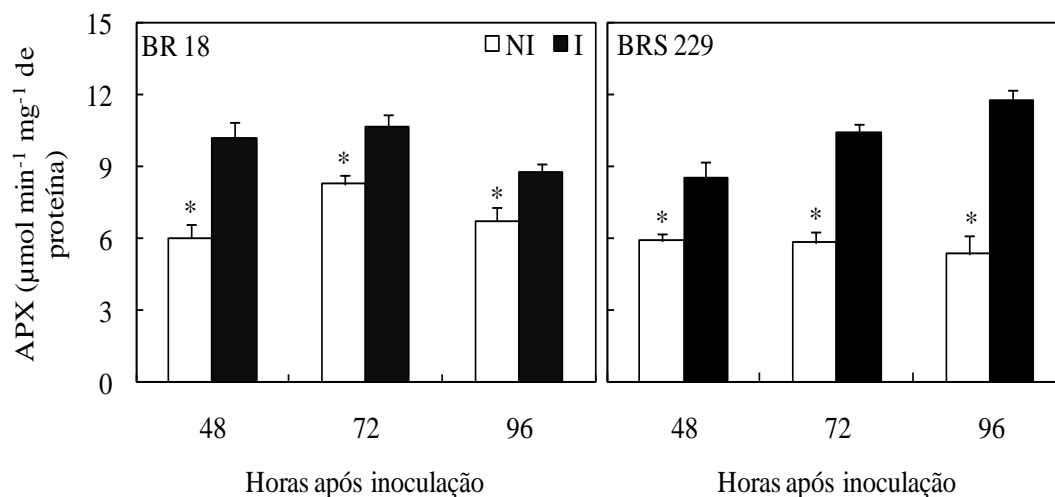


Figura 5. Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Pyricularia oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

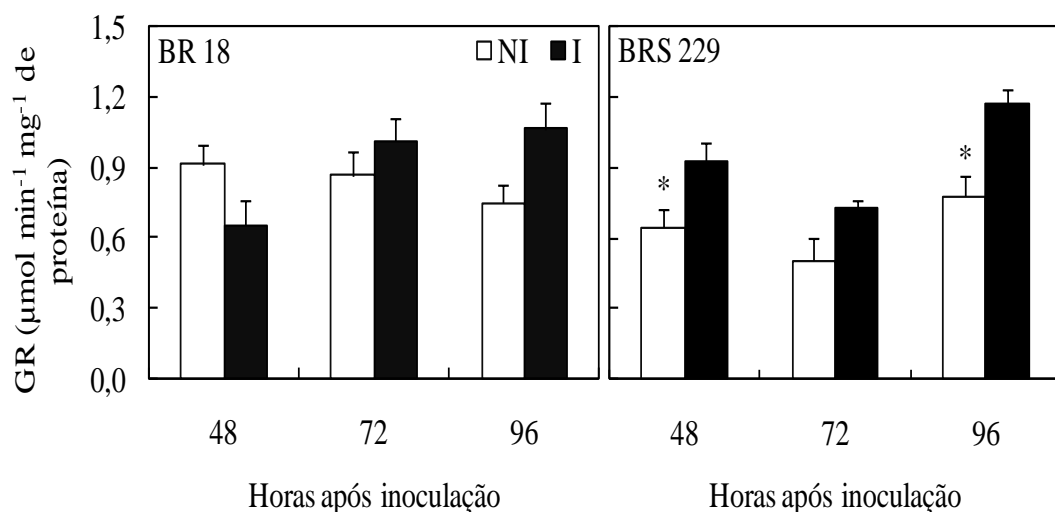


Figura 6. Atividade da redutase da glutathiona (GR) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Pyricularia oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

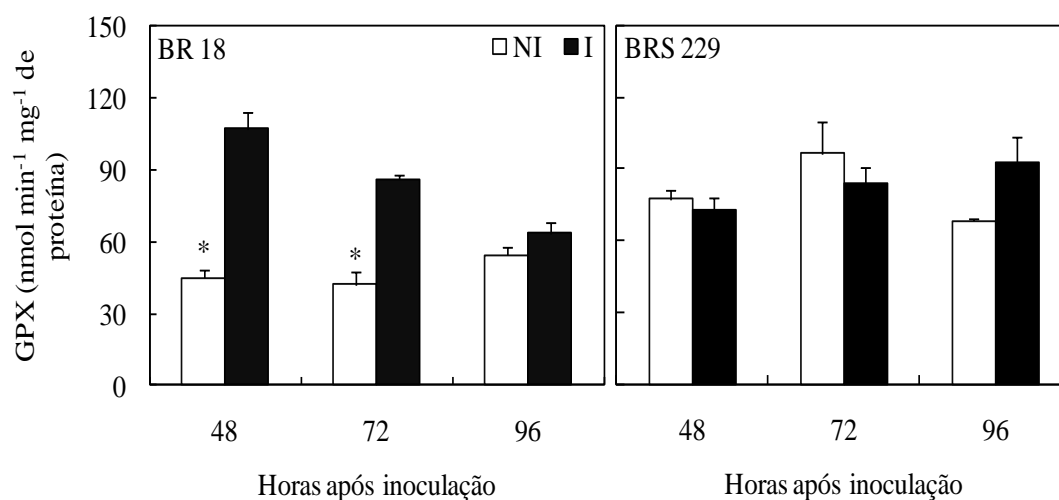


Figura 7. Atividade da peroxidase da glutathiona (GPX) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Pyricularia oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

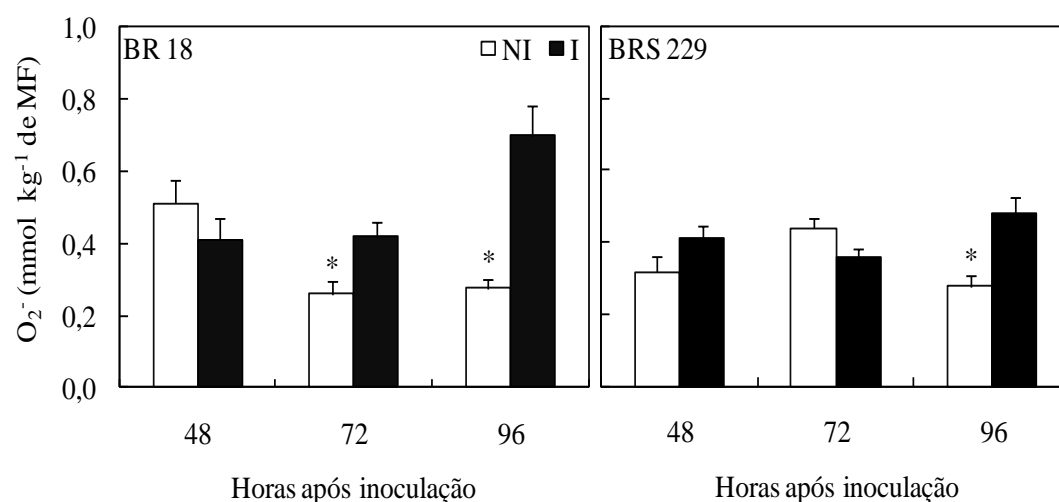


Figura 8. Concentração de superóxido (O₂⁻) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Pyricularia oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média. MF = massa fresca.

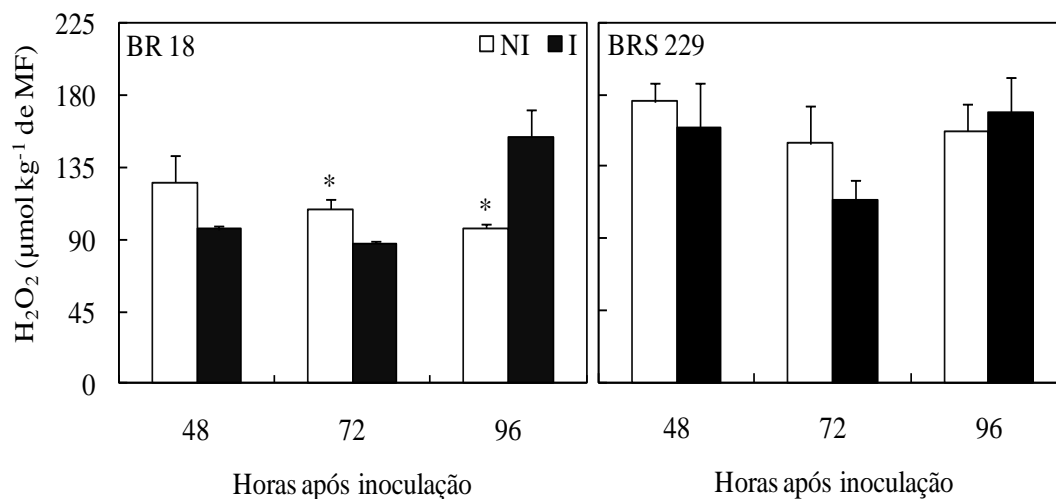


Figura 9. Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Pyricularia oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média. MF = massa fresca.

