

Caracterização da resistência à ferrugem em variedades europeias de lírio-de-um-dia

Madalena Ramos

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientadores: Professor Doutor Pedro Manuel Vieira Talhinhas
Professora Doutora Ana Paula Ferreira Ramos

Júri

Presidente:

Doutora Elisabete Tavares Lacerda de Figueiredo Oliveira, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais:

Doutor Arlindo Lima, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutor Pedro Manuel Vieira Talhinhas, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, orientador.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Pedro Talhinhos, orientador deste trabalho, pelo apoio, pela orientação científica e conselhos, pela disponibilidade e paciência ao longo de todo o trabalho, por toda ajuda na revisão do trabalho escrito e pela boa disposição;

À Professora Doutora Ana Paula Ramos, orientadora deste trabalho, por todo o apoio e ajuda, pelos conselhos, sugestões e disponibilidade oferecida durante a realização deste estudo;

À Doutora Maria do Céu Silva um agradecimento especial por toda a ajuda, disponibilidade demonstrada, sugestões e transmissão de conhecimentos para a realização do trabalho;

Ao viveiro STAPOFLOR Lda. e ao Engenheiro José Cáceres pela cedência do material vegetal, imprescindível para a realização deste estudo;

Ao Engenheiro Vítor Várzea pela disponibilidade demonstrada e pelas sugestões;

À Rita Carvalho por toda ajuda prestada na recolha de material vegetal infetado e como colega de equipa no projeto 'Serviço de Testagem de Resistência à Ferrugem em *Hemerocallis*', assim como à Elsa Silva, pela importante ajuda no trabalho;

Ao Doutor Carlos Lobo e ao Guilherme Roxo pela recolha e envio de material vegetal infetado com ferrugem proveniente do Jardim Botânico da Madeira;

À Professora Doutora Maria Leonor Morais pela recolha de material vegetal infetado com ferrugem;

À Doutora Ana Cabral, Doutora Andreia Loureiro, Doutora Helena Azinheira e ao Mestre Norberto Guilengue pela simpatia e toda ajuda prestada no laboratório;

À Doutora Ana Rodrigues pela disponibilização do *Software* WinFOLIA imprescindível à realização deste trabalho;

À Engenheira Alexandra Canha pela disponibilidade e interesse;

À D. Amélia pela simpatia e ajuda a cuidar das plantas na estufa;

Aos meus amigos e colegas, em especial à Diana Acácio e à Daniela Dias, pela sua amizade, paciência, boa disposição e por toda ajuda e apoio demonstrado;

Aos meus pais e irmã pelo apoio incondicional, pelo carinho e por me terem ajudado na conclusão desta etapa, da minha vida.

Este trabalho teve apoio do LEAF (Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem; UID/AGR/04129/2013) e do projeto PTDC/BIA-MIC/1716/2014, ambos suportados financeiramente pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, bem como do Instituto Superior de Agronomia no âmbito da primeira edição do concurso de Apoio ao Desenvolvimento de Ideias Inovadoras ApINOV@ISA.

Muito obrigada

Resumo

O lírio-de-um-dia (*Hemerocallis* spp.) é uma ornamental perene amplamente cultivada em jardins de todo o mundo, registrando-se a existência de milhares de cultivares. A ferrugem de lírio-de-um-dia, causada por *Puccinia hemerocallidis*, é originária da Ásia, estando no entanto a doença reportada em todos os continentes desde o ano 2000. A partir do momento em que a ferrugem se disseminou, constatou-se que cultivares de lírio-de-um-dia mostravam distintas respostas de resistência à ferrugem, assim como vários espécimes do fungo mostram diferenças morfológicas e genéticas.

A diversidade dos isolados de *P. hemerocallidis* identificados em Portugal, caracterizada a partir da morfologia dos uredósporos e teleutósporos, da sequenciação da região rDNA-ITS e da determinação do tamanho do genoma, sugere que a introdução do fungo em Portugal possa ter origem norte ou centro americana.

O nível de resistência à ferrugem foi estudado para 17 cultivares de lírio-de-um-dia. A quantificação da área afetada por cloroses, pústulas, necroses e senescência e da ocorrência de esporulação em plantas envasadas revelou-se uma metodologia precisa, melhorando os métodos qualitativos rotinamente usados. O estudo desta coleção permitiu identificar três cultivares moderadamente resistentes, duas moderadamente suscetíveis e 12 suscetíveis. O estudo histológico duma interação incompatível revelou a ocorrência duma resposta hipersensível parcial, em que o colapso das células da planta não foi rápido o suficiente para condicionar a infecção do agente patogénico, levando ao aparecimento de lesões necróticas nas folhas e esporulação tardia.

Este estudo incluiu sete cultivares europeias, das quais apenas uma mostrou ser moderadamente resistente à ferrugem. A elevada proporção de cultivares suscetíveis pode representar uma ameaça à atividade viveirista da ornamental, caso a doença se propague pela Europa. O presente trabalho permitiu estabelecer metodologias de avaliação da resistência de *Hemerocallis* à ferrugem, servindo em simultâneo de alerta para a necessidade de proceder à caracterização sistemática dessa resistência nas variedades europeias.

Palavras-chave: *Hemerocallis*, *Puccinia hemerocallidis*, Europa, resistência a doença, organismo de quarentena

Abstract

Daylily (*Hemerocallis* spp.) is a perennial ornamental plant cultivated in gardens worldwide, with thousands of cultivars registered. Daylily rust, caused by *Puccinia hemerocallidis*, is originary from Asia, but the disease was reported in all continents since the year 2000. From the moment that the daylily rust disseminated, it was found that the daylily cultivars showed distinct resistance responses to rust, as the several specimens of the fungus showed morphologic and genetic differences.

The diversity of the isolates of *P. hemerocallidis* identified in Portugal, characterized by the morphology of urediniospores and teliospores, by sequencing of the rDNA-ITS region and by the determination of the genome size, suggests that the introduction of daylily rust in Portugal may have come from North or Central America.

The resistance level to daylily rust was studied for 17 daylily cultivars. The methodology to quantify the area affected by chlorosis, pustules, necrosis and senescence, and the occurrence of sporulation, in potted plants, revealed to be precise, improving the qualitative methods normally used. In the daylily collection studied, three moderately resistant, two moderately susceptible and 12 susceptible cultivars were identified. The histological study of an incompatible interaction showed the occurrence of a partial hypersensitive response, where the collapse of the plant cells was not fast enough to restrict pathogen infection, causing the appearance of necrotic lesions on the leaves and late sporulation.

In this study, seven european cultivars were included, from which only one showed to be moderately resistant to daylily rust. The high proportion of susceptible cultivars may present a threat to breeding and nursery industries, if the disease spreads through Europe. This study allowed to create methodologies of evaluation of *Hemerocallis* resistance to daylily rust, simultaneously alerting for the need of a systematic characterization of resistance in european cultivars.

Keywords: *Hemerocallis*, *Puccinia hemerocallidis*, Europe, disease resistance, quarantine.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo.....	ii
<i>Abstract</i>	iii
Índice	iv
Índice de quadros.....	vi
Índice de figuras.....	vii
Lista de abreviaturas e acrónimos.....	ix
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Lírio-de-um-dia (<i>Hemerocallis</i> spp.)	3
2.2. Ferrugem do lírio-de-um-dia (<i>Puccinia hemerocallidis</i>)	8
2.2.1. Origem e Distribuição geográfica.....	8
2.2.2. Taxonomia.....	8
2.2.3. Sintomatologia.....	9
2.2.4. Ciclo de vida.....	10
2.2.5. Condições ótimas de germinação dos uredósporos	12
2.2.6. Processo de infeção	13
2.2.7. Caracterização da morfologia dos uredósporos e teleutósporos.....	14
2.2.8. Caracterização genética de <i>Puccinia hemerocallidis</i>	15
2.2.9. <i>Puccinia hemerocallidis</i> em Portugal	16
2.2.10. Meios de luta.....	17
2.3 Mecanismos celulares, bioquímicos e moleculares de resistência do lírio-de-um-dia a <i>Puccinia hemerocallidis</i>	20
3. Material e métodos.....	23
3.1. Avaliação da diversidade entre populações de <i>Puccinia hemerocallidis</i> de Portugal	23
3.1.1. Monitorização da ocorrência da ferrugem em populações de <i>Hemerocallis</i> em jardins portugueses.....	23
3.1.2. Caracterização morfológica dos uredósporos e teleutósporos.....	24
3.1.3. Caracterização molecular	24

3.1.4. Caracterização citogenómica.....	27
3.2. Avaliação do nível de resistência à ferrugem	28
3.2.1. Material biológico.....	28
3.2.2. Manutenção do material vegetal.....	29
3.2.3. Produção e manutenção de inóculo	30
3.2.4. Caracterização histológica do processo de infeção	30
3.2.5. Inoculação e avaliação da resistência	31
3.3. Análise estatística	33
4. Resultados e discussão.....	34
4.1. Caracterização dos isolados de <i>Puccinia hemerocallidis</i> encontrados em Portugal.....	34
4.1.1. Caracterização morfológica e biometria dos uredósporos e teleutósporos	35
4.1.2. Caracterização da diversidade genética entre isolados	39
4.2. Caracterização do nível de resistência de <i>Hemerocallis</i> à ferrugem	47
4.2.1. Avaliação macroscópica do nível de resistência à ferrugem da coleção de lírio-de-um-dia	47
4.2.2. Caracterização histológica de interações contrastantes	57
4.2.3. Resistência de <i>Hemerocallis</i> à ferrugem	60
5. Conclusões	65
6. Referências Bibliográficas	68
ANEXO	I

Índice de quadros

Quadro 1. Classificação de espécies de <i>Hemerocallis</i> e características de cada grupo morfológico.....	4
Quadro 2. Classificação dos diferentes tipos de épocas de floração.	6
Quadro 3. Escala dos tipos de reação de plantas de <i>Hemerocallis</i> a <i>Puccinia hemerocallidis</i>	22
Quadro 4. Referência e localização dos isolados de <i>Puccinia hemerocallidis</i> em estudo. ...	23
Quadro 5. Características dos Primers ITS.....	25
Quadro 6. Programa de amplificação utilizado.	25
Quadro 7. Genótipos de <i>Hemerocallis</i> utilizados no presente estudo, época de floração, tipo de folhagem, ploidia, nacionalidade, autores e genealogia.....	29
Quadro 8. Populações de <i>Hemerocallis</i> monitorizadas para a presença de ferrugem.	35
Quadro 9. Características biométricas dos uredósporos de quatro isolados de <i>Puccinia hemerocallidis</i> coletados em Portugal e dados biométricos de uredósporos de isolados provenientes de outras regiões geográficas.	37
Quadro 10. Características biométricas dos teleutósporos de <i>Puccinia hemerocallidis</i> do isolado Ph02.	39
Quadro 11. Resultados do grau de pureza dado pela razão A_{260}/A_{280} e a concentração do DNA de cada isolado.....	39
Quadro 12. Referência de acesso atribuída pela base de dados GenBank aos isolados Ph02, Ph04, Ph14 e Ph16.	41
Quadro 13. Resultados de citometria de fluxo referentes aos isolados em estudo de <i>Puccinia hemerocallidis</i>	44
Quadro 14. Parâmetros relativos à monitorização da ferrugem (período de incubação, período latente e esporulação) e categoria de resistência de cultivares de lírio-de-um-dia inoculadas com <i>Puccinia hemerocallidis</i>	51
Quadro 15. Área sob a curva de progressão da doença (AUDPC) correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada para cada cultivar de lírio-de-um-dia inoculada com <i>Puccinia hemerocallidis</i> e respetiva análise estatística aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$).	56

Índice de figuras

Figura 1. Ilustração da planta lírio-de-um-dia	7
Figura 2. Distribuição mundial de <i>Puccinia hemerocallidis</i> , com datas dos primeiros registos	8
Figura 3. Sintomas (e sinal) causados por <i>Puccinia hemerocallidis</i> em <i>Hemerocallis</i> sp. A- Pontuações cloróticas na página inferior da folha 7 a 10 dias após a infeção; B- Soros uredospóricos amarelos-alaranjados que rompem a epiderme na página inferior da folha; C- Soros teleutospóricos na página inferior da folha.	10
Figura 4. Ciclo de vida da ferrugem <i>Puccinia hemerocallidis</i>	11
Figura 5. Estruturas de <i>Puccinia hemerocallidis</i> : A e B- uredo; B- teleuto; C- uredósporos; D- teleutósporos	14
Figura 6. Folha de <i>Hemerocallis</i> sp. em início de senescência, com infeção de <i>Puccinia hemerocallidis</i> cercada por um halo verde.	15
Figura 7. Uredósporos de <i>Puccinia hemerocallidis</i> dos isolados Ph02 (A), Ph06 (B), Ph14(C) e Ph16 (D).	36
Figura 8. Teleutósporos de <i>Puccinia hemerocallidis</i> do isolado Ph02.	38
Figura 9. Resultados da extração de DNA dos quatro isolados em estudo com as respetivas quantidades de λ DNA usadas como padrão (10, 25 e 100 ng).	40
Figura 10. Resultado do PCR da amplificação da região rDNA-ITS de cada isolado e respetivo controlo positivo e negativo.	40
Figura 11. Filograma obtido a partir de dados da região rDNA-ITS para o estabelecimento de relações filogénicas entre os quatro isolados de <i>Puccinia hemerocallidis</i> estudados e as sequências de isolados provenientes da Austrália, Costa Rica, EUA, Japão, México, Porto Covo (Portugal) e Rússia.	42
Figura 12. Alinhamento múltiplo de duas frações das sequências da região rDNA-ITS dos isolados em estudo, incluído a sequência obtida por Carvalho <i>et al.</i> (2018) com origem em Porto Covo.	43
Figura 13. Gráficos resultantes da análise do isolados Ph02 de <i>Puccinia hemerocallidis</i> e de <i>Rhamnus alaternus</i> no citómetro de fluxo. Nos eixos das coordenadas estão o SSC (side scatter) e o FL1 (fluorescência) (A) resultante do laser de 532 nm assim como a contagem de partículas analisadas (counts) (B).	43
Figura 14. Evolução dos sintomas de ferrugem em cultivares de <i>Hemerocallis</i> após inoculação com uredósporos de <i>Puccinia hemerocallidis</i>	50
Figura 15. Presença de cloroses, soros uredospóricos e lesões necróticas na página inferior em <i>Hemerocallis</i> 'German Highlight', observada ao 16º dia após a inoculação.	53

Figura 16. Sintomas (e sinal) causados por <i>Puccinia hemerocallidis</i> em <i>Hemerocallis</i> 'Bitsy', observadas um mês após a inoculação. A- Pústulas sobre lesões necróticas na página superior; B- Uredósporos sobre lesões necróticas na página inferior da folha.....	54
Figura 17. Área sob a curva de progressão da doença (AUDPC) correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada para cada cultivar de lírio-de-um-dia inoculada com <i>Puccinia hemerocallidis</i>	57
Figura 18. Processo de germinação dos uredósporos de <i>Puccinia hemerocallidis</i> sobre a cultivar de <i>Hemerocallis</i> 'Indian Sky'. Diferenciação do tubo germinativo (TG) dos uredósporos (U) (A, B) e formação de um apressório (AP) no final do tubo germinativo (B), 24 horas após a inoculação.	58
Figura 19. Processo de infecção de <i>Puccinia hemerocallidis</i> sobre a cultivar de <i>Hemerocallis</i> 'Indian Sky' (interação compatível), 7 dias após a inoculação. Presença de várias hifas intercelulares (HI) (A), que formam "neckbands" (N) e haustórios (HA) dentro das células do mesofilo (B). Início da formação de um soro uredospórico (IU) sob a cutícula (A).....	59
Figura 20. Processo de infecção de <i>Puccinia hemerocallidis</i> sobre a cultivar de <i>Hemerocallis</i> 'Bitsy' (interação selecionada como incompatível), 7 dias após a inoculação. Presença de uma hifa de penetração (HP) dentro da cavidade subestomática (E), hifas intercelulares (HI) haustórios (HA) e células mortas da planta (CM).	59
Figura 21. Processo de infecção de <i>Puccinia hemerocallidis</i> sobre as cultivares de <i>Hemerocallis</i> 'Bitsy' (A) (interação selecionada como incompatível) e 'Indian Sky' (B) (interação compatível), 1 mês após a inoculação. Soros uredospóricos (SU) sob a cutícula com uredósporos (U) no seu interior (A, B). Presença de células mortas (CM) em redor do soro uredospórico (SU) (A).....	60

Lista de abreviaturas e acrónimos

ADS	American Daylily Society
dai	Dias após inoculação
AUDPC	Área sob a curva de progresso da doença
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPPO	Organização Europeia e Mediterrânea para a Proteção de Plantas
EUA	Estados Unidos da América
F	Geração filial
FRAC	Fungicide Resistance Action Committee
ITS	Internal Transcribed Spacer
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nt	Nucleótidos
pb	Par de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PR	Proteína relacionada com patogenicidade
PVP	Polivinilpirrolidona
rDNA	DNA ribossomal
RH	Reação de hipersensibilidade
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
TAE	Tris-Acetato-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
Tm	Temperatura de desnaturação
UV	Ultravioleta
WPB	Woody Plant Buffer

1. Introdução

O lírio-de-um-dia (*Hemerocallis* spp.), originário da Ásia Oriental (Stout, 1934) é uma monocotiledónea pertencente à família Xanthorrhoeaceae. Atualmente esta ornamental perene é amplamente utilizada em jardins de todo o mundo (Blythe *et al.*, 2015), o que justifica a existência de dezenas de milhares de cultivares, resultado do trabalho de seleção de vários viveiristas e melhoradores, contando com mais de 90 000 cultivares registadas (ADS, 2019a).

A existência de um elevado número de cultivares manifesta-se em flores com uma diversidade de cores, formas e tamanhos, com diferentes hábitos de crescimento e períodos de floração (Mueller *et al.*, 2003).

A ferrugem de lírio-de-um-dia (causada por *Puccinia hemerocallidis* von Thümen), foi descrita pela primeira vez em 1880 em *Hemerocallis fulva* L. na Sibéria (von Thümen, 1880), mantendo-se confinada ao continente asiático durante o século XX. No entanto, a partir do ano 2000, a doença foi reportada em todos os continentes (EUA (2000), Canadá e Brasil (2001), Austrália (2002), América Central (2006)) e África do Sul (2007), exceto na Europa (EPPO, 2009), onde foi incluída na lista A1 de doenças de quarentena (EPPO, 2015).

Depois da ferrugem ter sido observada pela primeira vez em plantas da cultivar 'Pardon Me' num viveiro nos Estados Unidos da América, aparentemente introduzida a partir de plantas importadas da América do Sul (Williams-Woodward *et al.*, 2001), as agências reguladoras aplicaram várias medidas de erradicação e quarentena, de forma a limitar a progressão do fungo (Wise *et al.*, 2004). No entanto, o transporte da ornamental no outono é normalmente feito através do propágulo, sem folhas desenvolvidas, o que dificulta a identificação da ferrugem nos portos (Buck & Ono, 2012). Também a não deteção de infeções leves e a ausência de sintomas aquando a inspeção (Jones & Sansford, 2005), poderão ter sido as causas da rápida disseminação da doença.

A partir de novembro de 2015 foram observados sintomas de ferrugem em plantas de lírio-de-um-dia em Portugal, nomeadamente em Lisboa, Tavira e na ilha da Madeira (Silva *et al.*, 2016).

O atual nível de disseminação da doença no país é baixo devido à inexistente atividade viveirista desta ornamental em Portugal e por esta doença ser específica de *Hemerocallis*, não afetando outras culturas. Perante o registo da ferrugem no país, entidades oficiais (DGAV) não consideram exequível a aplicação de nenhuma medida concreta de erradicação. No entanto, existe uma grande probabilidade de o inóculo do fungo sobreviver durante o inverno ameno (EPPO, 2009) de Portugal, o que pode levar à proliferação do inóculo a partir de Portugal para o resto da Europa, representando uma ameaça para os melhoradores e viveiristas europeus de lírio-de-um-dia, que é uma atividade bastante importante.

A doença pode ser controlada através de várias estratégias, que incluem a quarentena das plantas nos viveiros (Buck & Ono, 2012), eliminação de plantas infetadas em jardins e a utilização de fungicidas preventivos para reduzir a germinação dos uredósporos de *P. hemerocallidis* (Buck & Williams-Woodward, 2003) e o desenvolvimento de lesões.

A utilização de fungicidas, como medida de controlo, aumenta drasticamente os custos de produção do lírio-de-um-dia, que até ao surgimento da ferrugem era praticamente isento de pragas e doenças, o que torna a utilização de cultivares resistentes à ferrugem a solução mais viável para controlar a doença, proporcionando aos viveiros e aos entusiastas desta planta uma opção ambientalmente mais segura e económica para controlar a doença (Mueller *et al.*, 2003).

Perante isto, é necessário conhecer a suscetibilidade das cultivares europeias à doença, na hipótese desta se disseminar por outros países europeus, uma vez que existem vários estudos que demonstram a existência de variabilidade genética de cultivares em relação à suscetibilidade de *Hemerocallis* ao agente patogénico (Robbins & Vann, 2002; Mueller *et al.*, 2003; Robbins, 2003; Blythe *et al.*, 2015).

O desconhecimento da resposta de cultivares europeias de lírio-de-um-dia à ferrugem conduz ao objetivo principal deste trabalho, que consiste em avaliar a resistência à ferrugem a uma coleção de cultivares de lírio-de-um-dia, utilizando a população do fungo identificado em Portugal, beneficiando assim da posição única do país na Europa neste âmbito. Paralelamente, populações de *P. hemerocallidis* identificadas em Portugal foram estudadas para comparar as características morfológicas, citogenómica e genética pela sequenciação da região rDNA-ITS.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Lírio-de-um-dia (*Hemerocallis* spp.)

O lírio-de-um-dia (*Hemerocallis* spp.) é uma monocotiledónea perene pertencente à família Xanthorrhoeaceae. O seu nome botânico, *Hemerocallis*, é derivado das palavras gregas *hemero* (“um dia”) e *callis* (“beleza”), referindo-se ao facto de cada flor apenas durar um dia (Chen *et al.*, 2005), ainda que a floração da planta se mantenha por largos períodos.

O lírio-de-um-dia é nativo do leste da Ásia, incluído a China, Coreia, Japão e Rússia Oriental (Stout, 1934), onde há milhares de anos era cultivada devido ao valor nutricional das raízes, folhas e flores que podem ser consumidas tanto secas como frescas, assim como pelas suas várias propriedades medicinais (Erhardt, 1992). Acredita-se que o lírio-de-um-dia chegou à Europa cerca de 300 a.C. transportado pelos comerciantes de seda e especiarias (Gulia *et al.*, 2009), passando a ser posteriormente cultivado pelos gregos e romanos (Baker, 1937). Por volta de 1620, *Hemerocallis flava* L. e *Hemerocallis fulva* L. começaram a ser cultivadas no Reino Unido (Stout, 1934), proporcionando que o género fosse introduzido no continente americano nos séculos XVIII e XIX (Garber, 2004), popularizando-se depois em outras regiões do mundo.

O desenvolvimento dos primeiros híbridos do género *Hemerocallis* começou na Europa no final do século XIX, em consequência da criação do primeiro híbrido F1 ‘Apricot’ resultado do cruzamento entre *H. flava* x *Hemerocallis middendorffii* Trautv. & C.A. Mey. desenvolvido em 1892 pelo inglês George Yeld (Hill & Hill, 1992; ADS, 2019a).

A facilidade que o género *Hemerocallis* tem de originar novos híbridos suscitou, desde a década de 1920 (HE, 2008), o interesse de vários melhoradores e amadores por esta ornamental, estimando-se que ocorreram aproximadamente 5 milhões de cruzamentos ao longo de 100 anos (McGarty, 2009).

Os EUA são o maior produtor de novos híbridos de *Hemerocallis* (HE, 2008), sendo considerada uma das principais ornamentais perenes neste país, com a existência de dezenas de milhares de cultivares e a introdução de novos híbridos todos os anos. Desde 1947, as cultivares começaram a ser registadas oficialmente, existindo atualmente mais de 90 000 cultivares registadas na American Daylily Society (2019).

A maior atividade viveirista de *Hemerocallis* encontra-se nos EUA, existindo também grupos de criadores no Canadá, Reino Unido, Austrália, Nova Zelândia, Alemanha, Japão, Coreia e China (Mahagamasekera, 2000), entre outros países.

Embora poucas espécies selvagens sejam vendidas por viveiristas ou cultivadas, estas representam a origem de todo património genético, com algumas características que ainda suscitam muito interesse para a produção de híbridos de lírio-de-um-dia (McGarty, 2009), nomeadamente a resistência em relação às baixas temperaturas e ao ensombramento,

elevado vigor vegetativo, períodos de floração longos e desenvolvimento vegetativo e floral rápidos (Hill & Hill, 1992).

Inicialmente Stout (1941) reconheceu cerca de 20 espécies do gênero *Hemerocallis* e as restantes espécies foram descobertas, identificadas e classificadas, desde então, por Hu (1968), Erhardt (1992), Kang & Chung (1997). Erhardt (1992) desenvolveu uma classificação para espécies de *Hemerocallis*, separando-as em cinco grupos morfológicos: Fulva, Citrina, Middendorffii, Nana e Multiflora (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação de espécies de *Hemerocallis* e características de cada grupo morfológico (Adaptado de Erhardt, 1992).

Grupo Morfológico	Espécies	Caraterísticas comuns
Citrina	<i>H. altissima</i> ; <i>H. citrina</i> ; <i>H. coreana</i> ; <i>H. lilioasphodelus</i> ; <i>H. minor</i> ; <i>H. pedicellata</i> ; <i>H. thunbergii</i> ; <i>H. yezoensis</i>	As inflorescências têm múltiplas ramificações. As flores são predominantemente amarelas, noturnas, perfumadas com perianto de tubo longo.
Fulva	<i>H. aurantiaca</i> ; <i>H. fulva</i>	As inflorescências são ramificadas. As flores são castanhas avermelhadas de hábito diurno. As raízes têm uma dilatação em forma de fuso.
Middendorffii	<i>H. dumortieri</i> ; <i>H. esculenta</i> ; <i>H. exaltata</i> ; <i>H. hakuunensis</i> ; <i>H. middendorffii</i>	As inflorescências não são ramificadas. As flores são de cor-laranja, hábito diurno. As brácteas são curtas, largas e sobrepostas.
Nana	<i>H. forrestii</i> ; <i>H. nana</i>	As inflorescências têm no máximo 50 cm de comprimento e não são ramificadas. As flores são avermelhadas-alaranjadas, hábito diurno, tubo do perianto mais curto do que 1 cm. Não é resistente ao inverno.
Multiflora	<i>H. microntha</i> ; <i>H. multiflora</i> ; <i>H. plicata</i> .	As inflorescências têm muitas ramificações, curtas. As flores são laranja a amarelo-alaranjado, hábito diurno. O pedúnculo da flor tem menos de 7 cm e tubos com menos de 2 cm de comprimento.

A maioria das variedades de lírio-de-um-dia é diploide, com o total de 11 pares de cromossomas (Hill & Hill, 1992) e o tamanho do genoma está compreendido entre 8,02-8,53 pg (Podwyszynska *et al.*, 2014). No entanto, as variedades poliploides são as mais procuradas, especialmente as triploides (com 33 cromossomas) e as tetraploides (com 44 cromossomas) (Hill & Hill, 1992), para integrar os programas de melhoramento (Gulia *et al.*, 2009). As variedades triploides e tetraploides possuem respetivamente um genoma com 12,24-13,16 pg (dados não apresentados) e 16,01-17,13 pg (Podwyszynska *et al.*, 2014).

No geral, as variedades tetraploides são caracterizadas por possuir um crescimento vegetativo mais vigoroso, folhagem mais densa, maior número de flores de tamanho superior e cores mais brilhantes (Hill & Hill, 1992). Porém, de acordo com os vários ensaios já realizados, verifica-se uma tendência para as variedades tetraploides mostrarem maior suscetibilidade à ferrugem do que as variedades diploides (Blythe *et al.*, 2015). As variedades

triploides também possuem características igualmente apreciadas, mas devido ao número ímpar de cromossomas, estas são normalmente inférteis, e como tal menos interessantes para os melhoradores (Podwyszynska *et al.*, 2014).

As plantas do género *Hemerocallis* possuem um caule subterrâneo, denominado de “coroa”, que contém o meristema apical, de onde se desenvolvem as folhas e as raízes. A maioria das variedades adapta-se bem a diferentes tipos de solo, devido às suas raízes caracteristicamente robustas e carnudas, capazes de armazenar água (Mahagamasekera, 2000) e de resistir a longos períodos de seca e calor (Gulia *et al.*, 2009). Porém, o seu crescimento é beneficiado em solos com uma boa drenagem (Solaris Farms, 2017), férteis com textura argilo-arenosa, ricos em matéria orgânica e pH ligeiramente ácido, compreendido entre 5,5 a 7,0 (Ribeiro, 2012). Não é aconselhado plantar esta ornamental perto de árvores, de modo a evitar a competição por humidade, nutrientes e luz (Tombolato, 2004).

As folhas estão fortemente nervuradas e dispostas em duas fileiras estreitamente compactadas (Mahagamasekera, 2000), formando uma folhagem densa, capaz de diminuir o desenvolvimento de infestantes (Blythe *et al.*, 2015) e proteger o solo da erosão. Esta forte densidade, associada a uma rápida taxa de crescimento e propagação e à cor e brilho das folhas, gera um importante interesse ornamental como planta de cobertura, adicionalmente à componente cromática resultante da floração. A disposição, altura e cor das folhas varia entre espécies e cultivares (Mahagamasekera, 2000).

As plantas de *Hemerocallis* possuem três tipos de hábito de crescimento. As que possuem um hábito do tipo dormente caracterizam-se pela senescência da folhagem no final do outono e perda total desta no inverno, permanecendo no estado de dormência até à primavera, sendo assim as cultivares mais resistentes às baixas temperaturas, geadas, ventos e neve (Hill & Hill, 1992). As plantas com hábito de crescimento perene mantêm a folhagem verde durante todo o ano, a menos que se verifique um período com temperaturas mais baixas com geadas, que levem à senescência das folhas, indicando que estas plantas são mais sensíveis a invernos severos (Hill & Hill, 1992). O hábito do tipo semi-perene resulta da hibridação entre cultivares dormentes e perenes, de forma a combinar a resistência às condições adversas do inverno (Hill & Hill, 1992), levando a que a planta perca parte ou a maioria da folhagem, consoante as condições ambientais dominantes (Gulia *et al.*, 2009).

