

Sys 391089

633.13
B664m

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

MANCHA DE *Pyrenophora* EM GRÃOS DE AVEIA:
PERÍODO DE SUSCETIBILIDADE, CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DOS
GRÃOS E INFLUÊNCIA DA ÉPOCA DE COLHEITA

Carla Azambuja Centeno Bocchese
Eng. Agr., M.Sc.(UFRGS)

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

AGR
T
633.13
B664m

Porto Alegre (RS), Brasil
Agosto de 2003

CARLA AZAMBUJA CENTENO BOCCHESI
Engenheira Agrônoma - UFRGS
Mestre em Fitotecnia - UFRGS

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

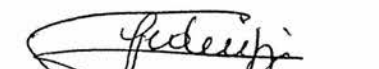
DOUTOR EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil


Aprovado em: 25.08.2003
Pela Banca Examinadora


JOSÉ ANTÔNIO MARTINELLI
Orientador-PPG Fitotecnia

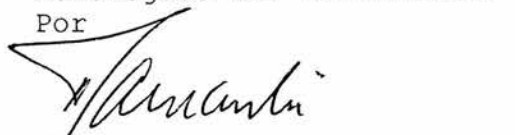

VALMIR DUARTE
PPG Fitotecnia


LUIZ CARLOS FEDERIZZI
PPG Fitotecnia


ENILSON LUIZ SACCOL DE SÁ
PPG Microbiologia Agrícola
e do Ambiente/UFRGS


ARIANO MORAES PRESTES
EMBRAPA - CNPTrigo
Passo Fundo / RS

Homologado em: 06.10.2003
Por


HOMERO BERGAMASCHI
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia


GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN
Diretor da Faculdade
de Agronomia

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Antônio Martinelli, pela orientação, confiança e amizade, presença constante no decorrer de minha formação científica.

Aos professores Luiz Carlos Federizzi e Jorge Ernesto Mariáh, pela disponibilidade em auxiliar e esclarecer minhas dúvidas.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia, pelos conhecimentos a mim transmitidos.

Aos amigos, funcionários e colegas de trabalho do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia, pela atenção e auxílio.

À minha querida filha Carolina, que suportou muitas ausências e que sempre me recebeu com muito carinho, durante todo o período do curso em que precisei me manter afastada. À minha querida tia, Cleude Bocchese Guazzelli pelo carinho e apoio constante. Ao meu pai, Domingos Vicente Bocchese, pela excelente educação que me proporcionou.

A Deus por todas as oportunidades de aprendizado encontradas em minha longa caminhada rumo ao aprimoramento.

À CAPES e FINEP pelo amparo financeiro.

MANCHA DE *Pyrenophora* EM GRÃOS DE AVEIA: PERÍODO DE SUSCETIBILIDADE, CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DOS GRÃOS E INFLUÊNCIA DA ÉPOCA DE COLHEITA¹

Autora: Carla Azambuja Centeno Bocchese
Orientador: José Antônio Martinelli

RESUMO

A mancha negra dos grãos de aveia branca, cujo principal agente é *Pyrenophora chaetomioides*, é caracterizada pelo escurecimento de seus tecidos superficiais e pode ocasionar redução na qualidade e valor dos mesmos para a indústria alimentícia. É possível que características bioquímicas presentes nestes tecidos possam influenciar na resistência ao patógeno. Evidências do papel de componentes bioquímicos constitutivos e induzidos na resistência dependem da demonstração de que estão presentes ou são produzidos em quantidade suficiente, no local e tempo exatos, para inibir a penetração e desenvolvimento do patógeno nos tecidos da semente. Os objetivos deste trabalho foram: i) Conhecer o processo de formação da mancha nos grãos e identificar a época de maior incidência de *P. chaetomioides* nos componentes florais após a emissão da panícula até a maturação fisiológica; ii) Avaliar os índices de suscetibilidade de 15 genótipos de cultivares de aveia branca à mancha negra e sua correlação com a infecção; iii) Correlacionar a presença de lipase e peroxidase em grãos maduros com a suscetibilidade à *P. chaetomioides* e formação da mancha. Não houve correlação entre o percentual de grãos não manchados e o nível de infecção ($r = -0,18$). O período de suscetibilidade à formação da mancha compreende a fase de grão aquoso até o momento da colheita dos mesmos. Os genótipos selecionados agruparam-se em diferentes níveis de incidência com relação à mancha-negra e infecção, mas não houve correlação entre estas duas variáveis. A análise de grãos maduros dos genótipos selecionados apresentou diferenças significativas nos níveis de peroxidase e lipase, entretanto, não houve correlação significativa com relação à resistência para formação de mancha e infecção. As curvas de atividade da peroxidase durante o desenvolvimento dos grãos também não foram suficientes para separar cultivares com maior e menor nível de resistência.

Tese de Doutorado em Fitotecnia. Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (79p.) Agosto, 2003.

***Pyrenophora* SPOTS ON OAT KERNELS : PERIOD OF SUSCETIBILITY,
BIOCHEMICAL CHARACHTERISTICS OF KERNELS
AND EFFECT OF THE HARVEST.¹**

Author: Carla Azambuja Centeno Bocchese
Adviser: José Antônio Martinelli

ABSTRACT

Darkening of oat kernels, whose main agent is *Pyrenophora chaetomioides* is characterized by superficial darkening of their tissues and can cause quality and value reduction for the food industry. It is possible that biochemical characteristics present in these tissues can influence on the resistance to the patogen. Evidence of the constitutive biochemical components on resistance depends of the demonstration of their presence or production in enough quantity in the exact place and time for inhibition of the patogen's penetration and development in seed tissue. The objectives of this work were: i) To determinate the period for formation of grain spot and to identify the time of major incidence of *P. chaetomioides* in flower components after the emission of panicle, untill phisiological maturation.ii) Evaluation of the susceptibility of fifteen oat genotypes to black spot and its corelation with infection. lii) To Corelate of the presence of lipase and peroxidase in mature grains with susceptibility of *P. chaetomioides* and spot formation. The corelation between percentual of grains without spots and the level of infection wasn't significant ($r= 0,18$). The susceptibility of grains to patogen for spot formation is during the stages of milky grain untill harvest. The analysis of mature grains of selected genotypes showed significant differences in peroxidase and lipase levels but there was not significant corelation in relation to resistance for spot formation and infection although, few genotypes susceptible to infection and spot formation had peroxidase levels similar of resistant ones. Also, the peroxidase growth curves during grains development weren't sufficient to separate suscetible cultivars of resistant ones.

Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (79p.) August, 2003.

SUMÁRIO

	Páginas
1. CAPÍTULO I:.....	01
1.0. Introdução.....	01
1.1. O Hospedeiro <i>Avena sativa</i> L.....	04
1.2. Histórico e ocorrência da moléstia.....	05
1.3. O Patógeno <i>Pyrenophora chaetomioides</i>	07
1.4. Ciclo da doença.....	09
1.5. Infecção.....	11
1.6. Controle químico.....	13
1.7. O Grão de Aveia.....	14
1.8. Alguns componentes do grão que apresentam variação entre as cultivares.....	15
1.8.1. Lipídios.....	15
1.8.2. Proteínas e enzimas.....	18
2. CAPÍTULO II: Processo de infecção e formação de mancha em grãos de cultivares de aveia branca com níveis diferenciados de resistência para <i>Pyrenophora chaetomioides</i> , influenciados pela época de colheita e controle químico.....	21
2.1. Introdução.....	21
2.2. Material e métodos.....	23
2.3. Resultados e discussão.....	29
3. CAPÍTULO III: Estudos bioquímicos e histoquímicos em grãos de aveia branca com resistência e suscetibilidade a formação de manchas por <i>Pyrenophora chaetomioides</i>	46
3.1. Introdução.....	46
3.2. Material e métodos.....	49
3.3. Resultados e discussão.....	54
4. CONCLUSÕES.....	70
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

RELAÇÃO DE TABELAS

	Páginas
1. Percentual de grãos manchados, obtidos a partir de avaliação visual, e da incidência de <i>Pyrenophora chaetomioides</i> nos mesmos, quando plaqueados em meio de cultura (BDA), avaliados em 15 genótipos de aveia branca.	30
2. Incidência de <i>Pyrenophora chaetomioides</i> em diferentes épocas durante a formação dos grãos, nos componentes florais (glumas, lemas, páleas e carpelos) de 6 genótipos de aveia branca, na EEA/UFRGS, 2002.	32
3. Incidência de <i>Pyrenophora chaetomioides</i> em grãos manchados quando plaqueados em meio de cultura (BDA) e percentual de grãos de aveia branca manchados em cinco épocas de colheita na EEA/UFRGS, 2001. Os valores apresentados nesta tabela representam as médias de 10 genótipos avaliados em cada época de colheita.....	39
4. Incidência de <i>Pyrenophora chaetomioides</i> , percentual de grãos manchados de aveia branca; rendimento (Kg/ha) e peso do hectolitro (PH) em três épocas de colheita na EEA/UFRGS, 2002. Os valores apresentados nesta tabela representam as médias de 14 genótipos avaliados em cada época de colheita.....	40
5. Percentuais de grãos manchados e incidência de <i>P. chaetomioides</i> , quando plaqueados em meio de cultura (BDA), obtidos dos genótipos de aveia branca utilizados para o ensaio de atraso de colheita na EEA/UFRGS, 2002. Os dados apresentados representam as médias gerais das três épocas de colheita.....	40
6. Rendimento e Peso do hectolitro de grãos dos genótipos de aveia branca no ensaio de épocas de colheita na EEA/UFRGS, 2002. Os dados apresentados representam as médias gerais das três épocas de colheita.....	41
7. Incidência de <i>Pyrenophora chaetomioides</i> em grãos de aveia branca, rendimento (Kg/ha) e peso do hectolitro (Kg/hl) em seis épocas de aplicação de fungicida, na EEA/UFRGS, 2002. Os valores apresentados nesta tabela representam as médias de 14 genótipos para cada tratamento com fungicida.....	44
8. Incidência de <i>Pyrenophora chaetomioides</i> e percentual de grãos manchados em 14 genótipos de aveia branca no experimento de épocas de aplicação de fungicida, na EEA/UFRGS, 2002. Os valores apresentados nesta tabela representam as médias dos genótipos em todos os tratamentos com fungicidas.....	44

9.	Rendimento (Kg/ha) e peso hectolitro (Kg/hl) de grãos de 14 genótipos de aveia branca no experimento de épocas de aplicação de fungicida, na EEA/UFRGS, 2002. Os valores apresentados nesta tabela representam as médias dos genótipos em todos os tratamentos com fungicidas.....	45
10.	Análise da variância das variáveis incidência de <i>Pyrenophora chaetomioides</i> , rendimento (Kg/ha) e peso do hectolitro (PH). EEA/UFRGS, 2002.....	45
11.	Atividade da peroxidase, em grãos maduros de genótipos de aveia branca com resistência diferenciada à mancha nos grãos, safra 2001..	59
12.	Atividade da peroxidase em sementes de genótipos de aveia branca com resistência diferenciada à mancha no grão, safra 2002. Os dados apresentados representam obtidos nas duas últimas coletas durante o desenvolvimento dos grãos.....	65
13.	Atividade da peroxidase em sementes de genótipos de aveia branca com resistência diferenciada à mancha no grão, safra 2002. Os dados apresentados representam as médias obtidas das seis coletas durante o desenvolvimento dos grãos.....	66
14.	Atividade da lipase (% hidrólise), em sementes de genótipos de aveia branca com resistência diferenciada à mancha no grão.....	68

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Páginas
1. Amostra de grãos de aveia branca UFRGS-15 com as características desejadas pela indústria alimentícia (A) e evidenciando a presença de manchas (B).....	2
2. Ciclo de <i>Pyrenophora chaetomioides</i> na cultura de aveia branca. (Fonte: Autora, 2003).....	10
3. Cortes transversais e longitudinais do grão de aveia e observações microscópicas dos diferentes tecidos. Fonte: FULCHER, 1986.....	15
4. Gradiente pré-estabelecido para avaliação visual dos genótipos de aveia branca. Foto: BOCCHESI, 2003.....	24
5. Incidência de <i>Pyrenophora chaetomioides</i> em carpelos de 6 genótipos de aveia branca durante os estádios de desenvolvimento dos grãos, na EEA/UFRGS, 2002.....	32
6. Análise da ocorrência de mancha nos grãos em sua fase inicial de desenvolvimento (A) e no período de maior predisposição à infecção por <i>Pyrenophora chaetomioides</i> (B).....	33
7. Incidência de <i>Pyrenophora chaetomioides</i> nos componentes florais de cultivares aveia branca, quando plaqueados em meio de cultura (BDA), na EEA/UFRGS, 2002. Legenda: os números: 1, 2, 3, 4, 5 e 6 no eixo (X) correspondem aos estádios: florescimento, grão aquoso, grão leitoso, grão em massa mole, grão em massa, e grão em massa dura, respectivamente.....	34
8. Micélio na superfície da testa e aderência do mesmo com os demais tecidos do pericarpo do grão de aveia infectado através da Microscopia Eletrônica de Varredura (190X).....	36
9. Percentuais de grãos manchados e incidência de <i>P.chaetomioides</i> , quando plaqueados em meio de cultura (BDA), nas cinco épocas de colheita, na EEA/UFRGS, 2001.....	39
10. Gradiente pré-estabelecido para avaliação visual dos genótipos de aveia branca. Foto: BOCCHESI, 2003.....	50
11. Desenho esquemático do micélio de <i>Pyrenophora chaetomioides</i> Speg. nos tecidos do grão de aveia branca e a notada presença de vesículas em resposta à infecção. Fonte: BOCCHESI, 2003.....	55
12. (A) Vesículas em tecidos do pericarpo e testa de grãos infectados; (B) Micélio do fungo, na testa da semente, corado com Sudan Black.....	56

13. Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície da testa do grão de aveia, apresentando vesícula e micélio. (A) 350x; (B) 1000x.....	56
14. Corte transversal do grão de aveia branca, corado com Azul de Toluidina O com aumento de 400x; (A) Vesícula apresentando ligações protoplasmáticas com células do aleurona; (B) Testa e aleurona apresentando coloração típica da presença de fenóis.....	57
15. Análise da atividade da peroxidase e infecção dos grãos maduros sem manchas por <i>Pyrenophora chaetomioides</i> nos genótipos de aveia branca. Coeficiente de correlação ($r= 0,132$).....	60
16. Análise da atividade da peroxidase em grãos maduros e % de grãos manchados nos genótipos de aveia branca. Coeficiente de correlação ($r= 0,066$).....	61
17. Atividade de peroxidase dos genótipos UFRGS16 e UFRGS19 durante seu desenvolvimento dos grãos. As datas das coletas correspondem aos seguintes estádios: florescimento, grão aquoso, grão leitoso, grão em massa mole, grão em massa, grão em massa dura. Na EEA/UFRGS, 2001.....	62
18. Curvas de atividade da peroxidase e incidência de <i>Pyrenophora chaetomioides</i> durante os estádios de formação dos grãos de genótipos de aveia branca, na EEA/UFRGS, 2002. As datas das coletas correspondem aos seguintes estádios de desenvolvimento dos grãos: florescimento, grão aquoso, grão leitoso, grão em massa mole, grão em massa, grão em massa dura.....	63
19. Atividade da peroxidase durante o desenvolvimento dos grãos dos seis genótipos testados. As datas das coletas correspondem aos seguintes estádios: florescimento, grão aquoso, grão leitoso, grão em massa mole, grão em massa, grão em massa dura. Na EEA/UFRGS, 2002.....	64
20. Análise da atividade da peroxidase e incidência de <i>Pyrenophora chaetomioides</i> em grãos de genótipos de aveia branca durante o desenvolvimento dos grãos, quando plaqueados em meio de cultura (BDA). EEA/UFRGS, 2002. Coeficiente de correlação ($r= 0,29$).....	66
21. Atividade da lipase (% de hidrólise) em grãos maduros de aveia e incidência de <i>Pyrenophora chaetomioides</i> nos grãos sem manchas, quando plaqueados em meio de cultura (BDA), de genótipos de aveia branca. Coeficiente de correlação ($r= 0,059$).....	69
22. Atividade da lipase (% de hidrólise) em grãos maduros de genótipos de aveia branca e o percentual de grãos com manchas avaliados visualmente. Coeficiente de correlação ($r= 0,375$).....	69

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A aveia encontra-se entre os cereais de maior importância e, sua produção, ocupa o sexto lugar na classificação da produção mundial de cereais (GUTKOSKI & PEDÓ, 2000).

O Brasil, desde 1989, tem se destacado como grande produtor de aveia na América Latina. Os principais estados produtores são Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (CARVALHO & FEDERIZZI, 1988).

A área cultivada com aveia cresceu muito nos últimos anos, especialmente no sul do Brasil. A produção brasileira, que se situava em torno de 176 mil toneladas em 1987, passou, em 1999, para cerca de 290 mil toneladas, o que significa aumentos substanciais em área cultivada e produtividade. O aumento da área plantada tornou-se possível devido ao lançamento de mais de quarenta novos cultivares pelas instituições que integram o programa de melhoramento genético de aveia. A produtividade e o rendimento industrial se elevaram, a partir de plantas mais precoces, de menor porte e resistentes à algumas moléstias fúngicas (GUTKOSKI & PEDÓ, 2000).

A versatilidade de sua utilização, aliada às qualidades nutritivas, contribuiu para o estabelecimento desta espécie como uma das melhores alternativas para cultivo de estação fria, como salientavam CARVALHO et al. ainda em 1980.

Atualmente a presença de grãos manchados apresenta-se como grave problema na produção de grãos, já que deprecia o produto e impede sua comercialização, com perdas totais nos lotes que apresentam incidência superior a 3% de grãos manchados após descascados, o que põe em risco toda a cadeia produtiva.

Provavelmente, caso não houver soluções viáveis nos próximos anos para minimizar o problema da mancha nos grãos de aveia (Figura 1), o Brasil voltará para a condição de importador de aveia, para atingir os padrões de qualidade aceitáveis pela indústria alimentícia.



Figura 1. Amostra de grãos de aveia branca UFRGS-15 com as características desejadas pela indústria alimentícia (A) e evidenciando a presença de manchas (B).

Neste contexto encontra-se *Pyrenophora chaetomioides*, o agente causal da mancha negra nos grãos de aveia branca. Esta doença vem se destacando dentre as manchas foliares em termos de incidência e severidade no sul do Brasil. BLUM (1997), constatou a presença em alta frequência de *P. chaetomioides* em grãos manchados de aveia, o que já indicava que este patógeno poderia ter um importante papel na formação de manchas. Apesar de *P. chaetomioides* causar

manchas tanto nas folhas como nas sementes de aveia, não existe correlação na incidência entre elas.

P. chaetomioides sobrevive em restos de cultura de aveia e nas sementes infectadas, os quais constituem a principal fonte de inóculo deste patógeno para as lavouras que utilizam a rotação de culturas (BLUM et al., 1995).

O inóculo, presente na semente (BOCCHESI, 2000), é responsável pela introdução do patógeno em áreas novas, já que o controle químico das sementes não tem sido eficiente (LÂNGARO, 1998), fato que tem contribuído para o agravamento deste problema.

Até o momento, não existem informações na literatura sobre possíveis soluções para a mancha nos grãos de aveia. No Brasil, o problema tornou-se relevante pelas condições de ambiente favoráveis e pela utilização da técnica de plantio direto pelos produtores, onde o fungo dispõe de condições ótimas para seu desenvolvimento e sobrevivência.

Pyrenophora chaetomioides está presente nos grãos de aveia, somente nos tecidos do pericarpo, provavelmente devido a sua grande atividade proteolítica e lipolítica, e a falta de enzimas que possam degradar o amido (BOCCHESI et al, 2001). A habilidade enzimática deste fungo poderia ser influenciada pelas características bioquímicas presentes nos tecidos superficiais da semente e ocasionar a reação diferencial à formação de mancha observada nas cultivares de aveia.

Assim, o objetivo deste trabalho foi entender o processo de formação de manchas na superfície de grãos de aveia pelo fungo *P. chaetomioides*, a partir da correlação da atividade da lipase e peroxidase presente nos grãos de aveia com a incidência e formação de manchas, na busca de resistência genética à moléstia da mancha-negra.

1.1. O Hospedeiro *Avena sativa* L.

A aveia é uma gramínea pertencente à família *Poaceae*, tribo *Aveneae*, e gênero *Avena*. O gênero *Avena* compreende várias espécies silvestres, nativas e cultivadas, distribuídas em seis continentes. A área de maior diversidade em espécies está situada entre 25 e 45 ° latitude norte, 90 ° longitude leste e 20 ° longitude oeste, estendendo-se das Ilhas Canárias, bacia do Mediterrâneo e Oriente Médio até o Himalaia (MURPHY & HOFFMAN, 1992). O centro de origem da aveia encontra-se na Ásia e no Oriente Médio, semelhante à cevada e ao trigo.