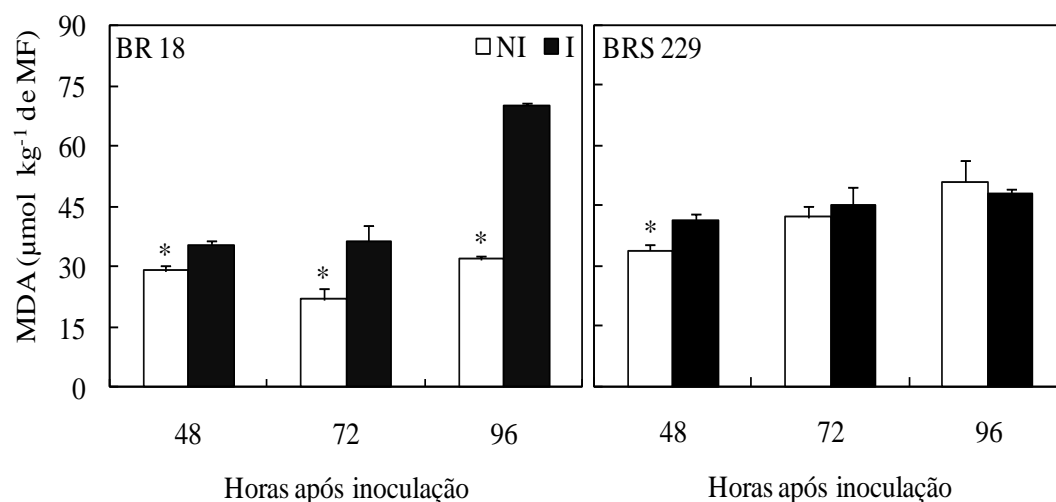


Figura 10. Concentração de aldeído malônico (MDA) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Pyricularia oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média. MF = massa fresca.

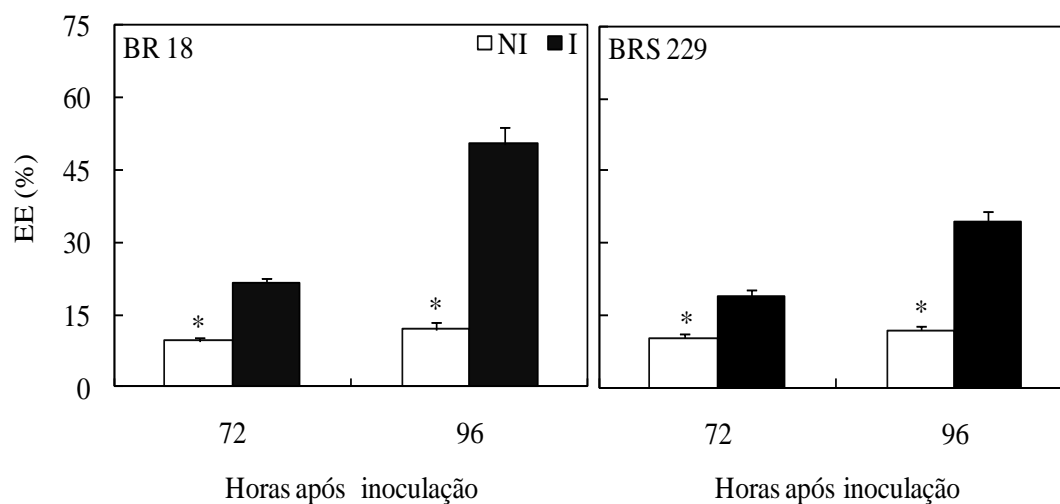


Figura 11. Extravasamento de eletrólitos (EE) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Pyricularia oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

Capítulo 2

**Alterações Fisiológicas em Plantas de Trigo Infectadas por
*Pyricularia oryzae***

RESUMO

Este estudo investigou as alterações fisiológicas em plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 infectadas por *Pyricularia oryzae*, agente causal da brusone. Foram avaliados a severidade da brusone e os parâmetros de trocas gasosas taxa líquida de assimilação de CO₂ (A), condutância estomática (g_s), concentração interna de CO₂ (C_i) e taxa de transpiração (E) às 48, 72 e 96 horas após a inoculação (hai). Adicionalmente, foram determinadas a taxa máxima de carboxilação (V_{cmax}), a taxa máxima de transporte de elétrons usados na regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) (J_{max}), a respiração (R_d) e calculada a relação J_{max}/V_{cmax} com base na resposta de A a diferentes concentrações internas de CO₂ (curva A/C_i). Os parâmetros de trocas gasosas A , g_s e E foram significativamente reduzidos nas plantas de trigo inoculadas das duas cultivares em relação aos das plantas não inoculadas. Essa redução, no entanto, foi menos pronunciada nas plantas inoculadas da cultivar BR 229 do que nas plantas inoculadas da cultivar BR 18, o que foi associado à menor severidade da brusone observada na cultivar BRS 229. A decresceu em 99 e 78%, g_s em 53 e 44%, e E em 43 e 38% às 96 hai nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, em relação às plantas não inoculadas. C_i aumentou em 32 e 14% às 96 hai nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, em relação às plantas não inoculadas, indicando que a redução no influxo de CO₂, causada pelo decréscimo na g_s , não foi o principal fator associado com a redução em A , mas sim limitações bioquímicas do cloroplasto. Confirmando essa observação, a análise das curvas A/C_i revelou que a infecção por *P. oryzae* reduziu V_{cmax} e J_{max} . As plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, apresentaram redução de 91 e 75% no V_{cmax} e de 87 e 60% no J_{max} às 96 hai em relação às plantas não inoculadas. Aumentos de 55 e 60% na relação J_{max}/V_{cmax} foram observados nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, comparados com os das plantas não inoculadas, sugerindo que a menor atividade da Rubisco foi o principal fator associado à redução em A decorrente da infecção por *P. oryzae*. Para a cultivar BR 18, R_d aumentou 208% nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas às 96 hai, porém não houve diferença em R_d entre plantas inoculadas e não inoculadas para a cultivar BRS 229. Os resultados do

presente estudo demonstraram que a fotossíntese de plantas de trigo foi significativamente reduzida pela infecção por *P. oryzae*, a qual esteve associada principalmente à menor atividade aparente da Rubisco, seguido pela menor regeneração de RuBP.

INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é o cereal de inverno mais importante no Brasil (EMBRAPA, 2009). A produção anual brasileira oscila entre 5 e 6 milhões de toneladas, enquanto o consumo de trigo é de cerca de 10 milhões de toneladas (Reis et al., 2011). Cerca de 90% da produção brasileira é proveniente da região sul, mas o mesmo também é cultivado em alguns Estados da região Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (EMBRAPA, 2009). Diversos fatores têm contribuído para reduzir a produtividade e a qualidade do trigo brasileiro, porém as doenças estão entre os mais importantes (Goulart et al., 2007).

A brusone, causada pelo fungo *Pyricularia oryzae* Cavara (teleomorfo: *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr), é a doença de importância econômica mais recentemente identificada na cultura do trigo (Urashima e Kato, 1998; Goulart et al., 2007). O primeiro relato mundial da ocorrência da brusone em trigo foi feito em 1985, no Estado do Paraná (Igarashi et al., 1986). A partir desse Estado, *P. oryzae* se disseminou para os Estados de São Paulo (Igarashi, 1990), Mato Grosso do Sul (Goulart et al., 1990), Rio Grande do Sul (Picinini e Fernandes, 1990), Goiás (Prabhu et al., 1992) e na região do cerrado brasileiro (Anjos et al., 1996), ocorrendo, portanto, nas principais regiões tritícolas do Brasil (Goulart et al., 2007). As elevadas perdas causadas pela brusone (Goulart e Paiva, 2000; Goulart et al., 2007) associadas à ausência de fungicidas eficientes e cultivares resistentes (Goulart e Paiva, 1992; Goulart e Paiva, 1993; Urashima e Kato, 1994) fazem de *P. oryzae* um dos patógenos mais importantes da cultura do trigo atualmente no Brasil.