Tal como expresso pelo nome vulgar, cada flor abre no início da manhã e sofre uma rápida senescência no final da tarde, durando apenas um dia. No entanto, a planta possui gemas que podem gerar cerca de 50 botões florais (Tombolato *et al.*, 2010) durante toda a época de floração que é bastante variável consoante a cultivar. A época de floração pode ir de junho a outubro (Hill & Hill, 1992), o que justifica o extenso sistema de classificação adotado pelos melhoradores da espécie (Quadro 2). Esta variabilidade permite ter um canteiro em floração durante todo o verão, apenas através da escolha das variedades adequadas.

Quadro 2. Classificação dos diferentes tipos de épocas de floração (ADS, 2019b).

Denominação	Descrição
Extra precoce	A floração varia entre maio e junho (hemisfério norte)
Precoce	A floração ocorre 3 a 5 semanas antes do auge da floração das cultivares temporãs
Temporã precoce	A floração ocorre 1 a 3 semanas antes do auge da floração das cultivares temporãs
Temporã	Ocorre em meados de julho, quando a maioria das variedades florescem
Temporã tardia	A floração ocorre 1 a 3 semanas após a auge da floração das cultivares temporãs
Tardia	A floração ocorre 4 a 6 semanas após a auge da floração das cultivares temporãs, quando a maioria das cultivares termina a floração
Muito tardia	A floração ocorre no final do verão, sendo as últimas cultivares a florir
<i>Rebloomer</i>	Estas cultivares florescem mais do que uma vez durante a época de floração

O lírio-de-um-dia é uma planta monoica (Hill & Hill, 1992). Caso haja fertilização, após a polinização, formam-se, 50 dias depois, cápsulas com três camadas de sementes pretas que podem ser redondas ou elípticas (Gulia *et al.*, 2009). Normalmente, uma planta germinada a partir da semente requer dois anos para florescer (Gulia *et al.*, 2009).

As inflorescências podem ter origem apical ou axilar, com uma elevada diversidade de cores, formas, geometrias e dimensões entre cultivares. O lírio-de-um-dia é considerada uma planta indiferente ao fotoperíodo, não necessitando do estímulo da luz para florir (Hill & Hill, 1992). No entanto, a floração beneficia da exposição à luz solar por longos períodos, exigindo um mínimo de seis horas diárias de luz solar direta (Garber, 2004) para manter uma intensa coloração das pétalas, principalmente em variedades com inflorescências de cor mais clara (Solaris Farms, 2017).

Após vários anos de crescimento as plantas de *Hemerocallis* são compostas por várias “coroas”, que devem ser separadas e propagadas entre cada 2 a 5 anos (Hill & Hill, 1992) para dar origem a plantas individuais (Gulia, et al., 2009). A melhor época para transplantar as “coroas” é após a floração, quando estas retomam o ciclo vegetativo, produzindo novas raízes (Solaris Farms, 2017). Durante a plantação, o solo incorporado com matéria orgânica deverá ter uma profundidade entre 15 a 20 cm, com espaço suficiente para acomodar as raízes sem as dobrar ou quebrar, de modo que a “coroa” não se encontre a mais de 2,5 cm abaixo do solo (Hill & Hill, 1992), com o compasso suficientemente grande entre plantas para que se desenvolvam sem sombra.

Diferentes espécies e cultivares mostram uma grande diversidade no hábito de crescimento, época de floração, tamanho, forma, cor e fragrância das flores, o que torna o lírio-de-um-dia apropriado para se integrar numa paisagem ou jardim (Mahagamasekera, 2000) (Figura 1). Esta ornamental é ocasionalmente atacada por afídeos e ácaros na base

das folhas, e/ou por tripses que afetam os botões florais (Gulia *et al.*, 2009), que causam estragos pouco relevantes, sendo por isso considerada uma ornamental livre de pragas e doenças, até ao aparecimento da ferrugem (William-Woodward & Buck, 2002).

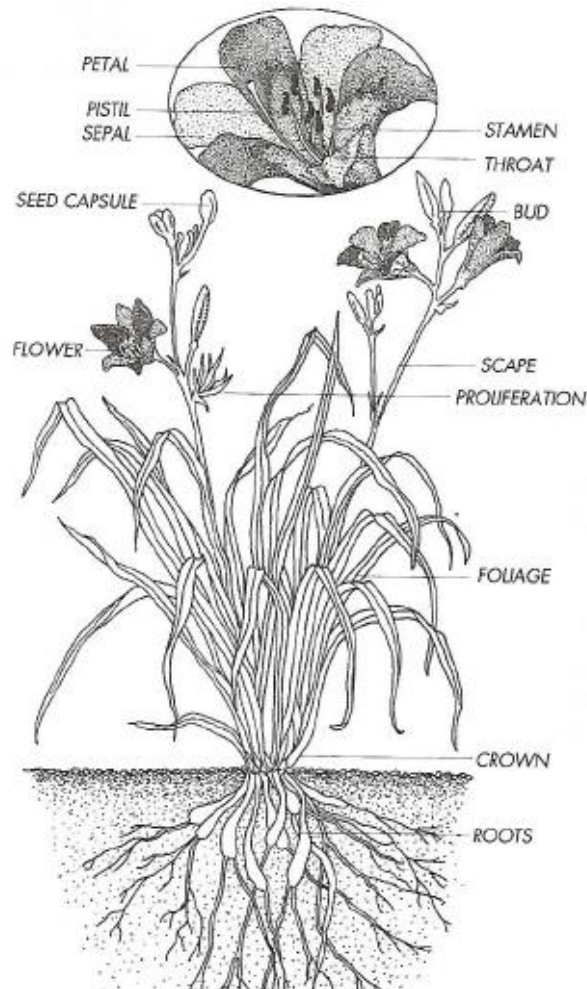


Figura 1. Ilustração da planta lírio-de-um-dia (Hill & Hill, 1992).

2.2. Ferrugem do lírio-de-um-dia (*Puccinia hemerocallidis*)

2.2.1. Origem e Distribuição geográfica

A ferrugem do lírio-de-um-dia, causada pelo fungo *Puccinia hemerocallidis* von Thümen, foi descrita pela primeira vez em 1880, a partir de material teleutospórico recolhido em *H. fulva* na Rússia Oriental (von Thümen, 1880). Apenas anos mais tarde a fase uredospórica foi descrita por Dietel (1899).

Da mesma forma que o lírio-de-um-dia é cultivado em praticamente em todo o mundo, a doença foi notificada fora da Ásia a partir do século XXI, verificando-se que, em apenas sete anos, foi relatada na América do Norte em 2000 (Williams-Woodward *et al.*, 2001), na América do Sul em 2001 (Carvalho *et al.*, 2001), na Austrália em 2002 (EPPO, 2002) e na África do Sul em 2007 (Mostert *et al.*, 2008) (Figura 2), excetuando-se apenas a Europa.

O agente patogénico foi incluído na lista A1 de doenças de quarentena pela Organização Europeia e Mediterrânea de Proteção das Plantas (EPPO), após a interceção pelo Reino Unido de plantas com ferrugem importadas dos EUA por duas vezes, em 2001 e 2002 (EPPO, 2015). Em ambas as deteções acredita-se que o surto tenha sido erradicado (Jones & Sansford, 2005). Em novembro de 2015 foram observados sintomas de ferrugem em plantas de *Hemerocallis lilioasphodelus* L. em jardins de Lisboa, Tavira e Funchal, ilha da Madeira (Silva *et al.*, 2016).

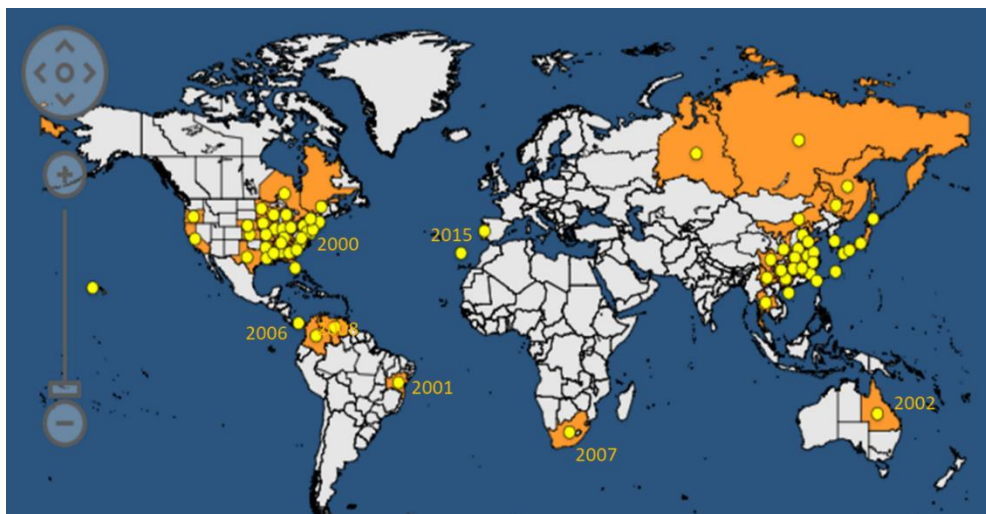


Figura 2. Distribuição mundial de *Puccinia hemerocallidis*, com datas dos primeiros registos (Carvalho *et al.*, 2018).

2.2.2. Taxonomia

O género *Puccinia* abrange cerca de 4000 espécies (Kirk *et al.*, 2008). Pertence à ordem Pucciniales, que é um dos maiores grupos de organismos fitopatogénicos responsáveis por provocar doenças nas culturas com impacto económico bastante importante em todo o

mundo, nomeadamente ferrugens nos cereais, soja, café, pinheiros, leguminosas e plantas ornamentais (Talhinhas *et al.*, 2015).

Puccinia hemerocallidis foi inicialmente considerado o mesmo agente patogénico da ferrugem de *Hosta* spp. (Dietel, 1898) por possuírem teleutos e teleutósporos morfológicamente semelhantes e devido ao facto de ambas as entidades serem macrocíclicas e partilharem *Patrinia villosa* (Thunb.) Juss. como hospedeiro ecídico (Hiratsuka *et al.*, 1992; Kishi, 1998). Porém, ao verificar-se a especificidade no desenvolvimento dos uredósporos e teleutósporos em relação ao hospedeiro, foi concluído que o agente causal da ferrugem do lírio-de-um-dia (*P. hemerocallidis*) não é o mesmo que afeta *Hosta*, agora reconhecida como causada por *Puccinia funkiae* Dietel (Ono, 2003).

Patrinia villosa, para além de ser o hospedeiro secundário dos fungos *P. hemerocallidis* e *P. funkiae*, também é infetada por uma ferrugem microcíclica, *Puccinia patriniae* Hennings, que apresenta semelhanças morfológicas em relação à estrutura dos teleutos e dos teleutósporos com os outros dois fungos (Hiratsuka *et al.*, 1992). As semelhanças evidentes nos ciclos de vida das três espécies de *Puccinia* sugerem que estas tenham evoluído a partir de um ancestral comum (Chatasiri *et al.*, 2006), apoiada pela lei de Tranzschel, em que uma espécie microcíclica é derivada de uma espécie macrocíclica e heteroécica, que elimina a produção de uredósporos no decorrer da evolução (Cummins & Hiratsuka, 2003).

Atualmente, o fungo *Puccinia hemerocallidis* está classificado da seguinte forma (Kirk *et al.*, 2008):

REINO - Fungi
DIVISÃO - Basidiomycota
CLASSE - Pucciniomycetes
ORDEM - Pucciniales
FAMÍLIA - Pucciniaceae
GÉNERO - *Puccinia*
ESPÉCIE - *Puccinia hemerocallidis* von Thümen

2.2.3. Sintomatologia

Os sintomas mais comuns da ferrugem incluem o aparecimento de manchas e estrias amareladas, manchas aquosas bronzeadas com margens mais escuras, grandes lesões amareladas e pequenos pontos discretos (Buck & Ono, 2012) (Figura 3). A planta tende a restringir o crescimento, provocando o surgimento de estrias.

Inúmeras pústulas desenvolvem-se na página superior e inferior da folha, que se identificam por pequenas manchas cor-de-laranja e amarelas (Williams-Woodward *et al.*, 2001) (Figura 3). As pústulas crescem e libertam grandes quantidades de esporos (uredósporos) alaranjados (Figura 3) (Buck & Ono, 2012). Conforme a evolução dos sintomas, as plantas começam a apresentar folhas mais amareladas, perdendo assim o vigor e o valor como cultura ornamental.

Com a diminuição da temperatura, no outono, os teleutos diferenciam-se nas lesões provocadas pelos uredósporos para produzir teleutósporos de cor escura. As lesões alaranjadas escurecem tornando-se castanhas ou pretas (Figura 3) (Buck & Ono, 2012).

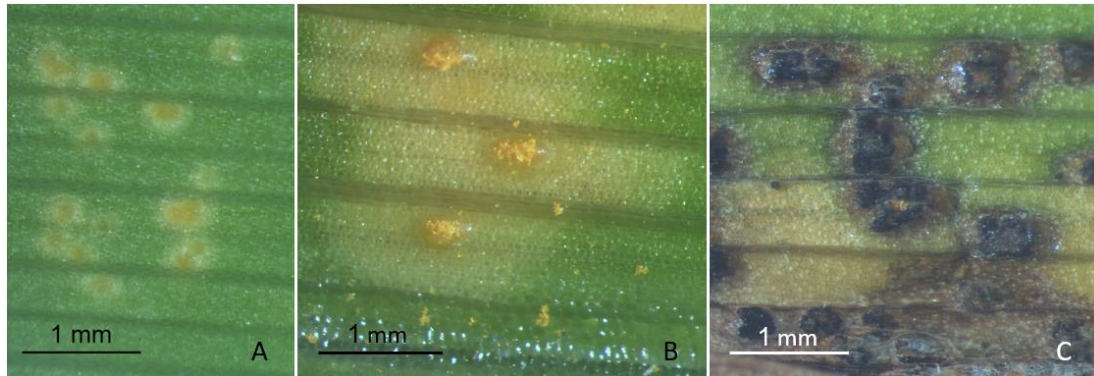


Figura 3. Sintomas (e sinal) causados por *Puccinia hemerocallidis* em *Hemerocallis* sp. A- Pontuações cloróticas na página inferior da folha 7 a 10 dias após a infecção; B- Soros uredospóricos amarelos-alaranjados que rompem a epiderme na página inferior da folha; C- Soros teleutospóricos na página inferior da folha.

2.2.4. Ciclo de vida

Entre os fungos causadores de ferrugem (ordem Pucciniales), apenas *P. hemerocallidis* é conhecido por infectar *Hemerocallis* sp.

O agente causal da ferrugem do lírio-de-um-dia é considerado um parasita obrigatório biotrófico, ou seja, requer um hospedeiro vivo para se desenvolver. Este é um fungo heteroécico, o que significa que precisa de dois hospedeiros distintos para completar o seu ciclo de vida (Buck & Ono, 2012), em que *Hemerocallis* corresponde ao hospedeiro primário, manifestando sintomas quando infetada pelo fungo (Figura 4).

O hospedeiro secundário (ou alternante) corresponde a uma herbácea perene do género *Patrinia* (Valerianaceae) (Hiratsuka *et al.*, 1992). Estas plantas são mencionadas devido à importância que têm na conclusão do ciclo de vida do patógeno e manutenção da variabilidade genética, decorrente da fase sexuada. O género *Patrinia* é nativo da Ásia Oriental, não sendo cultivado no continente americano e europeu (He *et al.*, 2017; Plants of the World Online, 2019), apresentando assim um papel irrelevante na manutenção e disseminação da doença após o inverno nestas regiões (Celetti *et al.*, 2004). No entanto, a infecção do hospedeiro alternante não é necessária, já que os uredósporos conseguem reinfectar várias ou as mesmas plantas de *Hemerocallis* (Mueller *et al.*, 2003).

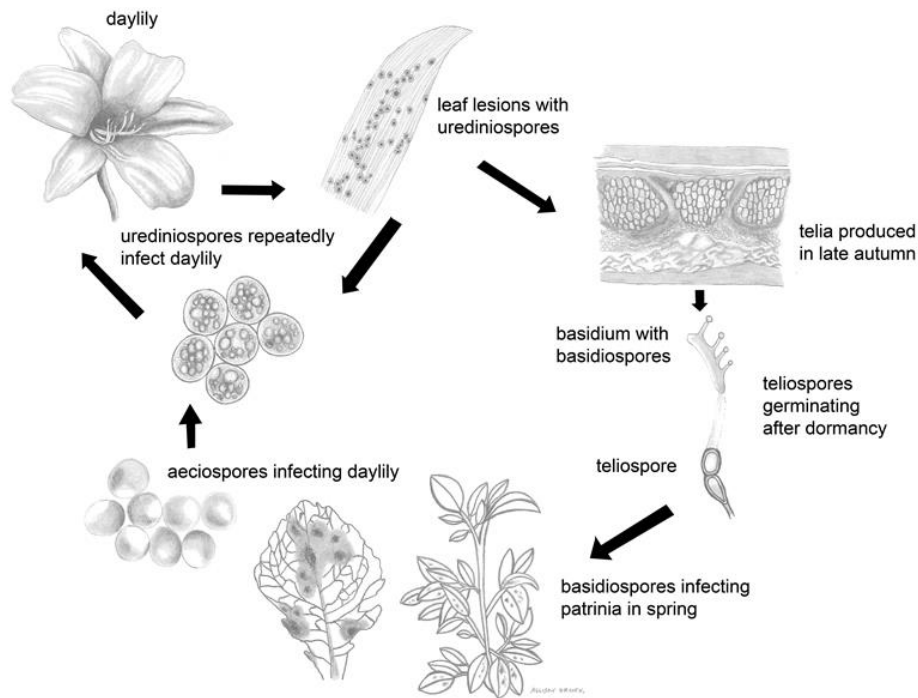


Figura 4. Ciclo de vida da ferrugem *Puccinia hemerocallidis* (Buck & Ono, 2012).

Puccinia hemerocallidis é uma ferrugem macrocíclica porque produz cinco tipos diferentes de esporos (Buck & Ono, 2012). Os uredósporos, teleutósporos e basidiósporos são produzidos nas plantas de *Hemerocallis*, sendo os uredósporos os esporos mais importantes no decorrer da doença. No hospedeiro secundário (*Patrinia* spp.) são produzidos outros dois tipos de esporos, os ecidiólósporos e ecidiósporos (Carlile *et al.*, 2001).

Os uredósporos correspondem aos esporos alaranjados e pulverulentos, produzidos em ambas as páginas da folha (Figura 3), responsáveis por propagar a doença durante os meses de verão.

Os teleutósporos são castanhos-escuros, de paredes celulares espessas e representam a estrutura de resistência da ferrugem. Os teleutos diferenciam-se no outono, nas lesões provocadas pelos uredósporos, sobrevivendo durante os meses de inverno (Buck & Ono, 2012). Durante a primavera, os teleutósporos germinam e originam uma hifa especializada onde, na extremidade (basídio), ocorre meiose, responsável por quatro núcleos haploides que migram através de esterigmas dando origem aos basidiósporos, de formação exógena (Carlile *et al.*, 2001).

Na ausência de *Patrinia* spp. (tal como se verifica fora da região de origem de *P. hemerocallis*), a produção de basidiósporos não permite assegurar a manutenção de inóculo, pelo que o fungo fica dependente da manutenção da viabilidade dos uredósporos durante eventuais períodos de dormência (isto é, de ausência de folhagem) da planta.

Os basidiósporos são disseminados pelo vento e por pequenas gotículas de água até ao hospedeiro secundário (*Patrinia* spp.), onde vão germinar e formar um micélio haploide que coloniza os tecidos da folha, 5 a 7 dias após a infeção (Ono, 2003). A partir deste micélio, forma-se um ecidiólo que produz ecidiolósporos no seu interior e uma solução açucarada que atrai dípteros e outros insetos (Malloch, 2019), de modo a assegurar a fertilização cruzada (Emmitt, 2016). Da fertilização cruzada resulta um micélio dicariótico que se desenvolve no tecido da folha, após 12 a 15 dias (Ono, 2003). O ecídio formado rompe a superfície adaxial da folha e liberta os ecidiósporos dicarióticos (Carlile *et al.*, 2001), que são dispersos pelo vento até às plantas de lírio-de-um-dia, as únicas que conseguem infetar.

Os ecidiósporos germinam e os tubos germinativos penetram na superfície da folha, a partir da abertura dos estomas, formando um micélio dicariótico que conseqüentemente forma uma lesão na folha, originando o uredo que rompe a superfície foliar e liberta uredósporos dicarióticos. Esta é a fase mais importante do ciclo de um fungo heteroécico, sendo denominado de “estado de repetição” (Schumann & Leonard, 2000), porque os uredósporos são os únicos esporos com capacidade de infetar a mesma planta hospedeira, na qual são produzidos, diversas vezes durante a estação. No final do verão, tanto nos uredos iniciais quanto nos produzidos posteriormente pela reinfeção, ocorre uma transição para teleutos, com a produção gradual de teleutósporos (Petersen, 1974).

Em regiões onde o clima é mais ameno, as temperaturas podem não baixar o suficiente para provocar a dormência da folhagem durante o inverno, proporcionando que os uredósporos continuem viáveis que assim constituirá quer o inóculo primário quer secundário (Buck & Ono, 2012).

2.2.5. Condições ótimas de germinação dos uredósporos

A viabilidade dos uredósporos é influenciada por diversos fatores que afetam diretamente a aptidão do fungo em infetar a planta hospedeira.

O uredósporo, em contacto com a folha da planta, necessita no mínimo de 5 a 6 horas de humidade contínua (Mueller *et al.*, 2003) para adquirir capacidade de germinar e de desenvolver lesões no hospedeiro, o que torna os dias chuvosos e nublados de verão ideais para ocorrência de novas infeções.

A luz tem um efeito negativo na germinação dos uredósporos de *P. hemerocallidis* (Dong & Buck, 2011), assim como no posterior processo de infeção, desenvolvimento de lesão, esporulação e dispersão dos esporos (Buck *et al.*, 2010). A exposição dos uredósporos à luz compromete o alongamento do tubo germinativo, que poderá ter um comprimento insuficiente para alcançar os estomas do hospedeiro (Buck *et al.*, 2010), diminuindo assim a taxa de sucesso da infeção (Mueller & Buck, 2003). A germinação dos uredósporos é

maximizada sob condições de luminosidade inferiores a $21 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ (Mueller & Buck, 2003).

A hidratação dos uredósporos é um fator que influencia a sensibilidade destes à luz, uma vez que o alongamento do tubo germinativo é significativamente menor em uredósporos hidratados em comparação com os uredósporos secos (Buck *et al.*, 2010; Dong & Buck, 2011).

A temperatura ótima de germinação está compreendida entre 22 e 24°C, tendo em conta que a temperatura registada nas primeiras horas de incubação podem ser as mais importantes (Mueller & Buck, 2003). Temperaturas inferiores a 7°C e superiores a 34°C inibem a germinação dos uredósporos (Mueller & Buck, 2003).

O desenvolvimento das lesões é superior quando as folhas estão expostas a uma temperatura de 22 a 30°C durante o processo de infeção. Temperaturas inferiores a 10°C e superiores a 30°C condicionam negativamente a progressão da doença e o aparecimento de lesões (Mueller & Buck, 2003).

Na presença de todas as condições ótimas ocorre a germinação de 90% dos uredósporos (Tapsoba & Wilson, 1997). No entanto, quando os uredósporos não germinam, perdem a viabilidade após um dia (Buck & Williams-Woodward, 2003). As condições ambientais são um fator preponderante no processo inicial de infeção, que perde importância depois do agente patogénico infetar o hospedeiro (Mueller *et al.*, 2003).

2.2.6. Processo de infeção

Quando um uredósporo cai sobre a folha de *Hemerocallis*, após ter sido disseminado pelo vento, chuva ou pelo movimento de pessoas e animais (Buck & Ono, 2012), adere à superfície da folha, formando um único tubo germinativo após 24 horas, que se alonga seguindo as características topográficas da superfície da folha até encontrar as células guarda dos estomas (Li *et al.*, 2007). O conteúdo citoplasmático presente dentro do esporo é transferido para o tubo germinativo, levando à sua dilação e consequente formação do apressório sobre o estoma (Emmitt, 2016). O apressório vai formar uma hifa de penetração que vai entrar na cavidade subestomática e desenvolver hifas que crescem até às células hospedeiras e iniciar a formação de haustórios. Para isso, as hifas formam uma célula mãe do haustório que inicia a penetração da célula vegetal diferenciando uma estrutura conhecida como “neckbands” na superfície da célula vegetal, permitindo à hifa aumentar de tamanho e tornar-se num haustório (Emmitt, 2016), que facilita a obtenção de nutrientes e a supressão imunológica do hospedeiro, na primeira fase de infeção.

Uma a duas semanas após o agente patogénico estabelecer uma relação parasitária com a planta (Williams-Woodward *et al.*, 2001), o movimento e a deposição de nutrientes é redirecionado, resultando na formação de vários soros uredospóricos abaixo da cutícula,

originando pústulas que irrompem através da epiderme para libertar os uredósporos (Li *et al.*, 2007).

2.2.7. Caracterização da morfologia dos uredósporos e teleutósporos

Os soros uredospóricos diferenciam-se inicialmente na página inferior da folha, sob a forma de pequenas manchas circulares ou irregulares com menos de 1 mm de diâmetro, com uma tonalidade ligeiramente mais escura em relação à cor da folha (Hernández *et al.*, 2002). Na superfície adaxial da folha surgem pequenas pontuações cloróticas correspondentes aos soros, que evoluem sob a epiderme apresentando geralmente uma margem estreita e escura, originando pústulas que irrompem a partir da epiderme, que têm uma forma circular ou elíptica com cerca de 2 mm de diâmetro, com uma cor que pode variar entre o amarelo claro e o amarelo alaranjado (Figura 5) (Hernández *et al.*, 2002). A senescência natural das folhas leva normalmente à formação de um halo verde em torno de pústulas ou de infeções da ferrugem já existentes (Figura 6) (Hernández *et al.*, 2002), ilustrando como a ferrugem consegue estabelecer uma relação biotrófica com o hospedeiro condicionando a sua fisiologia a ponto de retardar a senescência nos locais infetados.

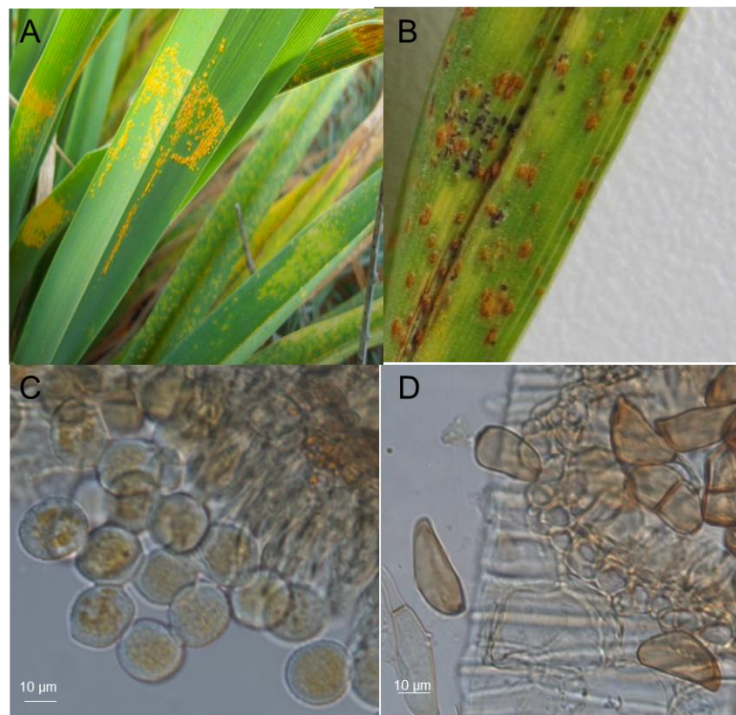


Figura 5. Estruturas de *Puccinia hemerocallidis*: A e B- uredo; B- teleuto; C- uredósporos; D- teleutósporos (Carvalho *et al.*, 2018).

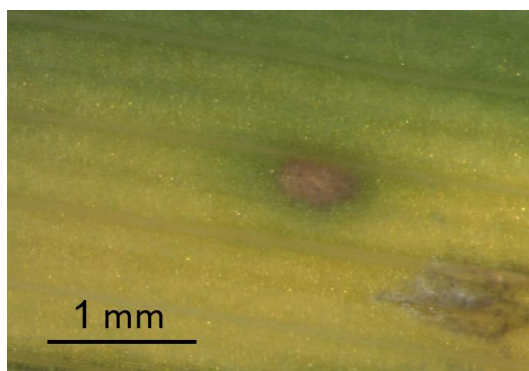


Figura 6. Folha de *Hemerocallis* sp. em início de senescência, com infecção de *Puccinia hemerocallidis* cercada por um halo verde.

Os uredósporos são amarelos, globosos e elipsoides (média = $24 \mu\text{m} \pm 2,8$ por $20,5 \mu\text{m} \pm 2,2$). A parede do uredósporo é hialina, de largura variável, medindo em média $2,6 \mu\text{m} (\pm 0,6)$ na maturação, com cinco a seis poros germinativos obscuros (Figura 5). Um pedicelo não persistente está ligado aos uredósporos que raramente permanece aderente (Hernández *et al.*, 2002).

Os teleutos são hipófilos, subepidérmicos, redondos a ligeiramente alongados com 0,5 a 1,5 mm de diâmetro (Figura 5).

Os teleutósporos são geralmente elipsoides, com uma pequena protuberância apical ou angular. Estes podem não possuir septos ou estar divididos por um. Os teleutósporos não septados medem em média $33 \mu\text{m} \pm 5,3$ por $14,6 \mu\text{m} \pm 1,9$ e os teleutósporos com um septo medem em média $43,9 \mu\text{m} \pm 7,7$ por $16,6 \mu\text{m} \pm 2,3$. A parede dos teleutósporos é lisa, acastanhada, castanho-escura no ápice (Figura 5) (Hernández *et al.*, 2002).