A aveia foi domesticada depois das culturas de cevada e de trigo, sendo, inicialmente, considerada uma planta invasora das mesmas. A introdução destas culturas em regiões mais frias possibilitou que a aveia ganhasse em competitividade e, finalmente, fosse domesticada como uma cultura alternativa (THOMAS, 1995).

A aveia é uma espécie autógama e anual. Apresenta ciclo de crescimento variável entre 120 a mais de 200 dias, dependendo da cultivar e das condições edafoclimáticas. O hábito de crescimento é cespitoso, podendo atingir a estatura entre 0,7 a 2,0 m. Em relação às características botânicas, apresenta um sistema radicular fibroso e fasciculado, colmo ereto e cilíndrico, folhas com lígula bem desenvolvida e com ausência de aurícula. A inflorescência é uma panícula piramidal, terminal e aberta, apresentando espiguetas contendo entre um e três grãos (FLOSS, 1998).

As espécies do gênero *Avena* possuem três níveis de ploidia: diplóides ($2n=2x=14$), tetraplóides ($2n=4x=28$) e hexaplóides ($2n=6x=42$), sendo que neste nível é composto por formas extremamente variáveis, interférteis e de fácil dispersão, porém todas as espécies deste gênero possuem meiose regular dentro

de seu nível de ploidia e dentro de cada grupo existem formas cultivadas, as quais somente sobrevivem sob cultivo (SERENO TAVARES, 1991).

As espécies hexaplóides compreendem tipos cultivados, como *A. sativa* e *A. byzantina*, e espécies silvestres, como *A. sterilis* e *A. fatua* (THOMAS, 1995).

As espécies *A. sativa* e *A. byzantina* foram amplamente recombinadas em programas de melhoramento genético, de forma que a aveia cultivada é denominada *A. sativa* (FEDERIZZI et al, 1999). *A. sativa* é destinada à produção de grãos de alta qualidade industrial, mas pode também ter duplo propósito para produção de forragem e produção de grãos do rebrote (FLOSS, 1991).

As espécies selvagens do gênero *Avena* têm sido avaliadas como possíveis fontes de resistência a moléstias para transferência às espécies cultivadas. *A. sterilis* já foi utilizada na busca de resistência à ferrugem da folha e do colmo (FREY, 1994), no entanto, ainda não para resistência a mancha negra nos grãos.

1.2. Histórico e ocorrência da moléstia

O primeiro relato da forma imperfeita, *Drechslera avenae*, foi em 1889, na região de Pavia, na Itália, por BRIOSI & CAVARA, sendo inicialmente denominado *Helminthosporium teres* Sacc. forma *avenae-sativae*. Coube a ITO, no Japão, em 1930, o primeiro relato da forma perfeita, *P. chaetomioides* Speg., identificada em restos culturais (TEMPE, 1964).

Já em 1974 havia relatos de epidemias da helmintosporiose da aveia, na Alemanha e sul dos Estados Unidos, em que a mesma destacava-se como a doença mais severa depois da ferrugem da folha, com perdas estimadas de 30-40% na produção de grãos (GOUGH & McDANIEL, 1974). No Brasil, a helmintosporiose da aveia foi relatada por Costa Neto, na década de 60, no Rio Grande do Sul.

Os sintomas mais comumente observados na helmintosporiose da aveia podem surgir logo após a emergência da planta (IVANOFF, 1963) e foram descritos por ELLIS em 1971, como manchas inicialmente pequenas (1-3 x 1-2mm), com o centro branco circundado por um halo marrom-avermelhado que posteriormente coalescem e alongam-se, formando pequenas listras longitudinais.

As manchas em colmos podem ser alongadas e estreitas ou expandirem-se irregularmente (HARDER & HABER, 1992).

As lesões típicas de *P. chaetomioides* se desenvolvem nas folhas porém, em condições propícias, a doença pode atingir as bainhas das plantas. Onde há contato direto com as bainhas, os nós ficam escuros e a região próxima aos nós sofre um processo de infecção mais acentuado. No caso de infecção mais grave, a massa micelial do fungo pode ser observada na cavidade interna do colmo, com conseqüente quebra dos mesmos na terceira ou quarta região internodal. Estes autores ressaltam que este sintoma de "colmo negro" cujo agente causal é o fungo *P. chaetomioides*, assemelha-se bastante àquele descrito para *Septoria avenae* Frank (LUKE et al., 1957).

Esta doença por interferir no desenvolvimento pleno das plantas, pode também causar dano às sementes (DRECHSLER, 1923). REIS (1987) considerou que a colonização ou infecção das sementes, é causada por parasitas necrotróficos, não somente *P. chaetomioides*, sob condições naturais. BLUM (1995) relatou *P. chaetomioides* como o principal patógeno associado às sementes de aveia da região sul do Brasil.

BOEWE (1960) associou a destruição do tecido foliar das plantas infectadas à conseqüente produção de grãos leves, enrugados, escurecidos na base e com qualidade inadequada para produção de alimentos. Entretanto, não havia sintomatologia típica sobre a semente infectada que fosse útil para a diagnose e

que tivesse sido descrita até o trabalho de BLUM (1997). Trabalhos mais recentes (BOCCHESI et al, 2001) determinaram a localização do micélio de *P. chaetomioides* nos tecidos da cariopse de aveia como muito superficial e limitada aos três tecidos do pericarpo, referindo a testa da semente como a barreira para sua penetração. Também correlacionaram a intensidade das manchas com a densidade de micélio nos tecidos, sugerindo que o gradiente de severidade da mancha pode ser devido à interação entre fatores do ambiente favoráveis à infecção e a composição lipídica dos grãos.

Atualmente, no Brasil, a ocorrência de grãos manchados aumentou em níveis preocupantes em vista das condições de ambiente favoráveis ao desenvolvimento do patógeno e pela utilização da técnica de plantio direto pelos produtores, que disponibiliza ao patógeno a resteva de aveia, meio ideal para sua sobrevivência na área.

O grão de aveia destinado ao consumo humano deve atender a uma exigência de qualidade mínima. Com este intuito, as indústrias objetivando a manutenção de altos padrões de qualidade têm maior exigência qualitativa para aquisição de grãos, e não estão aceitando o produto com percentuais de grãos manchados superiores a 3%. Conseqüentemente, há necessidade iminente de soluções para minimizar este problema, o qual está colocando em risco toda a cadeia produtiva desta cultura.

1.3. O Patógeno *Pyrenophora chaetomioides*

O agente causal da helmintosporiose da aveia é o fungo *P. chaetomioides* (forma perfeita de *Drechslera chaetomioides*), pertencente à subdivisão Ascomycotina, classe Loculoascomycetes, ordem Pleosporales, família Pleosporaceae, *Pyrenophora chaetomioides*. (MENEZES & OLIVEIRA, 1993).

Os conidióforos de *D. chaetomioides* emergem solitários ou em grupos de 2-4, são mais ou menos cilíndricos, retos ou sinuosos, frequentemente geniculados, algumas vezes dilatados na base, pardos, lisos, com comprimento acima de 350 μm e espessura de 8-11 μm (ELLIS, 1971).

Os conídios de *D. chaetomioides* são solitários, ocasionalmente em cadeia, retos, cilíndricos, algumas vezes afilados levemente, raramente obclavados, pálidos a amarelados, ou marron-oliváceos, planos, 30-170 x 11-22 μm e com 1-9 pseudoseptos. No hospedeiro, os conídios medem normalmente 50-110 x 15-19 μm , com 2-6 pseudoseptos, e, em cultura, normalmente 30-60 x 12-15 μm , com 2-5 pseudoseptos, e hilum com 4-6 μm de largura (ELLIS, 1971).

O micélio de *P. chaetomioides* dentro dos tecidos da semente é escuro, espesso, muito septado, irregular, intracelular e viável por longo período (TURNER & MILLARD, 1931).

A forma perfeita de *D. chaetomioides*, *P. chaetomioides*, possui estruturas denominadas pseudotécios que se desenvolvem sobre os restos culturais do tecido hospedeiro infectado. Estes são imersos a erupentes, semiglobosos a globosos negros, com setas longas, medindo de 450-800 x 300-600 μm , com um ostíolo curto e cilíndrico. As setas são marrom-escuras, normalmente retas, septadas, medindo 250-430 x 9-12 μm . Sobre os pseudotécios, misturando-se às setas, podem ser encontrados conidióforos (SIVANESEN, 1987).

As ascas são cilíndricas a cilíndrico-clavadas, bitunicadas, contendo de 2-8 ascosporos, retas ou levemente curvadas, medindo 180-360 x 32-45 μm . Os ascosporos são hialinos a amarelo-claros, elipsoidais, arredondados em ambas as extremidades, constrictos nos septos, com septos transversais, envolvidos por uma fina mucilagem (SIVANESEN, 1987). O número de septos transversais é

uma característica fundamental que diferencia *P. chaetomioides* de todas as outras espécies (KENNETH, 1962).

Os pseudotécios de *P. chaetomioides* têm sido, frequentemente, encontrados sobre restos culturais de aveia em lavouras na região sul do Brasil (BLUM, 1997). Porém, essas estruturas oriundas da fase perfeita deste fungo, são consideradas de pequena relevância como fonte de inóculo. As principais fontes de inóculo primário são sementes e restos culturais de aveia contaminados onde o fungo sobrevive. Os sintomas podem ser detectados logo após a emergência, através das manchas ovais de cor pardo-escura, produzidas sobre o coleóptilo e na primeira folha. À medida que as folhas basais são colonizadas pelo fungo e morrem, uma grande quantidade de esporos é produzida e disseminada para as folhas superiores e para os grãos em formação, completando o seu ciclo. O grão atacado apresenta manchas escuras, que podem consistir em pequenas pontuações ou cobrir toda a superfície. A mancha no grão representa o maior prejuízo dessa moléstia à cultura.

1.4. Ciclo da doença

O ciclo primário dessa doença é iniciado com o micélio, os ascosporos e conídios presentes nas sementes (SCHILDER & BERGSTROM, 1995) ou nos resíduos infectados do cultivo anterior (ADEE & PFENDER, 1989). A infecção primária pode reduzir significativamente o potencial de rendimento da cultura devido aos danos que provoca nas plântulas (WRIGHT & SUTTON, 1990). O ciclo secundário da epidemia engloba a produção de conídios nas lesões primárias, a liberação, a dispersão e a infecção de novos tecidos. A infecção das folhas superiores, a qual está associada com os conídios, é a que provoca os maiores danos devido a interferência no rendimento e acumulação de fotossintatos (REES & PLATZ, 1980). Os autores observaram ainda que folhas

mais velhas produzem mais conídios que as mais novas, indicando que os fungos possuem maior habilidade em colonizar as folhas mais próximas da senescência natural. Uma representação esquemática do ciclo dessas doenças pode ser vista na Figura 2.

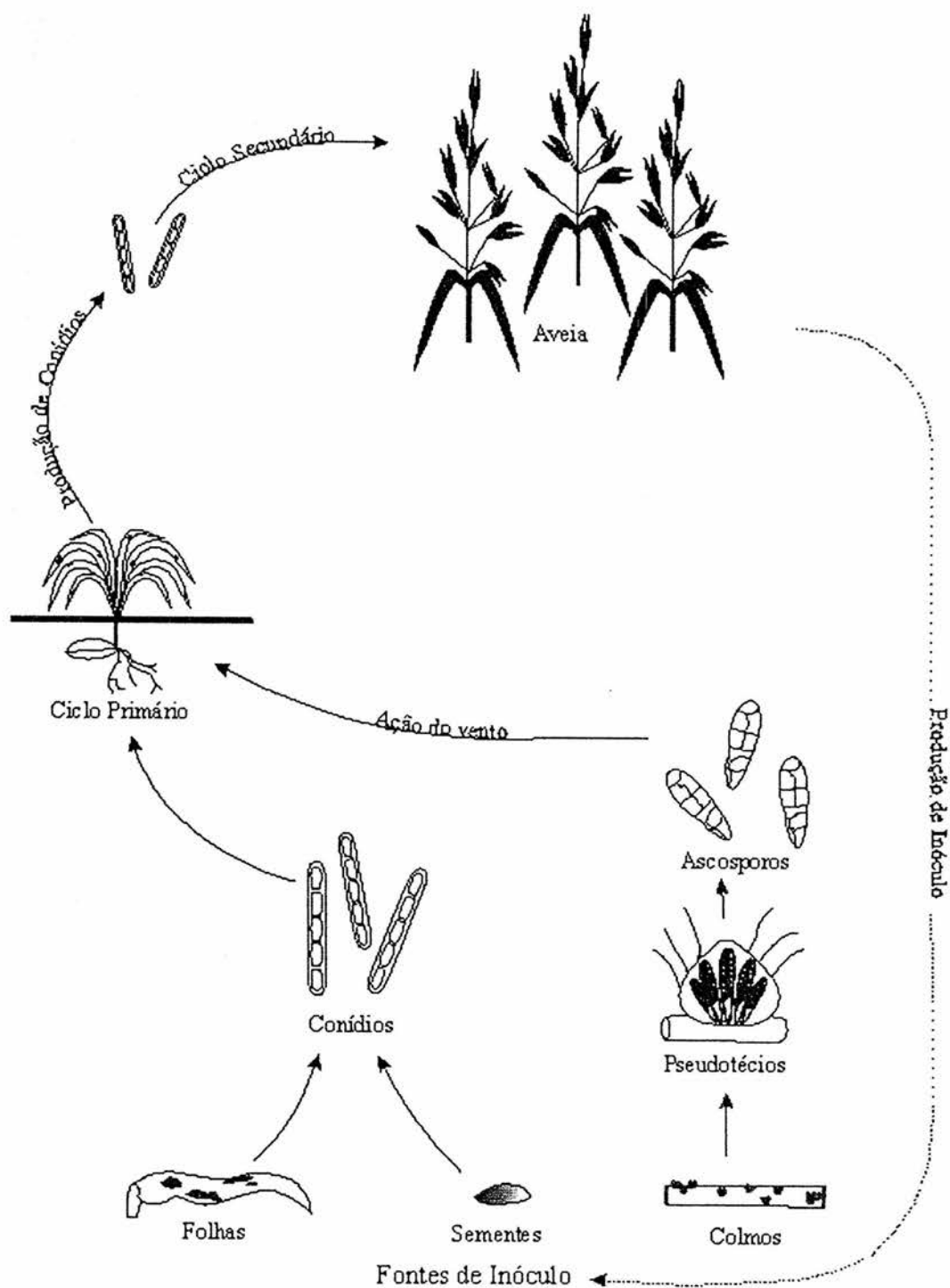


Figura 2. Ciclo de *Pyrenophora chaetomioides* na cultura de aveia branca. (Fonte: Autora, 2003)

1.5. Infecção

Segundo ARORA et al. (1980) a germinação dos conídios de *Helminthosporium avenae* em folhas, ocorre normalmente a partir da célula terminal, inicia 45 minutos após a inoculação e se completa dentro de quatro horas. Nesse momento o tubo germinativo cessa o seu crescimento e ocorre a formação do apressório. Apenas 30 % dos tubos germinativos formam apressório, enquanto que o restante continua o crescimento. Os apressórios são formados geralmente sobre a junção de duas células da epiderme e muito raramente sobre os estômatos. Uma fina hifa de infecção, com aproximadamente 4 μm , se forma na superfície inferior do apressório e penetra diretamente a cutícula e a parede celular externa. Aparentemente o mecanismo de penetração não é inteiramente mecânico, uma vez que a parede celular da epiderme sob o apressório apresenta um amolecimento que facilita a entrada da hifa de infecção. Alguns autores relatam a participação de enzimas cutinolíticas, celulolíticas e pectolíticas secretadas pelo fungo durante a penetração da hifa infectiva (STROBEL & MATHRE, 1970; WHEELER, 1975 citados por AURORA et al, 1980). Normalmente entre 12 e 16 horas após a formação, se desenvolve uma vesícula na extremidade da hifa de infecção, de onde partem novas hifas que, em 8 h, irão penetrar nas células adjacentes. A granulação do citoplasma do hospedeiro ocorre após 36 h e a clorose nas folhas é visível 48 h após a entrada das hifas infectivas no interior das células (ARORA et al., 1980).

Segundo HARGREAVES (1982), os conídios de *Pyrenophora teres* germinam 24 horas após sua inoculação na superfície de folhas de cevada, produzindo tubos germinativos longos e bifurcados onde se formam um ou mais apressórios. Na superfície interna das células epidérmicas, em posição adjacente ao apressório é formada a papila, que impede a penetração da hifa de infecção.

Em alguns sítios de infecção o fungo é capaz de penetrar na célula epidérmica e formar uma vesícula, sem desencadear a formação da papila. Em estudo de fluorescência com luz ultravioleta esse autor verificou que as paredes da célula infectada e da hifa do fungo estavam impregnadas pela mesma substância presente na papila e na cápsula que envolvia a vesícula, indicando que esse material pode estar associado com a resistência a *P. teres*. Também observou que o material depositado nos sítios de infecção se acumula na periferia das lesões produzidas a partir da inoculação com *P. teres*, formando uma barreira impermeável que impede o movimento de nutrientes da planta para o patógeno e de enzimas e toxinas do fungo para as células sadias do hospedeiro. Segundo o autor, esse material pode ser fungitóxico ou inibir e desativar enzimas ou toxinas produzidas pelo fungo. Ainda neste estudo preliminar foi observado que um composto antifúngico pré-formado, provavelmente avenacina, estava presente em concentrações similares tanto em folhas inoculadas quanto em folhas não inoculadas.

Em aveia, o processo de infecção é rápido. A penetração na folha ocorre entre 12 e 16 horas após a inoculação. O fungo cresce no interior da célula do hospedeiro e ocorre um colapso nas células do mesófilo, sendo estas invadidas pelo micélio do fungo. Ocorre também a invasão do tecido vascular e um crescimento mais acentuado do micélio nas células epidérmicas, com conseqüente aparecimento dos sintomas (MULLER, 1964 citado por HARDER & HABER, 1992). A infecção da semente ocorre durante o florescimento da espiguetta, os conídios de *Pyrenophora* spp. germinam e penetram no pericarpo do grão em maturação. Alguns trabalhos demonstraram que o estágio de grão leitoso é o mais suscetível à infecção e que a suscetibilidade foliar nem sempre é correlacionada com a da semente, permanecendo em dormência até a

germinação da mesma ocorrer (TURNER & MILLARD, 1931; SCHILDER & BERGSTROM, 1994). Segundo ROSA (2002), a suscetibilidade das sementes de aveia é maior durante os estágios de grão leitoso e grão em massa mole. Quando a infecção ocorre nesse período, a incidência de *P. chaetomioides* nos grãos é maior.

1.6. Controle químico

O controle de *P. chaetomioides* pode ser feito com o tratamento foliar e das sementes com fungicidas e apresenta melhor eficiência quando é utilizado de forma integrada com outros métodos de controle, tais como, bom manejo de práticas culturais, rotação de culturas, e uso de agentes químicos. As práticas que visam reduzir o inóculo primário podem retardar o aparecimento deste fungo, de modo que, em muitos casos, o limiar de ação não é atingido. Na aplicação de fungicidas torna-se necessário a avaliação dos aspectos técnicos, econômicos e do impacto ambiental, além da necessidade de quantificar as perdas específicas, antes de se decidir pelo uso, puro e simples, do tratamento (RIBEIRO, 1996).

O tratamento químico da semente tem sido a principal forma de controle para *P. chaetomioides* (BOEWE, 1960; TEMPE, 1964; JONES & CLIFFORD, 1983; HARDER & HABER, 1992). Porém, atualmente, os tratamentos com fungicidas modernos não têm sido erradicativos (BLUM, 1997), em vista dos níveis elevados do patógeno na semente, trazendo como consequência a presença da doença na parte aérea da cultura. REIS & SOARES (1995) testaram fungicidas e doses a serem recomendadas para os tratamentos de sementes que fossem mais eficientes e obtiveram um controle máximo de 30 % para *P. chaetomioides*, com a mistura tiram+carboxim, demonstrando assim a dificuldade da erradicação deste fungo. Entre os fungicidas testados no Brasil para controle desse patógeno, os

mais eficientes foram difenoconazole, guazatina, iminoctadina, iprodione + tiram e o triadimenol (REIS & CASA, 1998).

1.7. O Grão de Aveia

O grão de aveia é um fruto-semente denominado cariopse (BETCHEL, 1989), que se desenvolve dentro de coberturas florais que, na realidade, são folhas modificadas, denominadas glumas e formam parte da palha. As coberturas florais envolvem as cariopses tão firmemente que permanecem aderidas a elas após a colheita e se constituem na casca dos grãos de aveia (HOSENEY, 1994).

A cariopse do grão de aveia apresenta tamanho e cor variável, formato fusiforme e com as extremidades pontiagudas. Em uma das extremidades, encontra-se o embrião e no lado oposto está a crease, que se estende por todo comprimento da cariopse (FULCHER, 1986). Apresenta também similaridades na aparência com os grãos de trigo e arroz, exceção aos numerosos tricomas presentes em sua superfície (HOSENEY, 1994).