A infecção por patógenos altera vários processos fisiológicos do hospedeiro, incluindo a respiração, a fotossíntese, a translocação de água e nutrientes, a transpiração e a regulação do crescimento (Lucas, 1998). O principal processo fisiológico afetado pelas doenças foliares é a fotossíntese (Bastiaans, 1991; Bassanezi et al., 2000, Bassanezi et al., 2002; Domiciano et al., 2009; Dallagnol et al., 2011), porém os mecanismos pelos quais os patógenos a reduzem não estão totalmente esclarecidos. Bassanezi et al. (2002), mensurando as trocas gasosas de plantas de feijoeiro infectadas por *Uromyces appendiculatus*, *Pseudocercospora griseola* ou *Colletotrichum lindemuthianum*, demonstraram que a redução na fotossíntese causada por *U. appendiculatus* e *P. griseola* foi

devida à menor carboxilação, enquanto a redução na concentração interna de CO₂ (C_i) devida ao aumento na resistência estomática foi o principal fator associado com o decréscimo na fotossíntese em decorrência da infecção por *C. lindemuthianum*. Em arroz, foi demonstrado que a infecção por *Bipolaris oryzae* reduziu a condutância estomática (g_s), mas não C_i , indicando que a redução na fotossíntese foi devida a efeitos diretos da infecção pelo patógeno nos cloroplastos (Dallagnol et al., 2011).

As medições simultâneas das trocas gasosas em resposta à variação na concentração de CO₂ é uma das formas mais eficientes para determinar uma ampla gama de limitações bioquímicas e biofísicas na fotossíntese *in vivo* (Long e Bernacchi, 2003). Com base na resposta da taxa de assimilação de CO₂ (A) a diferentes concentrações internas de CO₂ (curva A/C_i), é possível estimar-se, *in vivo*, a atividade aparente da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) ou taxa máxima de carboxilação (V_{cmax}) e a taxa máxima de transporte de elétrons usados na regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) (J_{max}) sob condições ambientes (Long e Bernacchi, 2003). A análise das curvas A/C_i de plantas de laranja doce infectadas por *Xylella fastidiosa* revelou que o decréscimo em V_{cmax} , além de menor g_s , foi o fator associado à redução em A causada pela bactéria (Habermann et al., 2003). Para o patossistema feijoeiro-*U. appendiculatus*, foi demonstrado que a redução em A em decorrência da infecção pelo fungo também foi associada com o decréscimo em V_{cmax} (Bassanezi et al., 2000). Observações semelhantes foram feitas por Nogués et al. (2002), os quais verificaram reduções em V_{max} e J_{max} em plantas de tomateiro infectadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Embora a brusone seja uma das doenças mais importantes da cultura do trigo, estudos da interação trigo-*P. oryzae* ainda são limitados (Tufan et al., 2009). Considerando-se a escassez de informações das alterações fisiológicas em plantas de trigo em decorrência da infecção por *P. oryzae*, no presente estudo foram investigadas as mudanças nos parâmetros de trocas gasosas, bem como elucidar alguns dos mecanismos responsáveis por tais alterações, analisando as curvas A/C_i , em duas cultivares de trigo com graus diferentes de resistência à brusone.

MATERIAL E MÉTODOS

Crescimento das plantas: sementes de trigo das cultivares BR 18 (gentilmente cedidas pelo Dr. Douglas Lau, EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, Passo Fundo - RS) e BRS 229 (gentilmente cedidas pelo M.Sc. Márcio Só e Silva, EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, Passo Fundo - RS) foram semeadas em vasos plásticos na densidade de 12 sementes por vaso contendo 1 kg de substrato. Estudos prévios demonstraram que as cultivares BR 18 e BRS 229 foram suscetível e parcialmente resistente à brusone no estágio de planta jovem, respectivamente (Cruz et al., 2010). Após a emergência das plântulas, realizou-se o desbaste, deixando seis plântulas por vaso. O substrato utilizado foi o Tropstrato HT (Vida Verde, Mogi Mirim - SP), composto de casca de pinus, turfa, vermiculita expandida e enriquecido com macro e micronutrientes. O substrato foi adubado antes da semeadura com 1,63 g de fosfato de cálcio por vaso. Após a emergência das plântulas, aplicaram-se 30 mL de solução nutritiva contendo, em g L⁻¹, 6,4 KCl, 3,48 K₂SO₄, 5,01 MgSO₄.7H₂O, 2,3 (NH₂)₂CO, 0,009 NH₄MO₇O₂₄.4H₂O, 0,054 H₃BO₃, 0,222 ZnSO₄.7H₂O, 0,058 CuSO₄.5H₂O e 0,137 MnCl₂.4H₂O. A solução nutritiva foi aplicada semanalmente. Um volume de 15 mL de uma solução nutritiva contendo 0,27 g FeSO₄.7H₂O e 0,37 g de EDTA bissódico L⁻¹ também foi aplicado após a emergência das plântulas. As plantas foram regadas diariamente.

Inoculação das plantas: o isolado de *P. oryzae* (UFV/DFP Po-01) utilizado neste trabalho foi obtido de espigas de trigo da cultivar BR 18 em Viçosa-MG. Esse isolado foi preservado em papel filtro contido em tubos de microcentrífuga com sílica gel (Dhingra e Sinclair, 1985). O papel filtro, apresentando crescimento micelial do fungo, foi transferido para placas de Petri contendo meio aveia-água. Após o crescimento micelial, discos de meio contendo o fungo foram transferidos para novas placas contendo o mesmo meio. Essas placas foram mantidas em câmara de crescimento de microrganismos tipo BOD com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 24 h, por 10 dias. Após esse período, os conídios do fungo foram cuidadosamente removidos das placas de Petri com pincel de cerdas macias e água contendo gelatina (1%, m/v). A suspensão de conídios foi calibrada em hemacitômetro para se obter uma concentração de 1 × 10⁵ conídios mL⁻¹. A suspensão de conídios foi pulverizada na superfície adaxial das folhas das plantas

de trigo no estágio 19 (Zadoks et al., 1974), utilizando-se um atomizador Airbrush (Paasche Airbrush Co., Chicago, IL). Após a inoculação, as plantas foram mantidas no escuro em câmara úmida, a 25 °C, por 24 h. Em seguida, as plantas foram transferidas para casa de vegetação com umidade relativa de $80 \pm 5\%$ e temperatura de 25 ± 3 °C.

Avaliação da severidade da brusone: a severidade da brusone foi avaliada na quinta folha, a partir da base, das plantas das duas cultivares de trigo às 72 e 96 hai usando a escala proposta pelo IRRI (1996).

Avaliações das trocas gasosas: as avaliações das trocas gasosas foram feitas na quinta folha, a partir da base, das plantas inoculadas e não inoculadas com *P. oryzae* das cultivares BRS 229 e BR 18. As avaliações foram realizadas às 48, 72 e 96 horas após inoculação (hai). Os parâmetros de trocas gasosas taxa líquida de assimilação de CO₂ (*A*), condutância estomática (*g_s*), concentração interna de CO₂ (*C_i*) e taxa de transpiração (*E*) foram estimados das 9:00 às 12:00 h, sob irradiância de 1000 μmol fótons m⁻² s⁻¹ e concentração externa de CO₂ de 400 μmol mol⁻¹ utilizando-se um analisador de gases a infravermelho portátil (LI-6400, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA), operando em sistema aberto.

A resposta de *A* a diferentes concentrações internas de CO₂ (curvas *A/C_i*) foi determinada na irradiância mencionada anteriormente. As medições iniciaram-se a 400 μmol CO₂ mol⁻¹ e, uma vez atingido o “*steady state*”, a concentração de CO₂ foi gradualmente diminuída até 75 μmol mol⁻¹ e, posteriormente, gradualmente aumentada até 1750 μmol mol⁻¹. Regressões não lineares, baseadas nas equações de Farquhar et al. (1980), e posteriormente modificadas por Sharkey (1985) e Harley e Sharkey (1991), foram usadas para estimar a taxa máxima de carboxilação (*V_{cmax}*), a taxa máxima de transporte de elétrons usados na regeneração da RuBP (*J_{max}*) e a taxa de respiração (*R_d*), para cada curva *A/C_i*. As medições foram realizadas nas épocas e horários mencionadas previamente. Durante as medições, a umidade relativa do ar foi cerca de 80% e a temperatura foliar variou de 25 a 28 °C. Os parâmetros *V_{cmax}*, *J_{max}* e *R_d* de cada curva *A/C_i* foram calculados com os valores originais sendo corrigidos para a temperatura comum de 25 °C (Long e Bernachi, 2003).