A partir da observação de teleutósporos provenientes de várias regiões dos EUA e da Ásia, Hernández *et al.* (2002) constataram que a morfologia dos teleutósporos de espécimes americanos são relativamente diferentes da de espécimes asiáticos, uma vez que os teleutos das coleções de ferrugens americanas são acastanhados, menores, menos densos e com muitos teleutósporos não-septados, comparando com os de coleções asiáticas, em que os teleutos são castanhos-escuros, densos e compactos, com teleutósporos de uma ou duas células.

2.2.8. Caracterização genética de *Puccinia hemerocallidis*

Devido às diferenças morfológicas encontradas entre os teleutósporos de espécimes americanos e asiáticos, Hernández *et al.* (2002) procederam à sequenciação da região ITS do DNA ribossomal de isolados de ferrugem de distintas áreas geográficas dos EUA e da Ásia. As sequências ITS diferiram em 10 posições ao longo de 600 pb, em que os espécimes asiáticos compartilharam substituições de dois pares de bases e uma inserção/deleção que

não ocorreu nos espécimes americanos. Também foi encontrada uma posição ambígua entre (adenina ou timina) e timina nos espécimes americanos, que corresponderia a uma adenina nos espécimes asiáticos (Hernández *et al.*, 2002). As diferenças genéticas encontradas através da comparação da região ITS entre os espécimes americanos e asiáticos estudados são reduzidas, sendo possível inferir que todos os espécimes são da mesma espécie (Hernández *et al.*, 2002). No entanto, dados preliminares sugerem a existência de raças (Buck, 2013), tal como detalhado em 2.3.

A estimativa do tamanho do genoma de *P. hemerocallidis* é de 345 Mpb (Carvalho *et al.*, 2018), sendo um valor bastante próximo ao tamanho médio do genoma para espécies do género *Puccinia* (248 Mpb) (Talhinhas *et al.*, 2015) e da ordem Pucciniales (335,6 Mpb) (Ramos *et al.*, 2015). Esta ordem, para além de ser considerada o maior grupo de organismos fitopatogénico, também possui o maior tamanho médio do genoma em comparação com o tamanho médio geral para fungos de 60 Mpb (Tavares *et al.*, 2014).

2.2.9. *Puccinia hemerocallidis* em Portugal

Após a observação de sintomas de ferrugem causada por *P. hemerocallidis* em plantas de lírio-de-um-dia em Portugal, vários focos da doença, encontrados em jardins de Lisboa, Alentejo, Algarve e Madeira, têm sido monitorizados e usados para a realização de análises visando caracterizar estruturas do agente patogénico (Carvalho *et al.*, 2018).

Os sintomas encontrados incluíam pequenas lesões com soros uredospóricos laranja/amarelos nas páginas superiores das folhas, sobre os quais os soros teleutospóricos castanhos se desenvolviam. As folhas infetadas apresentavam pústulas alaranjadas que cobriam 25 a 75% da superfície das folhas, com 85 a 90% das plantas sintomáticas (Silva *et al.*, 2016).

A análise microscópica das pústulas revelou a presença de uredósporos e teleutósporos. Os soros uredospóricos eram subepidérmicos e amarelos a alaranjados. Os uredósporos eram globosos a elipsoides (19 a 24 x 16 a 21 µm), amarelo-pálidos, uniformemente equinulados. Os teleutos eram subepidérmicos e de cor castanho-escura. Os teleutósporos foram produzidos em manchas em depressão, e eram clavados a elipsoides (30 a 40 x 12 a 15 µm), pedicelados e circundados por paráfises pardas (Silva *et al.*, 2016).

O resultado da amplificação da região ITS do DNA ribossomal de uma amostra de uredósporos retirados de uma pústula de material infetado coletado em Porto Covo (Alentejo), demonstrou que a sequência nucleotídica corresponde aos espécimes de *P. hemerocallidis* dos EUA e da Costa Rica, sugerindo que o surto de ferrugem em Portugal teve origem norte ou centro americana (Carvalho *et al.*, 2018).

Portugal foi o primeiro país da Europa onde a ferrugem do lírio-de-um-dia foi detetada. Porém a atividade viveirista desta ornamental no país é praticamente inexistente, sendo o seu

cultivo em jardins públicos e privados não muito frequente. O reduzido número de populações de *Hemerocallis* distribuído pelo país pode representar uma vantagem no sentido de limitar a disseminação natural da doença.

2.2.10. Meios de luta

Nos espaços ou regiões onde a doença não está presente é necessário tomar medidas profiláticas, de modo a evitar a sua introdução. A monitorização é uma das estratégias de gestão mais importantes, consistindo na inspeção cuidada das plantas de modo a detetar os primeiros focos da doença. Quando necessário deve-se aplicar medidas de quarentena locais.

Quando um viveiro, centro de jardinagem ou horto recebe um lote de plantas, este deverá ser inspecionado para a doença. Para isso o lote deverá ser recebido e separado numa área isolada do restante material vegetal presente nas instalações durante vários dias até se verificar que as plantas se encontram sãs. Caso alguma planta do lote desenvolva sintomas e/ou sinal de doença, as plantas terão de ser imediatamente removidas e cortadas para destruição da folhagem. Durante todo este processo os trabalhadores devem estar cientes de que os esporos podem ser disseminados através da roupa e das ferramentas.

Para o controlo efetivo da ferrugem é necessário aplicar várias estratégias de combate. Os fungicidas são uma importante ferramenta de gestão da ferrugem utilizada por viveiristas e jardineiros, embora o cultivo de variedades resistentes seja a melhor estratégia de gestão. Os fungicidas são necessários para o controlo do fungo quando surgem novas raças que podem superar a resistência do hospedeiro (Buck *et al.*, 2011).

A luta química geralmente feita pelos produtores comerciais engloba o uso de várias substâncias ativas como: azoxistrobina ou piraclostrobina (grupo FRAC 11); clorotalonil (grupo FRAC M5); miclobutanil, propiconazol, triadimefão ou tebuconazol (grupo FRAC 3); e flutolanil (grupo FRAC 7) (Buck & Williams-Woodward, 2003; FRAC, 2017). Em ensaios controlados, Emmitt (2016) constatou que realização de uma pulverização foliar antes da inoculação da doença reduz o desenvolvimento das lesões provocadas pelo agente causal, levando que os produtores optem por fazer tratamentos sequenciados com intervalos de 7, 14, 21 ou 28 dias (Buck & Ono, 2012). Atualmente, os viveiristas ainda não têm uma combinação de substâncias ativas nem o intervalo de aplicação definido para o controlo e erradicação da ferrugem, apenas recomendações, uma vez que nenhuma substância ativa mencionada é capaz de eliminar completamente a doença (Emmitt, 2016). No entanto, em Portugal nenhum produto fitofarmacêutico está homologado para a ferrugem do lírio-de-um-dia, devido ao recente registo da doença no país.

A rega por aspersão não é aconselhada uma vez que a humidade proporciona o processo de infeção e as gotículas de água contribuem para a dispersão dos esporos entre as folhas. Além disso, as plantas deveram ser regadas durante o início da manhã (Emmitt,

2016) para que a água sobre as folhas possa evaporar durante o dia e não ser irrigada à noite, quando a infecção é potenciada (Mueller & Buck, 2003). O espaçamento entre as plantas deve ser mantido para promover o fluxo de ar, contribuindo assim para a diminuição da humidade relativa.

Plantas de *Patrinia* spp., presentes no continente asiático, representam um problema acrescido no controlo da doença, uma vez que estas permitem ao fungo completar o seu ciclo de vida. Com o objetivo de romper o ciclo da doença, torna-se imperativo eliminar o hospedeiro alternante nas imediações dos viveiros e dos jardins com *Hemerocallis*.

O uso de cultivares resistentes é a ferramenta de gestão mais eficaz para o controlo da ferrugem. Porém, o desenvolvimento de variedades resistentes à doença apenas ganhou destaque depois do aparecimento da ferrugem do lírio-de-um-dia nos EUA (Williams-Woodward *et al.*, 2001).

Como o lírio-de-um-dia era considerado uma ornamental livre de pragas e doenças fora do continente asiático (Blythe *et al.*, 2015), o trabalho desenvolvido na hibridação de novas variedades estava principalmente orientado para melhorar características como a cor e forma das pétalas, período de floração, resistência às baixas temperaturas no inverno, altura da flor em relação à folhagem entre outros aspetos (Whatley & Missouri, 1990), enquanto que a resistência à ferrugem não era um fator importante a considerar. Por esse motivo, quando a ferrugem do lírio-de-um-dia foi detetada em vários continentes, surgiu uma necessidade premente de determinar a suscetibilidade das variedades existentes em relação à doença. Nesse sentido, Williams-Woodward *et al.* (2001), Mueller *et al.* (2003), Robbins (2003) e Blythe *et al.* (2015) realizaram estudos que visaram testar a resistência de variedades comerciais de *Hemerocallis*.

Em 2001 foi feito um estudo preliminar por Williams-Woodward *et al.* (2001), onde foi relatado que quatro variedades apresentaram resistência à ferrugem, nove mostraram alguma suscetibilidade e 13 variedades eram bastante suscetíveis. Mueller *et al.* (2003) testou no seu ensaio 84 variedades, em que 17% mostravam resistência, 15% foram consideradas moderadamente resistentes, 26% eram moderadamente suscetíveis e 44% suscetíveis.

Numa pesquisa feita sobre a severidade da ferrugem em *Hemerocallis* cultivadas em viveiro no Arkansas (EUA) em 2001 e 2002 por Robbins & Vann (2002) e Robbins (2003), 75 e 70% das variedades estudadas em cada ano receberam a classificação de resistentes e moderadamente resistente, enquanto que 4 e 16% das variedades estudadas mostraram moderada e alta suscetibilidade.

Em 2013, Blythe *et al.* (2015) estudaram a suscetibilidade de 575 variedades em condições de campo, tendo concluído que 21% das variedades não mostravam sinais visuais de infecção, 40% apresentavam resistência aparente e moderada suscetibilidade, enquanto que 39% eram altamente suscetíveis à doença. De acordo com Blythe *et al.* (2015) os

resultados obtidos estavam em concordância com os ensaios concretizados por Williams-Woodward *et al.* (2001) e Mueller *et al.* (2003) ao usar plantas inoculadas em estufa no estado da Geórgia (EUA), enquanto que as percentagens das variedades resistentes e moderadamente resistentes à ferrugem em viveiros do Arkansas apresentadas por Robbins & Vann (2002) e Robbins (2003) parecem ser maiores. Todas estas possibilidades demonstram que existem muitas variantes na resposta à ferrugem que condicionam os resultados relativos à determinação da suscetibilidade do lírio-de-um-dia à ferrugem.

O aumento do conhecimento relativamente à resistência e à suscetibilidade do lírio-de-um-dia à ferrugem ajudará os produtores e os melhoradores a selecionar as variedades que tenham o potencial de reduzir os surtos de ferrugem (Mueller *et al.*, 2003). A escolha de variedades resistentes permite reduzir ou eliminar o uso de produtos fitofarmacêuticos como medida de controlo, resultando na diminuição dos custos associados aos tratamentos e proporcionando aos viveiros uma produção ambientalmente e operativamente mais segura e sustentável.

Em regiões de climas frios, os lírios-de-um-dia entram no estado de dormência, perdendo as folhas no inverno e, na ausência do hospedeiro ecídico, o ciclo da doença é interrompido, uma vez que os uredósporos são incapazes de se manterem viáveis a baixas temperaturas. Todavia, em climas com inverno ameno, a maioria das variedades mantém as folhas, gerando condições adequadas para manutenção e sobrevivência do inóculo (Williams-Woodward *et al.*, 2001). Este facto, verificado entre o norte e o sul dos EUA, poderá ser uma realidade no contexto europeu, ou seja, ao contrário do norte da Europa, as condições climáticas da região Mediterrânica permitirão a sobrevivência do inóculo durante o inverno e a conseqüente propagação da doença para outros países da Europa (Carvalho *et al.*, 2018).

De modo a travar a disseminação da doença, é necessário planear e implementar estratégias de proteção fitossanitária eficazes, de modo a manter o valor económico e ornamental do lírio-de-um-dia, minimizando o uso de produtos fitofarmacêuticos em viveiros e jardins (Carvalho *et al.*, 2018), através da aplicação imediata de medidas preventivas que incluem a obtenção cuidada de material vegetal, provenientes de regiões onde a doença está presente, destruir focos de doença, evitar a presença contínua de folhagem (quebrando o ciclo uredospórico) (Carvalho *et al.*, 2018). O controlo da ferrugem a médio e a longo prazo, passa pela aplicação de programas de melhoramento e seleção de cultivares resistentes.

2.3 Mecanismos celulares, bioquímicos e moleculares de resistência do lírio-de-um-dia a *Puccinia hemerocallidis*

Mueller *et al.* (2003) relatam que existe variação da suscetibilidade à doença entre diferentes cultivares comerciais de *Hemerocallis*, indicando a existência de cultivares de lírio-de-um-dia que possuem mecanismos de resistência em relação ao desenvolvimento do agente patogénico. De acordo com os tipos de interação observados entre o agente patogénico e o hospedeiro foram definidos dois tipos de resistência: resistência completa e incompleta ou parcial. A resistência completa caracteriza-se pela ausência de esporulação nos hospedeiros, enquanto que na resistência parcial, ocorre esporulação, mas em quantidades inferiores ao verificado em cultivares suscetíveis (Li *et al.*, 2007).

O mecanismo de resistência do lírio-de-um-dia contra a ferrugem é dado por uma resposta hipersensível (RH) (Li *et al.*, 2007), que consiste no condicionamento do desenvolvimento do agente patogénico através do colapso das células do hospedeiro de forma a envolver rapidamente o foco de infeção (Morel & Dangl, 1997), inviabilizando assim os tecidos celulares adjacentes e consequentemente bloquear o avanço do patogénio. Caso a resposta de defesa não seja rápida e/ou intensa o suficiente, a planta apresenta suscetibilidade ao agente hospedeiro (Bashir *et al.*, 2013).

O conjunto de reações que compõem a resposta hipersensível tem início com o reconhecimento do agente patogénico pela planta. A deteção de diversas estruturas químicas de baixo peso molecular libertadas pelo agente invasor (eliciadores) é feita pelas moléculas recetoras (recetores), que podem estar localizadas na membrana plasmática ou no citoplasma das células do hospedeiro. Os eliciadores correspondem a um produto resultado da expressão do gene de avirulência (Avr) reconhecido pelo produto do gene de resistência (R) do hospedeiro (Morel & Dangl, 1997; Peck, 2003; Bashir *et al.*, 2013). O número de genes que conferem resistência a *P. hemerocallidis* presentes em *Hemerocallis* spp. ainda é desconhecido (Buck, 2013).

Quando as plantas hospedeiras reconhecem um agente patogénico, os mecanismos de transmissão de sinal são rapidamente ativados, conduzindo à produção de formas reativas de oxigénio como peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e o ião superóxido (O₂⁻), influxo de Ca²⁺, ativação de cinases, alteração no citoesqueleto e na transcrição de genes (Morel & Dangl, 1997; Dangl & Jones, 2001; Peck, 2003). Este conjunto de reações desencadeiam a ativação de fito-hormonas como o ácido salicílico, jasmonato, etileno, ácido abcísico, auxinas, óxido nítrico, entre outras, que vão induzir uma resposta de defesa global, com o objetivo de impedir o crescimento do fungo (Dangl & Jones, 2001).

A RH parece estar associada a um conjunto de alterações e à ativação de determinadas vias metabólicas, como a síntese de compostos fenólicos e algumas fitalexinas

e o aumento de atividade de enzimas oxidativas (ex. peroxidases), acumulação de formas reativas de oxigênio e ainda pela ativação de genes PR (Bashir *et al.*, 2013). A integração das alterações metabólicas traduzem uma ocorrência sequencial de uma série de eventos citológicos, nomeadamente: a migração do núcleo para o ponto de penetração e aumento do fluxo citoplasmático até cessar, ocorrendo depois um movimento browniano dos organelos, condensação do núcleo, acumulação de grânulos na periferia do citoplasma, retração do protoplasto e por fim o colapso do citoplasma e morte da célula infetada (Morel & Dangl, 1997; Bashir *et al.*, 2013).

Ao nível da parede celular ocorrem modificações estruturais que envolvem a deposição de fenóis, assim como a incorporação de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e de polissacáridos, que desempenham uma função de barreira à penetração do patógeno (Nicholson & Hammerschmidt, 1992).

O encapsulamento dos haustórios também tem sido associado à expressão de resistência de plantas hospedeiras às ferrugens. O principal componente responsável pelo processo de encapsulamento é a calose (polímero de 1,3- β -glucanas), sendo pouco permeável a pequenas moléculas, conseguindo assim restringir ou até bloquear a passagem de nutrientes para o fungo (Pirselová & Matusíková, 2012), de forma a confinar o seu desenvolvimento no hospedeiro (Diniz, 2010).

Quando a resposta de defesa do hospedeiro é ineficiente ou não é iniciada devido ao não reconhecimento dos eliciadores pelo hospedeiro, a planta é suscetível ao agente patogénico. O haustório resultante da diferenciação da hifa do fungo tem o seu citoplasma envolvido pela parede haustorial composto por uma camada externa, denominada de matriz extra-haustorial (Mendgen & Hahn, 2002; Garnica *et al.*, 2014). Esta matriz é uma região apoplástica que funciona como uma camada de regulação, permitindo que o haustório esteja dentro do citoplasma da célula da planta hospedeira sem violar fisicamente a membrana plasmática (Mendgen & Hahn, 2002). Uma vez estabelecida a interface planta-patógeno, o haustório produz múltiplas proteínas para aquisição de nutrientes, assim como distribui numerosas proteínas inibidoras de cisteína-protease de forma a inibir as proteases, suprimindo assim o sistema imunológico e a regulação metabólica da planta (Garnica *et al.*, 2014).

As cultivares de *Hemerocallis* classificadas como resistentes são caracterizadas pela rápida morte celular no local de penetração do fungo. Porém, o número de células hospedeiras mortas varia, ou seja, em cultivares altamente resistentes não se observa nenhum sintoma na superfície das folhas, embora seja possível detetar microscopicamente o colapso de algumas células (Li *et al.*, 2007). A diferença entre as cultivares resistentes e moderadamente resistentes está no número de células colapsadas sob os locais de infeção (Li *et al.*, 2007) de modo a impedir o desenvolvimento das hifas do fungo. As cultivares moderadamente

resistentes, para além de mostrarem mais lesões necróticas do que as cultivares resistentes, também libertam uredósporos (Li *et al.*, 2007), resultado da capacidade do agente causal obter nutrientes das células hospedeiras antes destas colapsarem, conseguindo manter um crescimento limitado e suportar a esporulação (Kurt & Les, 2005).

As cultivares suscetíveis caracterizam-se pela ausência de RH, porém podem ser separadas em duas categorias de acordo a velocidade do desenvolvimento dos soros uredospóricos e a quantidade de uredósporos formados (Quadro 3) (Li *et al.*, 2007).

Quadro 3. Escala dos tipos de reação de plantas de *Hemerocallis* a *Puccinia hemerocallidis* (adaptado de Li *et al.*, 2007).

Expressão fenotípica da interação lírio-de-um-dia – <i>Puccinia hemerocallidis</i>		
S	Suscetível	Produção de uredo e uredósporos.
MS	Moderadamente suscetível	Presença de algumas lesões esporuladas com poucas lesões necróticas.
MR	Moderadamente resistente	Presença de poucas lesões esporuladas com o aumento do número de lesões necróticas.
R	Resistente	Presença de lesões necróticas, sem esporulação.
HR	Altamente resistente	Sem sintomas visíveis.

Em 2013 foi realizado um ensaio que estudou a resposta fenotípica de 19 variedades de lírio-de-um-dia a 16 isolados de *P. hemerocallidis* e constatou-se que algumas variedades expressaram uma resposta distinta aos diferentes isolados coletados no sudeste dos EUA (Buck, 2013) , sugerindo que existem patótipos de *P. hemerocallidis* com distintos níveis de virulência.

3. Material e métodos

Depois da introdução da ferrugem do lírio-de-um-dia nos EUA, vários estudos foram publicados demonstrando a existência de variabilidade genética de cultivares em relação à suscetibilidade de *Hemerocallis* spp. ao agente patogénico (Robbins & Vann, 2002; Mueller & Buck, 2003; Blythe *et al.*, 2015). No entanto, nenhuma cultivar europeia de lírio-de-um-dia foi incluída nos trabalhos já realizados. O desconhecimento da suscetibilidade de cultivares europeias de *Hemerocallis* à ferrugem e a possibilidade da doença se disseminar por outros países da Europa conduz ao objetivo deste trabalho, que consiste em avaliar a resistência à ferrugem em cultivares de lírio-de-um-dia. Paralelamente, populações de *P. hemerocallidis* identificadas em Portugal foram estudadas para comparar as características morfológicas e a diversidade genética, pela sequenciação da região rDNA-ITS, e citogenómica.

A avaliação da resistência à ferrugem recaiu sobre uma coleção de *Hemerocallis* composta por cultivares americanas e europeias, utilizando um isolado de ferrugem obtido em Porto Covo. Para isto, os vários genótipos foram expostos ao agente patogénico para observação histológica do processo de infeção e consequente progressão da doença, de forma a classificar fenotipicamente a interação entre a ferrugem e o hospedeiro.

3.1. Avaliação da diversidade entre populações de *Puccinia hemerocallidis* de Portugal

3.1.1. Monitorização da ocorrência da ferrugem em populações de *Hemerocallis* em jardins portugueses

Após a observação de sintomas de ferrugem em plantas de lírio-de-um-dia em 2015, foi realizado um inventário que incluía a identificação da presença da ornamental em vários jardins públicos e privados, de modo a entender a progressão da doença em Portugal. As populações de *Hemerocallis* encontradas foram denominadas com ou sem ferrugem, consoante a presença ou ausência de sintomas causados pelo agente patogénico em estudo.

Amostras de folhas das plantas que evidenciaram a presença da ferrugem foram recolhidas de diferentes pontos do país. Dos locais inspecionados foram recolhidos e estudados quatro isolados de diferentes regiões de Portugal (Quadro 4).

Quadro 4. Referência e localização dos isolados de *Puccinia hemerocallidis* em estudo.

Referência do isolado	Localização
Ph02	Sobral de Monte Agraço
Ph06	Jardim Botânico da Madeira, Funchal
Ph14	Porto Covo, Sines
Ph16	Lagos

3.1.2. Caracterização morfológica dos uredósporos e teleutósporos

As amostras de folhas colhidas foram observadas à lupa binocular (Leica MZ 12) para recolha de imagens dos sintomas e deteção de uredósporos e teleutósporos. Estes foram colhidos com uma agulha, esterilizada à chama, e montados em lâminas com uma gota de lactofenol. A morfologia e a biometria (comprimento e largura) dos uredósporos e teleutósporos foi observada através da medição de 30 esporos por isolado recorrendo ao microscópio (Leica DM 2500), na ampliação 400x.

3.1.3. Caracterização molecular

3.1.3.1. Extração de DNA genómico

Fragmentos de folhas de *Hemerocallis* infetadas com cada isolado de ferrugem foram congeladas a -20°C e usadas para extrair o DNA genómico, com o DNeasy Plant Mini Kit¹ (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras foram maceradas na presença de azoto líquido em tubos de Eppendorf de 1,5 ml e depois com 400µl de solução tampão Buffer AP1 e 4 µl de RNase A para digerir as moléculas de RNA da amostra. O macerado obtido foi colocado no vortex de forma a ser homogeneizado e se romper os tecidos celulares.

Para eliminar as proteínas e os polissacarídeos, colocam-se as amostras a incubar durante 10 minutos a 65°C, adicionando-se depois 130 µl de tampão P3 e mantendo-as em gelo durante 5 minutos antes de serem centrifugadas por 5 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante obtido foi filtrado, na coluna QIAshredder Mini e centrifugado por 2 minutos (14000 rpm).

O eluído foi transferido para um tubo de Eppendorf, onde se adicionou 1,5 volumes de Buffer AW1. De seguida, pipetou-se 650 µl da mistura para uma coluna de centrifugação DNeasy Mini e centrifugou-se por 1 minuto (8000 rpm), retirando-se o fluxo. A coluna DNeasy Mini foi colocada dentro de outro tubo e a membrana desta lavada com 500 µl de tampão AW2 e centrifugou-se por 2 minutos (14000 rpm) para secar a membrana.

Por fim, removeu-se a coluna de centrifugação do tubo de recolha, transferindo-a para um tubo de Eppendorf de 1,5 ml e pipetou-se 50 µl de tampão AE diretamente para a membrana DNeasy e deixou-se a incubar por 5 minutos à temperatura ambiente antes de centrifugar por 1 minuto (8000 rpm) e armazenado a 4°C, obtendo-se assim, a eluição de DNA dos quatro isolados de *P. hemerocallidis*.

O DNA genómico obtido de cada isolado foi avaliado tanto quanto à qualidade como à quantidade num espectrofotómetro como descrito em 3.1.3.4 e em gel de agarose como

¹<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-plant-mini-kit/#orderinginformation>

descrito em 3.2.3.2. Em cada poço do gel de agarose depositou-se 5 µl de DNA + 2 µl de corante 6x NZYDNA loading dye (Nzytech). Em relação ao marcador foram depositados em três poços, 10, 25 e 100 ng de Lambda DNA, também acompanhados do referido corante.

3.1.3.2. Reação PCR

Os primers selecionados para a sequenciação da região ITS do rDNA foram o ITS1Ext e o ITS4Ext (Muthumeenakshi, 1996) (Quadro 5), que foram sintetizados pela empresa STABVIDA.

Para a preparação dos primers procedeu-se à diluição do liofilizado em TE (10 mmol/l Tris, 1 mmol EDTA, pH 8) para uma concentração final de 100 µmol/l. Os tubos de Eppendorf repousaram cerca de 15 minutos na bancada para que o liofilizado se dissolvesse. Após isto, preparou-se uma diluição de trabalho com a concentração final de 10 µmol/l de água destilada esterilizada e conservando-se a -20°C.

Quadro 5. Características dos Primers ITS.

Primer	Sequência	Tm (°C)	Comprimento (nt)
ITS1Ext	5'-GTA ACA AGG TTT CCG TAG GTG-3'	53,27	21
ITS4Ext	5'-TTC TTT TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	55,54	26

Cada PCR com 10 µl de volume final conteve 2 µl de cada amostra de DNA extraído dos isolados, 1 µl de cada primer e 5 µl de *Taq* DNA polimerase + dNTPs (NZY^{Taq} II 2x Green) (Nzytech). As reações de amplificação foram realizadas no termociclador (Biometra UNO II) programada de acordo com o Quadro 6.

Quadro 6. Programa de amplificação utilizado.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de Ciclos
Desnaturação inicial	95	5 min	1
Desnaturação	95	30 s	25
Emparelhamento	55	30 s	
Extensão	72	1 min	
Extensão final	72	5 min	1

Para análise dos produtos da amplificação, as amostras foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado por 3 µl de GreenSafe Premium (Nzytech), contendo tampão TAE 0,5x (20 mmol/l Tris, 8,5 mmol/l ácido acético, 0,5 mmol/l EDTA), com fonte de alimentação (Pharmacia Biotech EPS 1000) a 70 V durante 2 horas. No gel foram depositados 10 µl de cada amostra resultado da amplificação e 3 µl de marcador NZYDNA

Ladder V (Nzytech). O controlo positivo utilizado correspondeu à amplificação de um isolado de *P. hemerocallidis* previamente caracterizado e o controlo negativo à reação de amplificação sem DNA. As bandas foram observadas recorrendo a um transiluminador BTX 20.M UV.

3.1.3.3. Extração e purificação de DNA das bandas

As amostras da amplificação do DNA originaram mais do que uma banda na eletroforese, por isso foi necessário proceder à purificação do DNA por extração do gel, usando o kit GeneJET Gel Extraction² (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Para isso, as bandas foram cortadas do gel com ajuda do transiluminador BTX 20.M UV. Adicionou-se um volume de Binding Buffer numa proporção 1:1 de acordo com o peso inicial de cada banda. As misturas foram colocadas a incubar a 60°C durante 10 minutos, transferidas para a coluna de purificação GeneJET e centrifugadas por 1 minuto a 13000 rpm. O fluxo obtido foi descartado e adicionou-se 100 µl de Binding Buffer para o GeneJET e voltou-se a centrifugar por 1 minuto (13000 rpm) e a descartar o fluxo resultante. Foi adicionado 700 µl de Wash Buffer e centrifugou-se por 1 minuto (13000 rpm), retirando-se o fluxo obtido. Após isso, a coluna de purificação é centrifugada “vazia” para remover completamente os resíduos de Wash Buffer. A coluna GeneJET foi transferida para um tubo de Eppendorf de 1,5 ml e colocou-se 50 µl de Elution Buffer, centrifugando-se por fim, durante 1 minuto (13000 rpm). O DNA resultante das extrações foi armazenado a 4°C.

O produto final foi analisado num espectrofotómetro e em gel de agarose como descrito em 3.1.3.4.

3.1.3.4. Quantificação do DNA

A quantidade e a qualidade do DNA genómico e da extração do gel foram avaliadas através da medição da absorvância a 260 e 280 nm e da realização de uma eletroforese em gel.

A concentração de DNA foi calculada com base na absorvância a 260 nm (A_{260}), num espectrofotómetro Synergy HT (BioTek), considerando que cada unidade de A_{260} corresponde a 50 ng/µl de DNA. A relação entre as leituras A_{260}/A_{280} dá a indicação da contaminação de proteínas e fenóis da amostra.

Os resultados da amplificação da sequenciação da região rDNA-ITS foram analisados em gel de agarose como descrito anteriormente (3.2.3.2.), depositando em cada poço do gel 10 µl de DNA + 2 µl de corante 6x NZYDNA loading dye (Nzytech) e utilizou-se 3 µl de marcador NZYDNA Ladder V (Nzytech) como referência.