A cariopse representa em torno de 65-75% do grão, enquanto as cascas, 25-35% (LEONARD & MARTIN, 1968). A proporção de cariopses e cascas, um dos parâmetros de avaliação de rendimento industrial, é influenciada pelas condições ambientais e genéticas das cultivares.

Morfologicamente o grão de aveia pode ser dividido em duas partes principais que são o pericarpo e a semente (HOSENEY, 1994). O pericarpo é composto pelas camadas da epiderme, hipoderme e testa. Já a semente é formada pelo endosperma, composto pela camada de aleurona e endosperma amiláceo, e pelo embrião (BETCHEL & POMERANZ, 1981).

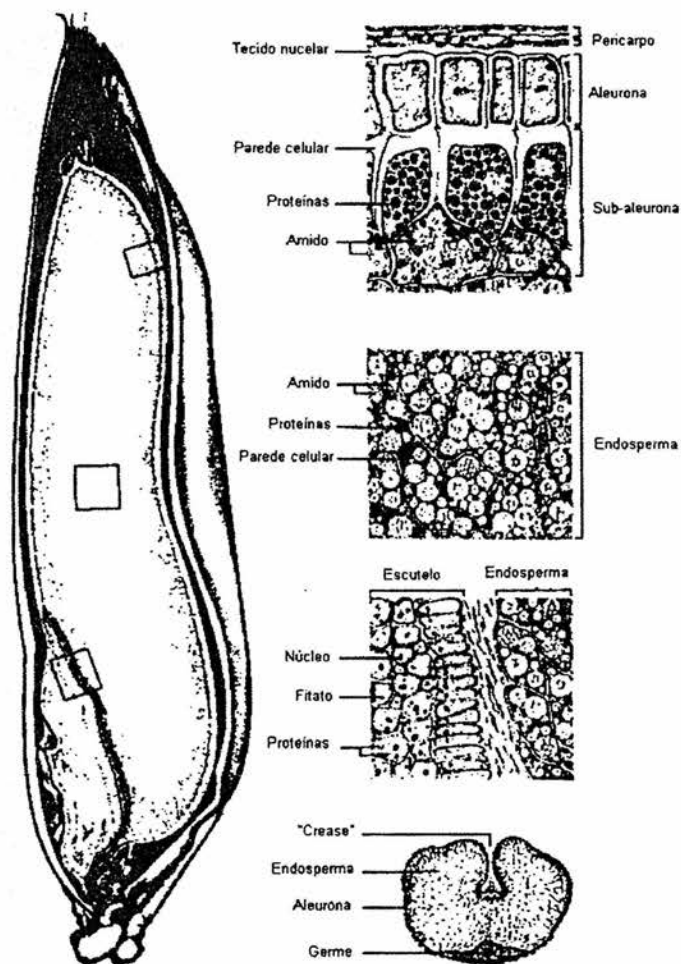


Figura 3. Cortes transversais e longitudinais do grão de aveia e observações microscópicas dos diferentes tecidos. Fonte: FULCHER, 1986.

1.8. Alguns componentes do grão que apresentam variação entre as cultivares

1.8.1. Lipídios

O conteúdo lipídico das cultivares de aveia é geralmente maior do que o de outros cereais, porém varia bastante. Valores tão baixos quanto 3% e tão altos quanto 12 % já foram relatados. A maioria das linhas contém de 5-9% de lipídios (HOSENEY, 1994).

A casca apresenta baixa percentagem de lipídios em relação ao total do grão de aveia. A maior quantidade de lipídios encontra-se no embrião, com 33,2%, mas sua relação com a quantidade total corresponde a 7,7%, pois

compreende apenas 3% do peso do grão. YOUNGS (1986) relatou os percentuais das diferentes partes do grão encontrando 12,5% no embrião, 22-25% no farelo, e 60% no endosperma, em relação ao total de lipídios do grão de aveia.

A influência da variação genética e do ambiente na quantidade total de lipídios bem como na composição dos ácidos graxos, foi estudada por SAASTAMOINEN et al (1989). O conteúdo de lipídios e a composição em ácidos graxos foram determinados em nove cultivares de aveia, cultivadas em seis diferentes locais e por dois anos. Em baixas temperaturas houve aumento da síntese dos ácidos graxos oléico e linoléico e diminuição dos ácidos palmítico e esteárico. Os resultados deste trabalho mostram diferenças significativas, especialmente em relação a concentração dos ácidos oléico e linoléico entre cultivares estudados. Contudo, fatores ambientais, especialmente o cultivo de aveia em temperaturas baixas, aumentou a síntese dos ácidos oléico e linoléico. Fatores genéticos influenciaram no aumento da concentração do ácido linoléico e diminuição simultânea de ácido oléico. Entretanto, fatores genéticos e do ambiente diferiram em alguns efeitos como o da atividade de síntese dos diferentes ácidos graxos.

Estudando a composição de ácidos graxos de óleos das cultivares de aveia: UPF15, UPF16, CTC3 e UFRGS14, PEDÓ & SGARBIERI (1997) encontraram valores médios para os ácidos graxos totais, insaturados e saturados, de 81 e 19%, respectivamente. Os ácidos linoléico, oléico e palmítico são os maiores representantes, com 39; 38 e 18% respectivamente, correspondendo a 96% do total de ácidos graxos. Os ácidos mirístico, esteárico, araquidômico e linolênico contribuem com apenas 3,4%, em média. A aveia contém mais ácido oléico e menos linoleico que arroz, trigo e cevada. Sua composição de lipídios apresenta-se similar aos demais cereais, porém, com

maiores quantidades de lipídios totais. Um fator que diferencia a aveia dos demais cereais, é a presença de maior quantidade de ácidos graxos livres. BROWNN et al. (1970) notaram a dominância de ácidos graxos livres em grãos imaturos de aveia, possivelmente ocasionados pela hidrólise enzimática.

BAKER & McKENZIE (1972) relataram que a herdabilidade da concentração de óleo nas sementes é alta e que trocas genéticas podem ser esperadas de seleções fenotípicas para concentração de óleo.

Resultados de estudos com genótipos de aveia e análises de correlação evidenciavam que podem ser selecionados três tipos de genótipos quanto a presença de óleos: óleos com altas quantidades de ácidos graxos saturados, óleos com altas quantidades de ácidos graxos insaturados e óleos com quantidades relativamente altas dos ácidos palmítico e linoléico (THRO et al., 1983).

BOCCHESI (2000) demonstrou a localização de *P. chaetomioides* nos tecidos superficiais da semente. Esta informação ofereceu condições para avaliar melhor as exigências nutricionais do patógeno, considerando que os componentes do grão não estão uniformemente distribuídos nas diferentes estruturas do grão. Nos tecidos superficiais das cultivares modernas encontra-se grande concentração de lipídios e baixa concentração de amido (PETERSON, 1992).

Fungos, tais como *P. chaetomioides* são caracterizados pela presença de altas concentrações dos ácidos palmítico, oléico e linoleico (RATTRAY, 1988) os quais também são encontrados em altas concentrações nos grãos de aveia (PEDÓ & SGARBIERI, 1997). O conteúdo de lipídios na célula fúngica pode fornecer melhores condições para a sobrevivência, impedindo sua desidratação, e

proteger o fungo contra os mecanismos de defesa da planta (CHOPRA & KHULLER, 1983).

1.8.2. Proteínas e enzimas

Muitas proteínas tem sido descritas por atuarem como inibidoras das enzimas hidrolíticas dos patógenos envolvidas na degradação da parede da célula do hospedeiro. As células das plantas também contém enzimas hidrolíticas, algumas tais como as glutanases e quitinases, as quais podem causar ruptura dos componentes da parede da célula do patógeno e conseqüentemente contribuir para a resistência à infecção (AGRIOS, 1997). GONNER & SCHLOSSER (1993) não encontraram atuação efetiva da quitinase na interação *P. chaetomioides* e *Avena sativa* L.

Por outro lado, a aveia é o cereal com os maiores níveis de triglicerídios e de atividade lipolítica. Assim o potencial para a rancidez oxidativa existe e pode resultar em produtos com baixa qualidade comercial (GUTKOSKI & PEDÓ, 2000).

A atividade da lipase é fortemente afetada pela quantidade de água disponível. A maior atividade ocorre em aveia com 25-50% de umidade, porém, ao aumentar para 75-100% a atividade é inibida (FREY & HAMMOND, 1975).

A enzima lipase é um potente biotransformador de gorduras (LEE & HAMMOND, 1990), a qual cataliza a hidrólise de triglicerídios para produzir diglicerídios e ácidos graxos livres. Os ácidos graxos insaturados podem ser convertidos a hidroperóxidos os quais, por sua vez, são transformados em hidroxi ácidos pela ação da lipoxigenase, peroxidase e outras enzimas, como também por processos não enzimáticos (YOUNGS, 1986). Esta enzima endógena fica disponibilizada para hidrolizar os lipídios após a ocorrência de lesão no grão (EVERS *et al.*, 1999).

A lipase não está uniformemente distribuída no grão de aveia. URQUHART. et al. (1983) afirmaram que a maior atividade de lipase está associada com a camada de aleurona. EKSTRAND et al. (1992) verificaram em estudos posteriores que o embrião apresenta maior atividade lipolítica quando comparado com a camada de aleurona e o endosperma.

A atividade da lipase varia durante o desenvolvimento, maturação, armazenamento e germinação do grão de aveia. URQUHART et al (1984) verificaram a atividade máxima entre 23 e 30 dias após a antese, ocorrendo o declínio com a aproximação da maturação.

A atividade lipolítica também varia entre cultivares e esta parece ser uma característica controlada geneticamente. FREY & HAMMOND (1975), em estudo de 352 cultivares de aveia, encontraram uma variação de vinte vezes. Variações consideráveis também foram observadas por PAMAR et al. (1994).

Em trabalho realizado por TRIONE & ROSS (1988) foi demonstrado o efeito inibitório da lipase na germinação de teliosporos e formação do esporídio de *Tilletia sp*, sugerindo que os lipídios podem atuar como bioreguladores para este fungo.

O micélio de *P. chaetomioides* cresce apenas nos tecidos superficiais da cariopse do grão de aveia, os quais são caracterizados pelo alta concentração de lipídios e de lipase. Este substrato pode estar interferindo positivamente no desenvolvimento de *P. chaetomioides*, devido a atuação da lipase, nos lipídios da superfície do grão, e por disponibilizar ácidos graxos livres para seu desenvolvimento.

A atividade da peroxidase e a síntese de lignina são fatores estreitamente relacionados entre si e com possibilidade de interferência na resistência à doenças (PASCHOLATI & LEITE, 1995). HAMMERSCHMIDT & KUC (1982) e

HAMMERSCHMIDT et al. (1982) demonstraram em seus trabalhos a veracidade desta afirmação, uma vez que as cultivares de pepino resistentes à antracnose apresentaram correlação os níveis de deposição de lignina e de atividade de peroxidase.

A peroxidação dos lipídios em aveia, segundo trabalho desenvolvido por GONNER & SCHLOSSER (1993), ocorre nos estágios iniciais do desenvolvimento da mancha foliar, a qual precede o aumento significativo do micélio nas folhas inoculadas com estirpes virulentas de *P. chaetomioides* e ao aparecimento de sintomas visíveis. Estes autores concluíram que a presença dos compostos resultantes da peroxidação dos lipídios parece estar mais relacionada com suscetibilidade do que resistência. WILLIANSO (1997) relatou a relação existente entre a suscetibilidade à ponta preta em cultivares de trigo e a presença de isoenzimas de peroxidase.

A peroxidação dos lipídios pode conduzir a ruptura da integridade da membrana (proteína-lipídio) e esta desorganização resultar em necrose (ADAM et al., 1989). Apesar das reações de oxidação serem bem documentadas em reações de hipersensibilidade, seu papel no desenvolvimento da mancha do grão de aveia ainda não foi investigado.

CAPÍTULO II

Processo de infecção e formação de mancha em grãos de cultivares de aveia branca com níveis diferenciados de resistência para *Pyrenophora chaetomioides*, influenciados pela época de colheita e controle químico

2.1. INTRODUÇÃO

A mancha-negra nos grãos de aveia branca, cujo principal agente causal é *Pyrenophora chaetomioides*, aumentou sua freqüência e intensidade nos últimos anos devido a mudanças nas práticas culturais. Dentre elas, destacam-se a utilização de aveia como cultura de cobertura do solo para semeadura direta sem rotação adequada e o emprego de cultivares suscetíveis. O agravamento do problema é devido à permanência dos restos de cultura de aveia infectados por *P. chaetomioides* os quais constituem uma das principais fontes de inóculo para esta moléstia.

O maior dano associado a este patógeno é a redução da qualidade dos grãos e das sementes, o que ocorre mesmo com baixa severidade sobre as folhas no campo. A qualidade da aveia é especificada em função do destino que será dado aos seus grãos. A indústria alimentícia fixa limites sobre diversos parâmetros, entre eles está o percentual de grãos descascados manchados que

não pode ultrapassar 3% do volume de grãos para ser aceito (COMISSÃO..., 2003). O aumento da severidade da mancha nos grãos tem ocasionado a rejeição de inúmeros lotes de grãos de aveia, com prejuízos para os produtores.

Apesar do aumento da importância econômica do cultivo da aveia branca para produção de grãos de alta qualidade e a ampla distribuição desta moléstia nas principais áreas de cultivo no sul do Brasil, relativamente poucos trabalhos sobre *P. chaetomioides* têm sido desenvolvidos na busca de novos conhecimentos que possam ser inseridos nas atuais práticas de manejo.

O processo de infecção e colonização por *P. chaetomioides* pode ocorrer logo após a emissão das panículas, onde este patógeno ocasiona manchas em todos os componentes florais de aveia branca. A determinação da época de maior suscetibilidade à infecção e formação da mancha nos grãos durante seu desenvolvimento poderá oferecer subsídios importantes ao controle químico de *P. chaetomioides* para produção de grãos com qualidade industrial e sementes sadias.

O manejo da mancha-negra através do controle químico tem se mostrado pouco eficaz na redução do inóculo em sementes e folhas, visto que o tratamento das sementes é prejudicado pela presença da casca aderida ao grão que dificulta a translocação do ingrediente ativo do fungicida, necessária para otimizar a eficácia do produto. Por outro lado, o tratamento foliar com fungicida ainda é efetuado pelos produtores quando há necessidade de controle de ferrugem e/ou quando a mancha-negra encontra-se com altos níveis de severidade nas folhas. Esse fato dificulta o controle efetivo desta moléstia, já que não há correlação entre a área de progresso da doença quanto à severidade nas folhas e incidência de *P. chaetomioides* nos grãos (ROSA et al., 2003).

SABESTA et al. ainda em 1995 relataram a ocorrência de níveis variáveis de resistência à mancha foliar por *P. chaetomioides* em cultivares de aveia. No Brasil, o estudo do comportamento das cultivares de aveia à mancha foliar, restringe-se aos trabalhos de LÂNGARO (2000) e BOCCHESI et al. (2003), onde também observaram a presença de variação nos graus de resistência, desde média até muito baixa resistência, nas cultivares de aveia testadas. Não existe até o momento classificação de cultivares de aveia quanto à suscetibilidade à mancha-negra dos grãos ocasionada por *P. chaetomioides*. A seleção de cultivares quanto à esta característica é necessária para enriquecer os estudos de melhoramento genético e ampliar o germoplasma de aveia com esta característica.

Os objetivos deste trabalho foram: i) Determinar a duração do período de suscetibilidade dos grãos a formação de manchas e identificar a época de maior incidência de *P. chaetomioides* nos componentes florais após a emissão da panícula até a maturação fisiológica. ii) Determinar os índices de suscetibilidade de 15 cultivares de aveia à mancha-negra e sua correlação quanto à infecção dos grãos. iii) Avaliar o efeito do fungicida na expressão da doença em diferentes épocas de aplicação.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Local e Período

Esta pesquisa foi realizada no Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia e na Estação Experimental Agronômica (EEA) da UFRGS,

localizada no município de El Dourado do Sul, no período de janeiro de 2001 a abril de 2003.

2.2.2. Origem das Sementes e análise do percentual de mancha e infecção

As 15 cultivares/linhagens de aveia utilizadas nesta pesquisa foram escolhidas após uma avaliação visual preliminar de seus grãos dentre um grande número de genótipos disponíveis no programa de melhoramento da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os genótipos utilizados neste trabalho foram: OR2, ER20877-2, UFRGS995004-2, UPF95204-2, UFRGS16, UFRGS9912002-2, UFRGS999007-5, UFRGS998013-3, UPF16, UFRGS999022-1, UFRGS995058-3, UFRGS15, UFRGS17, UFRGS19, UFRGS997005-2. A análise do percentual de mancha foi feita com 4 repetições de 100 grãos para cada genótipo e baseada na observação visual segundo gradiente pré-estabelecido (Figura 1). As categorias do gradiente representam níveis diferentes de severidade da mancha-negra (intensidade do escurecimento) nos grãos: C-I: 0-10%; C-II: 11-50%; C-III: mais de 50%.

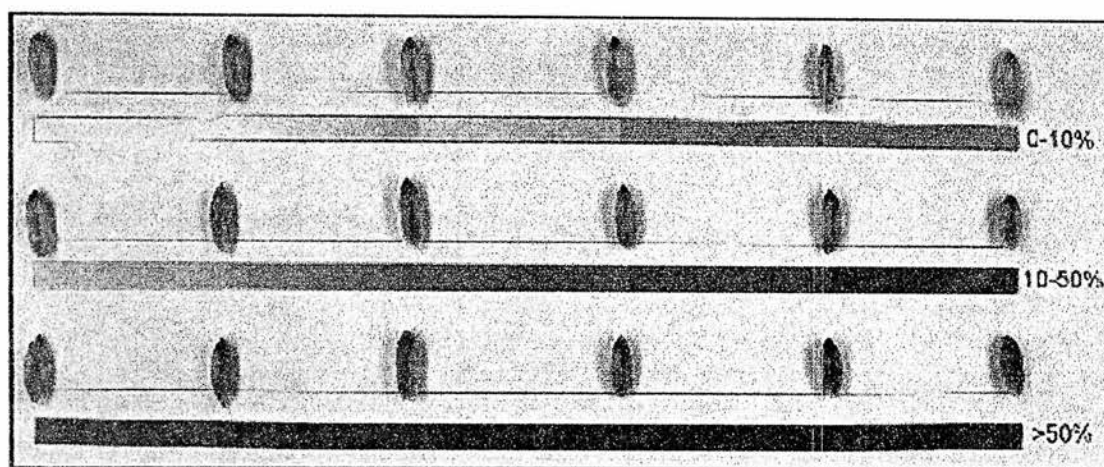


Figura 4. Gradiente pré-estabelecido para avaliação visual dos genótipos de aveia branca. Foto: BOCCHESI, 2003.

O percentual de infecção foi avaliado através da incidência de *Pyrenophora chaetomioides* em 400 grãos da categoria C-I de todos os genótipos testados,

quando incubados sobre meio de cultura BDA em placas de Pétri, sob temperatura controlada a $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e com fotoperíodo de 12h. Este experimento avaliou a incidência de *Pyrenophora chaetomioides* em 600 placas de Pétri, que continham 10 sementes por placa, sendo 40 placas para cada genótipo testado.