Delineamento experimental e análise estatística dos dados: o experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×2×3, consistindo de duas cultivares de trigo (BR 18 e BRS 229), plantas inoculadas e

não inoculadas com *P. oryzae* e três épocas de avaliação (48, 72 e 96 hai), com quatro repetições. Cada unidade experimental foi constituída de um vaso plástico de 1 L com seis plantas. Os dados de todas as variáveis avaliadas foram submetidos à análise de variância e as médias das plantas inoculadas e não inoculadas para cada cultivar dentro de cada época de avaliação foram comparadas pelo teste *t* ($P \leq 0,05$), utilizando-se o software SAS (versão 6.12; SAS Institute, Inc., Cary, NC).

RESULTADOS

Os fatores cultivares e épocas de avaliação, bem como a interação entre esses fatores, foram significativos para a severidade da brusone (Tabela 1). A severidade foi significativamente menor nas plantas da cultivar BRS 229 do que nas plantas da cultivar BR 18 às 72 e 96 hai (Figura 1). A severidade da brusone foi de 18 e 31% às 72 hai e de 22 e 44% às 96 hai nas plantas das cultivares BRS 229 e BR 18, respectivamente.

Pelo menos um dos fatores estudados, bem como algumas interações entre eles, foi significativo para A , g_s , C_i , E , V_{cmax} , J_{max} , J_{max}/V_{cmax} , e R_d (Tabela 2). Isoladamente, a inoculação foi o fator mais importante (maiores valores de F) para explicar a variação observada nessas variáveis. A interação dos fatores cultivares \times inoculação \times épocas de avaliação foi significativa apenas para C_i e R_d .

Nas plantas inoculadas, A foi significativamente menor em relação às plantas não inoculadas às 46, 72 e 96 hai (Figura 2). Houve decréscimo de 65 e 45% às 48 hai, de 78 e 32% às 72 hai, e de 99 e 78% às 96 hai em A nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, em relação às plantas não inoculadas.

O parâmetro g_s foi significativamente menor nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas às 48, 72 e 96 hai para a cultivar BR 18 e às 48 e 96 hai para a cultivar BRS 229 (Figura 3). A g_s decresceu em 53 e 44% às 96 hai nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, em relação às plantas não inoculadas.

Diferenças em C_i entre plantas inoculadas e não inoculadas foram observadas às 72 e 96 hai para a cultivar BR 18 e apenas às 96 hai para a cultivar BRS 229 (Figura 4), com maiores valores de C_i ocorrendo nas plantas inoculadas. O C_i aumentou em 32 e 14% às 96 hai nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, em relação às plantas não inoculadas.

O parâmetro E foi significativamente menor nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas às 48, 72 e 96 hai para a cultivar BR 18 e às 48 e 96 hai para a cultivar BRS 229 (Figura 5). Reduções de 43 e 38% foram observadas nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, em relação às plantas não inoculadas às 96 hai.

Para as plantas inoculadas da cultivar BR 18, os valores de V_{cmax} foram menores do que os observados para as plantas não inoculadas às 48, 72 e 96 hai (Figura 6). Para as plantas inoculadas da cultivar BRS 229, os valores de V_{cmax} foram menores do que os observados para as plantas inoculadas às 48 e 96 hai. Houve redução de 91 e 75% às 96 hai nos valores de V_{cmax} das plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, em relação às plantas não inoculadas.

O parâmetro J_{max} foi significativamente menor nas plantas inoculadas da cultivar BR 18 às 48, 72 e 96 hai e somente às 96 hai para as plantas inoculadas da cultivar BRS 229 em relação às plantas não inoculadas (Figura 7). O J_{max} decresceu em 87 e 60% às 96 hai nas plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, em relação às plantas não inoculadas.

A relação $J_{\text{max}}/V_{\text{cmax}}$ foi influenciada pela inoculação das plantas com *P. oryzae* às 48, 72 e 96 hai para a cultivar BR 18 e apenas às 96 hai para a cultivar BRS 229 (Figura 8). Para as duas cultivares, a relação $J_{\text{max}}/V_{\text{cmax}}$ das plantas inoculadas foi maior do que a das plantas não inoculadas. Aumentos de 55 e 60% na relação $J_{\text{max}}/V_{\text{cmax}}$ foram observados para as plantas inoculadas das cultivares BR 18 e BRS 229, respectivamente, comparadas com as plantas não inoculadas.

O parâmetro R_d foi significativamente influenciado apenas às 96 hai, e somente para as plantas da cultivar BR 18 (Figura 9). Houve aumento de 208% nos valores de R_d das plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas.

DISCUSSÃO

Este estudo apresenta as primeiras observações das alterações fisiológicas em plantas de trigo infectadas por *P. oryzae* por meio da avaliação de trocas gasosas e análise de curvas A/C_i , visando elucidar alguns dos mecanismos pelos quais *P. oryzae* reduz a fotossíntese de plantas de trigo. Confirmando resultados obtidos previamente por Cruz et al. (2010), os dados do presente estudo mostraram que as plantas da cultivar BRS 229 apresentaram menor severidade da brusone em relação às plantas da cultivar BR 18. Essa variação na severidade da brusone influenciou a magnitude do efeito da infecção por *P. oryzae* nos parâmetros fisiológicos estudados, visto que os mesmos foram menos afetados nas plantas inoculadas da cultivar BRS 229 do que nas plantas inoculadas da cultivar BR 18.

Neste estudo, A foi significativamente reduzido nas plantas inoculadas das duas cultivares em relação às plantas não inoculadas. Estes resultados confirmam os resultados obtidos para os patossistemas arroz-*P. oryzae* (Bastiaans, 1991), milho-*Phaeosphaeria maydis* (Godoy et al., 2001), feijoeiro-*U. appendiculatus*, feijoeiro-*P. griseola* e feijoeiro-*C. lindemuthianum* (Bassanezi et al., 2002), trigo-*Puccinia triticina* (Robert et al., 2005), videira-*Uncinula necator* e videira-*Plasmopara viticola* (Moriondo et al., 2005), nos quais foi demonstrado que a infecção fúngica reduziu A . O decréscimo em A observado no presente estudo foi relacionado com a severidade da brusone, visto que as plantas da cultivar BRS 229, que tiveram menor severidade, apresentaram menor redução em A em relação às plantas da cultivar BR 18. Alguns trabalhos têm demonstrado correlação negativa entre a resistência do hospedeiro e a redução em A . Plantas de eucalipto resistentes à ferrugem não apresentaram redução em A , porém decréscimo foi observado nas plantas suscetíveis inoculadas com *Puccinia psidii* comparadas com as plantas não inoculadas (Alves et al., 2011). Observações semelhantes foram feitas nos patossistemas castanheira-*Phytophthora cinnamomi* (Dinis et al., 2011) e arroz-*P. oryzae* (Bastiaans e Roumen, 1993).

A redução em g_s é um dos principais fatores limitantes à fotossíntese em plantas infectadas por patógenos por reduzir o influxo de CO_2 (Erickson et al., 2003). No entanto, os decréscimos em A proporcionalmente maiores do que os em g_s , e os aumentos em C_i observados nas plantas de trigo das duas cultivares

infectadas por *P. oryzae* demonstrou que o menor influxo de CO₂ não foi o principal fator associado à redução em *A*, mas sim alguma limitação bioquímica dos cloroplastos. Resultados similares foram encontrados por Dallagnol et al. (2011), os quais demonstraram que embora a redução em *A* em plantas de arroz infectadas por *B. oryzae* tenha se relacionado com decréscimo em *g_s*, o leve aumento em *C_i* indicou que a principal limitação à fotossíntese foi devida a efeitos diretos da infecção pelo fungo nos cloroplastos. De maneira similar, plantas de eucalipto suscetíveis à ferrugem e inoculadas com *P. psidii* apresentaram menores valores de *g_s* e maiores valores da relação *C_i/C_a* do que as plantas não inoculadas, indicando que a redução em *g_s* não foi o fator responsável pela redução na fotossíntese (Alves et al., 2011). Nas plantas resistentes, no entanto, não foram observadas diferenças em *g_s* e na relação *C_i/C_a* (Alves et al., 2011), o que está de acordo com os dados obtidos no presente estudo, em que esses parâmetros sofreram menor alteração nas plantas inoculadas da cultivar BRS 229, as quais apresentaram menor severidade da brusone comparadas com as plantas inoculadas da cultivar BR 18.