²<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0692>

3.1.3.5. Envio e análise das sequências de DNA

A sequenciação do DNA resultado da extração das bandas do gel foi efetuada pela empresa STABVIDA. As amostras enviadas continham 10 µl de DNA e 3 µl de um dos primers (10 µmol/l) (ITS1Ext e ITS4Ext).

Os arquivos com as sequências ITS obtidas em ambas as direções para cada isolado foram montados e editados para resolver ambiguidades usando os módulos EditSeq e SeqMan do pacote de *software* Lasergene (DNASTar). De forma a comparar a diversidade genética de diferentes amostras de *P. hemerocallidis* estudadas noutros continentes com os resultados obtidos, efetuou-se uma pesquisa de sequências homólogas através do *software* BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) disponibilizado pela NCBI³. O conjunto de sequências genéticas foram alinhadas pela ferramenta ClustalW com os parâmetros por omissão, usando o *software* MEGA7.014, e representadas por uma árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança de acordo com o modelo de Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993).

3.1.4. Caracterização citogenómica

O tamanho do genoma de cada isolado de *P. hemerocallidis* foi estimado por citometria de fluxo usando um citómetro de fluxo CyFlow Space (Sysmex Partec), seguindo o procedimento de Galbraith *et al.* (1983) adaptado por Tavares *et al.* (2014). Este método permite facilmente estimar o tamanho do genoma de fungos através da relação com uma espécie padrão adequada, em que o tamanho genómico padrão não deve variar mais que 3x em relação à espécie em análise (D'Hondt *et al.*, 2011).

Para libertar os núcleos das células do fungo foi utilizado um fragmento de material vegetal do hospedeiro infetado, uma porção de folha de *Rhamnus alaternus* L. (padrão de referência interno; 2C = 0,680 pg de DNA; Carvalho *et al.*, 2018) e 1 ml de solução tampão (Woody Plant Buffer; 0,2 mol/l Tris-HCl, 4 mmol/l MgCl₂, 1% Triton X-100, 2 mmol/l Na₂EDTA, 86 mmol/l NaCl, 20 mmol/l metabissulfito de sódio, 1% PVP-10, pH 7,5; Loureiro *et al.*, 2007), onde se aplicou cortes sucessivos com uma lâmina.

A suspensão nuclear foi filtrada através de um filtro de nylon de 30 µm para remover os detritos vegetais e fúngicos, adicionando-se de seguida 50 µl de iodeto de propídio (concentração final de 50 µg/ml; Sigma-Aldrich) para corar o DNA. A suspensão dentro de um tubo foi alimentada ao citómetro de fluxo.

No citómetro, as amostras foram analisadas através de um laser de cristal de estado sólido verde, de comprimento de onda de 532 nm. O comprimento de onda ótimo de excitação

³ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

do iodeto de propídio é de 530 nm, bastante semelhante ao comprimento de onda do laser emitido pelo citómetro, o que conduz a uma análise precisa (Loureiro, 2007).

Para cada amostra foram feitas cinco repetições e os resultados analisados através do *software* Partec FloMax v2.4d (Sysmex Partec), representando os dados adquiridos na forma de quatro gráficos: histograma do pulso de fluorescência integral em escala linear (FL); dispersão da luz (FSC) pela dispersão lateral da luz (SSC), ambos em escala logarítmica; tempo por FL e SSC na escala logarítmica por FL, ambos em escala linear. Para analisar núcleos intactos, o histograma FL foi limitado por um polígono definido no gráfico de pontos FL por SSC (Loureiro *et al.*, 2006). O histograma gerado pelos valores de fluorescência permite destacar dois picos que correspondem aos núcleos da espécie da amostra (*P. hemerocallis*) e da espécie usada como padrão (*R. alaternus*). Após conseguir os dados de fluorescência da amostra e do DNA padrão, calculou-se o valor do DNA nuclear com base no valor de DNA nuclear padrão, pela seguinte relação (Hanson *et al*, 2003):

$$\text{Conteúdo de DNA Nuclear/2C de } Puccinia \text{ hemerocallis (pg)} = \frac{\text{Média do pico da amostra (} Puccinia \text{ hemerocallis)}}{\text{Média do pico da amostra (} Rhamnus \text{ alaternus)}} \times \text{Conteúdo de DNA Nuclear/2C de } Rhamnus \text{ alaternus (0,68 pg)}$$

O número de pares de bases é determinado a partir da conversão do resultado da massa do genoma considerando que 1 pg equivale a 978 Mpb (Doležel & Bartoš, 2005).

Este método também foi realizado para determinar a ploidia da cultivar ‘Modest Hedwing’ uma vez que esta informação não se encontrava disponível. Um fragmento de folha de *Solanum lycopersicum* L. ‘Stupické’ (2C = 1,96 pg de DNA; Doležel *et al.*, 1992) foi usado como padrão de comparação.

3.2. Avaliação do nível de resistência à ferrugem

3.2.1. Material biológico

A avaliação da resistência incluiu o estudo de 17 genótipos de *Hemerocallis*, sendo que ‘Norton Orange’, ‘Norton Signal’, ‘Declaration of Love’, ‘Cherry Tiger’, ‘Romantic Rose’, ‘Carla’s Pretty’ e ‘German Highlight’ correspondem às cultivares europeias fornecidas pelo viveiro holandês Kwekerij Joosten⁴, enquanto que as restantes cultivares são americanas e foram gentilmente cedidas pelo viveiro Stapflor Lda⁵. (Quadro 7). De entre estas, 14 cultivares são de resistência desconhecida e três de resistência conhecida, duas das cultivares são classificadas como resistente (R) e a outra como moderadamente resistente (MR).

⁴ <https://www.kwekerij-joosten.nl/>

⁵ <http://www.stapflor.pt/>

Os lírios-de-um-dia foram inoculados com uredósporos de um isolado de *P. hemerocallidis*, proveniente de Porto Covo (Alentejo), possuindo a referência Ph14, que foram mantidos e multiplicados em várias plantas correspondentes a duas variedades desconhecidas de *Hemerocallis* suscetíveis à ferrugem.

Quadro 7. Genótipos de *Hemerocallis* utilizados no presente estudo, época de floração, tipo de folhagem, ploidia, nacionalidade, autores e genealogia. (ADS, 2019a)

Cultivar ¹	EF ²	TF ³	P ⁴	O ⁵	Autor	Genealogia
Bitsy (R)	EP	SP	D	EUA	Warner, 1963	Pinocchio x Sooner Gold
Carla's Pretty	TT	SP	T	NL	Heemskerk, 2006	-
Cherry Tiger	T	SP	T	NL	Heemskerk, 2006	-
Declaration of Love	TP	D	T	DE	Reinermann, 1998	Tigger x German Transrapid
German Highlight	TP	D	D	DE	Reinermann, 1994	Rudolf Seyer x Siloam Shocker
Indian Sky	T	P	D	EUA	Farris, 1963	-
Little Peanut	TP	SP	D	EUA	Winniford-E., 1985	Dallas Lass x Poe's Raven
Modest Hedwing	-	-	T	EUA	-	-
Norton Orange	TP	P	T	UK	Coe, 1971	-
Norton Signal	TT	D	T	UK	Coe, 1971	-
Persian Ruby	TP	D	T	EUA	Trimmer, 1998	Ruby Spider x (Nordic Night x Tet Regal Finale)
Romantic Rose	TP	D	D	NL	Heemskerk, 2013	-
Roswitha (R)	TP	D	D	EUA	Trimmer, 1992	Exotic Echo x Janice Brown
Rosy Rhino	T	SP	T	EUA	Salter, 2001	-
Stella d'Oro (MR)	TP	D	D	EUA	Jablonski, 1975	-
Stellar Double Rose	TP	D	D	EUA	Brown-C., 1995	-
Watermelon Slice	P	P	T	EUA	Scott-E., 1998	-

¹Cultivar: 'Bitsy', 'Roswitha' e 'Stella d'Oro' são cultivares com nível de resistência à ferrugem conhecida, em que MR e R correspondem, respetivamente, a cultivares moderadamente resistentes e resistentes à ferrugem;

²Época de floração: EP- Extra precoce; P- Precoce; TP- Temporã precoce; T- Temporã; TT- Temporã tardia;

³Tipo de folhagem: SP- Semi-perene; P- Perene; D- Dormente;

⁴Ploidia: D- Diploide; T- Tetraploide;

⁵Origem: EUA- Estados Unidos da América; UK- Reino Unido; DE- Alemanha; NL- Holanda.

3.2.2. Manutenção do material vegetal

Todas as plantas de lírio-de-um-dia foram mantidas em vasos de 4,3 l contendo uma mistura comercial de substrato universal composto por húmus de casca de pinheiro crivado e turfa (Siro Profissional Multiplicação). As plantas permaneceram em condições de estufa, com uma temperatura média de 24 a 28°C, humidade relativa de 60 a 70% e sob a luz natural. As plantas foram regadas diariamente de forma a manter o conforto hídrico. A presença de ácaros

foi controlada com recurso a enxofre em pó 95% (p/p) (Produtos Sodacasa), distribuindo-se uniformemente, sob as folhas das plantas, seis placas de Petri com aproximadamente 10 g de enxofre.

Com o crescimento das plantas, as folhas mais velhas foram removidas de forma a não condicionar a obtenção de resultados e estimular a produção de novas folhas.

3.2.3. Produção e manutenção de inóculo

Os uredósporos (isolado Ph14) foram colhidos com uma cápsula de gelatina e/ou para uma folha de alumínio e daí para um tubo de Eppendorf cerca de 10 a 12 dias após a inoculação inicial.

O método de inoculação das plantas foi feito segundo o protocolo adaptado de Mueller *et al.* (2003), em que os esporos depois de colhidos foram suspensos em água destilada e pulverizados sobre as folhas das plantas. Os uredósporos da suspensão foram quantificados com um hemacitómetro, indicando uma concentração média estimada de $4,9 \times 10^5$ uredósporos/ml de água destilada. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara húmida durante 24 horas num local escuro a 25°C, utilizando-se para isso um saco de plástico transparente de 30 x 40 cm previamente humedecido. Este procedimento de inoculação e incubação da doença nas plantas foi repetido aproximadamente uma semana e meia antes da realização dos vários ensaios.

3.2.4. Caracterização histológica do processo de infeção

Para observar a germinação dos uredósporos e a formação de apressórios formados nas folhas e conseqüente processo de colonização do fungo, começou-se por inocular as folhas de uma cultivar suscetível ('Indian Sky') e outra aparentemente resistente ('Bitsy') de acordo com os ensaios preliminares. A inoculação foi feita com o recurso a um pincel de pelo de pónei, apenas na página inferior da folha por ter maior quantidade de estomas (Li *et al.*, 2007) e mantida em câmara húmida durante 24 horas no escuro.

3.2.4.1. Germinação de uredósporos e formação de apressórios

Um dia após a inoculação, destacou-se um fragmento de folha de cada uma das cultivares. De seguida deixou-se secar a superfície do segmento de folha para ser possível conseguir um molde da superfície foliar, através da colocação de uma camada de verniz transparente. Aproximadamente 24 horas depois, o verniz foi destacado com ajuda de uma lâmina e uma pinça (Loureiro *et al.*, 2015).

A película de verniz foi corada com uma mistura de azul de algodão em lactofenol para corar as estruturas do fungo de azul e montada numa lâmina em lactofenol. A visualização

dos uredósporos e respectivos apressórios foi feita ao microscópio (Leica DM 2500), na ampliação 400x.

A determinação da percentagem de uredósporos germinados, baseou-se na contagem de um mínimo de 6 conjuntos de 100 uredósporos por cultivar. A percentagem de formação de apressórios foi calculada, relativamente ao total de uredósporos germinados.

3.2.4.2. Processo de colonização do fungo

Para avaliar o processo de colonização do agente patogénico, seccionaram-se com recurso a um micrótomo de congelação (Leica CM1850) amostras de folhas com 0,09 cm² cortadas de fragmentos de folhas inoculadas. Várias amostras foliares foram dispostas na vertical sobre os discos do micrótomo com ajuda de uma pinça e cobertas com goma arábica que congela, uma vez que a temperatura do ar dentro do micrótomo é de -12°C, permitindo manter a posição do conjunto das amostras. Os cortes transversais, com uma espessura de 20-25 µm, foram depois corados e montados numa mistura clara de azul de algodão em lactofenol. As lâminas preparadas foram observadas ao microscópio (Leica DM 2500), nas ampliações 400 e 630x.

Este procedimento repetiu-se para fragmentos de folhas destacadas 24, 48, 72 e 168 horas e um mês após a inoculação, com o objetivo de acompanhar o processo de infeção do agente patogénico no interior dos tecidos da planta após a inoculação.

3.2.5. Inoculação e avaliação da resistência

Para avaliar a suscetibilidade dos génotipos em estudo, as folhas das plantas pertencentes a cada génotipo foram pulverizadas, com uma suspensão de uredósporos, usando o procedimento referido em 3.2.3. Após 24 horas de incubação no escuro as plantas foram transferidas para condições de estufa a uma temperatura entre 24 e 28°C, onde se acompanhou diariamente a evolução da infeção até ao aparecimento de pústulas.

Os uredósporos na suspensão foram quantificados com ajuda de um hemacitómetro, indicando uma concentração média estimada de $7,1 \times 10^5$ uredósporos/ml de água destilada.

Para avaliar o nível de resistência à ferrugem dos 17 génotipos de acordo com a escala descrita por Li *et al.* (2007) (Quadro 3), foram selecionadas cinco folhas de cada cultivar, que representassem a totalidade da planta e, portanto, foram escolhidas folhas de diferentes idades. De notar que algumas plantas, à data dos ensaios exibiam no total menos de cinco folhas, devido ao lento desenvolvimento vegetativo e de severas lesões foliares provocadas pelos ácaros. Por este motivo apenas se acompanharam quatro folhas nas cultivares 'Carla's Pretty', 'German Highlight' e 'Persian Ruby'; três folhas nas cultivares 'Cherry Tiger', 'Modest Hedwing' e 'Romantic Rose' e duas folhas na cultivar 'Declaration of Love'.

Entre o 4º e o 16º dia após a inoculação, as faces adaxial e abaxial de cada folha escolhida foram fotografadas usando uma câmara digital (Canon PowerShot A2300), para depois, a imagem obtida, ser analisada no *software* WinFOLIA (Regent Instruments, Inc., Canadá), com o objetivo de determinar a área foliar afetada pela doença. As fotografias foram tiradas de acordo com as instruções do manual técnico do *software* WinFOLIA⁶, em que as folhas foram presas sobre uma superfície azul escura sem brilho, juntamente com uma figura geométrica de dimensões conhecidas, de modo a permitir a calibração da imagem obtida. A análise foliar foi feita consoante a atribuição dos tons correspondentes às áreas sem sintomas, cloroses, pústulas, necroses e senescência, obtendo-se no final o valor total da área com e sem doença. O termo clorose foi atribuído a pequenas pontuações verdes claras que contrastavam com o verde predominante de toda a folha, que se tornaram manchas amarelas no decorrer do ensaio. Pontuações de cor amarelo claro, que podiam ao não sobressair das cloroses foram denominadas de pústulas. As necroses correspondem a manchas acastanhadas que resultavam numa possível resposta hipersensível da planta ou da morte celular dos tecidos cloróticos. Manchas de cor acinzentada foram classificadas como senescência que correspondem a tecidos celulares mortos resultado do acelerado envelhecimento da folha. A página superior e inferior de cada folha foi observada separadamente, com a finalidade de averiguar eventuais diferenças entre os parâmetros. A área correspondente a cada parâmetro que compõe o quadro sintomatológico foi convertida em percentagem de acordo com a área total de cada folha, representados em forma de gráfico e analisados estatisticamente usando o procedimento referido em 3.3.

A partir da análise cromática das fotografias tiradas diariamente às folhas determinou-se a percentagem média da área foliar afetada por cada parâmetro sintomatológico definido para a doença, a partir do conjunto das cinco folhas escolhidas para cada cultivar. Os valores médios diários obtidos das áreas correspondentes às cloroses, pústulas, necroses e senescência foram somados resultando na área total afetada pela doença. A soma da média diária da área total doente resulta no cálculo do valor da área sob a curva de progresso da doença (AUDPC). A determinação da AUDPC permitiu quantificar a severidade da doença ao longo do ensaio, facilitando a avaliação do nível de resistência à ferrugem comparando o valor obtido entre cultivares.

Paralelamente à análise fotográfica, o período de incubação e o período latente foram determinados a partir da observação diária das folhas com uma lupa de bolso e com ajuda do registo fotográfico elaborado. O período de incubação corresponde ao número de dias entre a inoculação do fungo e a observação dos primeiros sintomas macroscópicos (Li *et al.*, 2007).

⁶ http://www.regentinstruments.com/assets/winfolia_about.html

O período latente indica o intervalo de tempo entre a inoculação e a libertação dos primeiros uredósporos pelos uredos (Li *et al.*, 2007).

No final do ensaio, a produção de uredósporos foi quantificada para cada cultivar, de acordo com o procedimento de Li *et al.* (2007). Um segmento retangular de folha de cada genótipo (com maior quantidade de pústulas) foi removido e as suas dimensões medidas com uma craveira digital para posterior cálculo da área. Cada fragmento de folha foi transferido para um tubo de Falcon de 15 ml contendo 8 ml de solução Tween 20 a 0,1% para o imergir. A transferência dos uredósporos para a solução foi potenciada através da agitação dos tubos de Falcon e o uso de um pincel de pelo de pónei. Após a remoção dos segmentos foliares, os tubos foram centrifugados por 3 minutos a 3000 rpm. Depois de descartar o sobrenadante, o precipitado foi ressuspensão usando 0,5 ml de água destilada. Os uredósporos em suspensão foram contados com ajuda de um hemacitómetro e a estimativa do número de uredósporos por centímetro quadrado de área foliar foi calculado dividindo-se o número de esporos num segmento foliar pela própria área.

3.3. Análise estatística

Os dados relativos à percentagem de área foliar afetada com cloroses, pústulas, necroses, senescência e conseqüentemente a área total doente, determinada ao longo do ensaio de inoculação das diferentes variedades, foram tratados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), assim como as variáveis biométricas (comprimento e largura) dos uredósporos e o tamanho do genoma de cada isolado de ferrugem.

Para testar a existência de diferenças significativas entre as médias das variáveis, foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$).

A análise estatística foi realizada com o *software* Statística 6.0 (StatSoft Inc.).

4. Resultados e discussão

4.1. Caracterização dos isolados de *Puccinia hemerocallidis* encontrados em Portugal

Pesquisas realizadas ao longo dos anos comprovam a existência de diversidade genética do agente patogénico da ferrugem através da existência de diferenças genéticas e morfológicas dos uredósporos e teleutósporos entre isolados de *P. hemerocallidis* coletados em distintas regiões geográficas (Hernández *et al.*, 2002; Buck, 2013). As diferenças observadas podem ajudar a entender uma possível evolução e trajetória do fungo entre os continentes e a origem dos primeiros surtos registados. As diferenças entre os vários espécimes da ferrugem são reduzidas, mas poderão ser uma das possíveis causas para a interação diferenciada entre o agente patogénico e o hospedeiro verificada por Buck (2013).

Após o primeiro registo da ferrugem do lírio-de-um-dia em Portugal, foi realizado um inventário onde se assinalou a presença ou a ausência de sintomas da doença em várias populações de *Hemerocallis* pelo país (Quadro 8). Os locais primeiramente indicados foram monitorizados com o propósito de acompanhar a progressão da disseminação da ferrugem, tendo sido verificado a existência de menos populações de *Hemerocallis* afetadas, em relação à primeira observação feita entre 2015 e 2016 (Silva *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2018).

Focos de ferrugem foram apenas encontrados em Sobral de Monte Agraço, Jardim Botânico da Madeira, Porto Covo e Lagos, uma vez que as restantes populações de *Hemerocallis* com ferrugem detetadas no passado foram destruídas com o intuito de eliminar as plantas doentes. Para além dos locais já assinalados, outros jardins com *Hemerocallis* foram anotados, no entanto, sem sintomas de ferrugem.

Quadro 8. Populações de *Hemerocallis* monitorizadas para a presença de ferrugem.

Ref	Local	1ª Ocorrência		Monitorização		Isolados obtidos
		Data	Obs.	Data	Obs.	
1	Oeiras	04.05.2015	HCF ¹		AH ³	
2	Sobral de Monte Agraço			04.02.2019	HCF	Ph02
3	Estufa Fria de Lisboa			17.05.2019	HSF	
4	Museu Calouste Gulbenkian, Lisboa	28.01.2016	HCF		AH	
5	Tavira	25.02.2016	HCF		AH	
6	Jardim Botânico da Madeira		HCF	07.06.2019	HCF	Ph06
7	Palmela	19.05.2016	HSF ²			
8	Instituto Superior de Agronomia	30.05.2016	HSF	02.05.2019	HSF	
9	Jardim Botânico d' Ajuda, Lisboa	30.01.2016	HSF	25.08.2019	HSF	
10	Vale Milhaços, Seixal			30.08.2019	HSF	
11	Jardim Botânico de Lisboa	30.05.2016	HSF	07.07.2019	HSF	
12	Jardim Botânico do Faial	18.02.2016	HSF			
13	Quinta da Regaleira, Sintra			30.08.2019	HSF	
14	Porto Covo, Sines	11.06.2016	HCF	01.08.2019	HCF	Ph14
15	Setúbal	02.07.2016	HSF	29.05.2019	HSF	
16	Lagos	17.12.2016	HCF	01.05.2019	HCF	Ph16
17	Vila Viçosa	30.04.2017	HSF			
18	Maceira-Liz, Leiria			09.06.2019	HSF	
19	Avelar, Ansião			10.06.2019	HSF	
20	Amora, Seixal			08.09.2019	HSF	
21	Biblioteca da Faculdade de Letras, Lisboa			23.09.2019	HSF	

¹HCF - populações de *Hemerocallis* com ferrugem;

²HSF - população de *Hemerocallis* sem sintomas de ferrugem;

³AH - Ausência da população de *Hemerocallis*, removidas após deteção de sintomas de ferrugem.

4.1.1. Caracterização morfológica e biometria dos uredósporos e teleutósporos

As características morfológicas dos uredósporos dos quatro isolados obtidos de folhas infetadas coincidem com a descrição feita por Hernández *et al.* (2002). Os uredósporos de todos os isolados apresentavam forma globosa a elipsoide, com um conteúdo amarelado e parede uniformemente hialina equinulada (Figura 7). No isolado Ph16 foi possível observar um pedicelo anexado a alguns uredósporos, o que não se verificou nos restantes isolados.

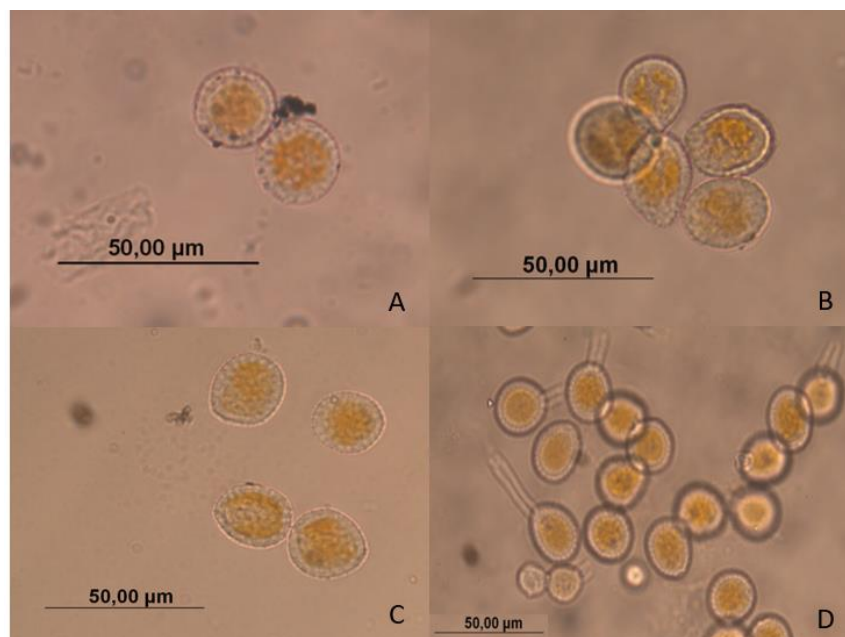


Figura 7. Uredósporos de *Puccinia hemerocallidis* dos isolados Ph02 (A), Ph06 (B), Ph14(C) e Ph16 (D).

As características biométricas (comprimento, largura e razão entre comprimento e largura) dos uredósporos dos quatro isolados em estudo apresentam-se no Quadro 9.

Os valores extremos apurados para o comprimento dos uredósporos dos quatro isolados variaram entre 19,1 µm (Ph06) e 21,8 µm (Ph16), relativamente ao valor mínimo, e 27,4 µm (Ph02) a 31,0 (Ph16) em relação ao valor máximo. O intervalo de valores mínimos correspondente à largura dos uredósporos está compreendido entre 17,5 µm (Ph02) e 19,7 µm (Ph16), enquanto que o valor máximo varia entre 22,2 µm (Ph02) e 25,5 µm (Ph14). Estes valores, de forma geral, enquadram-se com as dimensões apresentadas por von Thümen (1880) e Hernández *et al.* (2002).

Os isolados Ph02 e Ph06 não são significativamente diferentes em relação à dimensão média dos uredósporos, mostrando possuir um tamanho inferior quando comparados com os uredósporos dos isolados Ph14 e Ph16, que por sua vez não possuem uma dimensão média significativamente diferente entre si. As médias do comprimento e da largura dos esporos dos isolados Ph02 e Ph06 são semelhantes ao tamanho médio de 24 x 20,5 µm, correspondente ao conjunto de uredósporos de vários espécimes de *P. hemerocallis* estudados por Hernández *et al.* (2002). O tamanho médio dos uredósporos dos isolados Ph14 e Ph16 é ligeiramente superior ao apresentado em vários trabalhos (von Thümen, 1880; Maofan *et al.*, 1998; Hernández *et al.*, 2002; Pardo-Cardona *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2016), excepto aos uredósporos com um tamanho médio de 25,5 x 22 µm, associados ao primeiro registo de *P. hemerocallidis* na África do Sul (Mostert *et al.*, 2008).

A relação entre o comprimento e a largura dos uredósporos dos isolados Ph02, Ph06, Ph14 e Ph16 não diferiram significativamente entre si, indicando que a forma globosa é a dominante no conjunto de esporos observados.

Quadro 9. Características biométricas dos uredósporos de quatro isolados de *Puccinia hemerocallidis* coletados em Portugal e dados biométricos de uredósporos de isolados provenientes de outras regiões geográficas.

Isolado	Comprimento (C) (µm)		Largura (L) (µm)		C/L	
	Mín- (Q25-Média-Q75) -Máx		Mín- (Q25-Média-Q75) -Máx		Média	
Ph02	19,4- (21,6- 22,8 -24,1) -27,4	a	17,5- (19,8- 20,5 -21,5) -22,2	a	1,11	a
Ph06	19,1- (21,8- 23,8 -25,3) -29,5	a	17,7- (19,7- 20,4 -21,5) -23,6	a	1,17	a
Ph14	20,6- (23,8- 25,4 -26,9) -30,9	b	19,2- (21,2- 22,1 -23,0) -25,5	b	1,15	a
Ph16	21,8- (23,9- 25,3 -26,5) -31,0	b	19,7- (21,9- 22,7 -23,4) -25,2	b	1,12	a
Rússia (von Thümen, 1880)	19- (21) -31		16- (23) -27			
China (Maofan <i>et al.</i> , 1998)	16,8 - 28,1		14,0 - 21,1			
EUA (Hernández <i>et al.</i> , 2002)	13,5- (21,0- 24,0 -26,5) -36,0		12,0- (18,5- 20,5 -22,5) -29,5			
Venezuela (Pardo-Cardona <i>et al.</i> , 2008)	19 - 30		18 - 27			
África do Sul (Mostert <i>et al.</i> , 2008)	22 - 31		16 - 26			
Portugal (Silva <i>et al.</i> , 2016)	19 - 24		16 - 21			

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

A caracterização dos teleutósporos apenas foi feita para o isolado Ph02 porque a amostra de esporos deste isolado foi recolhida no inverno, porque os teleutósporos como estrutura de resistência, apenas se diferenciam a partir do outono devido à diminuição da temperatura.

Os teleutósporos da amostra apresentavam uma forma variável, geralmente elipsoide, associados a um pedicelo, castanho amarelado de comprimento variável. Os esporos encontrados eram asseptados ou possuíam um septo que restringia ligeiramente o teleutósporo. A parede era lisa e acastanhada, escurecendo na região do ápice. As características morfológicas dos teleutósporos (Figura 8) coincidem com as descrições feitas por Hernández *et al.* (2002) e von Thümen (1880).



Figura 8. Teleutósporos de *Puccinia hemerocallidis* do isolado Ph02.

As características biométricas (comprimento, largura e razão entre comprimento e largura) dos teleutósporos não septados e com um septo do isolado Ph02 apresentam-se no Quadro 10.

Ao comparar as dimensões médias dos esporos asseptados com os que possuem um septo é possível perceber que todos os parâmetros, exceto o comprimento, não são significativamente diferentes. O comprimento médio dos teleutósporos com um septo é bastante superior ao registado para os asseptados.

As dimensões registadas para cada tipo de teleutósporo são consentâneas com o tamanho médio de 33,0 x 14,6 μm (esporos asseptados) e 43,9 x 16,6 μm (esporos septados) determinado por Hernández *et al.* (2002). É possível constatar que o valor da média da largura dos esporos septados relatado por Hernández *et al.* (2002) é superior à obtida para Ph02, porém o intervalo de valores é bastante coerente.

Ao considerar a média do comprimento e da largura de todos os teleutósporos observados ($38,14 \pm 6,4 \times 14,20 \pm 2,9 \mu\text{m}$), verifica-se que a dimensão destes coincide com a caracterização biométrica dos teleutósporos associados aos primeiros focos da doença registados em Portugal ($35,0 \times 13,5 \mu\text{m}$; Silva *et al.*, 2016). Ao comparar os teleutósporos Ph02 com os registos feitos noutras regiões, verifica-se que o tamanho médio destes é inferior aos esporos encontrados na China ($50,8 \times 18,7 \mu\text{m}$; Maofan *et al.*, 1998), Venezuela ($50 \times 21 \mu\text{m}$; Pardo-Cardona *et al.*, 2008) e Rússia ($34 \times 25 \mu\text{m}$; von Thümen, 1880).