2.3.3. Infecção e formação da mancha durante o desenvolvimento dos grãos

Neste trabalho foram selecionados seis genótipos de aveia branca: UFRGS-19, UFRGS-16, UFRGS9990004-2, ER20877-2, UFRGS998013-3, UFRGS995058-3, os quais são representativos dos demais genótipos testados, uma vez que apresentaram níveis diferenciados de suscetibilidade à infecção e a formação de manchas. O percentual de infecção foi avaliado através da incidência de *P. chaetomioides* nos componentes florais (glumas, páleas, lemas e carpelos), isoladamente, de 160 flores de cada genótipo, quando incubados sobre meio de cultura BDA modificado (batata: 100 g/L; dextrose: 5 g/L; agar: 12 g/L) em placas de Pétri e incubadas durante 7 dias em câmara climatizada a $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$. O número de componentes florais infectados pelo patógeno foi contado e os dados expressos em termos do percentual de incidência. As coletas das inflorescências iniciaram logo após a emissão das panículas e continuaram até a época de colheita, perfazendo um total de seis coletas. Este experimento avaliou a incidência de *Pyrenophora chaetomioides* em 2.304 placas de Pétri, que continham 10 sementes por placa, sendo 16 placas/coleta para cada genótipo testado. Os dados foram submetidos à análise de variância e a discriminação da variação entre tratamentos foi feita pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

2.2.4 Infecção e formação da mancha nos grãos após o amadurecimento fisiológico

Foram utilizados 10 genótipos de aveia branca na estação de cultivo de 2001: UFRGS 995058-3, UFRGS 998013-3, UFRGS 17, OR 2, UFRGS 18, UFRGS 9912002-2, UPF95204-2, UFRGS999007-5, UFRGS 19, UFRGS999022-1 e 14 genótipos de aveia branca para estação de cultivo de 2002 :UFRGS 995058-3, UFRGS 9990004-2, UFRGS 998013-3, UFRGS 17, URS 20, UFRGS 18, UPF 18, UFRGS 14, UFRGS 16, URS 21, UFRGS 15, URS 22, UFRGS 19, ER 20877-2 com resistência diferenciada à infecção e a formação de mancha, colhidos em 3 épocas (1 = ideal; 2 = atraso de 7 dias ; 3 = atraso de quatorze dias; 4 = atraso de vinte um dias; 5 = atraso de 30 dias). Com o objetivo de ampliar a amostragem dos grãos neste estudo, trabalhou-se com populações diferentes nas duas estações de cultivo. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados (fatorial 14 x 7), com 4 repetições de parcelas de 3m². As amostras dos tratamentos foram constituídas das sementes colhidas em cada parcela, das quais foram retiradas subamostras contendo 100 sementes, totalizando 400 sementes por tratamento. Para a avaliação da severidade da mancha, os grãos foram descascados e classificados em dois grupos: manchados e não-manchados. Os valores obtidos foram expressos em porcentagem de grãos manchados. O percentual de infecção foi avaliado através da incidência de *P. chaetomioides* em 400 grãos não manchados de cada tratamento quando incubados sobre meio de cultura BDA modificado (batata: 100 g/L; dextrose: 5 g/L; agar: 12 g/L) em placas de Pétri e incubadas durante 7 dias em câmara climatizada a 23± 3°C. Este experimento avaliou a incidência de *Pyrenophora chaetomioides* em 2.880 placas de Pétri, sendo 40 placas para cada tratamento. Também foram realizadas avaliações de rendimento (Kg/ha) e peso do hectolitro

(Kg/ha) dos tratamentos. Os dados meteorológicos obtidos junto ao Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia/UFRGS referentes aos dois períodos de colheita foram: i) Ano 2001: Δ Temperatura:15,5-25,2 °C ; Precipitação acumulada: 84,2mm; ii) Ano 2002: Δ Temperatura:15,2 - 25,2 °C; Precipitação acumulada: 286,7mm. A análise estatística dos dados foi feita utilizando-se o programa SAS[®] Systems, versão 8.2, e a discriminação da variação entre tratamentos foi feita pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

2.2.5 Preparação das Sementes para Análise em Microscopia Eletrônica

Os grãos infectados por *Pyrenophora chaetomioides* foram hidratados por 5 minutos e após foi feita a remoção parcial ou total do pericarpo para análise da superfície. Procedimento básico utilizado na preparação das amostras se constituiu dos seguintes passos: 1) Os grãos selecionados foram reduzidos a peças menores e planas (amostras) para melhorar sua visualização no MEV (Microscópio Eletrônico de Varredura); 2) As amostras foram pré-fixadas em aldeído por 2h seguida por 3 lavagens (15min/cada) e pós-fixadas em OsO₄ 1% por 2h; 3) Após, foram desidratadas de uma maneira lenta e gradual (acetona:30,50, 70, 90 e 100%) . Na etapa em que o desidratante estava puro (100%) foram levadas para o aparelho de Ponto Crítico; 4) Cada amostra foi colocada em um suporte com auxílio de um microscópio estereoscópico, para facilitar a visualização do ponto ou área de interesse; 5) Esta etapa foi feita na metalizadora, onde as amostras tornaram-se condutivas através da deposição de metal na sua superfície; 6) Finalmente, as amostras foram observadas no Microscópio Eletrônico de Varredura.

2.2.6 Ação do fungicida em diferentes épocas de aplicação

O fungicida sistêmico Tebuconazole foi aplicado em 6 épocas durante a formação dos grãos (1 = floração; 2 = grão aquoso; 3 = grão leitoso; 4 = grão em

massa mole; 5 = grão em massa; 6 = grão em massa dura) de 14 genótipos de aveia branca: UFRGS 995058-3, UFRGS 9990004-2, UFRGS 998013-3, UFRGS 17, URS 20, UFRGS 18, UPF 18, UFRGS 14, UFRGS 16, URS 21, UFRGS 15, URS 22, UFRGS 19, ER 20877-2 e a testemunha sem aplicação. Utilizou-se um pulverizador portátil pressurizado com CO₂, equipado com uma barra com três bicos espaçados em 0,5 m, que foi conduzida a 0,45 m acima do ápice das plantas. O volume de calda foi de 200 L/ha e a dose de fungicida, 0,75 L/ha, correspondendo a 150 g de i.a./ha (COMISSÃO..., 2000). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados (fatorial 14 x 7), com 4 repetições de parcelas de 3m². As amostras dos tratamentos foram constituídas das sementes colhidas em cada parcela, das quais foram retiradas subamostras contendo 100 sementes, totalizando 400 sementes por tratamento. O percentual de infecção foi avaliado através da incidência de *P. chaetomioides* em 400 sementes de cada tratamento quando incubados sobre meio de cultura BDA modificado (batata: 100 g/L; dextrose: 5 g/L; agar: 12 g/L) em placas de Pétri e incubadas durante 7 dias em câmara climatizada a 23± 3°C. Este experimento avaliou a incidência de *Pyrenophora chaetomioides* em 3.920 placas de Pétri, sendo 40 placas para cada tratamento. Também foram realizadas avaliações de rendimento (Kg/ha), peso do hectolitro (Kg/hl) e percentual de grãos manchados. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa SAS® Systems, versão 8.2, e a discriminação da variação entre tratamentos foi feita pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O percentual de grãos não manchados e incidência de *P. chaetomioides* permitiram o agrupamento dos 15 genótipos selecionados em diferentes níveis de incidência com relação à mancha negra (Tabela 1). A resistência observada nos genótipos quanto à mancha negra apresentou-se variável, com a presença de genótipos mediantemente resistentes num extremo e completamente suscetíveis no outro. O genótipo UFRGS19 foi o que apresentou maior índice de resistência, diferenciando-se significativamente dos demais genótipos através das menores porcentagens de incidência de *P. chaetomioides* e de grãos manchados. Este genótipo também foi referido nos trabalhos de ROSA et al. (2001) como o mais resistente à infecção sob condições de campo em diferentes épocas de plantio. A natureza da resistência nos genótipos para esta moléstia parece englobar dois mecanismos: o de resistência a penetração do patógeno, barreira passiva que geralmente não envolve resposta do hospedeiro, e resistência ao desenvolvimento, geralmente ligada a caracteres fisiológicos da planta (BERGAMIN FILHO & KIMATI al., 1978). Alguns genótipos foram semelhantes tanto no percentual de grãos manchados como na incidência de *P. chaetomioides* tais como: ER20877-2, UFRGS 16 e UFRGS997005-2. Já outros genótipos foram semelhantes no percentual de grãos manchados mas diferiam na incidência tais como: UPF95204-2 e UFRGS999007-5. Conseqüentemente, a correlação obtida entre o percentual de grãos não manchados e o nível de infecção (Tabela 1) não foi significativa ($r=-0,18$). Por outro lado, a resistência ao desenvolvimento fúngico para a moléstia mancha-negra, observada através do percentual de grãos

manchados, parece ser mais importante que a resistência à infecção, pois genótipos com altos níveis de incidência *P. chaetomioides* apresentaram percentuais de grãos manchados semelhantes aos de baixa incidência de *P. chaetomioides*.

Tabela 1. Percentual de grãos manchados, obtidos a partir de avaliação visual, e da incidência de *Pyrenophora chaetomioides* nos mesmos, quando plaqueados em meio de cultura (BDA), avaliados em 15 genótipos de aveia branca.

Genótipos	%Grãos manchados	% Incidência
UFRGS995058-3	83,3 a ¹	24,6 abc
UFRGS999004-2	78,8 ab	12,4 bc
UFRGS998013-3	73,5 bc	21,0 abc
UFRGS17	72,5 bcd	29,2 abc
UFRGS9912002-2	66,8 cde	38,9 ab
UFRGS15	64,8 ef	14,1 bc
UPF16	59,8 e	8,4 bc
UFRGS999007-5	48,0 f	75,8 a
OR2	45,5 f	26,7 abc
UFRGS999022-1	44,3 f	19,6 abc
UPF95204-2	42,0 fg	11,4 bc
UFRGS997005-2	35,0 gh	5,7 cd
UFRGS16	33,5 gh	18,2 abc
ER20877-2	30,8 h	26,8 abc
UFRGS19	13,8 a	1,2 d

¹ Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5%.

As médias dos percentuais de incidência de *P. chaetomioides* nos componentes florais, glumas, lemas, páleas e carpelos (Tabela 2) e apenas dos carpelos (Figura 5) desde a exposição da panícula até o estágio de maturação fisiológica mostram evidências de que o período de maior suscetibilidade para o estabelecimento deste patógeno no grão ocorre no estágio de grão leitoso e massa mole. ROSA et al. (2001) também referiram os estádios de grão leitoso e massa mole como os mais suscetíveis a *P. chaetomioides*, através da utilização de tratamentos com panículas expostas e protegidas a campo SHILDER & BERGSTROM (1994) relataram que o estágio de grão leitoso é o período de maior suscetibilidade das sementes de trigo a *P. tritici-repentis* e TEVIOTDALE & HALL (1976) observaram maior suscetibilidade nas sementes de cevada a *P. graminea* no período que vai desde a emissão da espiga até o estágio de massa mole. Deste modo, o período de suscetibilidade a infecção por *Pyrenophora* spp durante o desenvolvimento das sementes de gramíneas demonstra ser variável.

No gráfico apresentado pela Figura 5 pode-se observar o aumento significativo da incidência de *P. chaetomioides* nos carpelos a partir do estágio de grão leitoso atingindo valor máximo no estágio de massa e, após, decrescendo nos estádios seguintes, até o de massa dura. Essa redução da presença do patógeno no estágio de massa dura pode ser explicada pela inibição por outros microrganismos, tal como *Fusarium graminearum*, também observado com alta frequência nos últimos estádios de desenvolvimento das sementes.

Tabela 2. Incidência de *Pyrenophora chaetomioides* em diferentes épocas durante a formação dos grãos, nos componentes florais (glumas, lemas, páleas e carpelos) de 6 genótipos de aveia branca, na EEA/UFRGS, 2002.

Épocas das coletas	Incidência de <i>P. chaetomioides</i> (%)
Florescimento	0,7 b ¹
Grão aquoso	1,1 ba
Grão leitoso	3,5 a
Grão em massa mole	3,8 a
Grão massa	3,1 ba
Grão massa dura	2,6 ba

¹ Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste Tukey a 5%.

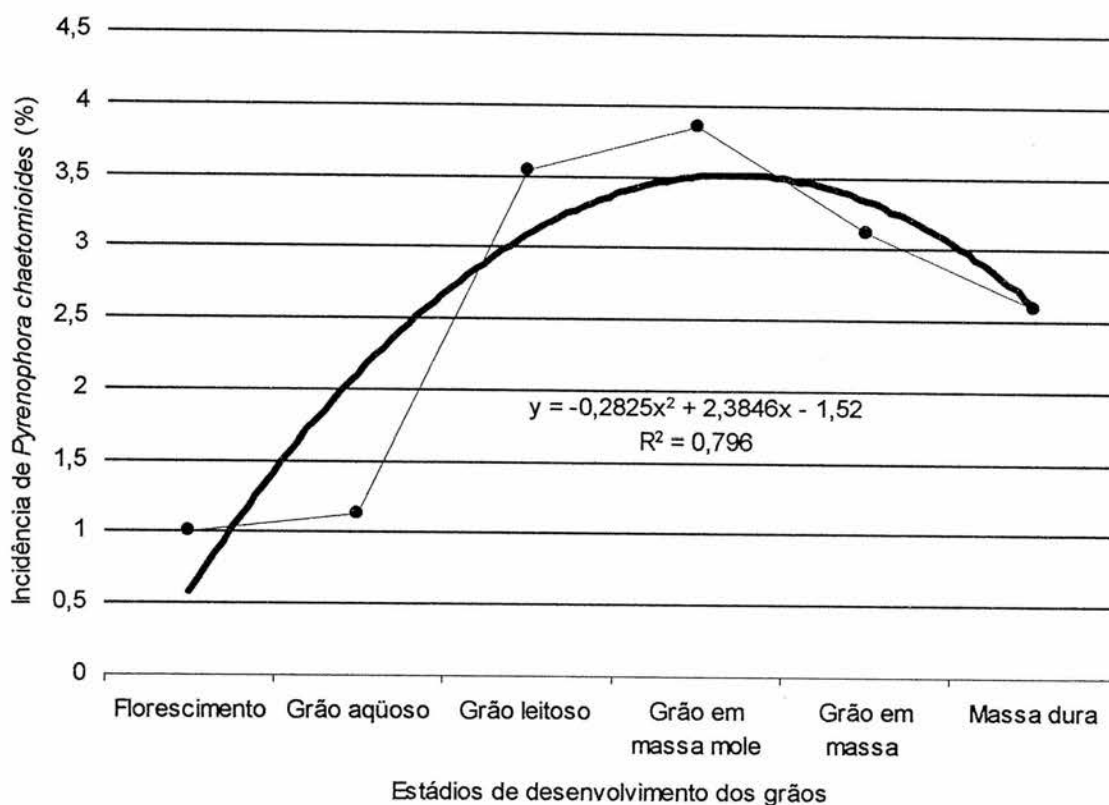


Figura 5. Incidência de *Pyrenophora chaetomioides* em carpelos de 6 genótipos de aveia branca durante os estádios de desenvolvimento dos grãos, na EEA/UFRGS, 2002.

Os esporos de *P. chaetomioides* dificilmente ficam em contato direto com o grão de aveia em vista das características morfológicas da semente, conseqüentemente estes precisam penetrar e colonizar sucessivamente, via proliferação micelial, gluma, lema e pálea. A gluma parece contribuir menos na

infecção que a lema e a pálea, já que a mesma não está aderida ao grão. A maior suscetibilidade dos grãos, observada a partir de 21 dias após a emissão das panículas, que coincide com o estágio de massa mole (Tabela 2 e Figura 5), também sugere que o fungo coloniza inicialmente os componentes florais externos para atingir os grãos, sendo estas as barreiras iniciais para a formação da mancha.

Na Figura 6 pode-se observar que nos estádios iniciais de desenvolvimento dos grãos não existe formação de mancha como a observada nos estádios de grão leitoso e massa mole.

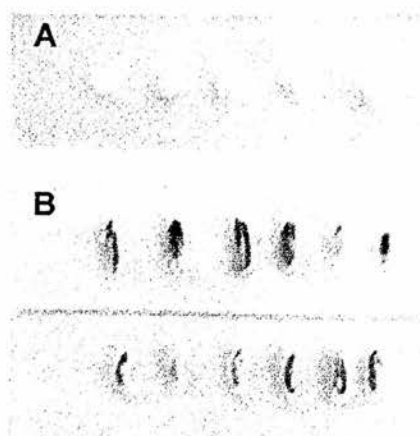


Figura 6. Análise da ocorrência de mancha nos grãos em sua fase inicial de desenvolvimento (A) e no período de maior predisposição à infecção por *Pyrenophora chaetomioides* (B).

O aumento da umidade, volume e maior disponibilidade de nutrientes dos grãos a partir da terceira semana, nos estádios de grão leitoso e massa mole, propicia maior contato dos mesmos com os demais componentes florais infectados, que podem estar contribuindo para o acesso deste fungo e predispondo o grão à infecção neste período.

A maioria dos eventos de infecção de sementes ocorre entre 5 e 14 dias após a inoculação, entretanto, em condições ótimas podem ocorrer a partir de 3 dias ou ir além de 21 dias em condições de campo. O tempo necessário para infecção das sementes pode ser influenciado pela umidade, temperatura, densidade de inóculo e estágio de desenvolvimento das sementes (SHILDER & BERGSTROM, 1994). ROSA (2002) quantificou os conídios de *P. chaetomioides* produzidas em folhas basais senescentes de aveia em condições de campo e constatou que a maior produção de conídios é influenciada pela precipitação e coincide com os estádios de grão leitoso e massa mole.

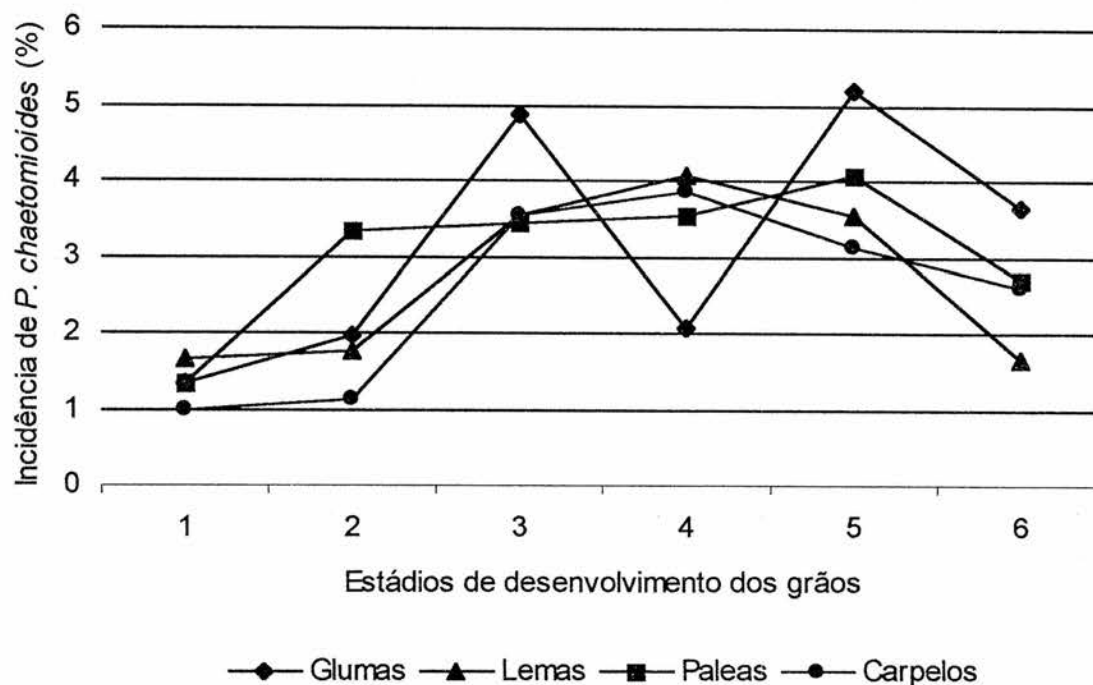


Figura 7. Incidência de *Pyrenophora chaetomioides* nos componentes florais de cultivares aveia branca, quando plaqueados em meio de cultura (BDA), na EEA/UFRGS, 2002. Legenda: os números: 1, 2, 3, 4, 5 e 6 no eixo (X) correspondem aos estádios: florescimento, grão aquoso, grão leitoso, grão em massa mole, grão em massa, e grão em massa dura, respectivamente.

O gráfico da Figura 7 utiliza as médias gerais de todos os genótipos testados nos estádios de desenvolvimento dos grãos e demonstra a maior

incidência de *P. chaetomioides* nos componentes florais mais externos, glumas, páleas e lemas, do que nos carpelos nos estádios iniciais (florescimento e grão aquoso), o que também pode sugerir que a infecção dos carpelos esteja na dependência da infecção dos componentes florais externos

A localização do micélio de *P. chaetomioides* é superficial e limitada aos três tecidos do pericarpo. Este fungo consegue penetrá-los facilmente, porém, não tem habilidade para transpô-los, pois na testa da cariopse de aveia, encontra a barreira para sua penetração (BOCCHESI, 2000). TURNER & MILLARD ainda em 1931 descreveram o micélio de *Pyrenophora* spp. dentro dos tecidos da semente como escuro, espesso, muito septado, irregular, intracelular e com viabilidade por longo tempo. BOCCHESI et al.(2001) em trabalho sobre a especificidade de *P. chaetomioides* nos tecidos da semente de aveia relataram a associação entre a intensidade das manchas e a densidade de micélio. Na Figura 8 pode-se observar o micélio espesso e ramificado na superfície da testa apresentando forte aderência com os demais tecidos do pericarpo.

As infecções oriundas do período de maior suscetibilidade à *P. chaetomioides* possivelmente sejam a principal causa do aumento de formação de manchas nos grãos em estádios posteriores, já que o micélio presente no pericarpo sob condições ambientais favoráveis, temperaturas amenas e alta umidade relativa, pode vir a colonizar mais tecidos da superfície do grãos.