A menor *g_s* observada nas plantas de trigo inoculadas com *P. oryzae* esteve diretamente relacionada com o decréscimo em *E*. Embora o decréscimo em *E* associado à redução na *g_s* seja comum para patógenos que colonizam o xilema e causam sintomas de murcha (Goodwin et al., 1988; Habermann et al., 2003, Gomes et al., 2004), alguns trabalhos também têm demonstrado redução concomitante nesses parâmetros causada por patógenos foliares tais como *P. triticina* em trigo (McGrath e Pennypacker, 1990) *U. appendiculatus*, *P. griseola* e *C. lindemuthianum* em feijoeiro (Duniway e Durbin, 1971; Bassanezi et al., 2002), *P. psidii* em eucalipto (Alves et al., 2011) e *B. oryzae* em arroz (Dallagnol et al., 2011). Em contrapartida, aumentos em *E* têm sido observados após a esporulação de alguns fungos, como os que causam ferrugens, devido ao rompimento da epiderme foliar (Duniway e Durbin, 1971; Owera et al., 1981).

Os resultados das curvas *A/C_i* revelaram que os valores de *V_{cmax}* e *J_{max}* nas plantas de trigo inoculadas com *P. oryzae* foram menores do que nas plantas não inoculadas, sendo que os decréscimos nesses parâmetros aumentaram com o progresso da doença. Este resultado está de acordo com observações obtidas para o patossistema laranja doce-*Xylella fastidiosa*, no qual a eficiência de carboxilação das plantas infectadas pela bactéria foi menor do que a das plantas

sadias (Habermann et al., 2003). Semelhantemente, plantas de tomateiro infectadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* apresentaram redução nos valores de V_{cmax} e J_{max} em relação aos das plantas sadias (Nogués et al., 2002). O decréscimo em V_{cmax} induzido por estresses abióticos tem sido associado à redução no conteúdo e na atividade da Rubisco (Allen et al., 1997; Farage e Long, 1999; Harmens et al., 2000; Nogués e Baker, 2000; Cardoso-Vilhena et al., 2004), e isso também tem sido demonstrado para o estresse causado por patógenos (Nogués et al., 2002), porém os estudos ainda são incipientes.

A regeneração de RuBP pode ser limitada pela incapacidade da cadeia de transporte de elétrons de fornecer poder redutor e ATP, bem como pela inativação ou perda de enzimas do ciclo de Calvin que não a Rubisco (Baker et al., 1997). Estudos prévios demonstraram que a inativação de enzimas do ciclo de Calvin, mas não a falta de redutores e ATP, foi o fator associado à redução em J_{max} de plantas de tomateiro infectadas por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Nogués et al., 2002). Esse resultado é suportado por observações feitas por Zhou et al. (2004) para o patossistema batata-*Potato virus Y*. Embora tenha ocorrido redução em J_{max} devida à infecção por *P. oryzae*, o aumento na relação $J_{\text{max}}/V_{\text{cmax}}$ nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas demonstrou que o V_{cmax} foi mais afetado do que o J_{max} . Assim, postula-se que a menor atividade da Rubisco tenha sido o principal fator associado à redução em A em decorrência da infecção por *P. oryzae*. Resultado semelhante foi observado por Bassanezi et al. (2000) para o patossistema feijoeiro-*U. appendiculatus*. De qualquer maneira, os parâmetros V_{cmax} , J_{max} bem como a relação $J_{\text{max}}/V_{\text{cmax}}$ foram menos afetados nas plantas inoculadas da cultivar BRS 229 do que nas plantas inoculadas da cultivar BR 18, o que foi relacionado com os menores valores de severidade observados nas plantas da cultivar BRS 229.

Diferenças em R_d entre plantas inoculadas e não inoculadas foram encontradas somente às 96 hai e para a cultivar BR 18, com os maiores valores de R_d ocorrendo nas plantas inoculadas. Este resultado está de acordo com os relatos feitos por Bassanezi et al. (2002), os quais observaram aumento em R_d em folhas de feijoeiro somente após o aparecimento dos sintomas de ferrugem, mancha angular ou antracnose. Aumento em R_d também foi observado em folhas de cevada infectadas por *Rhynchosporium secalis*, porém redução nesse parâmetro ocorreu somente quando a severidade excedeu 20% (Martin, 1986). De acordo

com Lucas (1998), folhas infectadas por patógenos hemibiotróficos e necrotróficos usualmente apresentam aumento em R_d , o qual é necessário para suprir a demanda causada pela elevada atividade metabólica das células do hospedeiro.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a fotossíntese de plantas de trigo foi significativamente reduzida pela infecção por *P. oryzae*. A análise das curvas A/C_i indicou que o decréscimo em A esteve associado principalmente à menor atividade aparente da Rubisco, seguido pela menor regeneração de RuBP. Os parâmetros de trocas gasosas, bem como V_{max} , J_{max} e a relação J_{max}/V_{max} , foram menos afetados nas plantas inoculadas da cultivar BR 229 do que nas plantas inoculadas da cultivar BR 18, o que esteve associado à menor severidade da brusone observada nas plantas da cultivar BRS 229. O conhecimento das alterações fisiológicas de plantas de trigo infectadas por *P. oryzae* é de suma importância para o desenvolvimento de estratégias de controle eficientes da brusone.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen DJ, McKee IF, Farage PK, Baker NR (1997) Analysis of the limitation to CO₂ assimilation on exposure of leaves of two *Brassica napus* cultivars to UV-B. *Plant, Cell Environ.* **20**: 633-640.
- Alves AA, Guimarães LMS, Chaves ARM, DaMatta FM, Alfenas AC (2011) Leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. *Acta Physiol. Plant.* **33**:1831-1839.
- Anjos JRN, Silva DB, Charchar MJD, Rodrigues GC (1996) Ocorrência de brusone (*Pyricularia grisea*) em trigo e centeio na região dos cerrados do Brasil Central. *Pesq. Agropec. Bras.* **31**:79-82.
- Baker NR, Nogués S, Allen DJ (1997) Photosynthesis and photoinhibition. In: Lumsden PJ (ed.): *Plants and UV-B: Response to Environmental Change*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 95-111.
- Bassanezi RB, Amorim L, Bergamin Filho A (2000) Análise das trocas gasosas em feijoeiro com ferrugem, mancha angular e antracnose. *Fitopatol. Bras.* **25**:643-650.
- Bassanezi RB, Amorim L, Bergamin Filho A, Berger RD (2002) Gas exchange and emission of chlorophyll fluorescence during the monocycle of rust, angular leaf spot and anthracnose on bean leaves as a function of their trophic characteristics. *J. Phytopathology* **150**:37-47.
- Bastiaans L (1991): Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. *Phytopathology* **81**:611-615.
- Bastiaans L, Roumen EC (1993) Effect on leaf photosynthetic rate by leaf blast for rice cultivars with different types and levels of resistance. *Euphytica* **66**:81-87.
- Cardoso-Vilhena J, Balaguer L, Eamus D, Ollerenshaw J, Barnes J (2004) Mechanisms underlying the amelioration of O₃-induced damage by elevated atmospheric concentrations of CO₂. *J. Exp. Bot.* **55**:771-781.
- Cruz MFA, Prestes AM, Maciel JLN, Scheeren PL (2010) Resistência parcial à brusone de genótipos de trigo comum e sintético nos estádios de planta jovem e de planta adulta. *Trop. Plant. Pathol.* **35**:24-31.