O comprimento médio do pedicelo é bastante inferior ao valor de 30 μm, mencionado por von Thümen (1880) e Pardo-Cardona *et al.* (2008). A relação entre o comprimento e a largura dos teleutósporos, indica que o conjunto dos esporos tem uma forma elipsoide.

Quadro 10. Características biométricas dos teleutósporos de *Puccinia hemerocallidis* do isolado Ph02.

Nº de Septos	Comprimento (C) (µm)	Largura (L) (µm)	Pedicelo (µm)	C/L
	Mín- (Q25-Média-Q75) -Máx	Mín- (Q25-Média-Q75) -Máx	Mín- (Q25-Média-Q75) -Máx	Média
0	27,1- (30,3- 33,7 -37,5) -40,0 a	7,3- (11,8- 13,5 -15,6) -18,6 a	0,0- (7,6- 13,5 -17,8) -35,3 a	2,64 a
1	29,1- (38,7- 42,3 -46,7) -52,5 b	10- (13,4- 14,8 -15,9) -22,2 a	0,0- (6,8- 13,0 -18,7) -32,3 a	2,96 a

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.1.2. Caracterização da diversidade genética entre isolados

A sequenciação da região rDNA-ITS permitiu averiguar a diversidade genética entre os isolados em estudo, assim como compará-los com sequências obtidas de outros isolados provenientes de diferentes regiões geográficas. A região ITS tem sido preferencialmente usada para identificar e estabelecer relações filogenéticas entre espécies e isolados, uma vez que esta região é facilmente amplificada com primers universais para as várias espécies de fungos, nomeadamente ferrugens, mesmo na presença de DNA da planta hospedeira (Gardes & Bruns, 1993). A concentração de DNA (ng/µl) dada pelo espectrofotómetro (Quadro 11) foi inferior a 10 ng/µl para os quatro isolados, assim como a razão entre A_{260}/A_{280} foi inferior a 1,7 indicando uma contaminação das amostras com proteínas (Desjardins & Conklin, 2011). A fraca intensidade de fluorescência observada das bandas definidas pela eletroforese (Figura 9) confirma os resultados apresentados pelo espectrofotómetro, indicando que a quantidade de DNA extraído é baixa.

Quando a quantidade de DNA presente na amostra é baixa, a medição da absorvância tende a gerar resultados mais imprecisos, o que poderá estar na causa nos resultados pouco satisfatórios da razão entre A_{260}/A_{280} .

Independentemente dos resultados pouco satisfatórios obtidos em relação ao DNA conseguido, optou-se por prosseguir com os procedimentos necessários para a determinação da sequência genética, devido ao stock limitado de uredósporos disponível de cada isolado para extração do DNA.

Quadro 11. Resultados do grau de pureza dado pela razão A_{260}/A_{280} e a concentração do DNA de cada isolado.

Referência do isolado	A_{260}/A_{280}	Concentração (ng/µl)
Ph02	1,25	2,5
Ph06	1,30	6,5
Ph14	1,25	2,5
Ph16	1,60	3,5

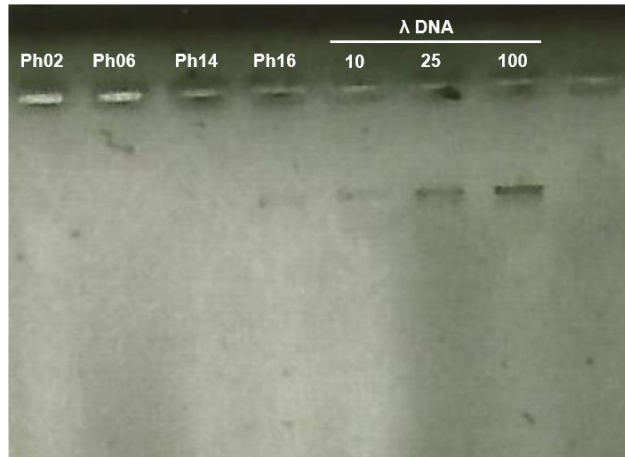


Figura 9. Resultados da extração de DNA dos quatro isolados em estudo com as respectivas quantidades de λDNA usadas como padrão (10, 25 e 100 ng).

A amplificação da sequenciação da região ITS do rDNA das quatro amostras de DNA pela reação PCR, foi visualizada através de bandas na eletroforese. No gel de agarose observou-se a diferenciação de várias bandas correspondentes a fragmentos de DNA com 600 a 700 pb, de acordo com o marcador NZYDNA Ladder V (Nzytech) (Figura 10). Uma vez que a sequenciação da região ITS deu origem a fragmentos de diferentes tamanhos, foi necessário proceder à extração e purificação do DNA das bandas. Apenas a região ITS do agente patogénico foi obtida, descartando assim as bandas formadas possivelmente por DNA das células do hospedeiro ou de outros organismos. A partir da purificação do DNA das bandas foi possível conferir que os fragmentos da região ITS de *P. hemerocallidis* são de aproximadamente 650 pb.

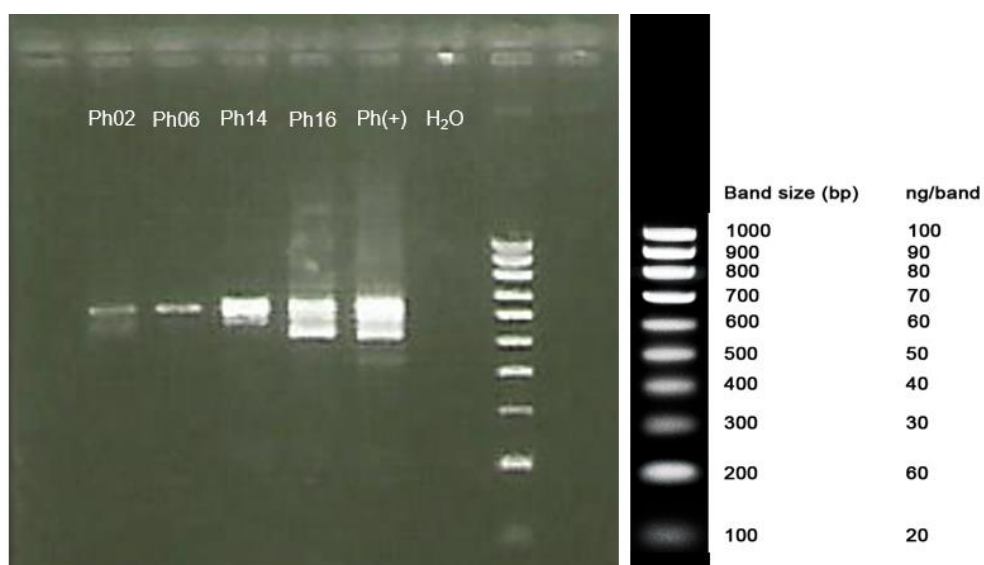


Figura 10. Resultado do PCR da amplificação da região rDNA-ITS de cada isolado e respetivo controlo positivo e negativo.

4.1.2.1. Análise filogenética e citogenômica

Para os quatro isolados obtiveram-se sequências da região rDNA-ITS que foram comparadas com as sequências de *P. hemerocallidis* existentes na base de dados NCBI, recorrendo-se ao programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

As sequências da região rDNA-ITS dos quatro isolados de *P. hemerocallidis* em estudo foram depositadas na base de dados GenBank⁷, onde para cada sequência foi atribuída uma referência de acesso (Quadro 12).

Quadro 12. Referência de acesso atribuída pela base de dados GenBank aos isolados Ph02, Ph04, Ph14 e Ph16.

Referência do isolado	Referência GenBank
Ph02	MN427630
Ph06	MN427631
Ph14	MN427632
Ph16	MN427633

As sequências ITS compreendidas entre os primers utilizados (MN427630, MN427631, MN427632, MN427633) foram alinhadas com sequências de *P. hemerocallidis* provenientes da Austrália (KM249855) (McTaggart *et al.*, 2016), Costa Rica (AF479740, AF479741) (Hernández *et al.*, 2002), EUA (AF479739, AF479742) (Hernández *et al.*, 2002), Japão (AB232543, AB232544, AB232545, AB232546, AB232547) (Chatasiri *et al.*, 2006), México (FJ897532, FJ897533, FJ897534, FJ897535) (Sandoval-Sánchez *et al.*, 2020), Rússia (AF479744) (Hernández *et al.*, 2002) e Porto Covo (Portugal) (Carvalho *et al.*, 2018), gerando uma árvore filogenética.

No filograma (Figura 11) referente aos dados obtidos da sequenciação da região ITS observou-se a formação de quatro nós principais. Os três primeiros ramos correspondem aos isolados de *P. hemerocallidis* provenientes do México (FJ897532, FJ897534, FJ897535) que se encontram afastados dos restantes isolados. Os isolados Ph06 (MN427631), Ph14 (MN427632) e Ph16 (MN427633) encontram-se reunidos no quarto ramo juntamente com os isolados oriundos dos EUA (AF479739, AF479742), Costa Rica (AF479740, AF479741) e Porto Covo (Ph14_RCA), este último, obtido do mesmo local do isolado Ph14. O isolado Ph02 (MN427630) está agrupado com o isolado do México (FJ897533) com uma distância filogenética inferior a 0,0020 dos restantes isolados em estudo. O quinto ramo agrupa os isolados do Japão (AB232543, AB232544, AB232545, AB232546, AB232547) e da Rússia (AF479744), possuindo uma distância filogenética superior a 0,0020 em relação aos isolados

⁷ <https://ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

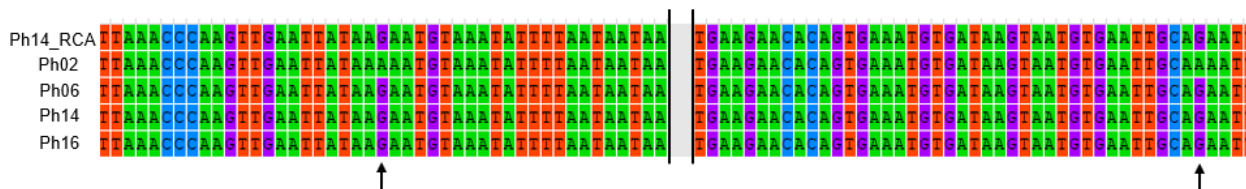


Figura 12. Alinhamento múltiplo de duas frações das sequências da região rDNA-ITS dos isolados em estudo, incluído a sequência obtida por Carvalho *et al.* (2018) com origem em Porto Covo.

Com o intuito de aprofundar o conhecimento em relação aos isolados de *P. hemerocallidis* em estudo, optou-se por estimar o tamanho do genoma por citometria de fluxo.

A média dos picos do histograma são o resultado dos valores de fluorescência que foram delimitados manualmente. Cada pico representa os núcleos de cada espécie sendo que o pico Ph corresponde à amostra dos isolados de *P. hemerocallidis* e o pico Ra à amostra de *Rhamnus alaternus*, usado como DNA padrão (Figura 13). Para além dos picos representados pelos núcleos de células das duas espécies presentes na amostra, também é possível verificar nos gráficos a leitura, pelo laser, de impurezas como a presença de partes de núcleos e outro tipo de detritos.

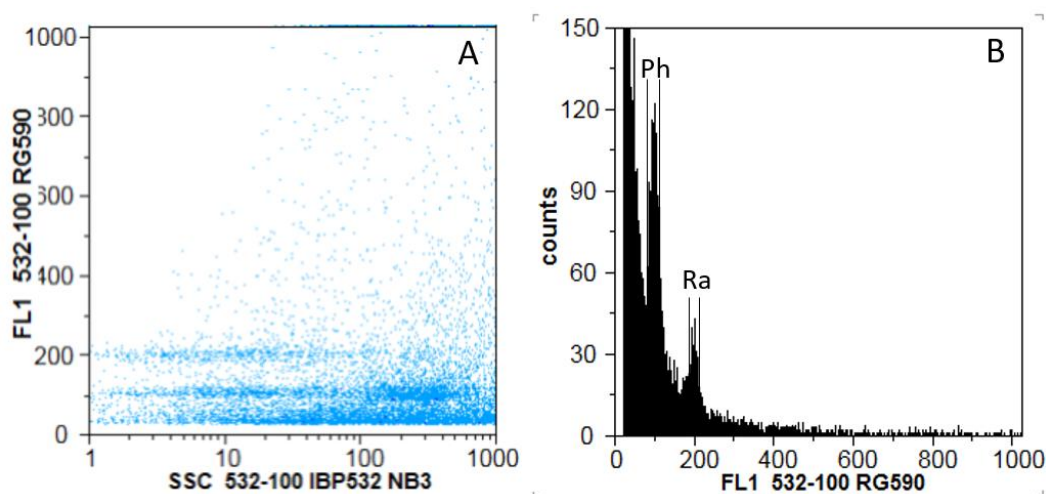


Figura 13. Gráficos resultantes da análise do isolados Ph02 de *Puccinia hemerocallidis* e de *Rhamnus alaternus* no citómetro de fluxo. Nos eixos das coordenadas estão o SSC (side scatter) e o FL1 (fluorescência) (A) resultante do laser de 532 nm assim como a contagem de partículas analisadas (counts) (B).

No Quadro 13 são apresentados os dados recolhidos para os isolados Ph02, Ph06, Ph14 e Ph16. O conteúdo nuclear das amostras é determinado com base na fluorescência do padrão (*Rhamnus alaternus*) cujo valor de DNA nuclear é de 0,68 pg/2C.

Quadro 13. Resultados de citometria de fluxo referentes aos isolados em estudo de *Puccinia hemerocallidis*.

Isolado	Conteúdo nuclear da amostra			Coeficiente de variação amostra (%)	Coeficiente de variação padrão (%)
	pg	Mpb			
Ph02	0,311	304,0	a	6,72	3,54
Ph06	0,307	300,0	a	7,60	4,60
Ph14	0,334	325,9	a	7,01	4,41
Ph16	0,321	313,5	a	7,65	3,97

Na coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

O tamanho genómico dos quatro isolados está compreendido entre 300,0 e 325,9 Mpb pelo que não é significativamente diferente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$) (Quadro 13). Os resultados obtidos vão de encontro ao valor estimado por Carvalho *et al.*, (2018) de 345 Mpb (isolado proveniente de Porto Covo). Ao considerar todas as medições já feitas do tamanho do genoma de *P. hemerocallidis* é possível afirmar que a espécie possui um genoma com o tamanho estimado de $318 \pm 26,1$ Mpb.

O tamanho do genoma do conjunto dos isolados de *P. hemerocallidis* é superior ao valor médio de 248 Mpb atribuído ao género *Puccinia* (Talhinhas *et al.*, 2015). Porém, o género *Puccinia* inclui espécies com o tamanho genómico bastante díspar, abrangendo quase toda a faixa de tamanhos de genoma reportados para ferrugens. A heterogeneidade do tamanho do genoma presente no género é demonstrada por *Puccinia chrysanthemi* Roze, possuindo um dos maiores genomas entre os fungos, com 806 Mpb em oposição com o genoma de 77 Mpb pertencente a *Puccinia triticina* Erikss e a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Erikss. e Henning (Tavares *et al.*, 2014).

Dentro das espécies do género *Puccinia* com o tamanho do genoma já estudado, *P. hemerocallidis* possui valores bastante próximos aos de *Puccinia pimpinellae* (Str.) Mart (322 Mpb, Talhinhas *et al.*, 2015), *Puccinia cichorii* (DC.) Belyynck (335 Mpb, Talhinhas *et al.*, 2015), *Puccinia allii* (DC.) F. Rudolphi (322 Mpb, Tavares *et al.*, 2014) e *Puccinia oxalidis* Dietel e Ellis (355 Mpb, Tavares *et al.*, 2014). Curiosamente, todas estas espécies são agentes causais de ferrugens pertencentes ao grupo 1. Este grupo abrange as ferrugens, em que a fase uredospórica e/ou teleutospórica infecta hospedeiros da sub-divisão Angiospermae, exceptuando a família Poaceae (Dixon *et al.*, 2009).

Todas as ferrugem estudadas que afetam monocotiledóneas, nomeadamente *Puccinia coronata* Corda (243 Mpb), *Puccinia cymbopogonis* Masee (217 Mpb), *Puccinia graminis* e *Puccinia triticina*, ambas com 77 Mpb (Tavares *et al.*, 2014), exceto *P. allii*, possuem um tamanho genómico inferior ao estimado para *P. hemerocallidis*.

Ao comparar num filograma a sequência da região ITS de várias amostras de *P. hemerocallidis* encontradas em várias regiões do mundo, é possível verificar que existe diversidade genética entre as populações. Os resultados mostraram a formação de dois grupos distintos, o primeiro que inclui os isolados correspondentes ao centro de origem da doença, provenientes do Japão e da Rússia, e o segundo grupo composto por isolados intercetados no centro e norte da América.

A ferrugem do lírio-de-um-dia foi reportada pela primeira vez, fora do continente asiático, na Geórgia (EUA) em 2000 (Williams-Woodward *et al.*, 2001), disseminando-se posteriormente para os restantes continentes através de transações comerciais. Após a introdução do agente patogénico no continente americano, foi possível verificar que a ferrugem é diferente entre populações americanas e japonesas de *Hemerocallis*, sugerindo que o agente patogénico tenha divergido geneticamente num curto espaço de tempo (Chatasiri *et al.*, 2006). No entanto, ainda não se conhecem as possíveis causas que expliquem as diferenças genéticas existentes entre os vários isolados.

A espécie *P. hemerocallidis* possui um genoma bastante grande, coincidindo com a ordem onde se inclui, sendo que a ordem Pucciniales tem o maior tamanho médio do genoma (335 Mpb) entre os fungos (Ramos *et al.*, 2015). Grandes genomas podem ser consequência da presença de elementos transponíveis, sequências repetidas não codificantes e poliploidização (Nemri *et al.*, 2014; Stukenbrock & Croll, 2014), que podem ser importantes fontes de diversidade e variação do tamanho do genoma, particularmente na ausência de reprodução sexuada (Talhinhas *et al.*, 2015). As variações do tamanho do genoma podem ser um mecanismo essencial para uma rápida evolução adaptativa dos fungos patogénicos, principalmente das ferrugens que infetam uma estreita gama de hospedeiros, ao precisarem de desenvolver interações específicas com o hospedeiro (Stukenbrock & Croll, 2014), com o objetivo de completarem o seu ciclo de vida. O mecanismo envolvido na manutenção da diversidade genética em espécies com o tamanho genómico superior poderá estar envolto no surgimento de patótipos com diferentes níveis de virulência para o hospedeiro.

A determinação do tamanho genómico de *P. hemerocallidis* foi feita com recurso a isolados supostamente provenientes do centro ou norte da América. No entanto seria interessante perceber se o tamanho do genoma dos isolados asiáticos usados para sequenciar a região rDNA-ITS (AB232543, AB232544, AB232545, AB232546, AB232547, AF479744) seriam significativamente diferente em relação ao valor estimado para a espécie. Este dado poderia ajudar a entender os mecanismos de evolução e criação de diversidade genética do fungo, uma vez que no continente asiático a presença do hospedeiro secundário (*Patrinia* spp.) permite ao agente patogénico completar o seu ciclo de vida.

As sequências nucleotídicas dos isolados Ph06, Ph14 e Ph16 correspondem inteiramente às dos isolados de *P. hemerocallidis* dos EUA e da Costa Rica, integrando-se

num grupo comum na árvore filogenética. A sequência correspondente ao isolado Ph02 é similar à do isolado de *P. hemerocallidis* do México, sugerindo que os surtos de ferrugem de lírio-de-um-dia em Portugal tiveram origem norte ou centro americana. O facto de apenas quatro amostras do fungo terem sido analisadas e de se constatar a existência de pequenas diferenças entre elas não permite descartar a hipótese da ocorrência de múltiplas introduções (Carvalho *et al.*, 2018), acrescentando ao facto da inexistência de sequências correspondentes aos isolados reportados na América do Sul, África do Sul e da Ásia Central e Meridional disponíveis para comparação.

4.2. Caracterização do nível de resistência de *Hemerocallis* à ferrugem

4.2.1. Avaliação macroscópica do nível de resistência à ferrugem da coleção de lírio-de-um-dia

Após *Puccinia hemerocallidis* começar a ser encontrada em populações de *Hemerocallis* fora do continente asiático a partir do início do século XXI (Williams-Woodward *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2001; EPPO, 2002; Mostert *et al.*, 2008; Pardo-Cardona *et al.*, 2008), constatou-se que cultivares da ornamental mostravam diferentes respostas de resistência perante a infecção do fungo (Mueller *et al.*, 2003). A partir desse momento, vários trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de categorizar as inúmeras cultivares consoante o nível de resistência apresentado (Robbins & Vann, 2002; Robbins, 2003; Mueller *et al.*, 2003; Blythe *et al.*, 2015). Apenas cultivares americanas têm sido incluídas nos trabalhos já realizados, o que coloca em desvantagem viveiristas europeus perante o registo da ferrugem na Europa (Silva *et al.*, 2016). No sentido de minimizar esse problema, o presente trabalho incluiu na coleção para o estudo da resistência, sete variedades europeias e 10 americanas, das quais três de nível de resistência conhecido.

O estudo do nível de resistência dos 17 genótipos à ferrugem foi concretizado através da monitorização diária das plantas entre o 4^o e o 16^a dia após a exposição das plantas ao agente patogénico, registando os principais acontecimentos do processo infeccioso, como o período de incubação e o período latente. No final do ensaio a esporulação também foi quantificada de forma a complementar a informação recolhida ao longo das duas semanas de observações.

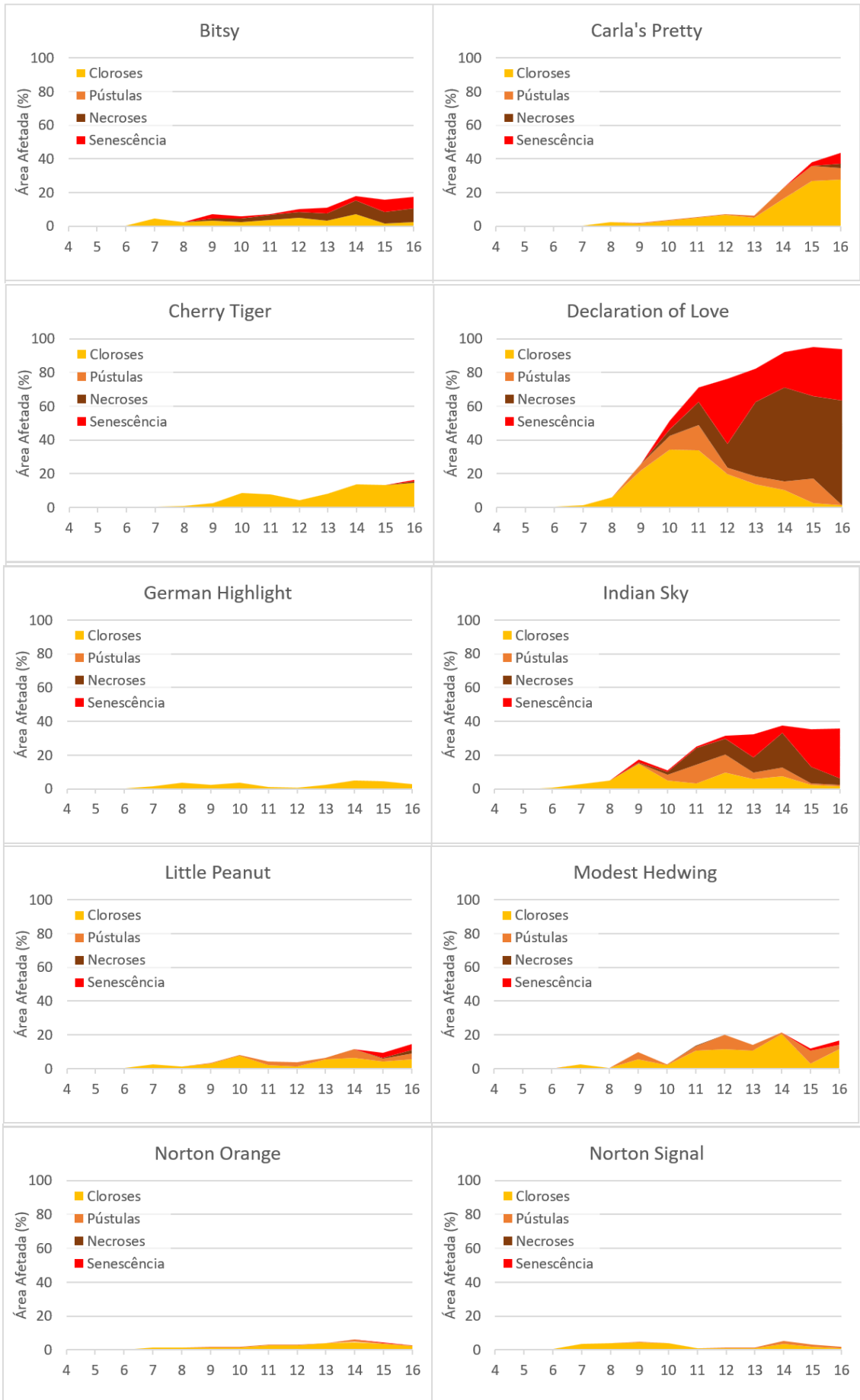
O nível de resistência à ferrugem das cultivares de lírio-de-um-dia em trabalhos anteriores tem sido avaliada com base na observação visual das plantas no período de tempo definido para o estudo. As avaliações foram feitas de acordo com a evolução da doença, considerando o número e o tipo de lesões (cloroses ou necroses) e a ocorrência ou não de esporulação, usando como termo de comparação a resposta à ferrugem da cultivar suscetível 'Pardon Me' (Mueller *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007). A atribuição do nível de resistência à ferrugem das cultivares através da observação visual conduz à subjetividade de algumas avaliações ao considerar por exemplo a área foliar afetada ou a intensidade da esporulação ao longo do estudo. Para minimizar possíveis erros de classificação das cultivares em relação ao nível de resistência, derivados de uma incorreta interpretação da evolução dos sintomas, em consequência de uma avaliação apoiada na observação visual, optou-se por quantificar a área correspondente às cloroses, pústulas, necroses e senescência.

A quantificação da área afetada pela doença foi realizada pelo *software* WinFOLIA com recurso a fotografias tiradas à página superior e inferior de uma amostra de folhas escolhidas para cada cultivar em estudo. A análise quantitativa das lesões provocadas pela

ferrugem, para além de representar mais uma ferramenta na determinação do nível de resistência de cada cultivar, também permite perceber a evolução da área foliar correspondente a cada parâmetro sintomatológico ao longo do tempo. A área correspondente a cada parâmetro que compõe o quadro sintomatológico foi convertida em percentagem de acordo com a área total de cada folha e representada em forma de gráfico (Figura 14), permitindo assim visualizar a evolução diária da ferrugem para cada cultivar.

Através da análise de variância (ANOVA) foi possível concluir que não se verificam diferenças significativas entre a página superior e inferior para todos os parâmetros observados (cloroses, necroses, número de pústulas, senescência e área total afetada pela doença), excetuando-se apenas o parâmetro correspondente ao número de pústulas na cultivar 'Modest Hedwing', possuindo maior número de pústulas na página superior da folha.

Através do registo diário da evolução da doença verificada visualmente e a partir da representação gráfica dos sintomas (Figura 14), foi possível perceber a existência de diferentes tipos de resposta entre os genótipos, permitindo assim classificá-los segundo o seu nível de resistência à ferrugem. De acordo com a evolução dos sintomas e o registo ou não de esporulação para cada cultivar, o nível de resistência à ferrugem foi atribuído seguindo a escala desenvolvida por Li *et al.* (2007) (Quadro 3), que define os critérios a ter em conta para a classificação das cultivares. A partir das diferentes respostas apresentadas pelas plantas perante o agente patogénico foi possível concluir que as cultivares 'Bitsy', 'Cherry Tiger' e 'Stella d'Oro' são moderadamente resistentes, a 'German Highlight' e a 'Romantic Rose' são moderadamente suscetíveis, enquanto que as restantes cultivares são suscetíveis (Quadro 14).



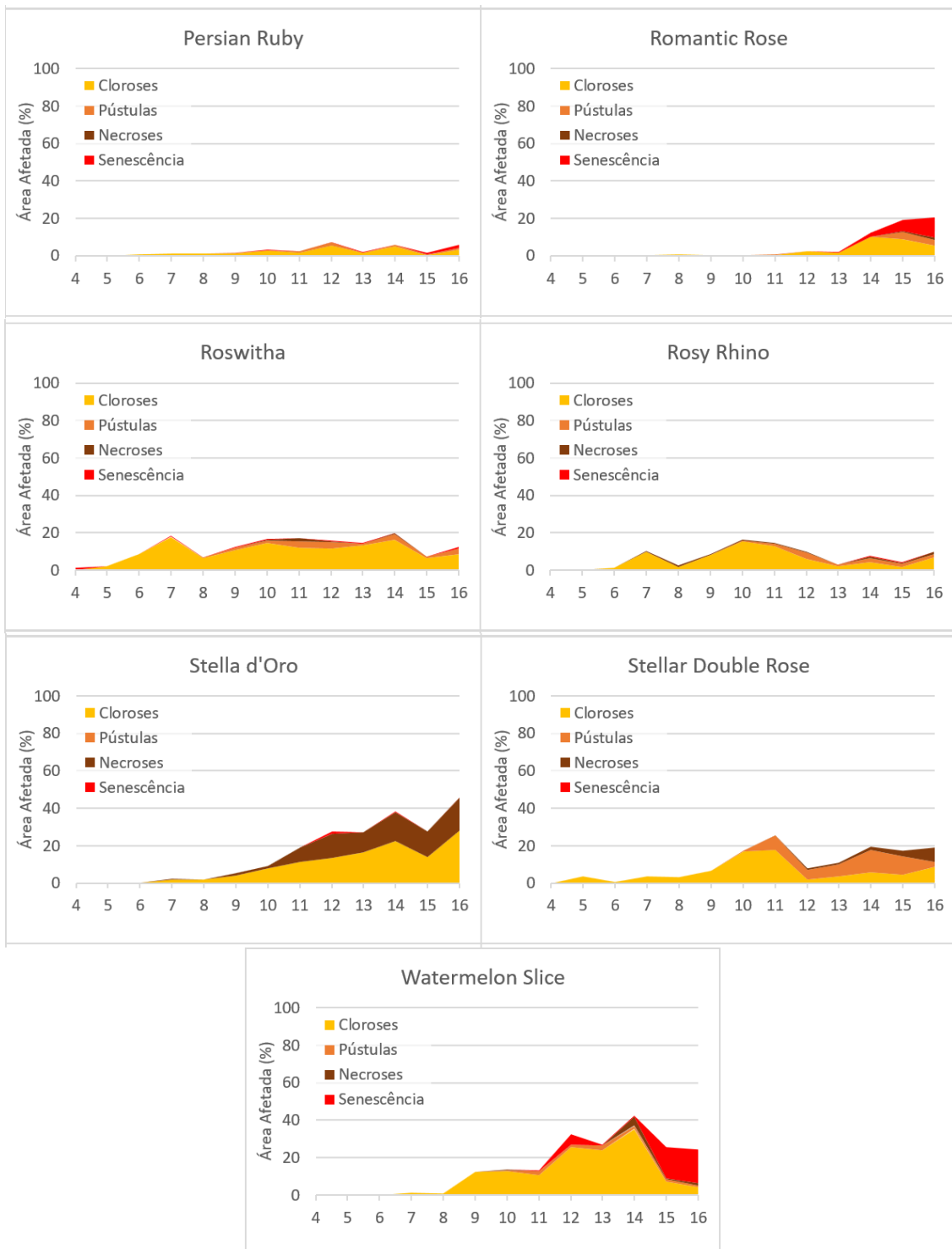


Figura 14. Evolução dos sintomas de ferrugem em cultivares de *Hemerocallis* após inoculação com uredósporos de *Puccinia hemerocallidis*.