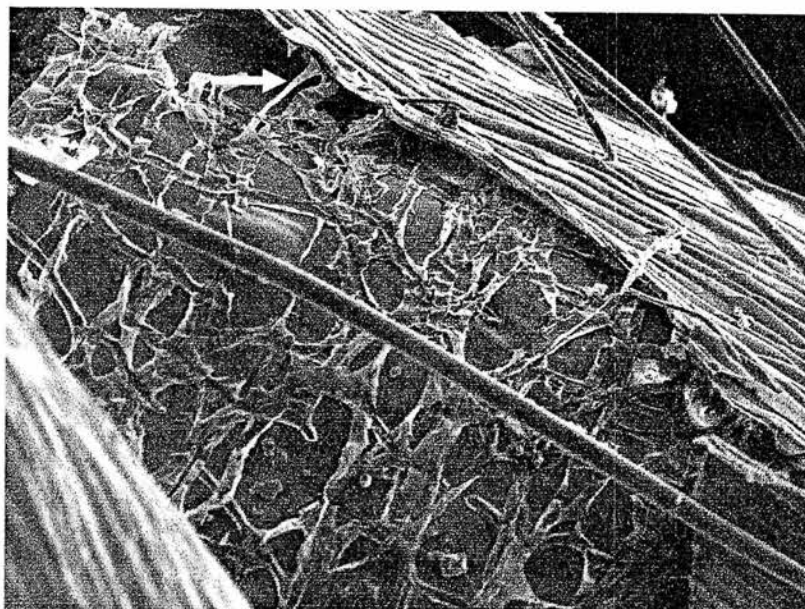


Figura 8. Micélio na superfície da testa e aderência do mesmo com os demais tecidos do pericarpo do grão de aveia infectado através da Microscopia Eletrônica de Varredura (190X).

Após a determinação do período de maior suscetibilidade a *P. chaetomioides*, ainda restou questionamento quanto ao efeito da permanência dos grãos a campo depois de sua maturação fisiológica para infecção e formação das manchas, já que poderia fornecer informações importantes sobre o manejo desta moléstia. Com este objetivo foi feito o experimento com atraso de colheita após a maturação fisiológica, com intervalos de sete dias.

Os resultados mostraram que os genótipos testados apresentaram diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey a 5%, quanto ao percentual de grãos manchados e percentual de incidência, conforme apresentado nas Tabelas 3, 4, 5 e Figura 9, correspondentes aos dois anos do experimento. Neste experimento, a cultivar UFRGS19 continuou apresentando baixos níveis de incidência e percentual de grãos manchados juntamente com alguns outros genótipos avaliados neste experimento com duração de dois anos (Tabela 5).

Houve diferença significativa entre épocas de colheita com relação ao percentual de grãos manchados nas duas estações de cultivo estudadas, como pode ser observado nas Tabelas 3 e 4. Entretanto, o percentual de incidência de *P. chaetomioides* não apresentou comportamento semelhante nas duas estações de cultivo estudadas. A incidência de *P. chaetomioides* na estação de cultivo de 2001 não apresentou diferença significativa entre as épocas de colheita, já em 2002, apresentou diferenças significativas. Deve ser ressaltado que nas duas estações de colheita do experimento foram observadas grandes diferenças na precipitação pluviométrica, sendo que em 2001, houve uma precipitação acumulada de 84,2 mm enquanto que em 2002 para o mesmo período foi de 286,7 mm. Já com relação as temperaturas médias foram observadas variações semelhantes nos dois períodos de colheita.

Os fatores de ambiente podem determinar o grau de predisposição do hospedeiro, além de ter efeito direto ou indireto sobre o patógeno, influenciando sua sobrevivência e desenvolvimento, tanto no hospedeiro como no meio ambiente (BEDENDO, 1995).

A umidade abundante, prolongada ou freqüente, na forma de chuva ou orvalho é um fator de grande relevância no desenvolvimento da maioria das epidemias ocasionadas por fungos (AGRIOS, 1997). ROSA (2002) relatou que o aumento da produção de conídios de *P. chaetomioides* é fortemente influenciado pela precipitação. Além disso, a umidade elevada favorece a disseminação e preenche um dos requerimentos essenciais para germinação dos conídios logo após a sua deposição na superfície do hospedeiro (AGRIOS, 1997). Logo, a significativa precipitação ocorrida nas épocas de colheita do ano de 2002 pode ter permitido que todos estes eventos tenham sido constantemente repetidos, o que provavelmente ocasionou o aumento de incidência de *P. chaetomioides*.

O aumento da formação de manchas nas duas estações de colheita, sob condições de umidade distintas, também ressalta a hipótese sugerida anteriormente, de que a infecção dos grãos ocorre principalmente nos estádios de grão leitoso e grão em massa mole, e que o progresso da formação de mancha é decorrente mais do crescimento micelial presente nos tecidos superficiais da semente do que por novas infecções, as quais são muito mais dependentes de umidades elevadas.

O rendimento de grãos apresentou variações entre as cultivares testadas e foi afetado negativamente pelo atraso na época de colheita, provavelmente por debulha ou acamamento. Já o peso do hectolitro também apresentou variações entre as cultivares mas não sofreu efeito com o atraso na colheita (Tabelas 4 e 6).

Em vista dos resultados obtidos, pode-se concluir que o período de suscetibilidade a formação da mancha compreende a fase de grão leitoso até o momento da colheita dos mesmos. Logo, a permanência prolongada dos grãos após sua maturação fisiológica pode comprometer a qualidade dos mesmos com o aumento de 20-30% da intensidade das manchas.

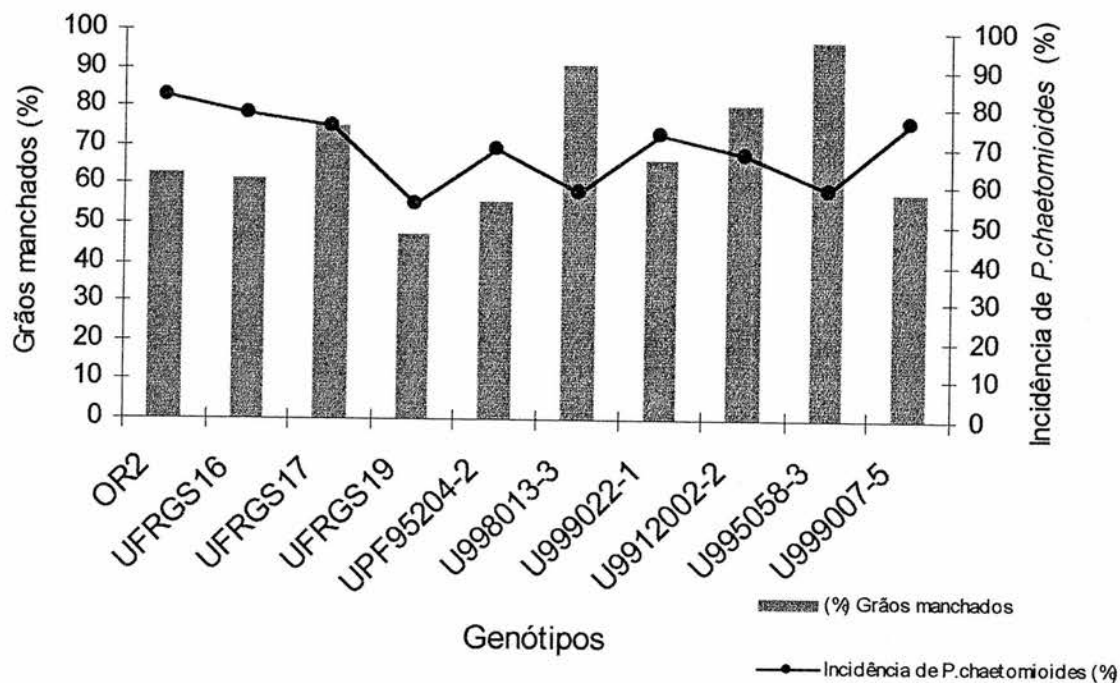


Figura 9. Percentuais de grãos manchados e incidência de *P. chaetomioides*, quando plaqueados em meio de cultura (BDA), nas cinco épocas de colheita, na EEA/UFRGS, 2001.

Tabela 3. Incidência de *Pyrenophora chaetomioides* em grãos manchados quando plaqueados em meio de cultura (BDA) e percentual de grãos de aveia branca manchados em cinco épocas de colheita na EEA/UFRGS, 2001. Os valores apresentados nesta tabela representam as médias de 10 genótipos avaliados em cada época de colheita.

Épocas de colheita	Incidência (%) de <i>P. chaetomioides</i>	% Grãos manchados
Época correta	66,6 a*	58,7 c
Atraso de 7 dias	72,0 a	68,7 b
Atraso de 14 dias	67,6 a	70,5 b
Atraso de 21 dias	68,2 a	71,0 b
Atraso de 30 dias	68,7 a	74,6 a
Médias	68,9	70,0
CV %	6,4	5,8

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

Tabela 4. Incidência de *Pyrenophora chaetomioides*, percentual de grãos manchados de aveia branca; rendimento (Kg/ha) e peso do hectolitro (PH) em três épocas de colheita na EEA/UFRGS, 2002. Os valores apresentados nesta tabela representam as médias de 14 genótipos avaliados em cada época de colheita.

Épocas de colheita	Incidência (%) de <i>P. chaetomioides</i>	% Grãos manchados	Rendimento (Kg/ha)	PH (Kg/hl)
Época correta	16,3 b*	40,7 c	2773,3 a	48,9 a
Atraso de 7 dias	16,5 b	47,7 b	2435,4 b	48,2 a
Atraso de 14 dias	27,0 a	48,9 a	1673,8 c	46,5 a
Médias	19,9	45,8	2294,2	47,8
CV %	27,2	13,9	9,4	38,7

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

Tabela 5. Percentuais de grãos manchados e incidência de *P. chaetomioides*, quando plaqueados em meio de cultura (BDA), obtidos dos genótipos de aveia branca utilizados para o ensaio de atraso de colheita na EEA/UFRGS, 2002. Os dados apresentados representam as médias gerais das três épocas de colheita.

Genótipos	(%) Grãos manchados	(%) Incidência
UFRGS 995058-3	69,7 ¹ a ^{2*}	14,9 ¹ cd ^{2*}
UFRGS 9990004-2	66,4 a	22,5 abc
UFRGS 998013-3	58,5 ab	17,2 cd
UFRGS 17	56,6 abc	19,2 bcd
URS 20	47,2 bcd	10,2 d
UFRGS 18	45,1 cde	19,2 bcd
UPF 18	44,8 cde	28,6 ab
UFRGS 14	43,7 cde	21,1 abc
UFRGS 16	42,3 def	20,0 abc
URS 21	41,8 def	22,3 abc
UFRGS 15	38,2 def	17,9 cd
URS 22	37,6 def	16,7 cd
UFRGS 19	34,5 ef	19,4 abc
ER 20877-2	30,6 f	29,9 a
Média	47,0	19,9
CV %	13,9	27,2

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

¹Médias originais. ²Os dados foram transformados pela transformação exponencial.

Tabela 6. Rendimento e Peso do hectolitro de grãos dos genótipos de aveia branca no ensaio de épocas de colheita na EEA/UFRGS, 2002. Os dados apresentados representam as médias gerais das três épocas de colheita.

Genótipos	Rendimento (Kg/ha)	PH (Kg/hl)
ER 20877-2	2790 ¹ a*	50,5 ¹ abc*
URS 20	2749 a	52,9 a
UPF 18	2795 a	47,8 cd
UFRGS 998013-3	2710 ab	48,9 abc
UFRGS 9990004-2	2578 abc	52,3 ab
URS 21	2326 abcd	50,2 abc
UFRGS 16	2232 abcd	48,0 bcd
UFRGS 995058-3	2164 abcd	47,6 cd
UFRGS 17	2112 abcd	47,9 bcd
URS 22	2067 bcd	48,4 abc
UFRGS 15	1926 cd	42,2 e
UFRGS 18	1897 d	43,6 de
UFRGS 19	1900 d	47,5 cd
UFRGS 14	1866 d	42,3 e
Média	2294	47,9
CV %	9,4	6,7

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

¹Médias originais.

A aplicação do fungicida sistêmico Tebuconazole (Folicur 200CE, 0,75L/ha) em seis épocas após a exposição da panícula foi baseada na hipótese de que a utilização do produto bloquearia a infecção no período suscetível dos grãos através da proteção do fungicida nos componentes florais superficiais, tais como gluma, lemas e páleas, o que conseqüentemente evitaria a entrada de micélio e formação de manchas.

O fungicida tebuconazole pertence ao grupo dos triazoles, os quais inibem a biossíntese do ergosterol, um componente necessário para as membranas celulares dos fungos e podem atuar como protetores ou como curativos (WEPPLER & HOLLAWAY, 2002). No primeiro caso, a ação tóxica é exercida sobre a germinação dos esporos, na formação do tubo germinativo e no apressório. Contudo, a inibição é apenas parcial, de modo que pode ocorrer penetração do patógeno nos tecidos tratados. No segundo, o desenvolvimento do

haustório e/ou crescimento micelial no interior dos tecidos são inibidos pela presença do fungicida (FORCELLINI, 1994).

BLUM et al. (1998) não observaram efeito do tratamento de semente ou mesmo do tratamento de semente associado com o fungicida na parte aérea sobre a incidência do fungo na semente colhida, mas apenas diferenças significativas entre as cultivares testadas. ROSA (2002) utilizou apenas tratamentos foliares com Tebuconazole aplicados a cada sete dias durante o desenvolvimento das sementes em uma estação de cultivo de aveia e observou a maior redução de incidência em relação à testemunha quando o produto foi aplicado durante o estágio de grão em massa mole.

Os resultados obtidos neste trabalho em relação ao níveis de incidência de *P. chaetomioides* e formação de mancha nos grãos com seis aplicações de Tebuconazole, durante o desenvolvimento das sementes demonstraram que o período da aplicação de fungicida que ocasionou redução significativa na incidência de *P. chaetomioides* em relação à parcela testemunha foi o florescimento. O fungicida não apresentou redução significativa para o percentual de manchas nos grãos e rendimento. Já com relação ao peso do hectolitro foi significativo somente quando aplicado nos estádios de floração e grão aquoso (Tabela 7).

A introdução de aplicação adicional de fungicida no manejo da mancha-negra para utilização pelos produtores depende da sua relação custo / benefício. O valor de uma aplicação de fungicida é US\$ 30,00 /ha, que corresponde a 300 Kg de grãos de aveia branca (MARTINELLI, 2003). Logo, para que seja viável economicamente é necessário que o aumento no rendimento seja maior que 300Kg e que reduza em mais de 50% a expressão da doença para justificar sua utilização.

Deste modo, aplicação adicional de Tebuconazole para o controle da moléstia mancha-negra parece não ser viável economicamente, uma vez que a aplicação de fungicida na floração, em relação a testemunha, reduziu apenas 21% da incidência do fungo nas sementes (Tabela 7). Além disso, não foi suficiente para reduzir a formação de manchas e nem produzir aumento significativo no rendimento que compensasse o aumento de custo do tratamento químico (Tabela 7).

As cultivares apresentaram diferenças significativas para todas as características analisadas (Tabelas 8 e 9). O genótipo UFRGS998013-3 apresentou percentuais baixos para incidência de *P. chaetomioides* e altos para grãos manchados, mas ainda assim obteve o melhor rendimento e peso do hectolitro em relação aos demais genótipos. O genótipo ER20877-2 apresentou percentual alto para incidência de *P. chaetomioides* e baixo para grãos manchados, com rendimento e peso hectolitro semelhantes ao genótipo anterior. Já o genótipo UFRGS 19 obteve baixos percentuais tanto para incidência como para grãos manchados, mas baixo rendimento e peso hectolitro em relação aos demais genótipos. Alguns dos genótipos foram semelhantes para as 4 variáveis analisadas, tais como UFRGS 19 e URS 22, UFRGS 14 e UFRGS 18. Entretanto, não houve interação entre épocas de aplicação e genótipos para todas as variáveis analisadas (Tabela 10), o que revela ausência de comportamento diferenciado dos genótipos frente a diferentes épocas de aplicação de fungicida.

Tabela 7. Incidência de *Pyrenophora chaetomioides* em grãos de aveia branca, rendimento (Kg/ha) e peso do hectolitro (Kg/hl) em seis épocas de aplicação de fungicida, na EEA/UFRGS, 2002. Os valores apresentados nesta tabela representam as médias de 14 genótipos para cada tratamento com fungicida.

Épocas da Aplicação do Fungicida	Incidência (%)		Rendimento (Kg/ha)	PH (Kg/hl)	Grãos Manchados (%)	
	de <i>P. chaetomioides</i>					
Testemunha	22,0		2577 ns	47,2	45,5	ns
Floração	17,3 ***		2749 ns	48,7 ***	43,7	ns
Grão aquoso	18,4		2782 ns	49,6 ***	42,1	ns
Grão leitoso	21,8		2585 ns	47,7	44,3	ns
Grão em massa	21,2		2617 ns	47,3	45,2	ns
Grão em massa mole	20,6		2568 ns	46,6	44,1	ns
Grão em massa dura	19,0		2513 ns	46,1	43,7	ns
Média	20,0		2627	47,6	44,1	
CV %	34,8		9,8	26,4	11,6	

*Médias comparadas com a testemunha pelo teste Dunnet a 5%.

Tabela 8. Incidência de *Pyrenophora chaetomioides* e percentual de grãos manchados em 14 genótipos de aveia branca no experimento de épocas de aplicação de fungicida, na EEA/UFRGS, 2002. Os valores apresentados nesta tabela representam as médias dos genótipos em todos os tratamentos com fungicidas.

Genótipos	Incidência (%) de <i>P. chaetomioides</i>	Grãos manchados (%)
ER 20877-2	29,2 a*	30,1 j**
UFRGS 14	27,1 ab	39,0 ef
UPF 18	24,9 abc	31,9 hi
UFRGS 9990004-2	24,2 abc	59,1 b
UFRGS 18	21,4 bcd	42,3 de
URS 21	21,0 bcd	40,3 def
UFRGS 16	19,9 cde	41,7 de
UFRGS 15	19,8 cde	37,2 egf
UFRGS 17	18,9 cde	51,7 c
UFRGS 998013-3	17,4 def	60,5 b
UFRGS 19	15,7 def	33,5 ghi
URS 22	15,4 def	34,9 gfh
UFRGS 995058-3	13,4 ef	67,2 a
URS 20	11,3 f	47,8 d
Média	20,0	44,1
CV %	34,8	11,6

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

Tabela 9. Rendimento (Kg/ha) e peso hectolitro (Kg/hl) de grãos de 14 genótipos de aveia branca no experimento de épocas de aplicação de fungicida, na EEA/UFRGS, 2002. Os valores apresentados nesta tabela representam as médias dos genótipos em todos os tratamentos com fungicidas.

Genótipos	Rendimento (Kg/ha)	PH (Kg/hl)
UFRGS 998013-3	3373,1 ¹ a ^{2*}	49,4 ¹ abc ^{2*}
UPF 18	3240,6 a	45,7 cde
ER 20877-2	3094,4 ab	51,2 ab
UFRGS 9990004-2	2985,4 ab	51,5 a
URS 20	2860,4 abc	50,1 abc
UFRGS 17	2859,6 abc	47,9 abcd
UFRGS 995058-3	2618,0 bcd	48,1 abcd
URS 21	2583,3 bcd	50,5 ab
URS 22	2398,2 cde	48,8 abc
UFRGS 16	2281,7 de	46,9 abcd
UFRGS 15	2218,7 de	41,7 e
UFRGS 19	2137,5 e	46,7 bcd
UFRGS 14	2152,2 e	43,5 de
UFRGS 18	1985,0 e	43,9 de
Média	2627,7	47,6
CV %	9,8	11,0

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

¹Médias originais, ²Dados transformados exponencialmente.

Tabela 10. Análise da variância das variáveis incidência de *Pyrenophora chaetomioides*, rendimento (Kg/ha) e peso do hectolitro (PH). EEA/UFRGS, 2002.

Causas de variação	Incidência de <i>P. chaetomioides</i> (%)		Rendimento (Kg/ha)	PH (Kg/hl)
	G.L.	Q.M.	Q.M.	Q.M.
Época	6	189,2*	34,6 ns	1,1*
Genótipo	13	734,8*	401,2*	5,0*
Época x Genótipo	78	43,2 ns	17,6 ns	9,9 ns

*significativo (P<0,05)

ns – não significativo

CAPÍTULO III

Estudos bioquímicos e histoquímicos em grãos de aveia branca com resistência e suscetibilidade a formação de manchas por *Pyrenophora chaetomioides*

3.1. INTRODUÇÃO

A mancha-negra da aveia, cujo principal agente é *P. chaetomioides*, também promove o escurecimento dos tecidos superficiais dos grãos, o que ocasiona redução na qualidade e valor dos mesmos para a indústria alimentícia. É possível que características histológicas ou bioquímicas presentes nestes tecidos possam influenciar na resistência ao patógeno.