- Dallagnol LJ, Rodrigues FA, Martins SCV, Cavatte PC, DaMatta, FM (2011) Alterations on rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae*. *Australasian Plant Pathol.* **40**:360-365.
- Dhingra O, Sinclair JB (1985) Basic Plant Pathology Methods. Boca Raton: CRC Press Inc. 434 p.
- Dinis LT, Peixoto F, Zhang C, Martins L, Costa R, Gomes-Laranjo J (2011) Physiological and biochemical changes in resistant and sensitive chestnut (*Castanea*) plantlets after inoculation with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiol. Mol. Plant Path.* **75**:146-156.
- Domiciano GP, Resende RS, Rodrigues FA, DaMatta FM (2009) Alteração na fotossíntese de plantas infectadas por patógenos. *Revis. Anu. Patol. Plantas* **17**:305-339.
- Duniway JM, Durbin RD (1971) Some effects of *Uromyces phaseoli* on the transpiration rate and stomatal response of bean leaves. *Phytopathology* **61**:114-119.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2009) Cultivo de trigo. Sistemas de produção, 4, versão eletrônica. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Trigo/CultivodeTrigo/introducao.htm>. Acesso: 19 dez 2011.
- Erickson JE, Stanosz GR, Kruger EL (2003) Photosynthetic consequences of Marssonina leaf spot differ between two poplar hybrids. *New Phytol.* **161**:577-583.
- Farage PK, Long SP (1999) The effects of O₃ fumigation during leaf development on photosynthesis of wheat and pea: an *in vivo* analysis. *Photosynth. Res.* **59**:1-7.
- Farquhar GD, Von Caemmerer S, Berry JA (1980) A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* **149**:78-90.
- Godoy CV, Amorim L, Bergamin Filho A (2001) Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infetadas por *Phaeosphaeria maydis*. *Fitopatol. Bras.* **26**:209-215.
- Gomes MMA, Lagôa AMMA, Machado EC, Medina CL, Machado MA (2003) Gas exchanges and carbohydrate metabolism in orange trees with citrus variegated chlorosis. *Braz. J. Plant Physiol.* **15**:25-31.

- Goodwin PH, De Vay JE, Meredith CP (1988) Physiological responses of *Vitis vinifera* cv. 'Chardonnay' to infection by the Pierce's disease bacterium. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **32**:17-32.
- Goulart ACP, Paiva FA (1992). Incidência da brusone (*Pyricularia grisea*) em diferentes cultivares de trigo (*Triticum aestivum*) em condições de campo. *Fitopatol. Bras.* **17**:321-325.
- Goulart ACP, Paiva FA (1993) Avaliação de fungicidas no controle da brusone (*Pyricularia grisea*) do trigo (*Triticum aestivum*). *Fitopatol. Bras.* **18**:167-173.
- Goulart ACP, Paiva FA (2000) Perdas no rendimento de grãos de trigo causada por *Pyricularia grisea*, nos anos de 1991 e 1992, no Mato Grosso do Sul. *Summa Phytopathol.* **26**:279-282.
- Goulart ACP, Paiva FA, Mesquita AN (1990) Ocorrência da brusone (*Pyricularia oryzae*) do trigo (*Triticum aestivum*) em Mato Grosso do Sul. *Fitopatol. Bras.* **15**:112-114.
- Goulart ACP, Sousa PG, Urashima AS (2007) Danos em trigo causados pela infecção de *Pyricularia grisea*. *Summa Phytopathol.* **33**:358-363.
- Habermann G, Machado EC, Rodrigues JD, Medina CL (2003) CO₂ assimilation, photosynthetic light response curves, and water relations of 'Pêra' sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Braz. J. Plant Physiol.* **15**:79-87.
- Harley PC, Sharkey TD (1991) An improved model of C₃ photosynthesis at high CO₂: reversed O₂ sensitivity explained by lack of glycerate re-entry into the chloroplast. *Photosynth. Res.* **27**:169-178.
- Harmens H, Stirling CM, Marshall C, Farrar JF (2000) Does downregulation of photosynthetic capacity by elevated CO₂ depend on N supply in *Dactylis glomerata*? *Physiol. Plant.* **108**: 43-50.
- Igarashi S (1990) Update on wheat blast (*Pyricularia oryzae*) in Brazil. In: Saunders, D.A. (Ed.). Wheat for nontraditional warm areas: a proceedings of the International Conference, Foz do Iguaçu, Brazil. México, DF: CIMMYT, 1991. p. 480-483.
- Igarashi S, Utiamada CM, Igarashi LC, Kazuma AH, Lopes RS (1986) *Pyricularia* sp. em trigo. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no Estado do Paraná. *Fitopatol. Bras.* **11**:351. (Resumo).
- IRRI (1996) Standard Evaluation System for Rice, 4th Ed. International Rice Research Institute, Manila, Philippines. 52 p.

- Long SP, Bernacchi CJ (2003) Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *J. Exp. Bot.* **54**:2393-2401.
- Lucas JA (1998). *Plant Pathology and Plant Pathogens* (3^a ed.). Blackwell Science, Oxford.
- Martin PJ (1986) Gaseous exchange studies of barley leaves infected with *Rhynchosporium secalis* (Oudem) J. J. Davis *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **28**:3-14.
- McGrath MT, Pennypacker SP (1990) Alteration of physiological processes in wheat flag leaves caused by stem rust and leaf rust. *Phytopathology* **80**:677-686.
- Moriondo M, Orlandini S, Giuntoli A, Bindi M (2005) The effect of downy and powdery mildew on grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaf gas exchange. *J. Phytopathol.* **153**:350-357.
- Nogués S, Baker NR (2000) Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *J. Exp. Bot.* **51**:1309-1317.
- Nogués S, Cotxarrera L, Alegre L, Trillas MI (2002) Limitations to photosynthesis in tomato leaves induced by *Fusarium* wilt. *New Phytol.* **154**:461-470.
- Owera SAP, Farrar JF, Whitbread R (1981): Growth and photosynthesis in barley infected with brown rust. *Physiol. Plant Path.* **18**:79-90.
- Picinini EC, Fernandes JMC (1990) Ocorrência da brusone (*Pyricularia oryzae*) em lavouras comerciais de trigo (*Triticum aestivum*) no Estado do Rio Grande do Sul. *Fitopatol. Bras.* **15**:83-84.
- Prabhu AS, Filippi MC, Castro N (1992) Pathogenic variation among isolate of *Pyricularia oryzae* infecting rice, wheat and grasses in Brazil. *Trop. Pest Manag.* **38**:367-371.
- Reis EM, Zanatta M, Brustolin F (2011) Eficiência do tratamento de sementes com o fungicida triadimenol na intensidade da ferrugem da folha do trigo. *Summa Phytopathol.* **37**:145-148.
- Robert C, Bancal MO, Ney B, Lannou C (2005) Wheat leaf photosynthesis loss due to leaf rust, with respect to lesion development and leaf nitrogen status. *New Phytol.* **165**:227-241.
- Sharkey TD (1985) Photosynthesis in intact leaves of C₃ plants: physics, physiology and rate limitations. *Bot. Rev.* **51**:53-105.

Tufan HA, McGrann GRD, Magusin A, Morel JB, Miché L, Boyd LA (2009) Wheat blast: histopathology and transcriptome reprogramming in response to adapted and nonadapted *Magnaporthe* isolates. *New Phytol.* **184**:473-484.

Urashima AS, Kato H (1994) Varietal resistance and chemical control of wheat blast fungus. *Summa Phytopathol.* **20**:107-112.

Urashima AS, Kato H (1998) Pathogenic relationship between isolates of *Pyricularia grisea* of wheat and other hosts at different host developmental stages. *Fitopatol. Bras.* **23**:30-35.

Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* **14**:415-421.

Zhou YH, Peng YH, Lei JL, Zou LY, Zheng JH, Yu JQ (2004) Effects of potato virus Y^{NTN} infection on gas exchange and photosystem 2 function in leaves of *Solanum tuberosum* L. *Photosynthetica* **42**:417-423.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Análise de variância dos efeitos de cultivares e épocas de avaliação na severidade da brusone.

Causas de variação	gl	Valores de F^z
Cultivares (C)	1	85,27**
Épocas de avaliação (EA)	1	20,70**
C × EA	1	5,18*

^z Níveis de probabilidade: * = 0,05 e ** = 0,01.