Adicionalmente à atribuição do nível de resistência das cultivares em estudo à ferrugem (Quadro 7), também foi possível concluir que as cultivares 'Jerry Nettles', 'Raspberries in Cream' e 'Wild Cherry' são suscetíveis à ferrugem do lírio-de-um-dia (Quadro 14), porque estas cultivares de *Hemerocallis* estavam infetadas com ferrugem em

Sobral de Monte Agraço. Nenhuma das cultivares é europeia e apenas a ‘Raspberries in Cream’ está descrita como suscetível na base de dados disponibilizada pela The National Gardening Association⁸ (2019), o que corresponde ao verificado.

Quadro 14. Parâmetros relativos à monitorização da ferrugem (período de incubação, período latente e esporulação) e categoria de resistência de cultivares de lírio-de-um-dia inoculadas com *Puccinia hemerocallidis*.

Cultivar ¹	P ²	O ³	Período de incubação (dias)	Período latente (dias)	Esporulação (x10 ³ Uredósporos/cm ² de folha 16 dai) ⁴	Categoria de resistência ⁵
Jerry Nettles	T	EUA	-	-	-	S
Raspberries in Cream	T	EUA	-	-	-	S
Wild Cherry	D	EUA	-	-	-	S
Carla's Pretty	T	NL	7	9	96,5	S
Declaration of Love	T	DE	6	9	18,8	S
Norton Orange	T	UK	4	10	210	S
Norton Signal	T	UK	4	10	44,0	S
Indian Sky	D	EUA	6	12	21,7	S
Modest Hedwing	T	EUA	7	12	102	S
Persian Ruby	T	EUA	7	12	31,9	S
Stellar Double Rose	D	EUA	6	12	40,3	S
Watermelon Slice	T	EUA	6	12	73,5	S
Roswitha (R)	D	EUA	5	13	170	S
Rosy Rhino	T	EUA	6	13	15,0	S
Little Peanut	D	EUA	6	14	93,3	S
German Highlight	D	DE	4	14	67,2	MS
Romantic Rose	D	NL	6	14	13,6	MS
Stella d'Oro (MR)	D	EUA	6	12	13,6	MR
Bitsy (R)	D	EUA	6	>16	4,47	MR
Cherry Tiger	T	NL	6	>16	3,57	MR

¹Cultivar: ‘Bitsy’, ‘Roswitha’ e ‘Stella d’Oro’ são cultivares com nível de resistência à ferrugem conhecida; ‘Jerry Nettles’, ‘Raspberries in Cream’ e ‘Wild Cherry’ são cultivares que mostraram suscetibilidade à ferrugem em condições de campo na população de *Hemerocallis* identificada em Sobral de Monte Agraço.

²Ploidia: D- Diploide; T- Tetraploide.

³Origem: EUA- Estados Unidos da América; UK- Reino Unido; DE- Alemanha; NL- Holanda.

⁴DAI: Dias após a inoculação.

⁵Categoria de resistência: MR- Moderadamente resistente; R- Resistente; MS- Moderadamente suscetível; S- Suscetível.

⁸ <https://garden.org/plants/view/33472/Daylily-Hemerocallis-Raspberries-in-Cream/>

Os genótipos suscetíveis à ferrugem começaram a mostrar sintomas entre o 4º e o 7º dia após a inoculação (Quadro 14), o que incluía o aparecimento de pequenas manchas cloróticas, inicialmente bastante discretas que aumentaram de dimensão no decorrer do processo de infecção, originando manchas amarelas em estrias.

O período latente terminou entre o 9º e o 14º dia após a inoculação (Quadro 14), geralmente dois dias depois do surgimento das primeiras pústulas. A senescência e formação de manchas necróticas resultado do envelhecimento das folhas potenciado pelo fungo foi bastante evidente nas cultivares 'Declaration of Love', 'Indian Sky', 'Romantic Rose' e 'Watermelon Slice' (Figura 14).

Também foi possível verificar que o período de incubação e o período latente foram idênticos nas cultivares 'Norton Orange' e 'Norton Signal', mostrando os primeiros sintomas ao 4º dia após a inoculação, com libertação dos primeiros uredósporos seis dias depois (Quadro 14). Da mesma forma, para as cultivares 'Indian Sky', 'Stellar Double Rose' e 'Watermelon Slice', o período de incubação e latente foram similares (Quadro 14).

As cultivares que registaram idêntico período de incubação não mostraram qualquer tipo de relação, no que diz respeito à quantidade de uredósporos/cm². Porém, as cultivares que registaram maior período latente foram as que mostraram ser moderadamente resistentes e moderadamente suscetíveis, verificando-se também que estas cultivares produziram menos uredósporos em comparação com as cultivares suscetíveis que registaram um período latente inferior.

O número de uredósporos libertados foi estimado no último dia do ensaio, sendo possível verificar que em 'Modest Hedwing', 'Norton Orange' e 'Roswitha' registou-se maior quantidade de uredósporos, enquanto que nas cultivares 'Declaration of Love', 'Indian Sky', 'Rosy Rhino' e 'Persian Ruby' a formação de uredósporos foi inferior. A reduzida produção de uredósporos verificada na cultivar 'Declaration of Love' não coincide com a percentagem de área foliar correspondente ao número de pústulas (Figura 14, Quadro 14). Esta incoerência pode ser explicada à ocorrência de uma esporulação precoce verificada para esta cultivar, em comparação com as restantes (Quadro 14), o que pode ter resultado numa acentuada libertação dos uredósporos durante a monitorização diária das folhas até ao último dia do ensaio.

As cultivares 'German Highlight' e 'Romantic Rose' foram classificadas como moderadamente suscetíveis, devido ao aparecimento de pequenas lesões cloróticas que tiveram um desenvolvimento bastante lento no decorrer do ensaio. Sobre algumas cloroses houve o desenvolvimento de pústulas que esporularam 14 dias após a inoculação (Quadro 14), assim como algumas lesões necróticas impercetíveis a olho nu (Figura 15).

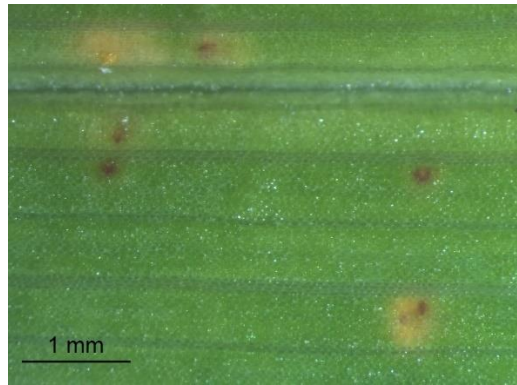


Figura 15. Presença de cloroses, soros uredospóricos e lesões necróticas na página inferior em *Hemerocallis* 'German Highlight', observada ao 16^o dia após a inoculação.

As cultivares moderadamente resistentes distinguiram-se pelo desenvolvimento de manchas necróticas a partir das cloroses formadas inicialmente (6 dias após a inoculação) (Quadro 14). No entanto, a cultivar 'Cherry Tiger' manteve as manchas cloróticas durante mais tempo em relação às outras duas cultivares moderadamente resistentes (Figura 14). As lesões necróticas sugerem estar associadas ao mecanismo de defesa da planta, através do colapso das células dos tecidos vegetais que envolvem o foco de infecção com o objetivo de condicionar o desenvolvimento do agente patogénico (Morel & Dangl, 1997).

Durante a monitorização das cultivares 'Bitsy' e 'Cherry Tiger' não se verificou a formação de pústulas e consequente esporulação. Uma vez que a fungo não esporulou nas cultivares 'Bitsy' e 'Cherry Tiger' durante o intervalo de tempo definido para o ensaio (Quadro 14), estas deveriam ser classificadas de resistentes ao invés de moderadamente resistentes, no entanto algumas semanas após a conclusão do ensaio constatou-se uma massa de uredósporos sobre as manchas necróticas (Figura 16). O mesmo se verificou na 'Stella d'Oro', em que a ferrugem formou pústulas que libertaram uredósporos 12 dias após a inoculação (Quadro 14). Os uredósporos encontrados em 'Bitsy' e 'Cherry Tiger' durante a estimativa da esporulação (Quadro 14), no final do ensaio, poderão ter resultado de pequenas esporulações, macroscopicamente impercetíveis.

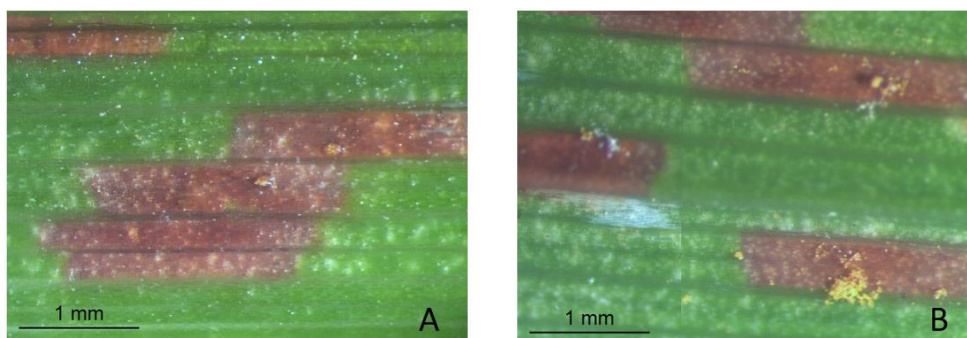


Figura 16. Sintomas (e sinal) causados por *Puccinia hemerocallidis* em *Hemerocallis* 'Bitsy', observadas um mês após a inoculação. A- Pústulas sobre lesões necróticas na página superior; B- Uredósporos sobre lesões necróticas na página inferior da folha.

De forma a averiguar a variação dos quatro parâmetros sintomatológicos, assim como a área total média afetada pela doença das 17 cultivares ao longo do ensaio, procedeu-se à análise estatística aplicando o teste de Tukey ($p < 0,05$). De acordo com os resultados da análise estatística (Ver anexo), constata-se que as percentagens médias registadas para as cloroses, pústulas, necroses e senescência resultando na área total afetada não foram significativamente diferentes ao longo do ensaio para as cultivares 'Little Peanut', 'Norton Orange', 'Norton Signal', 'Roswitha' e 'Rosy Rhino'. A mesma situação se verificou para as duas cultivares moderadamente suscetíveis ('German Highlight' e 'Romantic Rose'). As cultivares 'Modest Hedwing' e 'Stellar Double Rose' não apresentaram diferenças significativas em relação à área total doente, clorótica, necrótica e senescente, exceto na área correspondente a pústulas. A cultivar 'Carla's Pretty' não mostra diferenças significativas em relação à área total doente, necrótica e senescente. As cultivares suscetíveis que mostraram uma variação significativamente para todos os parâmetros medidos foram a 'Indian Sky' e a 'Declaration of Love'. A 'Watermelon Slice' apenas não mostrou diferenças significativas para a área correspondente às pústulas e necroses.

Em relação às cultivares moderadamente resistentes, a área total doente, assim como os restantes parâmetros, não apresentaram diferenças significativas nas cultivares 'Bitsy' e 'Cherry Tiger', em oposição à cultivar 'Stella d'Oro'.

Ao comparar, através da análise estatística, os parâmetros sintomatológicos registados em cada um dos dias do ensaio, é possível concluir que as variedades que não possuem parâmetros significativamente diferentes são menos suscetíveis à doença, porque a evolução dos sintomas é menos evidente e rápida. Nas cultivares mais suscetíveis, o desenvolvimento da doença é mais rápido e notório, levando que os parâmetros sintomatológicos entre os dias do ensaio sejam significativamente diferentes.

Ao analisar os gráficos alusivos à evolução da percentagem da área média correspondente aos parâmetros em estudo é possível notar a oscilação entre alguns valores

registados, principalmente nas cultivares 'Modest Hedwing', 'Roswitha', 'Rosy Rhino' e 'Stellar Double Rose' (Figura 14). As oscilações presentes nos gráficos poderão deve-se ao facto de algumas folhas usadas na monitorização da doença possuírem lesões provocadas por ácaros, o que dificultou a análise cromática feita pelo *software* WinFOLIA.

O valor da percentagem média de cada parâmetro sintomatológico para as 17 cultivares foi analisado estatisticamente, aplicando o teste de Tukey ($p < 0,05$) (Quadro 15), com a finalidade de comparar as cultivares entre si. As cultivares 'Cherry Tiger', 'German Highlight', 'Little Peanut', 'Norton Orange', 'Norton Signal', 'Persian Ruby', 'Romantic Rose' e 'Rosy Rhino' não são significativamente diferentes em relação à média das áreas com cloroses, pústulas, necroses, senescência e à área total com doença, possuindo os valores médios mais baixos para estes parâmetros. Em relação à média da área total afetada pela doença, as cultivares 'Indian Sky', 'Roswitha', 'Stella d'Oro' e 'Watermelon Slice' são as que possuem maior área doente, não sendo significativamente diferentes. As cultivares que não são significativamente diferentes, registando as maiores áreas médias em relação às cloroses, são a 'Carla's Pretty', 'Declaration of Love', 'Roswitha', 'Stella d'Oro' e 'Watermelon Slice'. As cultivares que formaram maior quantidade de pústulas foram a 'Indian Sky', 'Declaration of Love', 'Modest Hedwing' e 'Stella d'Oro', não sendo significativamente diferentes entre si. As cultivares 'Indian Sky' e 'Stella d'Oro' foram as que registam maior área com necroses, no entanto as necroses formadas pela última cultivar resultaram da resposta hipersensível desencadeada pela planta contra o patógeno, tendo sido mais intensa ao verificado para as cultivares 'Bitsy' e 'Cherry Tiger'. A cultivar 'Declaration of Love' é a que se destaca, com maior área média em todos os parâmetros em estudo, sendo significativamente diferente em relação a todas as outras cultivares nos valores correspondentes à área doente e necrosada.

Para melhorar a perceção da evolução da ferrugem em cada uma das cultivares procedeu-se ao cálculo da área sob a curva de progresso da doença (AUDPC) (Quadro 15) que fornece um resumo quantitativo da intensidade da doença ao longo dos dias (Jeger & Viljanen-Rollinson, 2001), para facilitar a comparação dos parâmetros sintomatológicos definidos entre as cultivares.

Os valores obtidos na determinação da AUDPC foram apresentados em forma de gráfico, em que o conjunto da quantidade da área afetada com cloroses, pústulas, necroses e senescência originam a área total doente da folha (Figura 17). Através da observação do gráfico AUDPC (Figura 17) torna-se evidente que as cultivares 'Declaration of Love', 'Indian Sky', 'Roswitha', 'Stella d'Oro' e 'Watermelon Slice' foram as que apresentaram maior área foliar afetada pela doença, em oposição às cultivares 'German Highlight', 'Norton Orange', 'Norton Signal' e 'Persian Ruby'.

Quadro 15. Área sob a curva de progressão da doença (AUDPC) correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada para cada cultivar de lírio-de-um-dia inoculada com *Puccinia hemerocallidis* e respectiva análise estatística aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Cultivar	CR ¹	Cloroses	Pústulas	Necroses	Senescência	Área total afetada
German Highlight	MS	27,87 a	0,16 a	0,00 a	0,00 ab	28,03 ab
Norton Orange	S	25,89 a	3,55 a	0,00 a	0,08 a	29,52 a
Norton Signal	S	26,81 a	4,39 a	0,00 a	0,00 a	31,21 a
Persian Ruby	S	23,77 a	5,28 ab	0,00 a	3,64 ab	32,70 ab
Romantic Rose	MS	30,69 a	7,01 ab	1,83 a	18,90 ab	58,43 abc
Little Peanut	S	39,88 a	16,91 abc	2,74 a	6,38 ab	65,91 abc
Cherry Tiger	MR	75,41 abc	0,00 a	0,93 a	1,00 a	77,34 abcd
Rosy Rhino	S	69,97 ab	11,47 ab	6,96 a	0,53 a	88,93 abcd
Bitsy	MR	36,53 a	0,00 a	37,05 ab	27,04 ab	100,62 abcd
Modest Hedwing	S	78,65 abcd	30,37 abcd	0,01 a	4,41 ab	113,45 abcde
Carla's Pretty	S	95,42 bcde	25,07 abc	2,44 a	9,21 ab	132,14 bcde
Stellar Double Rose	S	76,40 abc	44,39 abcd	13,92 ab	0,00 a	134,71 cde
Roswitha	S	128,78 de	16,78 abc	3,41 a	4,43 a	153,40 def
Watermelon Slice	S	133,95 e	10,44 abcd	7,64 a	41,34 abc	193,37 ef
Stella d'Oro	MR	120,81 cde	0,00 a	81,01 abc	1,84 a	203,66 ef
Indian Sky	S	58,81 ab	35,99 abcd	64,18 abc	75,06 abcd	234,04 f
Declaration of Love	S	120,55 bcde	40,59 abcd	165,32 d	104,47 abcd	430,94 g

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

¹Categoria de resistência: MR- Moderadamente resistente; MS- Moderadamente suscetível; S- Suscetível.

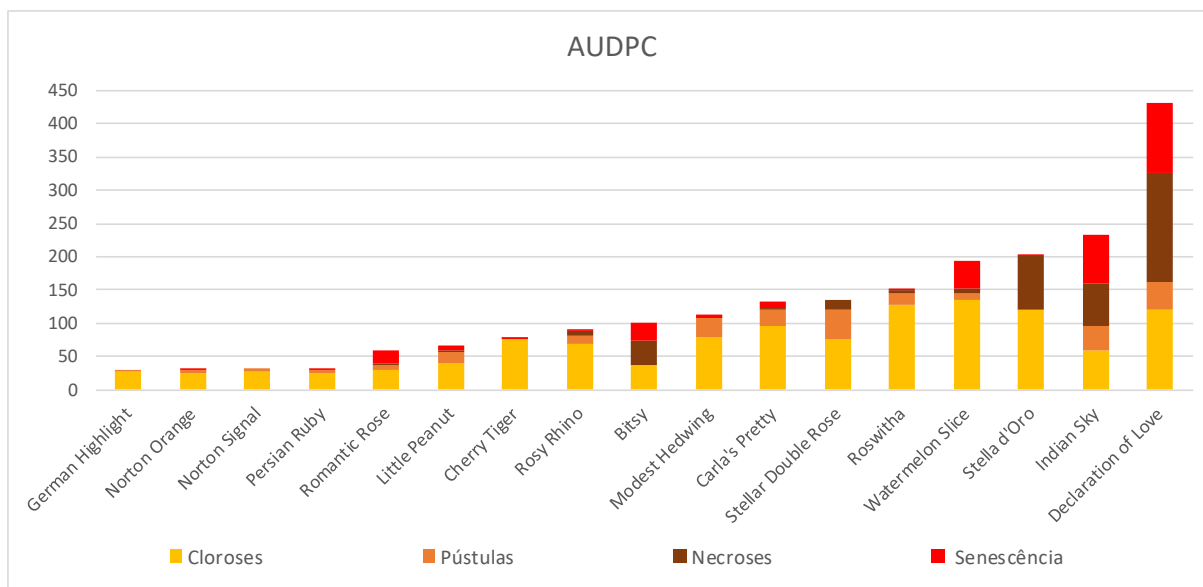


Figura 17. Área sob a curva de progressão da doença (AUDPC) correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada para cada cultivar de lírio-de-um-dia inoculada com *Puccinia hemerocallidis*.

4.2.2. Caracterização histológica de interações contrastantes

Ao inocular a coleção de lírios-de-um-dia foi possível avaliar o nível de resistência de cada uma das cultivares à ferrugem através da monitorização da evolução dos sintomas presentes nas folhas. No entanto, para melhor entender as diferentes respostas do hospedeiro ao agente patogénico, optou-se por selecionar uma cultivar suscetível ('Indian Sky') e outra moderadamente resistente ('Bitsy'), para efetuar estudos histológicos.

A observação dos moldes de verniz feitos à superfície foliar da folha permitiu visualizar o tubo germinativo e a formação de apressórios em uredósporos germinados (Figura 18). No entanto, também foi possível notar que a taxa de germinação dos uredósporos foi cerca de 10% nas duas cultivares. A baixa taxa de germinação dos uredósporos impossibilitou a determinação da taxa de formação de apressórios e condicionou todo o estudo histológico previsto, devido ao baixo número de infeções causadas pelos uredósporos.

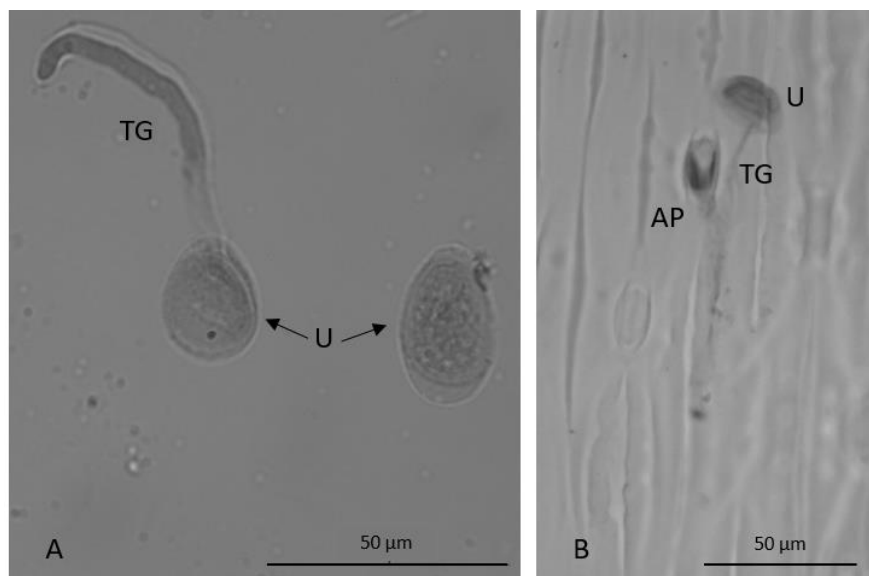


Figura 18. Processo de germinação dos uredósporos de *Puccinia hemerocallidis* sobre a cultivar de *Hemerocallis* 'Indian Sky'. Diferenciação do tubo germinativo (TG) dos uredósporos (U) (A, B) e formação de um apressório (AP) no final do tubo germinativo (B), 24 horas após a inoculação.

Os cortes histológicos apenas foram realizados a fragmentos de folhas destacadas sete dias após a inoculação, quando estas já apresentavam sintomas. Nos tecidos celulares das cultivares 'Bitsy' e 'Indian Sky' (Figura 19), observados ao microscópio, foi possível observar a presença de hifas de penetração dentro da cavidade subestomática, que deram origem uma célula mãe do haustório que penetra na célula vegetal e diferencia uma estrutura conhecida como "neckbands" que aumenta de tamanho, permitindo à hifa tornando-se num haustório (Emmitt, 2016). Na cultivar 'Bitsy' (Figura 20) verificou-se a presença de células mortas do hospedeiro, mostrando que a resposta de defesa da planta não foi rápida o suficiente para impedir o desenvolvimento inicial do fungo.

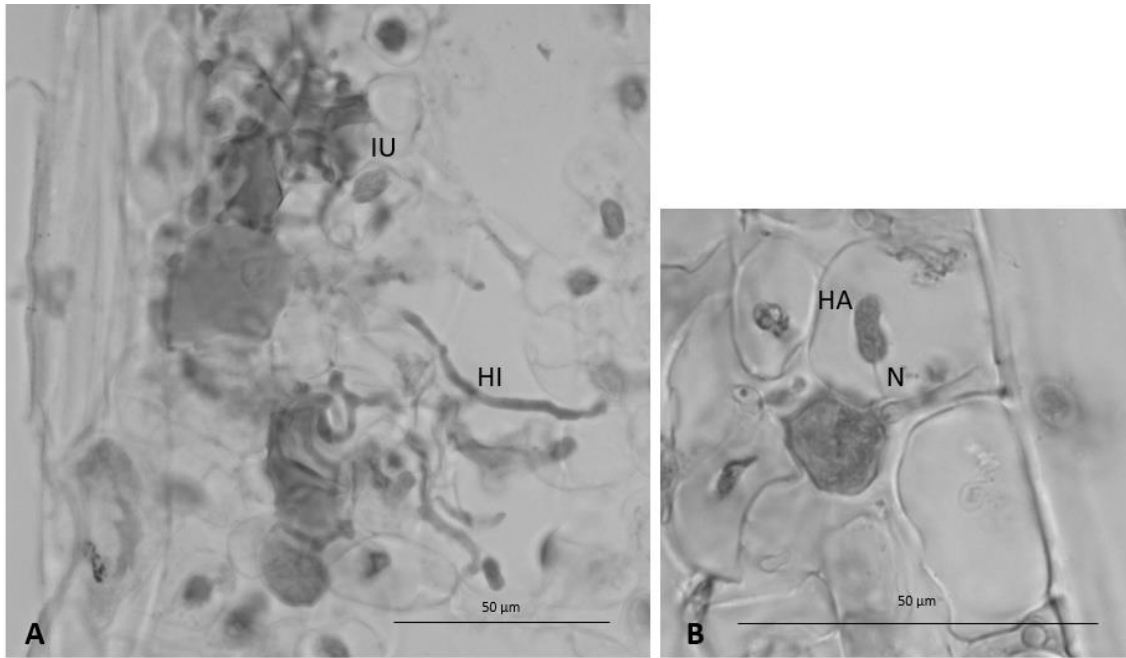


Figura 19. Processo de infecção de *Puccinia hemerocallidis* sobre a cultivar de *Hemerocallis* 'Indian Sky' (interação compatível), 7 dias após a inoculação. Presença de várias hifas intercelulares (HI) (A), que formam “neckbands” (N) e haustórios (HA) dentro das células do mesofilo (B). Início da formação de um soro uredospórico (IU) sob a cutícula (A).

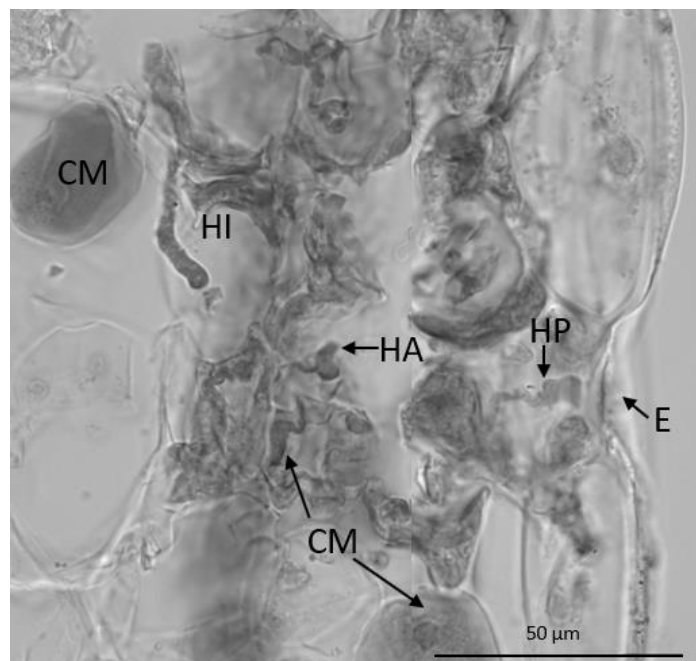


Figura 20. Processo de infecção de *Puccinia hemerocallidis* sobre a cultivar de *Hemerocallis* 'Bitsy' (interação selecionada como incompatível), 7 dias após a inoculação. Presença de uma hifa de penetração (HP) dentro da cavidade subestomática (E), hifas intercelulares (HI) haustórios (HA) e células mortas da planta (CM).

Cerca de um mês depois da inoculação das cultivares foi possível voltar a realizar cortes histológicos a segmentos de folhas destacadas para as mesmas cultivares em estudo. Para as cultivares 'Bitsy' e 'Indian Sky' foram observados soros uredospóricos com os respectivos uredósporos, no entanto para a cultivar 'Bitsy' foi possível ver várias células mortas sob a estrutura da pústula formada (Figura 21).