As plantas dispõem de mecanismos variados de defesa, os quais têm sido agrupados em constitutivos e induzíveis, havendo fatores estruturais e bioquímicos em ambos os grupos (PASCHOLATI & LEITE, 1994). A localização superficial do fungo *P. chaetomioides* nos grãos poderia estar relacionada com a composição química daqueles tecidos em determinado momento da formação dos grãos.

Ainda não foi elaborado um estudo avaliando os tecidos de genótipos de aveia branca com maior resistência ou suscetibilidade à formação de mancha, quanto a características histoquímicas e bioquímicas que possam diferenciá-los.

BOCCHESI et al. (2001) em trabalho preliminar relacionaram a localização restrita de *P. chaetomioides* nos tecidos do pericarpo à sua atividade enzimática. A grande atividade proteolítica e lipolítica justificaria a preferência por estes tecidos superficiais, os quais possuem lipídios e proteínas em valores mais elevados. Já sua baixa atividade amilolítica leva a crer que a falta desta habilidade o restringe ao pericarpo.

Os tecidos superficiais dos grãos de genótipos de aveia branca têm altas concentrações de lipídios (PETERSON, 1992), sendo esta característica variável entre os genótipos de aveia. Além disso a atividade da lipase é alta nas partes dos grãos onde os tecidos estão metabolizando gorduras. A atividade da lipase no aleurona é relativamente alta e, considerando a quantidade total, apresenta a maior contribuição para a atividade total desta enzima (EKSTRAND et al., 1992). HOI et al. (1990) encontraram grandes diferenças no percentual de hidrólise da enzima lipase entre 30 genótipos testados.

A enzima lipase é endógena e fica disponível para hidrolizar lipídios após a ocorrência de lesão no grão (EVERS et al., 1999), cujos compostos resultantes sofrem a ação de outras enzimas, dentre elas, a peroxidase. A peroxidase desempenha importante função em fenômenos relacionados ao stress (BOTELLA et al., 1994) e é responsável pelo escurecimento na maioria dos tecidos injuriados. Deste modo, os níveis da lipase e peroxidase podem estar influenciando na suscetibilidade à infecção e manchamento dos tecidos superficiais de grãos de aveia.

As peroxidases são hemoproteínas monoméricas que catalizam a oxidação de uma gama de substratos pela ação do peróxido de hidrogênio. Inúmeras implicações em processos fisiológicos tem sido a elas referidas, tais como: deposição de polifenóis e lignina (LAGRIMINI, 1991), suberização (BERNARDS &

LEWIS, 1998), resistência à patógenos (BESTWICK et al., 1998), dentre outros. A peroxidase não encontra-se distribuída uniformemente nos grãos de cereais, sendo referido altas atividades desta enzima à camada de células do aleurona, além do endosperma, e embrião. COCHRANE ainda em 1994 sugeriu que a atividade de peroxidase no aleurona do grão de cevada poderia estar atuando na formação de barreira antimicrobiana quando o tecido rompe-se durante a germinação. Já KERBY & SOMERVILLE (1992) notaram o aumento significativo em duas peroxidases extracelulares após a inoculação de folhas de cevada com oídio.

A atividade da lipase, por sua vez, varia ao longo do desenvolvimento dos grãos de aveia. URQUHART et al. (1984) verificaram a atividade máxima entre 23 e 30 dias após a antese, ocorrendo declínio com a aproximação da maturação. ROSA et al. (2001) relataram que o período de maior suscetibilidade dos grãos à infecção por *P. chaetomioides* seria no estágio de grão leitoso e massa mole, o que também coincide com o período de maior atividade desta enzima.

Ainda não há um padrão universal de resposta das enzimas no processo de resistência das plantas contra fitopatógenos: a atividade de enzimas específicas podem estar relacionadas tanto positivamente como negativamente com a infecção.

Apesar das reações de oxidação serem bem documentadas em reações de hipersensibilidade, seu papel na infecção do grão de aveia por *P. chaetomioides* ainda não foi identificado. Informações sobre os níveis de peroxidase e lipase em genótipos com resistência diferenciada à mancha e infecção no grão bem como seu comportamento durante a formação dos grãos, no período crítico da infecção, poderiam auxiliar na seleção de genótipos para o melhoramento.

Os objetivos deste trabalho foram: i) Correlacionar os diferentes níveis de atividade destas duas enzimas, encontrados em genótipos de aveia, com a infecção e formação de mancha; ii) Estudar a composição bioquímica das vesículas presentes nos tecidos superficiais de grãos de genótipos de aveia através da histoquímica em microscopia óptica a fim de elucidar seu envolvimento com a resistência à *P.chaetomioides*.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local e Período

Esta pesquisa foi realizada no Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia e na Estação Experimental Agronômica (EEA) da UFRGS, localizada no município de El Dourado do Sul, no período de janeiro de 2001 a abril de 2003.

3.2.2. Origem das Sementes e análise do percentual de mancha e infecção

As 15 cultivares/linhagens de aveia utilizadas nesta pesquisa foram escolhidas após uma avaliação visual preliminar de seus grãos dentre um grande número de genótipos disponíveis no programa de melhoramento da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os genótipos utilizados neste trabalho foram: OR2, ER20877-2, UFRGS995004-2, UPF95204-2, UFRGS16, UFRGS9912002-2, UFRGS999007-5, UFRGS998013-3, UPF16, UFRGS999022-1, UFRGS995058-3, UFRGS15, UFRGS17, UFRGS19, UFRGS997005-2. A análise do percentual de mancha foi feita com 4 repetições de 100 grãos para cada genótipo e baseada na observação visual segundo gradiente pré-estabelecido (Figura 1). As categorias do gradiente representam níveis diferentes de severidade (intensidade do

escurecimento) da mancha-negra nos grãos: C-I: 0-10%; C-II: 11-50%; C-III: mais de 50%.

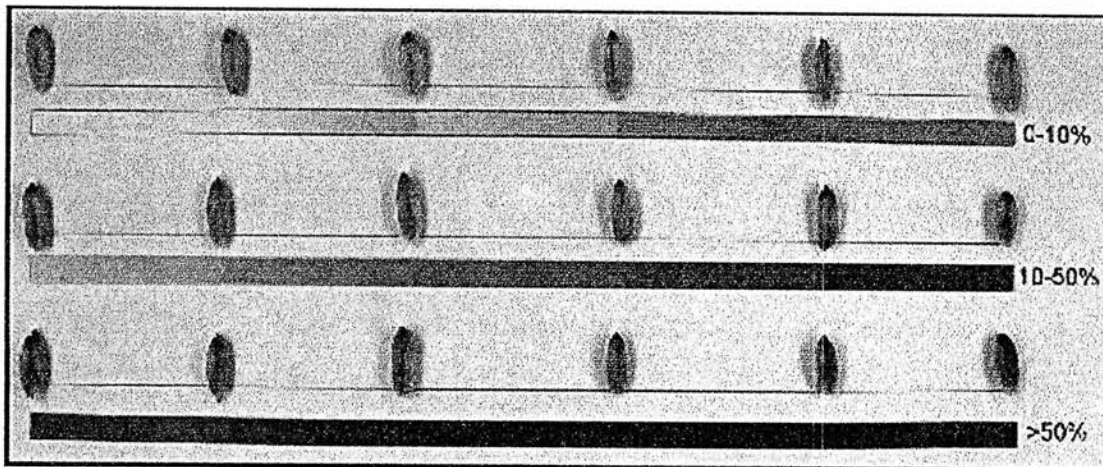


Figura 10. Gradiente pré-estabelecido para avaliação visual dos genótipos de aveia branca. Foto: BOCCHESI, 2003.

O percentual de infecção foi avaliado através da incidência de *P. chaetomioides* em 400 grãos da categoria C-I de todos os genótipos testados, quando incubados sobre meio de cultura BDA em placas de Pétri, sob temperatura controlada a $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e com fotoperíodo de 12h. Este experimento avaliou a incidência de *P. chaetomioides* em 600 placas de Pétri, sendo 40 placas para cada genótipo testado.

Classificação dos genótipos, segundo gradiente apresentado: Categoria (C-I): UFRGS19, ER20877-2, UFRGS16, UFRGS997005-2; Categoria (C-II): UPF95204-2, UFRGS999022-1, OR2, UFRGS999007-5, UPF16, UFRGS15, UFRGS9912002-2; Categoria (C-III): UFRGS998013-3, UFRGS995004-2, UFRGS995058-3, UFRGS17.

3.2.3. Preparação das Sementes para histoquímica em Microscopia Óptica

A identidade dos fenóis que se acumulam como uma resposta inicial à infecção não é frequentemente específica, comumente estimada através de

técnicas de histoquímica. As sementes após coletadas tiveram a casca removida, pois este trabalho foi desenvolvido apenas com a cariopse da aveia. O material foi fixado em solução de glutaraldeído 2% (GABRIEL, 1982), durante duas horas, à temperatura ambiente. Após este procedimento o material foi lavado em tampão fosfato pH 6,8, por 1h; desidratado em série de álcool etílico em concentrações crescentes, com duração de 15 min para cada etapa. Como meio para inclusão foi utilizado a parafina. As cariopses foram orientadas nos blocos tanto para cortes transversais como longitudinais em micrótono de rotação, com espessura de 10 a 15 μm . Para a coloração das secções foi utilizado Azul de Toluidina O em concentração de 0,05% em tampão de benzoato, pH 4,4 (O'BRIEN & McCULLY, 1981). O tempo de coloração foi de 5 min. Após a coloração, as lâminas foram lavadas sob fluxo de água corrente durante 1 min e secas sobre placa aquecedora. Como meio de montagem entre lâmina e lamínula foi utilizado o bálsamo do Canadá sintético. As observações e análises das seções foram realizadas em microscopia de campo claro, utilizando microscópio óptico Leica modelo CME (1349522X).

3.2.3. Preparação das Sementes para Análise em Microscopia Eletrônica

Os grãos foram hidratados por 5 min e após foi feita a remoção parcial ou total do pericarpo para análise da superfície. O Procedimento básico utilizado na preparação das amostras, segundo MACHADO (2001), se constituiu dos seguintes passos: 1) Os grãos selecionados foram reduzidos a peças menores e planas (amostras) para melhorar sua visualização no MEV (Microscópio Eletrônico de Varredura); 2) As amostras foram pré-fixadas em aldeído por 2h seguida por 3 lavagens (15min/cada) e pós-fixadas em OsO_4 1% por 2h; 3) Após, foram desidratadas de uma maneira lenta e gradual (acetona:30,50, 70, 90 e 100%). Na etapa em que o desidratante estava puro (100%) foram levadas para o

aparelho de Ponto Crítico; 4) Cada amostra foi colocada em um suporte com auxílio de um microscópio estereoscópico, para facilitar a visualização do ponto ou área de interesse; 5) Esta etapa foi feita na metalizadora, onde as amostras tornaram-se condutivas através da deposição de metal na sua superfície; 6) Finalmente, as amostras foram observadas no Microscópio Eletrônico de Varredura.

3.2.4. Preparação das Sementes para Análise em Microscópio estereoscópico

Os grãos foram hidratados por 5 min para remoção manual dos tecidos do pericarpo. A observação das vesículas na superfície da testa da semente foi feita com o microscópio estereoscópico Leica modelo MZ12 com câmara digital Leica DC200 acoplada, no aumento de 100x, sem corante. A medição das mesmas foi feita através do retículo Leica presente em uma das oculares do microscópio estereoscópico. Os grãos, após a remoção do pericarpo, foram imersos no corante Sudan Black por 5 min, que foi utilizado para visualização do micélio.

3.2.5. Lipase

Os genótipos utilizados para análise da lipase em grãos maduros foram: OR2, ER20877-2, UFRGS995004-2, UPF95204-2, UFRGS16, UFRGS9912002-2, UFRGS999007-5, UFRGS998013-3, UPF16, UFRGS999022-1, UFRGS995058-3, UFRGS15, UFRGS17, UFRGS19, UFRGS997005-2.

A atividade da lipase foi estimada através da percentagem de ácidos graxos hidrolizados em uma amostra de óleo de soja com grãos de aveia de cada genótipo utilizado, como descrito por PARMAR & HAMMOND (1994). Para cada teste foram utilizadas amostras de 10 g de cariopses de aveia as quais foram umedecidas com água. Após 2 h foi adicionado 10 ml de óleo de soja na amostra e incubou-se por 24 h a temperatura de 37 °C. Quantidade similar de óleo foi adicionada em um frasco de erlenmeyer e incubada por 24 h a 37 °C, que serviu

como controle negativo. Aproximadamente 0,2 ml de óleo de cada amostra foi dissolvido em 15 ml de dietil eter-metanol (2:1,v/v). Uma alíquota de 5 ml foi diluída a 50 ml com metanol e ajustada para pH 9,0 com hidróxido de sódio 0,01M. A hidrólise foi calculada como a razão dos ácidos graxos livres para o total dos ácidos graxos na amostra de óleo de soja após a incubação com as cariopses de aveia, obtida através da seguinte equação:

$$\% \text{hidrólise} = 4,361 \times (\text{ml de NaOH consumido pela amostra} - \text{ml de NaOH consumido pelo controle})$$

O valor da constante nesta equação está relacionado ao volume de NaOH consumido para proporção de ácidos graxos em 10 ml de óleo de soja, baseados na média do peso molecular do óleo de soja e na média do peso molecular dos ácidos graxos presentes no óleo de soja.

3.2.6. Peroxidase

Os genótipos utilizados para análise da peroxidase em grãos maduros foram: OR2, ER20877-2, UFRGS995004-2, UPF95204-2, UFRGS16, UFRGS9912002-2, UFRGS999007-5, UFRGS998013-3, UPF16, UFRGS999022-1, UFRGS995058-3, UFRGS15, UFRGS17, UFRGS19, UFRGS997005-2. A atividade da peroxidase durante o desenvolvimento dos grãos foi testada em duas estações de cultivo de aveia. Na primeira estação de cultivo foram utilizados dois genótipos: UFRGS 16 e UFRGS 19, os quais apresentavam níveis similares de resistência a formação de manchas, para avaliação da atividade enzima durante a formação dos grãos. Na segunda estação de cultivo foram utilizados 6 genótipos: UFRGS-19, UFRGS-16, UFRGS9990004-2, ER20877-2, UFRGS998013-3, UFRGS995058-3, os quais apresentavam níveis variados de resistência a formação de manchas a fim de verificar se diferenças na atividade da peroxidase durante a formação dos grãos poderiam influenciar na resistência.

A atividade de peroxidase foi determinada através da dispersão de 0,625 g de amostra em 25 ml de tampão TRIS-HCl 0,2M, pH 8,5, agitação por 10 min e centrifugação por 15 min a 2000 g. Uma alíquota de 0,5 ml do sobrenadante foi misturada com 3 ml da solução do substrato, realizando-se a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 420 nm. O substrato foi preparado pela homogeneização de 50 mM de guaiacol, 20 mM de peróxido de oxigênio e 5% de etanol em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0. Uma atividade de peroxidase correspondeu ao aumento de 0,001 na absorbância a 420 nm/min/g de amostra.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos tecidos superficiais dos grãos de 15 genótipos de aveia branca, com microscópio estereoscópico no aumento de 100x, permitiu observar a presença de vesículas de cor marrom avermelhada presentes nos tecidos do pericarpo e na testa da semente (Figuras 11 e 12A), com tamanho de aproximadamente 10 μm . Na Figura 12B a superfície do grão corada com Sudan Black mostra a presença do micélio próxima das vesículas, as quais parecem não inibir o crescimento micelial. A aderência do micélio à vesícula observada na Figura 13 também sugere que a substância presente nas vesículas não apresenta ação tóxica ao fungo.

A formação de vesículas apresentou ocorrência diferenciada entre os genótipos com média e muito baixa resistência a formação de manchas. Logo, mesmo que a formação de vesículas esteja associada a penetrações fúngicas mal sucedidas tanto por interações compatíveis ou incompatíveis, pode também ocorrer em penetrações bem sucedidas por interações compatíveis.

Conseqüentemente é possível que estas estruturas não sejam responsáveis pela restrição do crescimento fúngico, e que sejam necessários outros fatores tais como a acumulação de metabólitos fungitóxicos no sítio de penetração.

Não existe na literatura informações a respeito das alterações dos tecidos das sementes de aveia ocorridas no processo de infecção. SCHILDER & BERGSTROM (1994) relataram que o espessamento das paredes das células da epiderme das glumas, lemas e páleas foi suficiente para retardar o momento da infecção nos grãos de trigo. AURORA et al. (1980) descreveram a formação de vesículas no final do processo de infecção das folhas de aveia por *Helminthosporium avenae*. Já HARGREAVES (1981) em estudo sobre a natureza da resistência das folhas de aveia à *Pyrenophora teres* também observou a presença de vesículas e sugeriu que as mesmas podem estar associadas com a resistência à *P. teres*.

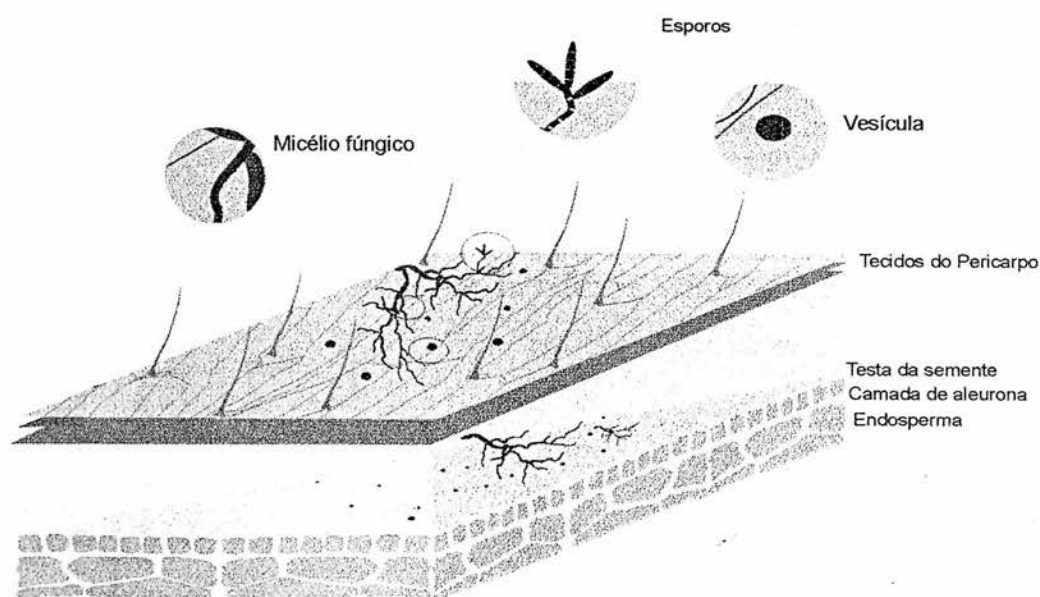


Figura 11. Desenho esquemático do micélio de *Pyrenophora chaetomioides* Speg. nos tecidos do grão de aveia branca e a notada presença de vesículas em resposta à infecção. Fonte: BOCHESE, 2003.

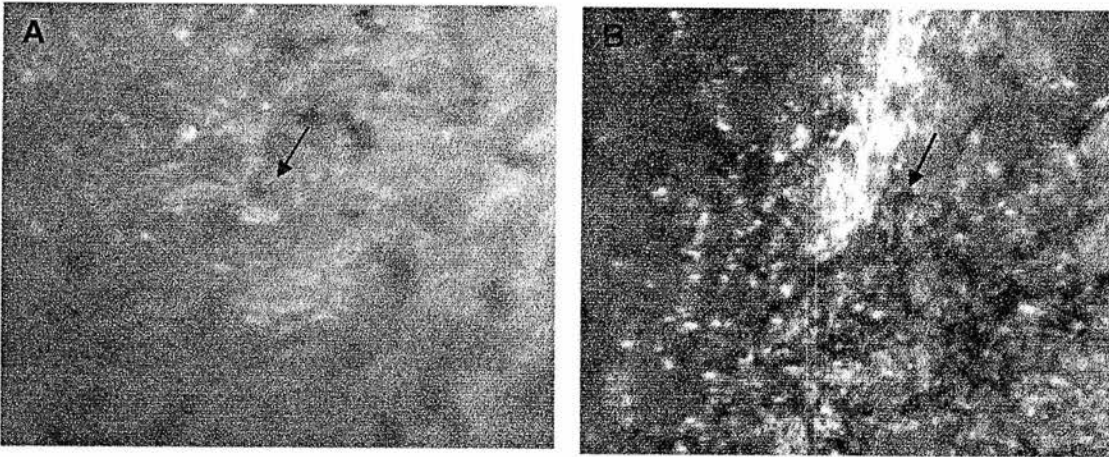


Figura 12. (A) Vesículas em tecidos do pericarpo e testa de grãos infectados; (B) Micélio do fungo, na testa da semente, corado com Sudan Black.