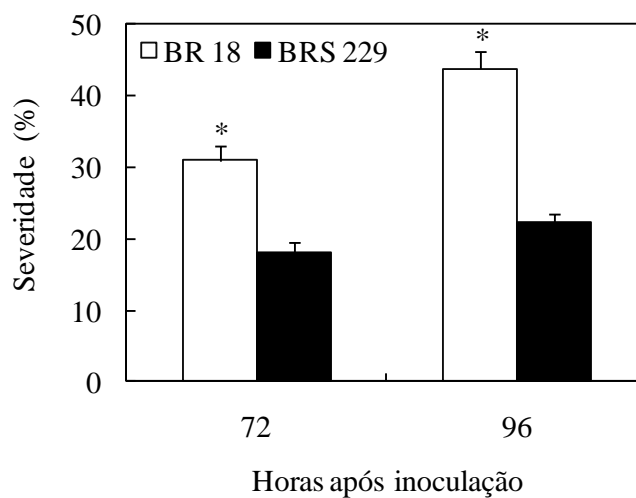


Figura 1. Severidade da brusone em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229. Médias das cultivares seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

- 1 **Tabela 2.** Análise de variância dos efeitos de cultivares, inoculação e épocas de avaliação na taxa líquida de assimilação de CO₂ (*A*),
 2 condutância estomática (*g_s*), concentração interna de CO₂ (*C_i*), taxa de transpiração (*E*), taxa máxima de carboxilação da RuBP
 3 (*V_{cmax}*), taxa máxima de transporte de elétrons usados na regeneração da RuBP (*J_{max}*), relação entre as taxas de regeneração e
 4 carboxilação da RuBP (*J_{max}/V_{cmax}*) e taxa de respiração (*R_d*).
 5

Causas de variação	gl	Valores de <i>F^z</i>							
		<i>A</i>	<i>g_s</i>	<i>C_i</i>	<i>E</i>	<i>V_{cmax}</i>	<i>J_{max}</i>	<i>J_{max}/V_{cmax}</i>	<i>R_d</i>
Cultivares (C)	1	29,10 ^{**}	24,03 ^{**}	15,86 ^{**}	18,84 ^{**}	22,77 ^{**}	0,97 ^{ns}	4,07 ^{ns}	0,14 ^{ns}
Inoculação (I)	1	576,17 ^{**}	53,63 ^{**}	159,53 ^{**}	41,89 ^{**}	435,12 ^{**}	122,12 ^{**}	81,29 ^{**}	13,89 ^{**}
Épocas de avaliação (EA)	2	12,79 ^{**}	4,33 [*]	8,51 ^{**}	2,14 ^{ns}	4,10 [*]	6,71 ^{**}	5,55 ^{**}	1,26 ^{ns}
C × I	1	103,67 ^{**}	10,70 ^{**}	21,60 ^{**}	5,34 [*]	90,72 ^{**}	32,62 ^{**}	1,52 ^{ns}	0,71 ^{ns}
C × EA	2	1,51 ^{ns}	0,85 ^{ns}	0,45 ^{ns}	0,03 ^{ns}	2,65 ^{ns}	2,21 ^{ns}	1,31 ^{ns}	0,66 ^{ns}
I × EA	2	13,72 ^{**}	3,15 ^{ns}	46,21 ^{**}	0,91 ^{ns}	23,26 ^{**}	14,42 ^{**}	2,06 ^{ns}	0,53 ^{ns}
C × I × EA	2	1,83 ^{ns}	0,56 ^{ns}	3,27 [*]	0,14 ^{ns}	1,39 ^{ns}	1,37 ^{ns}	1,82 ^{ns}	3,40 [*]

- 6 ^z Níveis de probabilidade: ^{ns} = não significativo, ^{*} = 0,05 e ^{**} = 0,01.

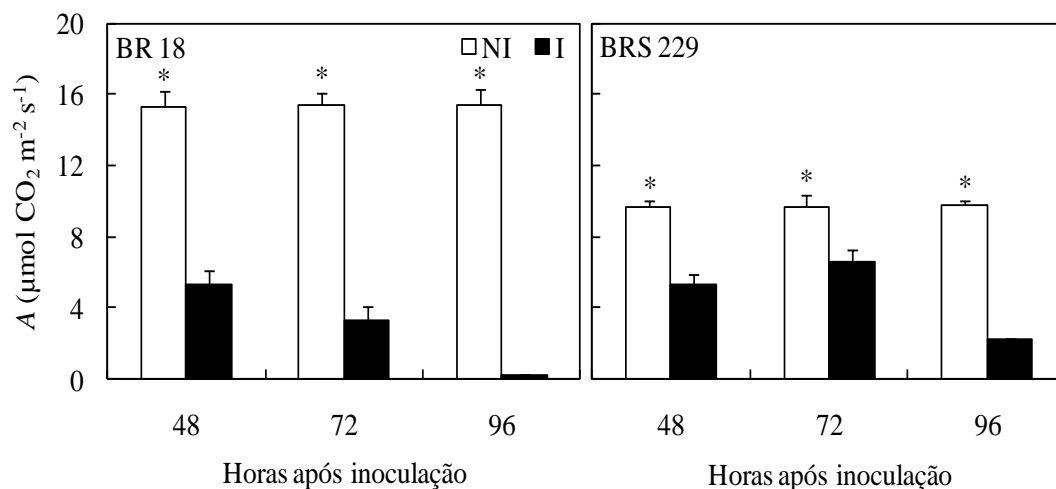


Figura 2. Taxa líquida de assimilação de CO₂ (A) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Pyricularia oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

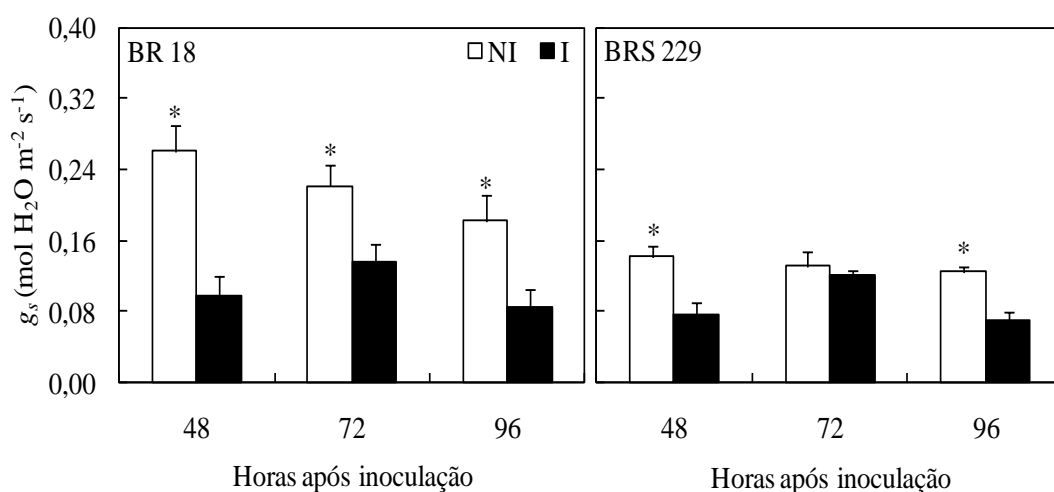


Figura 3. Condutância estomática (g_s) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Pyricularia oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

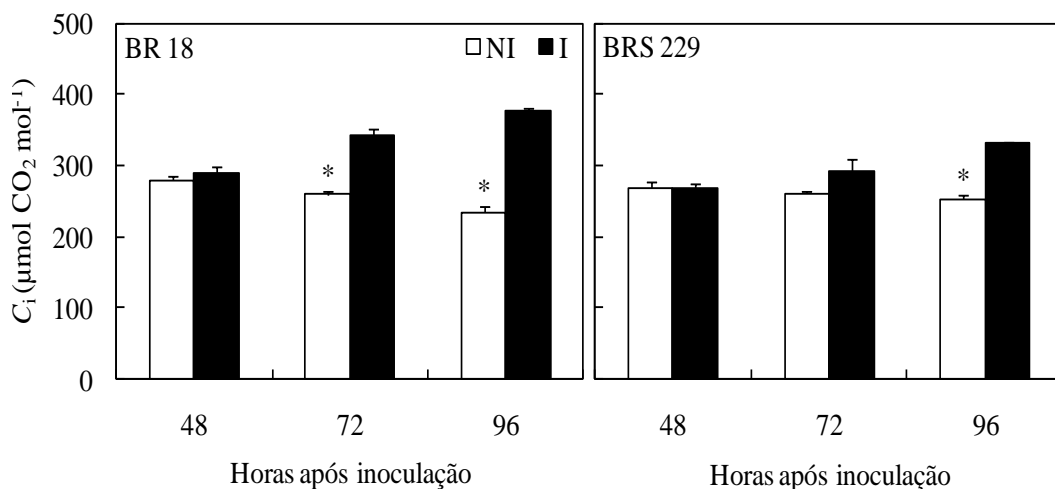


Figura 4. Concentração interna de CO₂ (C_i) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Pyricularia oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