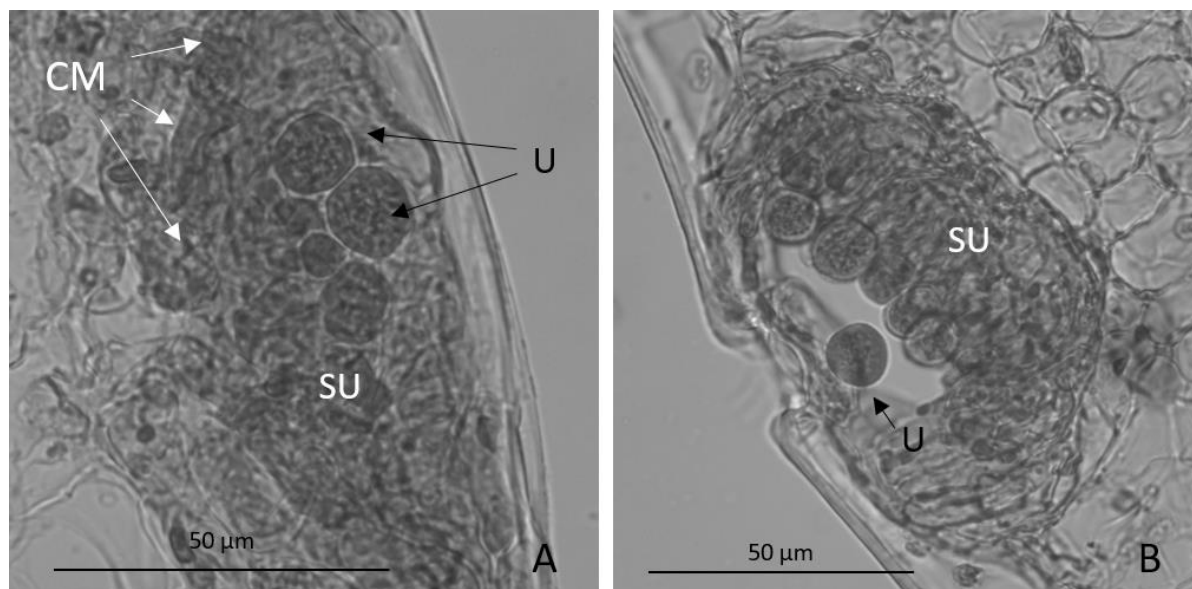


Figura 21. Processo de infecção de *Puccinia hemerocallidis* sobre as cultivares de *Hemerocallis* 'Bitsy' (A) (interação selecionada como incompatível) e 'Indian Sky' (B) (interação compatível), 1 mês após a inoculação. Soros uredospóricos (SU) sob a cutícula com uredósporos (U) no seu interior (A, B). Presença de células mortas (CM) em redor do soro uredospórico (SU) (A).

4.2.3. Resistência de *Hemerocallis* à ferrugem

De acordo com as condições de temperatura e humidade a que as cultivares de *Hemerocallis* foram sujeitas, assim como o isolado (Ph14) usado para conhecer o nível de resistência à ferrugem, foi verificada a existência de três respostas das plantas em relação ao fungo, nomeadamente moderadamente resistente, moderadamente suscetível e suscetível, de acordo com a classificação desenvolvida por Li *et al.* (2007).

O estabelecimento de relações entre as características do lírio-de-um-dia (época de floração, tipo de folhagem e ploidia) com os diferentes níveis de resistência à ferrugem poderá ser pouco consistente para o pequeno número de cultivares em estudo. Contudo, em relação à ploidia é possível constatar, que 10 das 15 cultivares suscetíveis são tetraploides, as duas cultivares moderadamente suscetíveis são diploides e uma das três cultivares moderadamente resistentes é tetraploide (Quadro 14). Estas proporções não correspondem ao observado por Robbins & Vann (2002), Robbins (2003), Mueller & Buck (2003) e Blythe *et*

al. (2015), que sugerem uma possível tendência das cultivares tetraploides serem mais suscetíveis à ferrugem do que as cultivares diploides.

A coleção de *Hemerocallis* estudada no presente trabalho incluía três cultivares em que os níveis de resistência à ferrugem tinham sido caracterizados em trabalhos anteriores.

No presente estudo e nas condições testadas a cultivar 'Roswitha', neste estudo, mostrou ser suscetível à ferrugem ao desenvolver os primeiros sintomas cinco dias após a inoculação, que se expressaram inicialmente através de pequenas pontuações cloróticas que aumentaram de dimensão, formando manchas amarelas em estrias e após 13 dias da inoculação iniciou-se a esporulação (Quadro 14). No entanto, a resposta desencadeada pela cultivar à infeção provocada pelo patogénio não coincide com a classificação de resistência atribuída por Robbins & Vann (2002). Devido à falta de informação relativa aos métodos usados na elaboração do estudo daqueles autores apenas é permitido especular possíveis origens da discrepância entre os resultados obtidos. As condições ambientais do Arkansas (EUA) (local onde o estudo foi realizado), o caso de nem todas as plantas terem sido expostas ao inóculo (Blythe *et al.*, 2015), a inadequada concentração de uredósporos usada durante a inoculação e/ou a utilização de um isolado de *P. hemerocallidis* com diferente nível de virulência, podem ter sido possíveis fatores que dificultaram o desenvolvimento do agente patogénico e consequentemente a obtenção de resultados. Curiosamente, 'Janice Brown' uma das cultivares que dá origem à 'Roswitha' é classificada como resistente à ferrugem (Robbins & Vann, 2002).

A cultivar 'Stella d'Oro' mostrou ser moderadamente resistente, devido ao facto de terem sido observadas pequenas lesões necróticas nas folhas a partir do 6º dia após a inoculação, aumentando de tamanho ao longo do tempo. Sob as lesões necróticas surgiram Soros uredospóricos que esporularam ao 12º dia após a inoculação. A descrição da evolução dos sintomas causados por *P. hemerocallidis* para esta cultivar, assim como a classificação atribuída, vai de encontro ao estudo realizado por Mueller *et al.* (2003). A 'Stella d'Oro' também foi estudada por Hsiang *et al.* (2004) e Li *et al.* (2007), através da inoculação de uma folha destacada mantida em câmara húmida numa placa de Petri a uma temperatura constante de 20°C e uma luz contínua de 40 W, após a incubação no escuro durante 24 horas. No ensaio realizado por Li *et al.* (2007), a cultivar 'Stella d'Oro' foi classificada como sendo resistente à ferrugem porque exibiu lesões necróticas sem esporular, o que possivelmente se deveu ao facto do ensaio ter tido uma duração de 10 dias. Revelando que o intervalo de tempo dedicado ao ensaio não foi o suficiente para a esporulação ocorrer, de acordo com os dados obtidos por Mueller *et al.* (2003), Hsiang *et al.* (2004) e com o que se observou no decurso do presente trabalho.

A informação relativa ao nível de resistência da cultivar 'Bitsy' à ferrugem foi obtida na base de dados disponibilizada pela The National Gardening Association⁹ (2019), onde indica que esta cultivar é resistente, não especificando o motivo da classificação atribuída. A informação disponibilizada pela base de dados não corresponde aos resultados obtidos neste trabalho. As primeiras lesões necróticas nas folhas surgiram 6 dias após a inoculação, contudo a esporulação foi bastante tardia, tendo apenas sido verificada um mês depois da inoculação. A esporulação para além de tardia, também foi reduzida, fator que pode levar a uma conclusão incorreta devido ao facto das observações realizadas para caracterizar o nível de resistência à *P. hemerocallidis* terem decorrido 10 a 20 dias após a inoculação (Mueller *et al.*, 2003; Hsiang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007). A partir da visualização dos cortes histológicos realizados a um fragmento de folha da cultivar 'Bitsy', um mês após a inoculação, foi possível comprovar a formação de pústulas e consequente libertação de uredósporos pelo fungo. As pústulas observadas estavam rodeadas por células mortas do hospedeiro (Figura 21), certificando que a planta iniciou o mecanismo de resistência (resposta hipersensível) (Figura 20). Porém, trata-se de uma resposta lenta que limita o crescimento e a proliferação do fungo nos tecidos da planta (Li *et al.*, 2007), o que levou a uma pequena e tardia esporulação e formação de evidentes lesões necróticas.

A existência de diferentes avaliações em relação ao nível de resistência das cultivares de *Hemerocallis* à ferrugem, evidencia que as plantas podem mostrar diferentes sintomas sob a influência de outros fatores externos para além do agente patogénico, como as condições ambientais (Mueller & Buck, 2003). A influência dos fatores externos poderá ter sido a causa dos diferentes resultados obtidos entre o presente trabalho e Robbins & Vann (2002) para a cultivar 'Roswitha'. As diferenças genéticas verificadas entre isolados de *P. hemerocallidis* de regiões geográficas distintas podem representar a existência de patótipos da ferrugem, que podem diferir em nível de virulência (Buck, 2013), o que poderá ser um fator a considerar na determinação do nível de resistência, caso este facto se confirme em trabalhos futuros.

A partir da avaliação feita do nível de resistência das cultivares europeias à ferrugem é possível inferir que das sete cultivares da coleção, uma delas é moderadamente resistente ('Cherry Tiger') (Quadro 14). As duas únicas cultivares moderadamente suscetíveis de toda a coleção são europeias ('German Highlight' e 'Romantic Rose') (Quadro 14), enquanto que as restantes cultivares são suscetíveis à ferrugem, sendo que a 'Carla's Pretty' e a 'Declaration of Love' são mais suscetíveis à ferrugem do que a 'Norton Orange' e 'Norton Signal' (Figura 17). Curiosamente, todas as cultivares europeias suscetíveis à ferrugem são tetraploides, exceto a 'Cherry Tiger' que é moderadamente resistente. Devido ao pequeno número de cultivares em estudo é pouco consistente estabelecer algum tipo de relação entre

⁹ <https://garden.org/plants/view/4937/Daylily-Hemerocallis-Bitsy/>

as diferentes proveniências das cultivares, contudo as cultivares europeias suscetíveis registaram um período de incubação e um período latente inferiores comparativamente com as cultivares americanas.

Em relação aos cortes histológicos feitos para as cultivares 'Indian Sky' e 'Bitsy' não foi possível caracterizar o processo inicial de infeção do agente patogénico, entre a inoculação e o aparecimento dos primeiros sintomas nas folhas, porque a taxa de germinação dos uredósporos verificada em ambas as cultivares foi muito baixa. O reduzido número de uredósporos germinados condicionou a realização dos cortes histológicos devido à dificuldade acrescida de encontrar microscopicamente as várias etapas do processo de infeção causada pela entrada dos apressórios na câmara estomática. No entanto, sete dias após a inoculação quando as folhas de ambas as cultivares mostravam sintomas, os cortes histológicos feitos permitiram visualizar a colonização do fungo nos tecidos celulares do hospedeiro.

Neste trabalho, o objetivo de caracterizar microscopicamente o processo inicial de infeção do fungo em duas cultivares com níveis de resistência mais dispares da coleção não foi conseguido, mas através de cortes histológicos feitos sete dias e um mês após a inoculação, foi possível observar diferentes interações entre o hospedeiro e o fungo. Na cultivar suscetível ('Indian Sky') visualizaram-se várias estruturas fúngicas (Figuras 19 e 21) que correspondem aos sintomas macroscópicos presentes nas folhas, não se verificando nenhuma resposta celular de resistência da planta com o propósito de condicionar o normal desenvolvimento do fungo. Ao contrário dos cortes histológicos feitos a um fragmento de folha da cultivar 'Bitsy' é possível verificar várias células mortas do hospedeiro (Figuras 20 e 21) que restringem o desenvolvimento do fungo, tornando-se evidente nas lesões necróticas nas folhas e na esporulação tardia. De acordo com os resultados conseguidos no estudo histológico foi possível distinguir as duas cultivares consoante o seu nível de resistência a *P. hemerocallis*, sendo possível confirmar que a ferrugem na cultivar 'Bitsy' produz uredósporos, contrariando a classificação de resistente atribuída por The National Gardening Association (2019).

Para além de caracterizar histologicamente cultivares suscetíveis e moderadamente resistentes, o trabalho elaborado por Li *et al.* (2007) também contemplou o estudo de uma cultivar considerada altamente resistente, onde foi possível verificar, microscopicamente, células mortas da planta dois dias após a inoculação. Desta forma o hospedeiro conseguiu impedir eficazmente o desenvolvimento do agente patogénico sem mostrar sintomas nas folhas. Seria, portanto, interessante proceder à realização do estudo histológico mais aprofundado de todo o processo de colonização do agente patogénico de todas as respostas de resistência à ferrugem (Quadro 3), com o objetivo de conhecer os diferentes mecanismos celulares de resistência da planta, que conduzem aos diferentes níveis de resistência à ferrugem.

A realização de estudos histológicos exige uma distribuição abundante e uniforme dos uredósporos sobre a superfície foliar com uma elevada taxa de germinação dos uredósporos para um elevado número de infecções. O uso do pincel para espalhar os uredósporos na página inferior da folha poderá ter sido a causa para o insucesso deste estudo em específico, devido à deficiente distribuição dos uredósporos nas folhas responsável pela existência de frações foliares com excesso e escassez de uredósporos. Nos locais com excesso de uredósporos a competição entre estes é superior podendo condicionar a sua viabilidade, no entanto quando a distribuição destes na folha é baixa a probabilidade de encontrar esporos germinados é bastante reduzida, ou seja, ambas as situações podem levar a uma baixa taxa de germinação dos uredósporos.

5. Conclusões

Através do estudo dos uredósporos correspondentes aos isolados de *P. hemerocallidis* encontrados em quatro regiões distintas (Ph02, Ph06, Ph14 e Ph16), foi possível concluir que estes mostravam pequenas diferenças, uma vez que as características biométricas indicam que o tamanho dos uredósporos dos isolados Ph02 e Ph06 é inferior aos dos isolados Ph14 e Ph16. A sequenciação da região rDNA-ITS de cada isolado também permitiu verificar que existem pequenas nuances entre as sequências genéticas dos isolados. Quando comparadas com a região ITS de *P. hemerocallidis* proveniente de outras regiões do mundo, constata-se que as sequências dos isolados Ph06, Ph14 e Ph16 (Madeira, Porto Covo e Lagos) são idênticas às dos isolados encontrados nos EUA e Costa Rica, enquanto que a sequência do isolado Ph02 (Sobral de Monte Agraço) é idêntica à dum isolado mexicano. Através das diferenças verificadas entre os isolados é possível suspeitar de múltiplas introduções da ferrugem do lírio-de-um-dia em Portugal, no entanto oriundas da mesma região geográfica (centro e norte da América). Ainda assim, a reduzida diversidade genética amostrada em Portugal não sugere a existência de raças fisiológicas, corroborando alguma incerteza que existe a este respeito a nível internacional. Esta questão necessita aprofundamento, implicando, no entanto, a realização de estudos comparativos de isolados de *P. hemerocallidis* de diferentes proveniências geográficas em interação com uma coleção de cultivares de *Hemerocallis* e de germoplasma espontâneo de espécies do género.

O tamanho genómico estimado para os isolados de *P. hemerocallidis* é de $318 \pm 26,1$ Mpb. Este valor é bastante semelhante ao tamanho médio do genoma para espécies da ordem Pucciniales (335,6 Mpb) (Ramos *et al.*, 2015). Pucciniales é considerada a ordem com maior tamanho médio do genoma em comparação com o tamanho médio geral dos fungos, indincando que *P. hemerocallidis* possui uma tamanho genómico bastante grande. No entanto, a determinação do tamanho genómico foi feito com isolados supostamente oriundos do centro ou norte da América, não incluído isolados asiáticos. Tendo este facto em conta não é possível concluir se existe variabilidade do tamanho genómico entre isolados de *P. hemerocallidis* provenientes de outros continentes. A análise do tamanho do genoma de isolados dos restantes continentes poderá permitir averiguar se o tamanho genómico é significativamente variável entre isolados, e de que forma presumíveis diferenças estarão relacionadas com a diversidade reportada pela análise da região ITS. O tamanho genómico da espécie poderá ser uma importante fonte de diversidade genética, contribuindo para uma rápida evolução adaptativa do fungo em diferentes condições.

Dentro da coleção de lírio-de-um-dia em estudo, apenas três cultivares mostraram ser moderadamente resistentes, nomeadamente a 'Bitsy', 'Stella d'Oro' e 'Cherry Tiger'. As cultivares europeias 'German Highlight' e 'Romantic Rose' mostraram ser moderadamente

suscetíveis, diferenciando-se das restantes cultivares suscetíveis devido à menor área foliar afetada por cloroses.

A quantificação da área foliar afetada com manchas cloróticas, pústulas, necroses e senescência em plantas envasadas mostrou ser um método bastante útil e preciso na determinação do nível de resistência à ferrugem, em adição às metodologias de avaliação qualitativa normalmente usadas. Através do método usado foi possível perceber que a evolução dos sintomas nas cultivares suscetíveis 'Little Peanut', 'Norton Orange', Norton Signal', 'Roswitha' e 'Rosy Rhino' é pouco significativa ao longo do ensaio, indicando que estas são menos suscetíveis à ferrugem do que as cultivares 'Indian Sky', 'Declaration of Love' e 'Watermelon Slice', em que o aumento da área total afetada pela doença é superior. O facto de existirem cultivares mais suscetíveis à doença do que outras leva que a disseminação da ferrugem possa ser mais ou menos problemática consoante a quantidade de esporos produzida em função da cultivar. Tal triagem implica métodos quantitativos de avaliação do progresso da doença, como os usados no presente trabalho. O estudo permitiu ainda mostrar que avaliação do nível da ferrugem não difere entre a página superior e inferior das folhas. Já a avaliação do nível de resistência à ferrugem em folhas destacadas, ensaiada várias vezes ao longo do período experimental (dados não apresentados), revelou ser pouco reprodutível. Para futuros estudos de avaliação da resistência de *Hemerocallis* à ferrugem recomenda-se, portanto, o uso de plantas envasadas em detrimento de folhas destacadas mantidas em câmara húmida, assim como a quantificação dos parâmetros sintomatológicos com recurso a um *software* específico para o efeito, de forma a oferecer uma avaliação mais precisa do nível de resistência à ferrugem.

A observação dos cortes histológicos realizados às folhas inoculadas da cultivar suscetível ('Indian Sky') e moderadamente resistente ('Bitsy') permitiu conferir o nível de resistência à ferrugem para cada cultivar ao se verificar o desenvolvimento do fungo nos tecidos celulares da planta. Em relação à 'Bitsy' foi possível visualizar células mortas da planta, adjacentes às células vegetais colonizadas por haustórios, com o objetivo de condicionar a progressão das hifas do fungo no tecido celular do hospedeiro. Este mecanismo de resistência é parcial, uma vez que o colapso das células da planta não é rápido o suficiente para condicionar a infeção do agente patogénico, levando ao aparecimento de lesões necróticas nas folhas. O facto do fungo se conseguir desenvolver, mesmo que condicionado pela resposta hipersensível do hospedeiro, justifica a formação tardia de algumas pústulas e a libertação de uredósporos sobre os tecidos necrosados. A classificação de moderadamente resistentes para as cultivares 'Bitsy' e 'Cherry Tiger' apenas foi atribuída um mês após a inoculação (superior ao intervalo de tempo definido para o ensaio), sendo possível concluir que é necessário aumentar o intervalo de tempo dedicado ao estudo das cultivares que mostrem lesões derivadas da resposta hipersensível do hospedeiro de modo a confirmar a

ocorrência ou não de esporulação. O estudo histológico feito às folhas infetadas foi uma importante ferramenta que permitiu caracterizar e distinguir as cultivares com diferentes níveis de resistência à ferrugem. Desta forma seria importante alargar e aprofundar este estudo a outras cultivares que mostrem diferentes interações entre a planta e *P. hemerocallidis*. Para além da observação microscópica dos tecidos vegetais, outras técnicas como a microscopia ótica de campo claro e de fluorescência para análise das fases pré- e pós-penetração do agente patogénico, podem ser aplicados com o propósito de caracterizar as respostas celulares e moleculares envolvidas nos diferentes níveis de resistência à ferrugem.

A partir da monitorização feita às populações de *Hemerocallis* presentes em Portugal para recolha de isolados de *Puccinia hemerocallidis*, para posterior caracterização, foi possível constatar que atualmente existem menos focos conhecidos de ferrugem no país em comparação com os registados em 2015 e 2016. A redução do número de populações da ornamental com ferrugem indica que a doença não se está a disseminar, mostrando-se apenas nos locais onde *P. hemerocallidis* foi detetada inicialmente. Isto, deve-se ao facto de várias populações de lírio-de-um-dia afetadas com a doença terem sido removidas, assim como a inexistente atividade viveirista desta ornamental em Portugal.

O facto da doença não se estar aparentemente a disseminar-se pelo país pode justificar o facto da ferrugem ainda não ter sido registada noutros países europeus desde da primeira deteção de *P. hemerocallidis* em populações de lírio-de-um-dia em Portugal. No entanto, a probabilidade da doença ser introduzida na Europa através da transação comercial de material vegetal infetado é muito forte. Adicionando o facto que quatro das sete cultivares europeias estudadas se apresentarem como suscetíveis à ferrugem, torna atualmente o continente europeu bastante vulnerável à doença. Neste sentido, a extensão da caracterização do nível de resistência para outras cultivares europeias de lírio-de-um-dia poderá representar uma vantagem no melhoramento genético de *Hemerocallis* através da seleção de cultivares resistentes a *P. hemerocallidis*.

6. Referências Bibliográficas

- ADS (2019a). *American Daylily Society* [<https://daylilies.org/>] (Acedido em 20 de julho de 2019).
- ADS (2019b). *Questions* [<https://daylilies.org/daylilies/faq/>] (Acedido em 27 de agosto de 2019).
- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. & Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), p. 3389–3402.
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Baker, G.P. (1937). *Hemerocallis: the daylily*. *Journal of the Royal Horticultural Society*, 62, p. 399.
- Bashir, Z.; Ahmad, A.; Shafique, S.; Anjum, T.; Shafique, S. & Akram, W. (2013). Hypersensitive Response – A Biophysical Phenomenon. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 3(2), p. 105-110.
<http://dx.doi.org/10.1556/EuJMI.3.2013.2.3>
- Blythe, E.K.; Pounders, C.; Anderson, M.; Watts, E. & Watts, B. (2015). Survey of 575 daylily cultivars for severity of daylily rust in a southern Mississippi landscape. *Hortechology*, 25(4), p. 551-564. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.25.4.551>
- Buck, J. & Williams-Woodward, J. (2003). The effect of fungicides on urediniospore germination and disease development of daylily rust. *Crop Protection*, 22(1), p. 135-140. [http://dx.doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00123-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00123-0)
- Buck, J.W. & Ono, Y. (2012) Daylily rust. *The Plant Health Instructor*. APS press, <http://dx.doi.org/10.1094/PHI-I-2012-0516-01>.
- Buck, J.W. (2013). Identification of pathotypes in the daylily rust pathogen *Puccinia hemerocallidis*. *Journal of Phytopathology*, 161(11-12), p. 784–790.
<https://doi.org/10.1111/jph.12134>
- Buck, J.W.; Dong, W. & Mueller, D.S. (2010). Effect of light exposure on in vitro germination and germ tube growth of eight species of rust fungi. *Mycologia*, 102(5), p. 1134–1140.
<https://doi.org/10.3852/09-283>
- Buck, J.W.; Wise, K. & Dong, W. (2011). Effect of postsymptom application of fungicides on urediniospore production by *Puccinia triticina* on wheat and *P. hemerocallidis* on daylily. *Plant Disease*, 95(3), p. 325-330. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-10-0646>

- Carlile, M.J.; Watkinson, S.C. & Gooday, G.W. (2001). *The Fungi*. Academic Press, London.
- Carvalho, A.; Coutinho, L. & Figueiredo, M. (2001). A primeira constatação da ferrugem do lírio-de-São-José nas Américas. *Arquivos do Instituto Biológico*, 68, p. 57.
- Carvalho, R.; Silva, E.; Loureiro, J.; Ramos, A.P & Talhinhos, P. (2018). Characterisation of *Puccinia hemerocallidis* causing the first outbreak of daylily rust in Europe. *Revista de Ciências Agrárias*, 41(Especial), p. 110-115. <https://doi.org/10.19084/RCA.17075>
- Celetti, M.; Hsiang, T. & Llewellyn, J. (2004). *Daylily Rust*. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. [<http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/04-089.htm>] (Acedido em 21 de maio de 2019)
- Chatasiri, S.; Kitade, O. & Ono, Y. (2006). Phylogenetic relationships among *Puccinia hemerocallidis*, *P. funkiae*, and *P. patriniae* (Uredinales) inferred from ITS sequence data. *Mycoscience*, 47(3), p. 123-129. <https://doi.org/10.1007/S10267-006-0283-Y>
- Chen, J.; Hall, D. & Luca, V. (2005). Effects of the growth retardant paclobutrazol on large-scale micropropagation of daylily (*Hemerocallis* spp.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 41(1), p. 58-62. <https://doi.org/10.1079/IVP2004595>
- Cummins, G.B. & Hiratsuka, Y. (2003). *Illustrated genera of rust fungi*. American Phytopathological Society, 3^a ed, St. Paul.
- D'Hondt, L.; Höfte, M.; Bockstaele, E.V. & Leus, L. (2011). Applications of flow cytometry in plant pathology for genome size determination, detection and physiological status. *Molecular Plant Pathology*, 12(8), p. 815-828. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00711.x>
- Dangl, J.L. & Jones, J.D.G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411(6839), p. 826-833. <https://doi.org/10.1038/35081161>
- Desjardins, P.R. & Conklin, D.S. (2011). Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Current Protocols in Molecular Biology*, 93(1), p. A.3J.1-A.3J.16. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mba03js93>
- Dietel, P. (1898). Einige Uredineen aus Ostasien. *Hedwigia*, 37, p. 212-218.
- Dietel, P. (1899). Uredinae japonicae. *Botanische Jahrbücher für Systematik*, 27, p. 564-576.
- Diniz, I.I.P.S. (2010). Respostas celulares e moleculares em interações hospedeiras e não hospedeiras cafeeiro-ferrugem (*Hemileia vastatrix* e *Uromyces vignae*). MSc, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal.

- Dixon, L.J.; Castlebury, L.A.; Aime, M.C.; Glynn, N.C. & Comstock, J.C. (2009). Phylogenetic relationships of sugarcane rust fungi. *Mycological Progress*, 9(4), p. 459-468.
<https://doi.org/10.1007/s11557-009-0649-6>
- Doležel, J. & Bartoš, J. (2005). Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany*, 95(1), p. 99-110. <https://doi.org/10.1093/aob/mci005>
- Doležel, J.; Sgorbati, S. & Lucretti, S. (1992). Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum*, 85(4), p. 625-631. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb04764.x>
- Dong, W. & Buck, J.W. (2011). Effect of light on in vivo urediniospore germination, lesion development and sporulation of *Puccinia hemerocallidis* on daylily and *Puccinia pelargonii-zonalis* on geranium. *Mycologia*, 103(6), p.1277-1283.
<https://doi.org/10.3852/11-047>
- Emmitt, R.S. (2016). *Management of daylily rust with different fungicides, fungicide combinations, and spray intervals and the determination of fungicide sensitivity profiles for Puccinia hemerocallidis*. MSc, University of Kentucky, Athens, EUA.
- EPPO (2002). First report of *Puccinia hemerocallidis* in Australia. *EPPO Reporting Service*, 2002, p. 38.
- EPPO (2009). *Puccinia hemerocallidis*. *EPPO Bulletin*, 39, p. 48-50.
- EPPO (2015). *EPPO A1 and A2 lists of pests recommended for regulation as quarantine pests*. EPPO, Paris.
- Erhardt, W. (1992). *Hemerocallis (daylilies)*. Timber Press, Portland.
- FRAC (2017). Fungicides sorted by mode of action. *FRAC Code List*.
- Galbraith, D.W.; Harkins, K.R.; Maddox, J.M.; Ayres, N.M.; Sharma, D.P. & Firoozabady, E. (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220(4601), p. 1049-1051. <https://doi.org/10.1126/science.220.4601.1049>
- Garber, M. (2004). *Daylily culture*. Cooperative Extension Service, Circular 545/reprint. Athens: College of Agricultural and Environmental Science.
- Gardes, M. & Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), p. 113-118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Garnica, D.P.; Nemri, A.; Upadhyaya, N.M.; Rathjen, J.P. & Dodds, P.N. (2014). The Ins and Outs of Rust Haustoria. *PLOS Pathogens*, 10(9), art. e1004329.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004329>

- Gulia, S.; Singh, B.; Carter, J. & Griesbach, R. (2009). Daylily: Botany, Propagation, Breeding. *Horticultural Reviews*, 35, p. 193-220.
<https://doi.org/10.1002/9780470593776.ch3>
- Hanson L.; Brown R.L.; Boyd A.; Johnson M.A. & Bennett M.D. (2003). First nuclear DNA C-values for 28 angiosperm genera. *Annals of Botany*, 91(1), p. 31-38.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcg005>
- HE (2008). *Hemerocallis History*. [http://www.hemerocallis-species.com/HE/html/English/Info_History_engl.html] (Acedido em 27 de setembro de 2019).
- He, X.; Luan, F.; Zhao, Z.; Ning, N.; Li, M.; Jin, L.; Chang, Y.; Zhang, Q.; Wu N. & Huang L. (2017). The Genus *Patrinia*: A Review of Traditional Uses, Phytochemical and Pharmacological Studies. *The American Journal of Chinese Medicine*, 45(4), p. 637-666. <https://doi.org/10.1142/S0192415X17500379>
- Hernández, J.; Palm, M. & Castlebury, L. (2002). *Puccinia hemerocallidis*, cause of daylily rust, a newly introduced disease in the Americas. *Plant Disease*, 86(11), p. 1194-1198.
<https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.11.1194>
- Hill, L. & Hill, N. (1992). *Daylilies: the perfect perennial*. A garden way publishing book, 3^a ed, Pownal.
- Hiratsuka, N.; Sato, T.; Katsuya, K.; Kakishima, M.; Hiratsuka, Y.; Kaneko, S.; Ono, Y.; Sato, S.; Harada, Y.; Hiratsuka, T. & Nakayama, K. (1992). *The rust flora of Japan*. Tsukuba Shuppankai Takezono, Ibaraki.
- Hsiang, T.; Cook, S. & Zhao, Y. (2004). Studies on Biology and Control of Daylily Rust in Canada. *The Daylily Journal*, 59(1), p. 47-57.
- Hu, S.Y. (1968). The species of *Hemerocallis*. *American Horticulture Magazine*, 47, p. 86-113.
- Inokuti, E.; Soares, D. & Barreto, R. (2012). Epidemic spread of *Puccinia hemerocallidis* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 7(1), p. 7-8. <https://doi.org/10.1007/s13314-011-0033-7>
- Jeger, M. & Viljanen-Rollinson, S. (2001). The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(1), p. 32–40. <https://doi.org/10.1007/s001220051615>
- Jones, D.R. & Sansford, C. (2005). *Pest Risk Analysis For UK Interceptions of Puccinia hemerocallidis*. Central Science Laboratory.