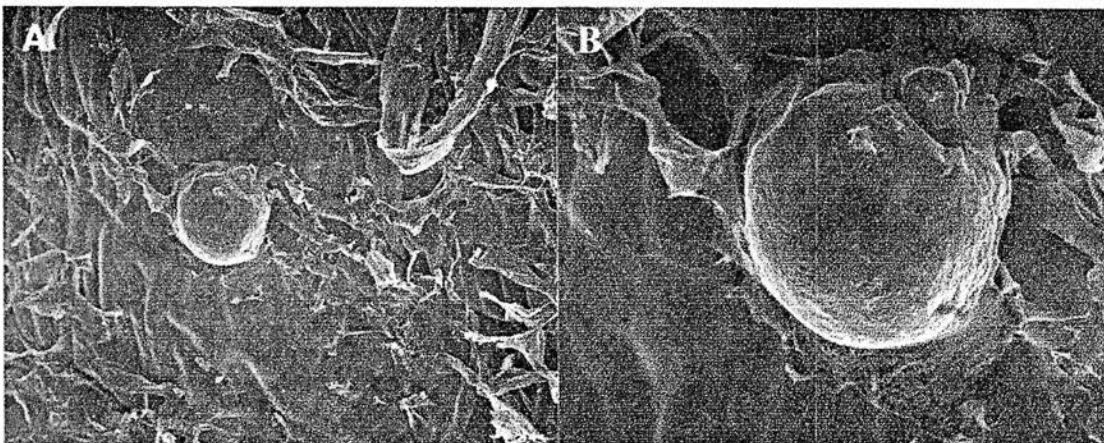


Figura 13. Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície da testa do grão de aveia, apresentando vesícula e micélio. (A) 350x; (B) 1000x.

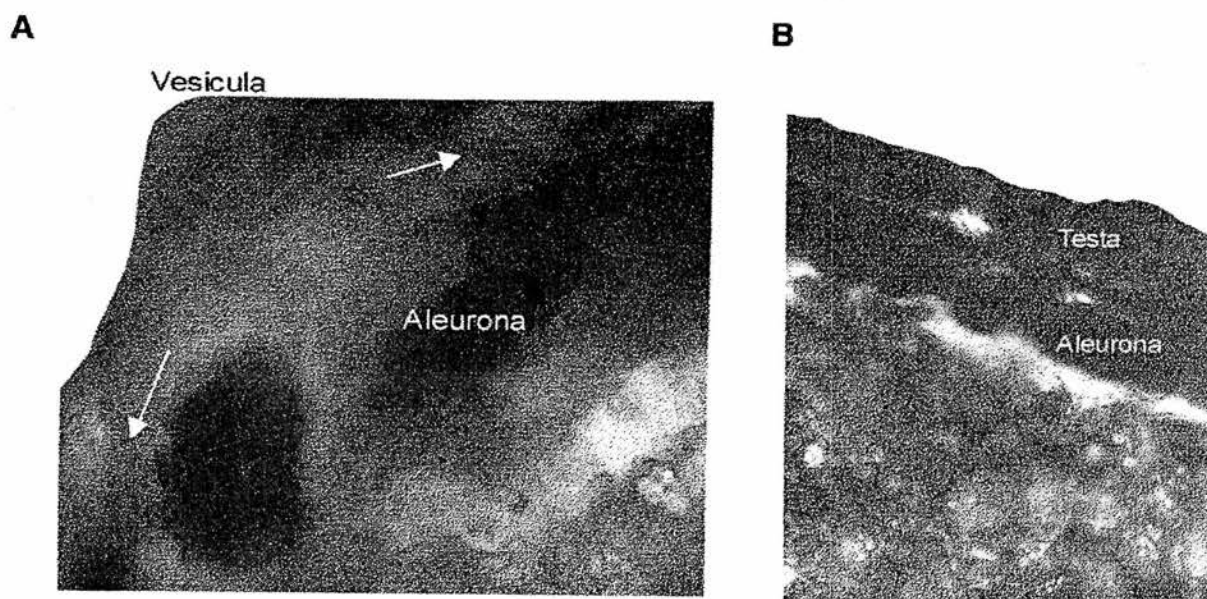


Figura 14. Corte transversal do grão de aveia branca, corado com Azul de Toluidina O com aumento de 400x; (A) Vesícula apresentando ligações protoplasmáticas com células do aleurona; (B) Testa e aleurona apresentando coloração típica da presença de fenóis.

Os tecidos superficiais dos 15 genótipos selecionados, apresentaram ocorrência diferenciada das referidas vesículas nos tecidos do grão de aveia, sendo observado que em genótipos com maior resistência à mancha no grão, a quantidade das mesmas é inferior aos genótipos com maior suscetibilidade. Na Figura 14 pode-se observar a coloração histoquímica com Azul de Toluidina O, onde a coloração rosada nas vesículas é típica da presença de pectina (A) e a coloração azulada nos tecidos do pericarpo típico de fenóis (B). A determinação da presença de pectina nas vesículas demonstrou que a presença diferencial destas vesículas em genótipos suscetíveis e resistentes não constituiu em prova definitiva da importância das mesmas na patogênese desta interação *Avena sativa* x *P. chaetomioides*, já que as mesmas não inibem o crescimento das hifas na superfície do grão de aveia e possivelmente sejam utilizadas como fonte de energia para o fungo. Vale lembrar que *P. chaetomioides* secreta inúmeras

enzimas no momento da invasão dos tecidos, além das já relatadas neste texto, estão as pectolíticas (WHEELER, 1975 citado por AURORA et al., 1978).

Quanto a composição bioquímica, os tecidos colonizados por *P. chaetomioides* encontram-se alta concentração de lipídios, lipase e peroxidase. O dano na célula pode ocasionar liberação de lipase, que promove processos de hidrólise, cujos compostos resultantes sofrem a ação de outras enzimas, dentre elas a peroxidase. A peroxidação dos lipídios pode conduzir a ruptura da integridade da membrana (proteína-lipídio) e esta desorganização resultar em necrose. Em geral o aumento significativo da peroxidase precede o acúmulo de lignina, já que a mesma depende da atividade oxidativa desta enzima para sua formação. A lignificação resultante, por sua vez, protege as paredes das células e papilas da digestão pelas enzimas do fungo. Logo, a atividade da peroxidase e a síntese de lignina são fatores estreitamente relacionados entre si e com possibilidade de interferência na resistência (PASCOLATI & LEITE, 1995).

Trocas nas isoenzimas de peroxidase ou a taxa de sua síntese podem ser responsáveis pela determinação da resistência ou suscetibilidade a um microorganismo fitopatogênico (FARKAS, 1966). Em alguns casos, o aumento da atividade da peroxidase ou aparecimento de novas isoenzimas pode ser um reflexo do sintoma de resposta, ou pode ser associado com processo degenerativo causado pela infecção (FARKAS & LOVREKOVICH, 1965). A problemática da interpretação das trocas na atividade da peroxidase em plantas infectadas é mais complicada pela ambigüidade do papel e sítios de ação desta enzima.

A análise de grãos maduros de 15 genótipos apresentou diferença significativa nos níveis de peroxidase (Tabela 11). Na Tabela 11 também pode ser

observado que vários genótipos tais como UFRGS 16 e UFRGS997005-2, UFRGS9912002 e UPF 16, UFRGS999007-5 e UFRGS999022-1, UFRGS 17 e UFRGS998013-3 obtiveram níveis semelhantes de peroxidase e de percentual de grãos manchados. Entretanto, não houve correlação significativa com relação ao percentual de grãos manchados ($r=0,066$) e infecção por *P. chaetomioides* ($r=0,132$) (Figuras 15 e 16).

Tabela 11. Atividade da peroxidase, em grãos maduros de genótipos de aveia branca com resistência diferenciada à mancha nos grãos, safra 2001.

Genótipos	Atividade da Peroxidase ¹	(%) Grãos manchados
UFRGS9912002-2	6,5 a ²	66,8 cde ²
UPF16	6,5 a	59,8 e
UFRGS16	5,8 ab	33,5 gh
UFRGS997005-2	5,6 abc	35,0 gh
UFRGS999007-5	5,6 abc	48,0 f
UFRGS999022-1	5,6 abc	44,3 f
UFRGS15	5,4 bcd	64,8 de
UFRGS19	5,1 bcde	13,8 i
UFRGS17	5,1 bcde	72,5 bcd
UFRGS998013-3	4,9 bcde	73,5 bc
UFRGS995058-3	4,8 cde	83,3 a
UPF95204-2	4,8 cde	42,0 fg
ER20877-2	4,7 cde	30,8 h
OR2	4,5 cde	45,5 f
UFRGS995004-2	4,3 e	78,8 ab

¹ Média da atividade da peroxidase (420 nm/min/g).

² Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste Tukey a 5%.

Por outro lado, os genótipos UFRGS 19 e UFRGS 17, UPF95204-2 e UFRGS995058-3 apresentaram características de maior e menor resistência a formação de manchas (% de grãos manchados), respectivamente, mas exibiram

níveis similares de atividade de peroxidase. Isto sugere que existam níveis de peroxidase suficientes nos grãos maduros de aveia de todos os genótipos testados para causar formação de manchas e que diferenças no substrato ou peróxido de hidrogênio possam ser os fatores que diferenciem entre suscetibilidade e resistência.

HAMMERSCHMIDT & KUC (1982) (HAMMERSCHMIDT et al., 1982) demonstraram que a resistência do pepino à antracnose foi correlacionada com elevados níveis de deposição de lignina e de atividade de peroxidase. WILLIANSO (1997) observou correlação entre a suscetibilidade à ponta preta em genótipos de trigo e a presença de isoenzimas de peroxidase. Entretanto, SULAMAN et al (2001) avaliaram a atividade da peroxidase em grãos maduros de cevada em genótipos com altos níveis de resistência e de suscetibilidade à ponta preta, cujo principal agente é *Alternaria alternata*, observaram a inexistência de correlação entre a atividade de peroxidase e a suscetibilidade à ponta preta.

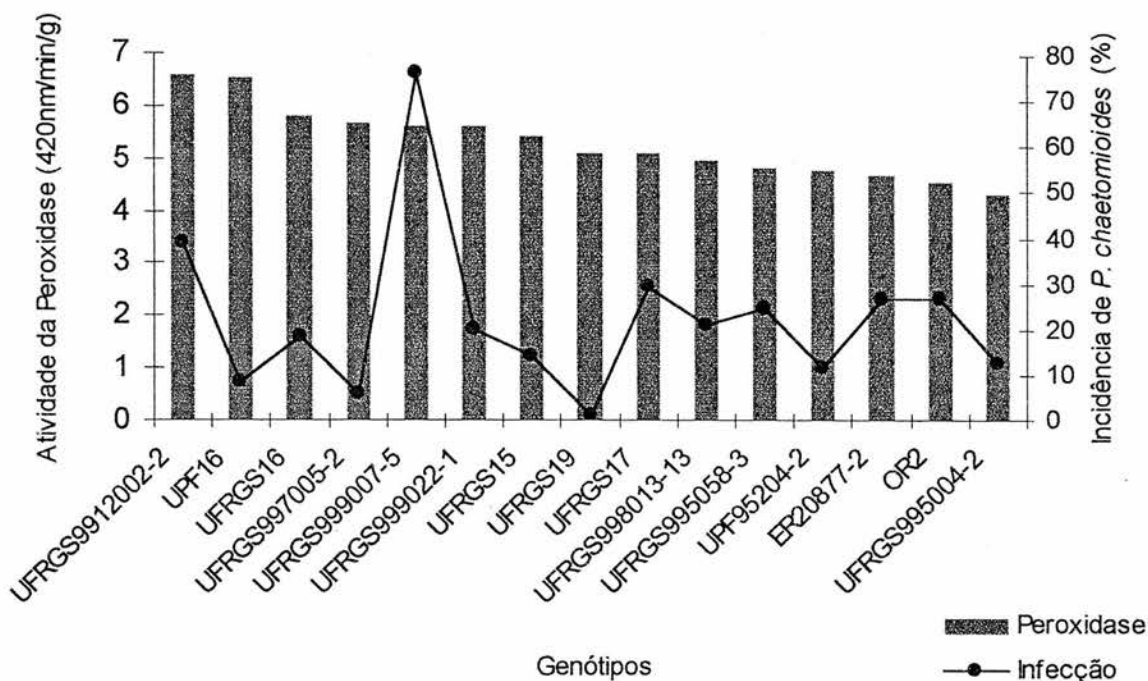


Figura 15. Análise da atividade da peroxidase e infecção dos grãos maduros sem manchas por *Pyrenophora chaetomioides* nos genótipos de aveia branca. Coeficiente de correlação ($r = 0,132$).

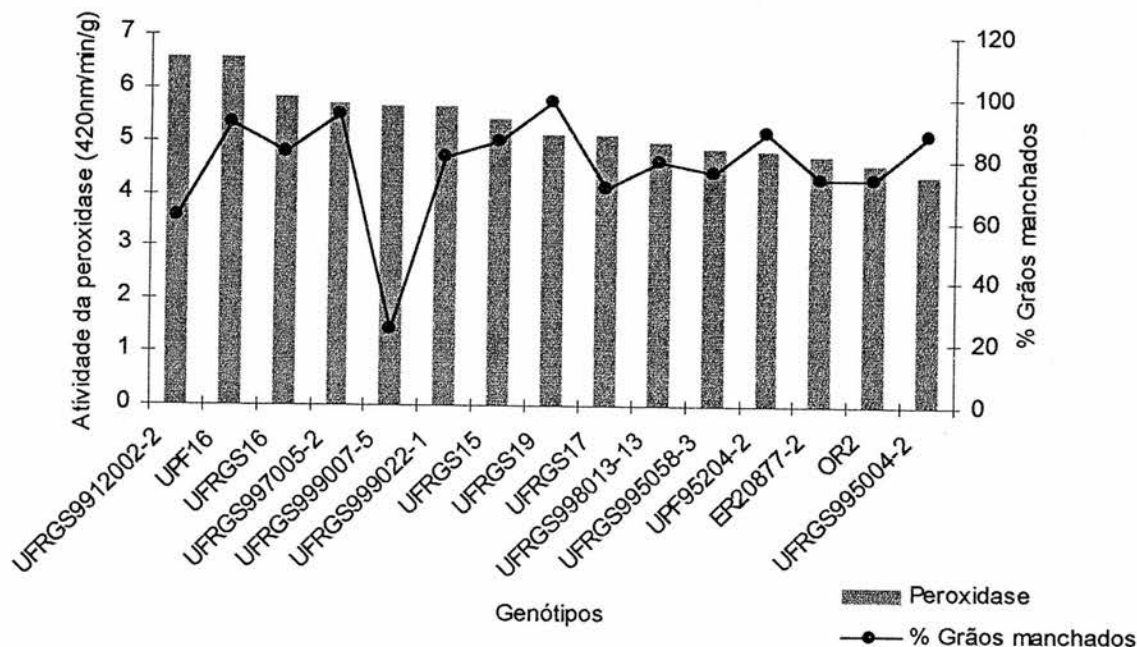


Figura 16. Análise da atividade da peroxidase em grãos maduros e % de grãos manchados nos genótipos de aveia branca. Coeficiente de correlação ($r= 0,066$).

A enzima peroxidase teve presença detectada desde a exposição das panículas até a maturação dos grãos de aveia. Na Figura 17, o gráfico da atividade de peroxidase dos genótipos UFRGS 16 e UFRGS 19 durante seu desenvolvimento na safra 2001, apresentou para cada genótipo uma curva de atividade de peroxidase, cujos valores parecem estar relacionados a etapas de desenvolvimento do grão. Existem evidências convincentes para o papel de certas substâncias químicas constitutivas ou induzidas na resistência, quando estão presentes ou são produzidas em quantidade suficiente, no local e tempo exatos para inibir o patógeno (DMITRIEV et al., 1990). Além disso, as alterações nas concentrações dessas substâncias devem estar relacionadas com mudanças na expressão da doença (PASCHOLATI & LEITE, 1994).

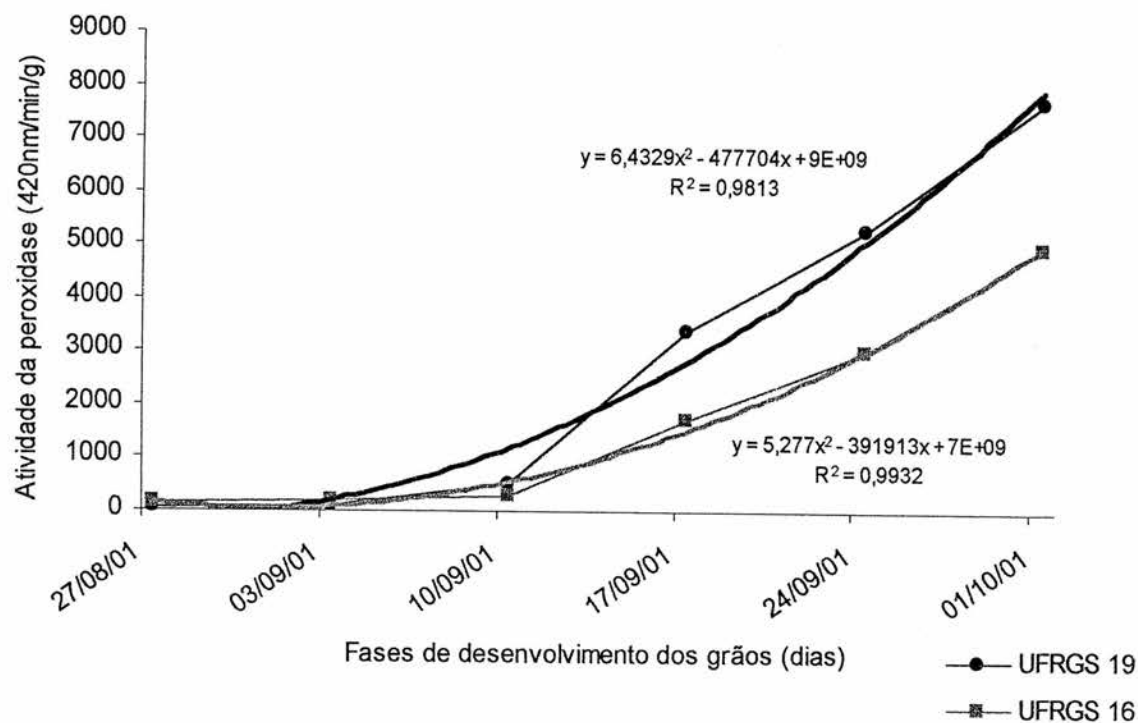


Figura 17. Atividade de peroxidase dos genótipos UFRGS16 e UFRGS19 durante seu desenvolvimento dos grãos. As datas das coletas correspondem aos seguintes estádios: florescimento, grão aquoso, grão leitoso, grão em massa mole, grão em massa, grão em massa dura. Na EEA/UFRGS, 2001

A média de atividade da peroxidase, obtida dos genótipos testados, durante a fase inicial de desenvolvimento dos grãos, por ocasião das duas primeiras coletas manteve-se em níveis baixos e aumentou nas coletas posteriores, que corresponderam aos estádios de grão leitoso, grão em massa mole e grão em massa, onde a infecção alcançou altos níveis (Figura 18). Vale ressaltar que são nestes estádios o período de maior suscetibilidade a *P. chaetomioides*.

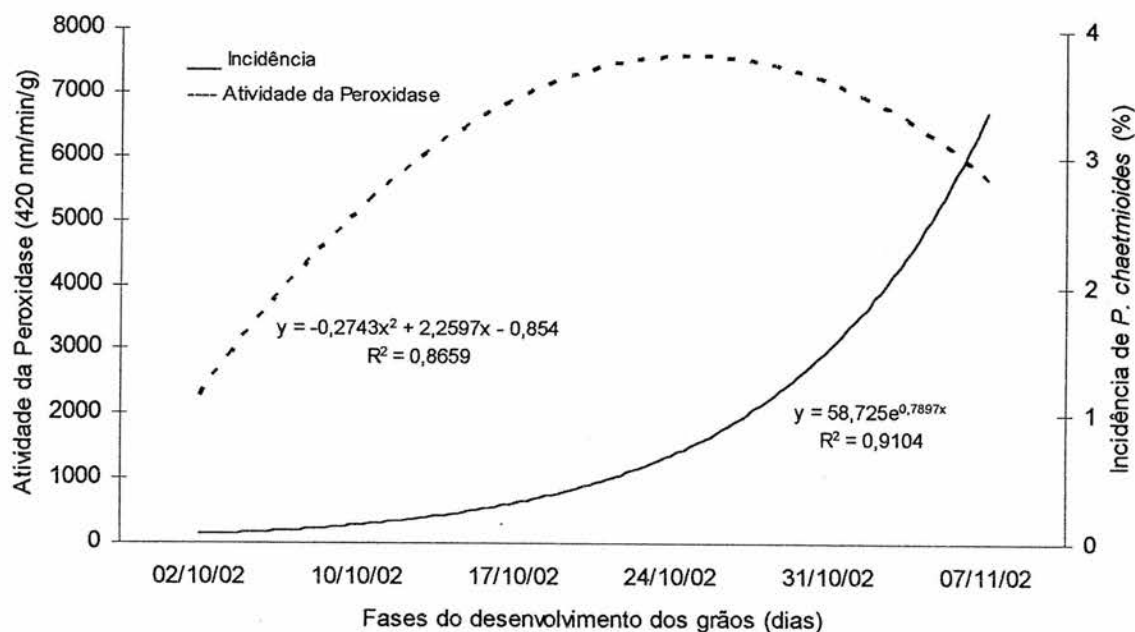


Figura 18. Curvas de atividade da peroxidase e incidência de *Pyrenophora chaetomioides* durante os estádios de formação dos grãos de genótipos de aveia branca, na EEA/UFRGS, 2002. As datas das coletas correspondem aos seguintes estádios de desenvolvimento dos grãos: florescimento, grão aquoso, grão leitoso, grão em massa mole, grão em massa, grão em massa dura.