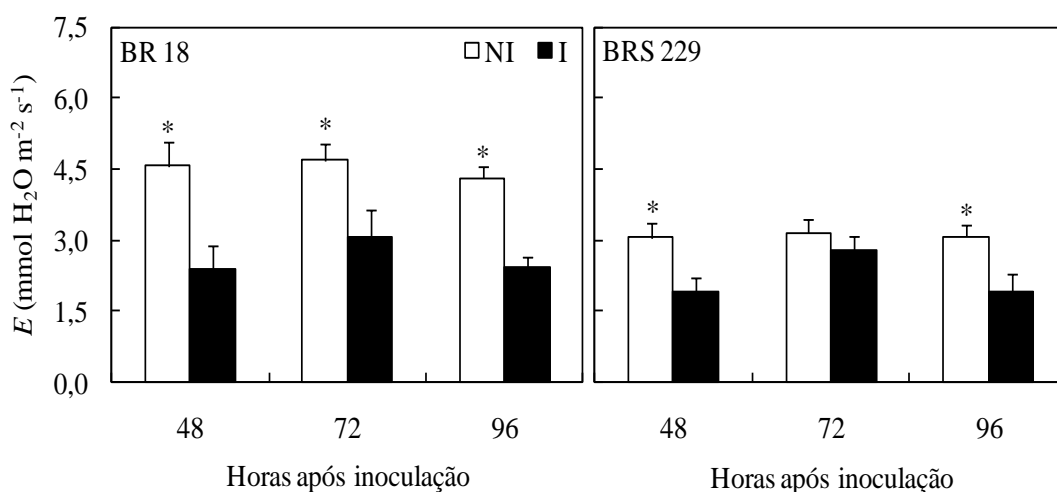


Figura 5. Taxa de transpiração (*E*) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Pyricularia oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

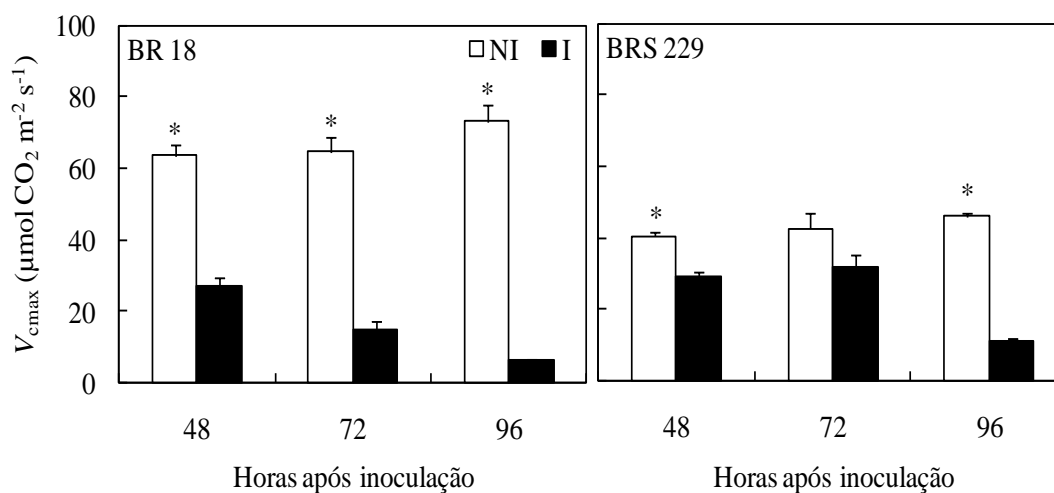


Figura 6. Taxa máxima de carboxilação (V_{cmax}) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Pyricularia oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

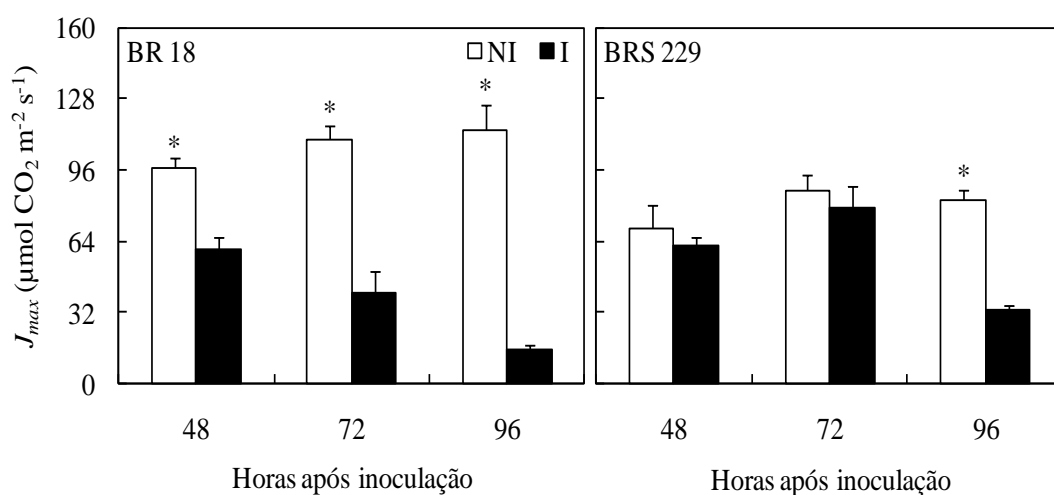


Figura 7. Taxa máxima de transporte de elétrons usados na regeneração da RuBP (J_{max}) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Pyricularia oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

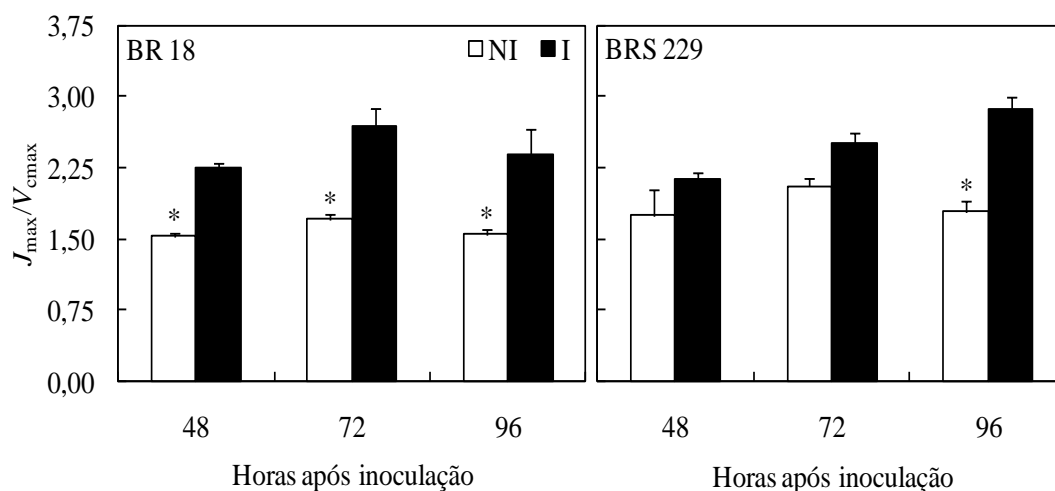


Figura 8. Relação entre as taxas de regeneração e carboxilação da RuBP ($J_{\max}/V_{c\max}$) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Pyricularia oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

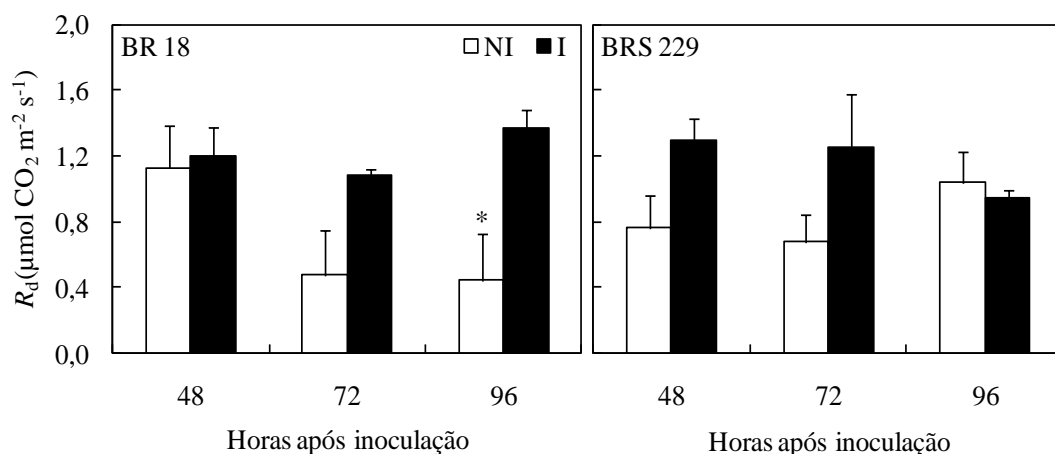


Figura 9. Taxa de respiração (R_d) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR 18 e BRS 229 não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Pyricularia oryzae*. Médias dos tratamentos NI e I seguidas de um asterisco (*), para cada época de avaliação, são significativamente diferentes pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.