- [<https://secure.fera.defra.gov.uk/phiw/riskRegister/downloadExternalPra.cfm?id=3916>]
(Acedido em 5 de maio de 2019).
- Kang, S.S. & Chung, M.G. (1997). *Hemerocallis taeanensis* (Liliaceae), a new species from Korea. *Systematic Botany*, 22(3), p. 427-431. <https://doi.org/10.2307/2419818>
- Kirk, P.M.; Cannon, P.F.; Minter, D.W. & Stalpers, J.A. (2008). *Dictionary of the Fungi*. CABI, 10^a ed, Wallingford.
- Kishi, K. (1998). *Plant diseases in Japan*. Zenkoku-Nouson-Kyouiku-Kyoukai, Tokyo.
- Kurt, L.J. & Les, S.J. (2005). Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. *Molecular Plant Pathology*, 6(2), p. 99-111. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00273.x>
- Li, Y.H.; Trigiano, M.T.; Fare, R.N.; Spiers, D.C.; Copes, W.E. (2007). Microscopic and macroscopic studies of the development of *Puccinia hemerocallidis* in resistant and susceptible daylily cultivars. *Plant Disease*, 91(6), p. 661-668.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0664>
- Loureiro, A.; Azinheira, H.G.; Silva, M.C. & Talhinhos, P. (2015). A method for obtaining RNA from *Hemileia vastatrix* appressoria produced in planta, suitable for transcriptomic analyses. *Fungal Biology*, 119(11), p. 1093-1099.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.08.008>
- Loureiro, J.; Rodriguez, E.; Dolez, J. & Santos, C. (2006). Flow Cytometric and Microscopic Analysis of the Effect of Tannic Acid on Plant Nuclei and Estimation of DNA Content. *Annals of Botany*, 98(3), p. 515-527. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl140>
- Loureiro, J.; Rodriguez, E.; Doležel, J. & Santos, C. (2007). Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. *Annals of Botany*, 100(4), p. 875–888. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm152>
- Loureiro, J.C.M. (2007). *Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal*. PhD, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.
- Mahagamasekera, M.G.P. (2000). *Daylily (Hemerocallis) as a model system for the study of ethylene-insensitive flower senescence: tissue culture and aspects of the development of proteolytic enzyme activities, with special emphasis on leucine aminopeptidase*. PhD, University of Canterbury, Canterbury, UK.
- Malloch, D. (2019). *Discussion of the Pucciniomycotina*. [<http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/NaturalHistoryOfFungi/PucciniomycotinaDiscussion.html>]
(Acedido em 27 de dezembro de 2019)

- Maofan, Z.; Difu, B. & Chunsen, Z. (1998). *Atlas of Diseases and Pests of Medicinal Plants in China*. Hubei Scientific and Technological Press, Wuhan.
- McGarty, T.P. (2009). *Hemerocallis: Species, Hybrids and Genetics*. Author's Edition: Florham Park, New Jersey.
- McTaggart, A.R.; Shivas, R.G.; Doungsa-ard, C.; Weese, T.L.; Beasley, D.R.; Hall, B.H.; Metcalf, D.A. & Geering, A.D.W. (2016). Identification of rust fungi (Pucciniales) on species of *Allium* in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 45(6), p. 581-592. <http://dx.doi.org/10.1007/s13313-016-0451-2>
- Mendgen, K. & Hahn, M. (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science*, 7(8), p. 352-356. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02297-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02297-5)
- Morel, J.B. & Dangl, J.L. (1997). The hypersensitive response and the induction of cell death. *Cell Death and Differentiation*, 4, p. 671-683. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400309>
- Mostert, L.; Bester, W. & Coertze, S. (2008). First Report of Daylily Rust Caused by *Puccinia hemerocallidis* in the Western Cape Province of South Africa. *Plant Disease*, 92(7), p. 1133. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-7-1133A>
- Mueller, D. & Buck, J. (2003). Effects of light, temperature, and leaf wetness duration on daylily rust. *Plant Disease*, 87(4), p. 442-445. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.4.442>
- Mueller, D.; Williams-Woodward, J. & Buck, J. (2003). Resistance of daylily cultivars to the daylily rust pathogen, *Puccinia hemerocallidis*. *HortScience*, 38(6), p. 1137-1140. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.38.6.1137>
- Muthumeenakshi, S. (1996). *Molecular taxonomy of the genus Trichoderma*. PhD, The Queen's University of Belfast, United Kingdom.
- Nemri, A.; Saunders, D.G.; Anderson, C.; Upadhyaya, N.M.; Win, J.; Lawrence, G.J.; Jones, D.A.; Kamoun, S.; Ellis, J.G. & Dodds, P.N. (2014). The genome sequence and effector complement of the flax rust pathogen *Melampsora lini*. *Frontiers in Plant Science*, 5, art. 98. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00098>
- Nicholson, R.L. & Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 30, p. 369-389. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.30.090192.002101>

- Ono, Y. (2003). Does *Puccinia hemerocallidis* regularly host-alternate between *Hemerocallis* and *Patrinia* plants in Japan? *Journal of General Plant Pathology*, 69(4) p. 240–243. <https://doi.org/10.1007/s10327-003-0047-x>
- Pardo-Cardona, V.M.; Caruso, D. & Rojas, T. (2008). Primer registro para Venezuela de *Puccinia hemerocallidis* Thüm., la roya del lirio de la mañana. *Agronomía Tropical*, 58(2), p. 193-196.
- Peck, S.C. (2003). Early phosphorylation events in biotic stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(4), p. 334-338. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00056-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00056-6)
- Petersen, R.H. (1974). The rust fungus life cycle. *The Botanical Review*, 40(4), p. 453-513.
- Pirselová, B. & Matusíková, I. (2012). Callose: the plant cell wall polysaccharide with multiple biological functions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(3) p. 635-644. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1103-y>
- Plants of the World online. (2019). *Patrinia Juss. Distribution*. [www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:331831-2] (Acedido em 26 de dezembro de 2019)
- Podwyszynska, M.; Gabryszewska, E.; Dyki, B.; Stepowska, A.A.; Kowalski, A.; Jasinski, A. (2014). Phenotypic and genome size changes (variation) in synthetic tetraploids of daylily (*Hemerocallis*) in relation to their diploid counterparts. *Euphytica*, 203(1), p. 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1212-3>
- Pollard, A.; Coggins, P. & Knight, P. (2004). Sensory Evaluation of Edible Daylilies (*Hemerocallis* sp.). *HortScience*, 39(4), p. 783-783. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.4.783C>
- Ramos, A.P.; Tavares, S.; Tavares, D.; Silva, M.C.; Loureiro, J. & Talhinhos, P. (2015). Flow cytometry reveals that the rust fungus, *Uromyces bidentis* (Pucciniales), possesses the largest fungal genome reported-2489 Mbp. *Molecular Plant Pathology*, 16(9), p. 1006-1010. <https://doi.org/10.1111/mpp.12255>
- Ribeiro, R.S. (2012). *Intensidade e controle de ferrugem em cultivares de Hemerocallis hibrida*. MSc, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Brasil.
- Robbins, J.A. & Vann, S. (2002). Susceptibility of daylily to daylily rust in Arkansas, p.86-91. In: J.R. Clark & M.R. Evans (eds.). *Horticultural studies 2001*. Arkansas Agricultural Experiment Station.494.
- Robbins, J.A. (2003). *Daylilies database*. [http://daylilies.uaex.edu/] (disponível em 18 de junho de 2019).

- Sandoval-Sánchez, M.; Nava-Díaz C.; Pérez-Cárcamo J. & Sandoval-Islas J.S. (2020). Identification of daylily rust (*Puccinia hemerocallis*) and characterization of resistance of five genotypes. *Mexican Journal of Phytopathology*, 38(1), p. 1-15.
<http://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1910-3>
- Schumann, G.L. & Leonard, K.J. (2000). Stem rust of wheat (black rust). *The Plant Health Instructor*. APS press. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2000-0721-01>
- Silva, E.; Carvalho, R.; Nunes, N.; Ramos, A.P. & Talhinhos, P. (2016). First report of *Puccinia hemerocallidis* causing daylily rust in Europe. *Plant Disease*, 100(10), p. 2163.
<http://doi.org/10.1094/PDIS-02-16-0242-PDN>
- Solaris Farms (2017). *Hemerocallis (daylily) Culture*.
[<http://www.solarisfarms.com/Daylily%20Culture.html>] (Acedido em 24 de abril de 2019).
- Stout, A.B. (1934). *Daylilies: the wild species and garden clones, both old and new, of the genus Hemerocallis*. Macmillan Press, New York.
- Stout, A.B. (1941). Memorandum on a monograph of the genus *Hemerocallis*. *Herbertia*, 8, p. 67-71.
- Stukenbrock, E. & Croll, D. (2014). The evolving fungal genome. *Fungal Biology Reviews*, 28(1), p. 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2014.02.001>
- Talhinhos, P.; Ramos, A.P.; Tavares, D.; Tavares, S. & Loureiro, J. (2015). Genome size estimates for six rust (Pucciniales) species. *Revista de Ciências Agrárias*, 38(2), p. 176-183. <https://doi.org/10.19084/rca.16912>
- Tamura, K. & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), p. 512-526.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Tapsoba, H. & Wilson, J. (1997). Effects of temperature and light on germination of urediniospores of the pearl millet rust pathogen, *Puccinia substriata* var. indica. *Plant Disease*, 81(9), p. 1049-1052. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.9.1049>
- Tavares, S.; Ramos, A.P.; Pires, A.S.; Azinheira, H.G.; Caldeirinha, P.; Link, T.; Abranches, R.; Silva, M.C.; Voegelé, R.T.; Loureiro, J. & Talhinhos, P. (2014). Genome size analyses of Pucciniales reveal the largest fungal genomes. *Frontiers in Plant Science*, 5, art. 422. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00422>

- The National Gardening Association. (2019). *Daylily (Hemerocallis 'Bitsy')* [<https://garden.org/plants/view/4937/Daylily-Hemerocallis-Bitsy/>] (Acedido em 8 de setembro de 2019).
- The National Gardening Association. (2019). *Daylily (Hemerocallis 'Raspberries in Cream')*. [<https://garden.org/plants/view/33472/Daylily-Hemerocallis-Raspberries-in-Cream/>] (Acedido em 1 de outubro de 2019)
- Tombolato, A.F.C. (2004). *Cultivo comercial de plantas ornamentais*. Instituto Agronômico, Campinas.
- Tombolato, A.F.C.; Uzzo, R.P.; Junqueira, A.H.; Peetz, M.S.; Stancato, G.C. & Alexandre, M.A.V. (2010). Bulbosas ornamentais no Brasil. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 16(2), p. 127-138.
- von Thümen, F. (1880). Beiträge zur Pilz-Flora Sibiriens. *Bulletin of Moscow Society of Naturalists*, 55, p. 72-104.
- Whatley, J.O.B. & Missouri, J. (1990). The art of hybridizing. *The Daylily Journal*.
- Williams-Woodward, J.L.; Hennen, J.F.; Parda, K.W. & Fowler, J.M. (2001). First Report of Daylily Rust in the United States. *Plant Disease*, 85(10), p. 1121.
<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.10.1121C>
- William-Woodward, J.L. & Buck, J.W. (2002). Disease and pest of daylily, p.222-239. In: F. Gatlin & J. Brennam (eds.), *New daylily handbook*. American *Hemerocallis* Society, Kansas City, MO.
- Wise, K.A.; Mueller, D.S. & Buck, J.W. (2004). *Quarantines and Ornamental Rusts*. APSnet Features. <http://dx.doi.org/10.1094/APSnetFeature-2004-0204>

ANEXO

Percentagens médias diárias da área foliar correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada pela doença para cada cultivar de *Hemerocallis* inoculada com *Puccinia hemerocallidis* ao longo do ensaio

Quadro 1. Percentagens médias diárias da área foliar correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada pela doença para a cultivar de *Hemerocallis* 'Bitsy' inoculada com *Puccinia hemerocallidis* ao longo do ensaio.

Dias após inoculação	Cloroses		Pústulas		Necroses		Senescência		Área total afetada	
4	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
5	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
6	0,15	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,15	a
7	4,68	a	0,00	a	0,00	a	0,14	a	4,82	a
8	2,35	a	0,00	a	0,13	a	0,13	a	2,61	a
9	3,48	a	0,00	a	1,25	a	2,35	a	7,08	a
10	2,51	a	0,00	a	1,96	a	1,62	a	6,09	a
11	3,60	a	0,00	a	3,08	a	0,64	a	7,32	a
12	4,99	a	0,00	a	3,45	a	1,85	a	10,29	a
13	3,33	a	0,00	a	4,16	a	3,68	a	11,17	a
14	7,34	a	0,00	a	7,92	a	2,54	a	17,80	a
15	1,70	a	0,00	a	6,67	a	7,26	a	15,63	a
16	2,39	a	0,00	a	8,43	a	6,82	a	17,64	a

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quadro 2. Percentagens médias diárias da área foliar correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada pela doença para a cultivar de *Hemerocallis* 'Carla's Pretty' inoculada com *Puccinia hemerocallidis* ao longo do ensaio.

Dias após inoculação	Cloroses		Pústulas		Necroses		Senescência		Área total afetada	
4	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
5	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
6	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
7	0,21	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,21	a
8	2,62	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	2,62	a
9	1,82	a	0,13	a	0,00	a	0,00	a	1,95	a
10	3,33	a	0,58	a	0,00	a	0,00	a	3,91	ab
11	4,98	ab	0,49	a	0,00	a	0,00	a	5,48	ab
12	6,66	ab	0,60	a	0,00	a	0,00	a	7,26	ab
13	4,98	ab	1,18	ab	0,00	a	0,36	a	6,52	ab
14	16,22	ab	6,28	ab	0,00	a	0,26	a	22,76	ab
15	27,05	b	8,67	b	0,07	a	2,15	a	37,95	ab
16	27,54	b	7,14	ab	2,37	a	6,44	a	43,49	b

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quadro 3. Percentagens médias diárias da área foliar correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada pela doença para a cultivar de *Hemerocallis* 'Cherry Tiger' inoculada com *Puccinia hemerocallidis* ao longo do ensaio.

Dias após inoculação	Cloroses		Pústulas		Necroses		Senescência		Área total afetada	
4	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
5	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
6	0,47	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,47	a
7	0,45	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,45	a
8	0,92	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,92	a
9	2,82	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	2,82	a
10	8,76	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	8,76	a
11	7,95	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	7,95	a
12	4,37	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	4,37	a
13	8,04	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	8,04	a
14	13,71	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	13,71	a
15	13,48	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	13,48	a
16	14,46	a	0,00	a	0,93	a	0,99	a	16,39	a

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quadro 4. Percentagens médias diárias da área foliar correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada pela doença para a cultivar de *Hemerocallis* 'Declaration of Love' inoculada com *Puccinia hemerocallidis* ao longo do ensaio.

Dias após inoculação	Cloroses		Pústulas		Necroses		Senescência		Área total afetada	
4	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
5	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
6	0,40	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,40	a
7	1,42	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	1,42	a
8	6,18	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	6,18	a
9	21,91	a	3,98	ab	0,00	a	0,00	a	25,89	ab
10	34,47	a	7,90	ab	3,75	a	5,23	ab	51,35	abc
11	33,95	a	14,90	b	13,73	a	8,63	abc	71,21	bc
12	19,97	a	3,80	ab	13,82	a	38,72	c	76,31	bc
13	13,81	a	4,74	ab	44,01	b	19,51	abc	82,06	bc
14	10,41	a	5,21	ab	55,65	b	20,84	abc	92,11	c
15	2,58	a	14,62	b	48,73	b	29,38	bc	95,31	c
16	1,15	a	0,20	a	61,94	b	30,39	bc	93,68	c

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quadro 5. Percentagens médias diárias da área foliar correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada pela doença para a cultivar de *Hemerocallis* 'German Highlight' inoculada com *Puccinia hemerocallidis* ao longo do ensaio.

Dias após inoculação	Cloroses		Pústulas		Necroses		Senescência		Área total afetada	
4	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
5	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
6	0,11	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,11	a
7	1,52	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	1,52	a
8	3,80	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	3,80	a
9	2,46	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	2,46	a
10	3,46	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	3,46	a
11	1,22	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	1,22	a
12	0,82	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,82	a
13	2,37	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	2,37	a
14	4,88	a	0,07	a	0,00	a	0,00	a	4,95	a
15	4,43	a	0,06	a	0,00	a	0,00	a	4,50	a
16	2,80	a	0,01	a	0,00	a	0,00	a	2,81	a

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quadro 6. Percentagens médias diárias da área foliar correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada pela doença para a cultivar de *Hemerocallis* 'Indian Sky' inoculada com *Puccinia hemerocallidis* ao longo do ensaio.

Dias após inoculação	Cloroses		Pústulas		Necroses		Senescência		Área total afetada	
4	6,60	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
5	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
6	0,48	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,48	a
7	2,80	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	2,80	ab
8	4,95	a	0,00	a	0,09	a	0,00	a	5,04	abc
9	14,72	a	0,56	a	0,36	ab	1,59	ab	17,23	abcd
10	5,14	a	3,39	a	1,40	ab	0,93	ab	10,85	abcd
11	3,30	a	11,17	c	9,69	b	0,95	ab	25,11	abcd
12	9,83	a	10,53	bc	9,40	ab	1,76	ab	31,52	bcd
13	5,90	a	3,81	a	9,03	ab	13,60	bc	32,34	bcd
14	7,45	a	5,13	ab	20,65	c	4,41	ab	37,64	d
15	2,52	a	0,73	a	9,73	b	22,19	cd	35,18	cd
16	1,72	a	0,67	a	3,83	ab	29,63	d	35,85	cd

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quadro 7. Percentagens médias diárias da área foliar correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada pela doença para a cultivar de *Hemerocallis* 'Little Peanut' inoculada com *Puccinia hemerocallidis* ao longo do ensaio.

Dias após inoculação	Cloroses		Pústulas		Necroses		Senescência		Área total afetada	
4	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
5	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
6	0,38	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,38	a
7	2,43	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	2,43	a
8	1,30	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	1,30	a
9	3,05	a	0,36	a	0,01	a	0,00	a	3,42	a
10	7,76	a	0,52	a	0,01	a	0,00	a	8,28	a
11	2,10	a	2,28	a	0,00	a	0,00	a	4,39	a
12	1,35	a	2,33	a	0,00	a	0,00	a	3,68	a
13	5,60	a	0,87	a	0,00	a	0,00	a	6,47	a
14	6,56	a	4,88	a	0,00	a	0,00	a	11,44	a
15	4,03	a	1,92	a	0,62	a	2,93	a	9,50	a
16	5,32	a	3,76	a	2,11	a	3,45	a	14,64	a

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quadro 8. Percentagens médias diárias da área foliar correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada pela doença para a cultivar de *Hemerocallis* 'Modest Hedwing' inoculada com *Puccinia hemerocallidis* ao longo do ensaio.

Dias após inoculação	Cloroses		Pústulas		Necroses		Senescência		Área total afetada	
4	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
5	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
6	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
7	2,47	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	2,47	a
8	0,38	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,38	a
9	5,46	a	4,29	abc	0,00	a	0,02	a	9,77	a
10	1,90	a	0,47	ab	0,00	a	0,29	a	2,67	a
11	10,78	a	2,67	abc	0,00	a	0,16	a	13,60	a
12	11,53	a	8,66	c	0,00	a	0,02	a	20,21	a
13	10,67	a	3,32	abc	0,00	a	0,05	a	14,04	a
14	20,66	a	0,85	ab	0,00	a	0,08	a	21,59	a
15	3,09	a	7,55	bc	0,00	a	1,42	a	12,07	a
16	11,73	a	2,55	abc	0,01	a	2,36	a	16,66	a

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quadro 9. Percentagens médias diárias da área foliar correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada pela doença para a cultivar de *Hemerocallis* 'Norton Orange' inoculada com *Puccinia hemerocallidis* ao longo do ensaio.

Dias após inoculação	Cloroses		Pústulas		Necroses		Senescência		Área total afetada	
4	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
5	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
6	0,12	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,12	a
7	1,45	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	1,45	a
8	1,59	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	1,59	a
9	1,38	a	0,29	a	0,00	a	0,00	a	1,66	a
10	1,56	a	0,22	a	0,00	a	0,00	a	1,79	a
11	2,86	a	0,14	a	0,00	a	0,00	a	3,00	a
12	2,80	a	0,15	a	0,00	a	0,00	a	2,95	a
13	2,80	a	0,09	a	0,00	a	0,00	a	3,90	a
14	4,64	a	1,44	a	0,00	a	0,00	a	6,09	a
15	3,38	a	0,76	a	0,00	a	0,07	a	4,21	a
16	2,30	a	0,45	a	0,00	a	0,00	a	2,75	a

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quadro 10. Percentagens médias diárias da área foliar correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada pela doença para a cultivar de *Hemerocallis* 'Norton Signal' inoculada com *Puccinia hemerocallidis* ao longo do ensaio

Dias após inoculação	Cloroses		Pústulas		Necroses		Senescência		Área total afetada	
4	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
5	0,45	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,45	a
6	0,72	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,72	a
7	3,42	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	3,42	a
8	3,98	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	3,98	a
9	4,53	a	0,09	a	0,00	a	0,00	a	4,63	a
10	3,90	a	0,13	a	0,00	a	0,00	a	4,03	a
11	0,77	a	0,17	a	0,00	a	0,00	a	0,94	a
12	1,14	a	0,18	a	0,00	a	0,00	a	1,33	a
13	1,17	a	0,24	a	0,00	a	0,00	a	1,40	a
14	3,73	a	1,54	a	0,00	a	0,00	a	5,27	a
15	1,89	a	1,36	a	0,00	a	0,00	a	3,26	a
16	1,11	a	0,68	a	0,00	a	0,00	a	1,78	a

Quadro 11. Percentagens médias diárias da área foliar correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada pela doença para a cultivar de *Hemerocallis* 'Persian Ruby' inoculada com *Puccinia hemerocallidis* ao longo do ensaio.

Dias após inoculação	Cloroses		Pústulas		Necroses		Senescência		Área total afetada	
4	0,02	a	0,00	a	0,00	a	0,02	a	0,05	a
5	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
6	0,67	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,67	a
7	1,03	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	1,03	a
8	0,98	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,98	a
9	1,14	a	0,33	a	0,00	a	0,12	a	1,59	a
10	2,95	a	0,12	a	0,00	a	0,20	a	3,27	a
11	1,60	a	0,85	a	0,00	a	0,03	a	2,47	a
12	5,38	a	1,76	a	0,00	a	0,21	a	7,34	a
13	1,42	a	0,36	a	0,00	a	0,07	a	1,85	a
14	4,81	a	0,93	a	0,00	a	0,07	a	5,81	a
15	0,29	a	0,25	a	0,00	a	1,06	a	1,60	a
16	3,49	a	0,70	a	0,00	a	1,85	a	6,04	a

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quadro 12. Percentagens médias diárias da área foliar correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada pela doença para a cultivar de *Hemerocallis* 'Romantic Rose' inoculada com *Puccinia hemerocallidis* ao longo do ensaio.

Dias após inoculação	Cloroses		Pústulas		Necroses		Senescência		Área total afetada	
4	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
5	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
6	0,10	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,10	a
7	0,28	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,28	a
8	0,63	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,63	a
9	0,42	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,42	a
10	0,48	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,48	a
11	0,46	a	0,26	a	0,00	a	0,00	a	0,72	a
12	2,21	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	2,21	a
13	1,60	a	0,14	a	0,00	a	0,10	a	1,84	a
14	10,05	a	0,08	a	0,00	a	2,04	a	12,17	a
15	8,89	a	3,78	a	0,49	a	6,13	a	19,29	a
16	5,55	a	2,75	a	1,34	a	10,62	a	20,27	a

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quadro 13. Percentagens médias diárias da área foliar correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada pela doença para a cultivar de *Hemerocallis* 'Roswitha' inoculada com *Puccinia hemerocallidis* ao longo do ensaio.

Dias após inoculação	Cloroses		Pústulas		Necroses		Senescência		Área total afetada	
4	0,19	a	0,00	a	0,00	a	1,31	a	1,50	a
5	2,15	a	0,00	a	0,00	a	0,17	a	2,32	a
6	8,50	a	0,00	a	0,07	a	0,21	a	8,78	a
7	17,79	a	0,00	a	0,15	a	0,32	a	18,26	a
8	6,31	a	0,35	a	0,00	a	0,22	a	6,88	a
9	10,90	a	1,02	a	0,16	a	0,24	a	12,32	a
10	14,68	a	1,21	a	0,54	a	0,13	a	16,56	a
11	11,93	a	3,29	a	1,81	a	0,07	a	17,10	a
12	11,49	a	3,33	a	0,51	a	0,34	a	15,67	a
13	13,35	a	0,73	a	0,04	a	0,24	a	14,37	a
14	16,31	a	3,18	a	0,08	a	0,22	a	19,79	a
15	6,51	a	0,63	a	0,01	a	0,33	a	7,48	a
16	8,68	a	3,04	a	0,03	a	0,63	a	12,38	a

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quadro 14. Percentagens médias diárias da área foliar correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada pela doença para a cultivar de *Hemerocallis* 'Rosy Rhino' inoculada com *Puccinia hemerocallidis* ao longo do ensaio.

Dias após inoculação	Cloroses		Pústulas		Necroses		Senescência		Área total afetada	
4	0,00	a	0,00	a	0,53	a	0,00	a	0,53	a
5	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
6	1,17	a	0,00	a	0,05	a	0,00	a	1,21	a
7	9,74	a	0,00	a	0,61	a	0,00	a	10,35	a
8	1,72	a	0,00	a	0,97	a	0,00	a	2,69	a
9	7,97	a	0,09	a	0,48	a	0,00	a	8,54	a
10	15,48	a	0,37	a	0,37	a	0,00	a	16,21	a
11	12,74	a	1,24	a	0,73	a	0,00	a	14,72	a
12	6,11	a	3,30	a	0,55	a	0,02	a	9,99	a
13	2,12	a	0,94	a	0,00	a	0,00	a	3,07	a
14	4,35	a	2,22	a	0,74	a	0,22	a	7,52	a
15	1,91	a	1,54	a	0,63	a	0,00	a	4,08	a
16	6,66	a	1,76	a	1,29	a	0,29	a	10,00	a

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quadro 15. Percentagens médias diárias da área foliar correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada pela doença para a cultivar de *Hemerocallis* 'Stella d'Oro' inoculada com *Puccinia hemerocallidis* ao longo do ensaio.

Dias após inoculação	Cloroses		Pústulas		Necroses		Senescência		Área total afetada	
4	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
5	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
6	0,12	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,12	a
7	1,70	a	0,00	a	0,52	a	0,00	a	2,22	a
8	1,74	a	0,00	a	0,21	a	0,00	a	1,94	a
9	3,94	a	0,00	a	1,24	ab	0,00	a	5,18	a
10	1,69	ab	0,00	a	1,49	ab	0,00	a	9,18	ab
11	11,17	a c	0,00	a	7,69	abc	0,00	a	18,87	abc
12	13,47	a c	0,00	a	12,96	cd	1,00	a	27,43	abc
13	16,32	a c	0,00	a	10,74	bcd	0,00	a	27,06	abc
14	22,60	abc	0,00	a	15,28	cd	0,47	a	38,34	bc
15	14,06	a c	0,00	a	13,41	cd	0,31	a	27,78	abc
16	28,00	c	0,00	a	17,47	d	0,07	a	45,54	c

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quadro 16. Percentagens médias diárias da área foliar correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada pela doença para a cultivar de *Hemerocallis* 'Stellar Double Rose' inoculada com *Puccinia hemerocallidis* ao longo do ensaio.

Dias após inoculação	Cloroses		Pústulas		Necroses		Senescência		Área total afetada	
4	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
5	3,43	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	3,43	a
6	0,77	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,77	a
7	3,57	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	3,57	a
8	3,08	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	3,08	a
9	6,41	a	0,04	a	0,09	a	0,00	a	6,55	a
10	16,92	a	0,51	ab	0,00	a	0,00	a	17,43	a
11	17,69	a	7,91	cde	0,04	a	0,00	a	25,64	a
12	1,99	a	4,92	abcd	0,86	a	0,00	a	7,78	a
13	3,81	a	6,36	bcde	0,59	a	0,00	a	10,76	a
14	5,54	a	12,00	e	1,90	a	0,00	a	19,44	a
15	4,27	a	10,25	de	2,74	a	0,00	a	17,26	a
16	8,92	a	2,39	abc	7,69	a	0,00	a	19,00	a

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quadro 17. Percentagens médias diárias da área foliar correspondente às cloroses, pústulas, necroses, senescência e área total afetada pela doença para a cultivar de *Hemerocallis* 'Watermelon Slice' inoculada com *Puccinia hemerocallidis* ao longo do ensaio.

Dias após inoculação	Cloroses	Pústulas	Necroses	Senescência	Área total afetada
4	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
5	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
6	0,01 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,01 a
7	1,21 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	1,21 a
8	0,81 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,81 a
9	12,38 abc	0,16 a	0,00 a	0,00 a	12,54 ab
10	12,63 abc	0,65 a	0,52 a	0,00 a	13,81 ab
11	10,56 abc	2,14 a	0,00 a	0,64 a	13,34 ab
12	25,60 cd	1,37 a	0,00 a	5,50 ab	32,47 b
13	23,83 bcd	2,78 a	0,00 a	0,08 a	26,69 ab
14	35,28 d	1,73 a	4,79 a	0,71 a	42,52 b
15	7,31 ab	0,97 a	0,79 a	16,49 b	25,57 ab
16	4,33 a	0,64 a	1,53 a	17,90 b	24,41 ab

Em cada coluna os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).