Na Figura 19 a atividade da peroxidase de seis genótipos analisados durante o desenvolvimento dos grãos, na safra 2002, permitiu separar os genótipos de média e muito baixa resistência à formação da mancha. Os genótipos UFRGS 19, ER20877-2 e UFRGS 16, portadores média resistência a formação da mancha, apresentaram os maiores valores de atividade da peroxidase nas duas últimas coletas, que corresponderam aos estádios de grão em massa mole e grão em massa dura. Os genótipos UFRGS995058-3, UFRGS999004-2 e UFRGS998013-3, portadores de muito baixa resistência a formação da mancha, apresentaram valores de atividade de peroxidase inferiores as anteriores na fase final de desenvolvimento dos grãos. Ainda que os valores da atividade da peroxidase nas duas últimas coletas tenham agrupado os genótipos com características de resistência a formação da mancha semelhantes não foi

possível associar a maior atividade de peroxidase à resistência. As médias da atividade da peroxidase nas últimas duas coletas oriundas dos genótipos com maior resistência não foram estatisticamente distintas daqueles de menor resistência a formação de manchas (Tabela 12). Por outro lado, a avaliação da resistência a formação de manchas foi feita visualmente, sendo pertinente desconsiderar as pequenas diferenças na peroxidase encontradas nas duas últimas coletas.

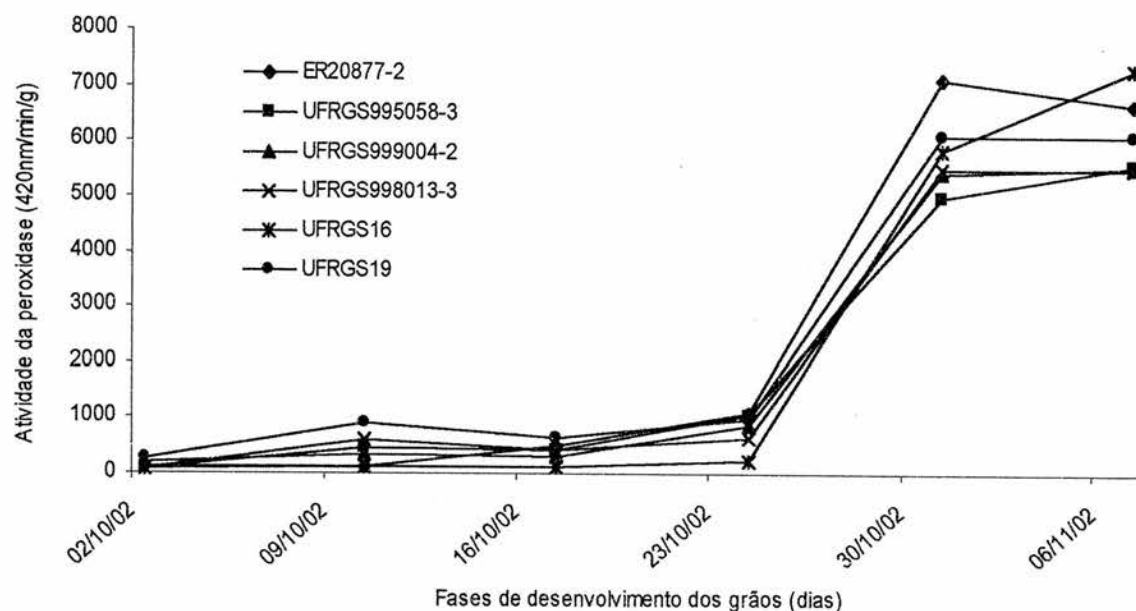


Figura 19. Atividade da peroxidase durante o desenvolvimento dos grãos dos seis genótipos testados. As datas das coletas correspondem aos seguintes estádios: florescimento, grão aquoso, grão leitoso, grão em massa mole, grão em massa, grão em massa dura. Na EEA/UFRGS, 2002.

Tabela 12. Atividade da peroxidase em sementes de genótipos de aveia branca com resistência diferenciada à mancha no grão, safra 2002. Os dados apresentados representam obtidos nas duas últimas coletas durante o desenvolvimento dos grãos.

Genótipos	Atividade da peroxidase	
	Coleta 30/10/2002	Coleta 06/11/2002
ER20877-2	7.136 A a	6.680 A a
UFRGS995058-2	5.008 A a	5.584 A a
UFRGS999004-2	5.432 A a	5.552 A a
UFRGS998013-3	5.504 A a	5.512 A a
UFRGS 16	5.848 A a	7.336 A a
UFRGS 19	6.112 A a	6.128 A a

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

Os 6 genótipos utilizados a fim de verificar se diferenças na atividade da peroxidase durante a formação dos grãos poderiam influenciar na resistência apresentaram diferença significativa nos níveis médios de peroxidase (Tabela 13). Na Tabela 13 pode ser observado que 3 genótipos apresentaram médias de atividade de peroxidase e percentuais de grãos manchados similares: UFRGS995058-2, UFRGS995004-2, UFRGS998013-3. Já os genótipos UFRGS 16, UFRGS 19 e ER20877-2 apresentaram médias distintas de atividade de peroxidase e percentuais de grãos manchados similares. Logo, as médias da atividade de peroxidase oriundas do desenvolvimento dos grãos também não permitiram diferenciar os genótipos quanto à formação de mancha uma vez que a correlação obtida foi baixa, $r = -0,14$. Além disso, também não houve correlação entre a atividade média da peroxidase e incidência de *P. chaetomioides* ($r=0,29$) (Figura 20).

Tabela 13. Atividade da peroxidase em sementes de genótipos de aveia branca com resistência diferenciada à mancha no grão, safra 2002. Os dados apresentados representam as médias obtidas das seis coletas durante o desenvolvimento dos grãos.

Genótipos	Atividade da Peroxidase ¹	Grãos manchados (%)
UFRGS 19	(2508) ² 6,20 a*	34,5 b*
ER 20877-2	(2608) 5,78 b	30,6 b
UFRGS 995058-2	(2100) 5,71 b	69,7 a
UFRGS 995004-2	(2108) 5,69 b	66,4 a
UFRGS 998013-3	(2122) 5,69 b	58,5 a
UFRGS 16	(2281) 5,06 c	42,3 b

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

¹Média da atividade da peroxidase (420 nm/min/g).

²Médias originais das coletas (transformação exponencial).

Coeficiente de correlação ($r = -0,144$)

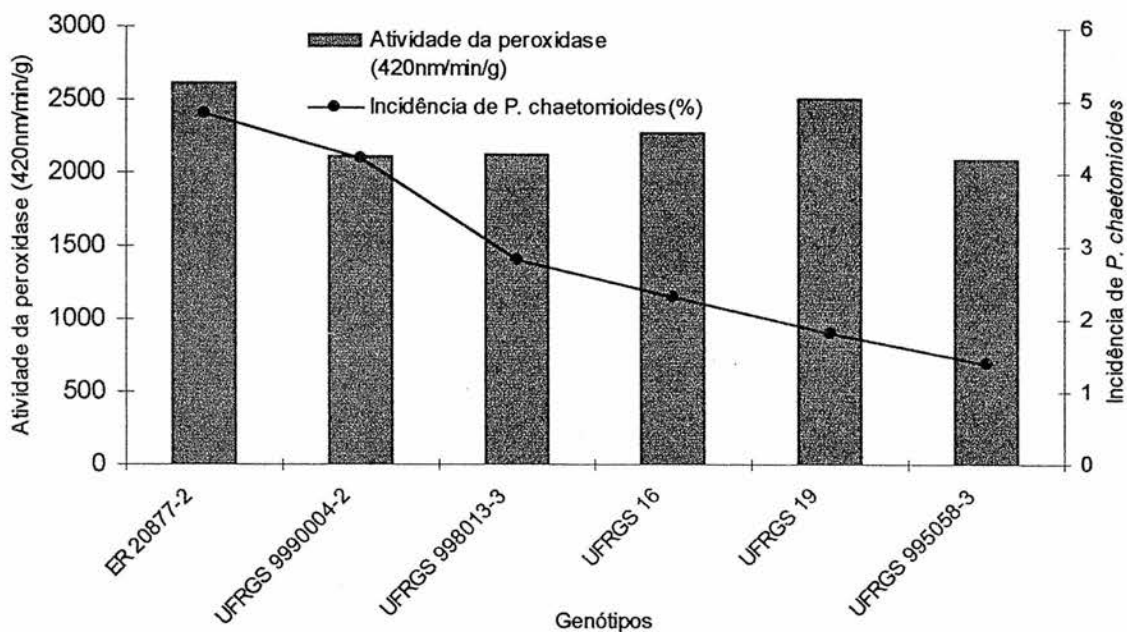


Figura 20. Análise da atividade da peroxidase e incidência de *Pyrenophora chaetomioides* em grãos de genótipos de aveia branca durante o desenvolvimento dos grãos, quando plaqueados em meio de cultura (BDA). EEA/UFRGS, 2002. Coeficiente de correlação ($r = 0,29$).

Segundo BELL (1981) as mudanças nos níveis de resistência que ocorrem durante a ontogênese resultam de alterações no conteúdo de nutrientes orgânicos, na vulnerabilidade dos tecidos às fitotoxinas e nos mecanismos estruturais e bioquímicos de defesa. O período de maior suscetibilidade dos grãos a *P. chaetomioides* ocorre no momento em que as sementes em formação encontram-se com altos níveis de atividade enzimática, após a terceira semana da exposição das panículas, podendo a peroxidase facilitar a infecção e conseqüente formação da mancha nos grãos. Esta hipótese pode facilmente explicar o fenômeno relatado, mas pode não dar resposta satisfatória para a questão se a peroxidase poderia desempenhar um papel significativo na diferença de resistência à moléstia entre os genótipos de aveia.

A análise da lipase em grãos maduros de aveia apresentou diferenças significativas no percentual de hidrólise entre os genótipos selecionados (Tabela 14). Os níveis de hidrólise (%) encontrados nos genótipos variaram entre 4,4 – 23,1%, permitindo separá-los em 4 classes distintas: muito alta, alta, média e muito baixa. HOI et al. (1999) utilizando metodologia similar em grãos de 30 genótipos de aveia obtiveram variações no percentual de hidrólise de 6,7 – 16,8%. Na Tabela 14 pode ser observado que 10 genótipos analisados obtiveram valores semelhantes aos obtidos por HOI et al. Genótipos com níveis de resistência a formação de mancha semelhantes, tais como UFRGS 19 e ER20877-2 apresentaram médio e muito alto percentual de hidrólise. Já os genótipos UFRGS 19 e UFRGS 998013-3 obtiveram valores médios no percentual de hidrólise mas apresentaram grandes diferenças quanto à resistência a formação de manchas nos grãos.

Deste modo, a avaliação da atividade de lipase nos grãos maduros dos genótipos selecionados não permitiu que a mesma fosse utilizada como

parâmetro para determinação de genótipos com resistência à formação de mancha e infecção, já que também não apresentou correlação significativa com a mancha ($r= 0,37$) e infecção ($r= 0,059$) (Figuras 21 e 22).

Tabela 14. Atividade da lipase (% hidrólise), em sementes de genótipos de aveia branca com resistência diferenciada à mancha no grão.

Genótipos	Classes ¹	Atividade da Lipase ²	Grãos manchados (%)
OR2	Muito alta	23,1 a*	45,5 f
ER20877-2	Muito alta	22,4 a	30,8 h
UFRGS999004-2	Alta	16,0 b	78,8 ab
UPF95204-2	Alta	14,9 bc	42,0 fg
UFRGS16	Alta	14,3 bc	33,5 gh
UFRGS9912002-2	Alta	13,9 c	66,8 cde
UFRGS999007-5	Média	11,0 d	48,0 f
UFRGS997005-2	Média	10,8 d	35,0 gh
UFRGS19	Média	10,8 d	13,8 i
UFRGS998013-3	Média	10,2 de	73,5 bc
UPF16	Média	8,4 ef	59,8 e
UFRGS999022-1	Baixa	6,7 fg	44,3 f
UFRGS995058-3	Baixa	5,9 gh	83,3 a
UFRGS15	Baixa	5,5 gh	64,8 de
UFRGS17	Baixa	4,4 h	72,5 bcd

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

¹Níveis similares de atividade da lipase (% hidrólise).

²Média da atividade da lipase (% hidrólise).

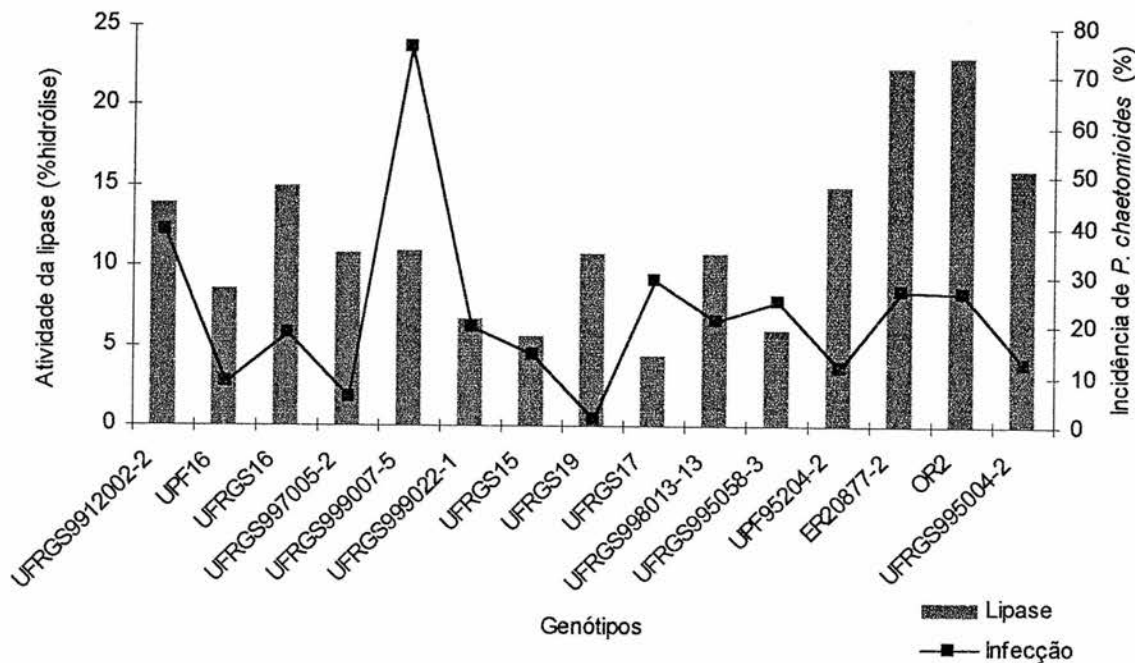


Figura 21. Atividade da lipase (% de hidrólise) em grãos maduros de aveia e incidência de *Pyrenophora chaetomioides* nos grãos sem manchas, quando plaqueados em meio de cultura (BDA), de genótipos de aveia branca. Coeficiente de correlação ($r= 0,059$).

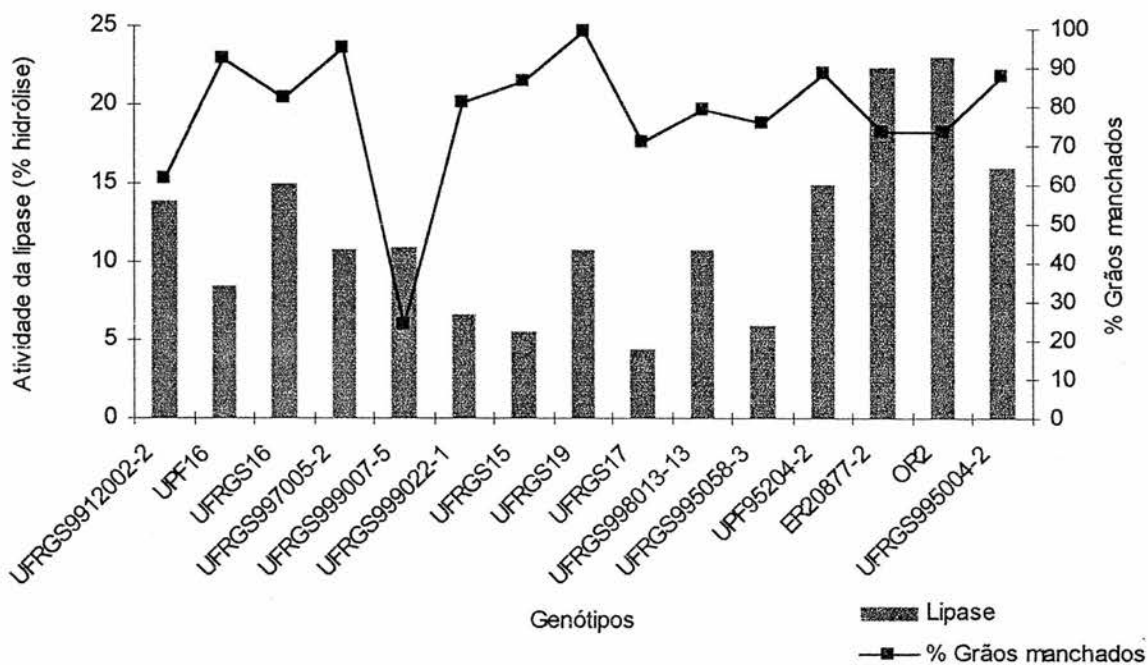


Figura 22. Atividade da lipase (% de hidrólise) em grãos maduros de genótipos de aveia branca e o percentual de grãos com manchas avaliados visualmente. Coeficiente de correlação ($r= 0,375$).

4. CONCLUSÕES

- Os propágulos de *Pyrenophora chaetomioides* raramente entram em contato com os carpelos, mas sim sucessivamente da gluma, lema ou pálea para infectar a semente.

- O período de suscetibilidade à formação da mancha compreende a fase de grão aquoso até o momento da colheita dos mesmos. Em decorrência, a permanência prolongada após sua maturação fisiológica pode comprometer a qualidade dos mesmos com aumento da intensidade de manchas.

- A aplicação adicional de Tebuconazole para o controle da moléstia da mancha-negra parece não ser viável economicamente, uma vez que a aplicação de fungicida na floração em relação a testemunha reduziu apenas 21% da incidência do fungo nas sementes. Além disso, não foi suficiente para reduzir a formação de manchas e nem produzir aumento significativo no rendimento que compensasse o aumento de custo do tratamento químico

- Os genótipos selecionados agruparam-se em diferentes níveis de incidência com relação à mancha-negra. A resistência observada nos genótipos

quanto à mancha-negra apresentou-se variável, com a presença de genótipos mediamente resistentes num extremo e completamente suscetíveis no outro.

- A avaliação da atividade da lipase e peroxidase nos grãos maduros não permite que sejam utilizadas como parâmetros para seleção de genótipos com resistência à formação de mancha e infecção.

5. REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS

- ADAM, A.; FARKAS, T.; SOMLYAI, G.; HEVESI, M. & KIRALY, Z. Consequence of O_2^- generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. **Physiol. Mol. Plant. Pathol.**, Cambridge, v. 34, p. 13-26, 1989.
- ADDEE, E.A.; PFENDER, W.F. The effect of primary inoculum level of *Pyrenophora tritici-repentis* on tan spot epidemic development in wheat. **Phytopathol.**, St. Paul, v. 79, p. 873-877, 1989.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4 ed. New York: Academic Press, 1997. 635p.
- AURORA, R. K., MANDAHAR, C. L., PAHWA, R. K. Infection of oats leaves by *Helminthosporium avenae*. I. Infection process. **Ind. J. Mycol. Plant Pathol.** Punjab, v. 10, n.1, p. 8-11, 1980.
- BAKER, R. J. & MCKENZIE, R. I. H. Herdability of oil in oats. *Avena sativa* L. **Crop Sci.**, Madison, v. 12, p. 201-203, 1972.
- BEBENDO, I. P. Ambiente e doença. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.331-341.
- BELL, A. A. Biochemical mechanisms of disease resistance. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, Palo Alto, v. 32, p. 21-81, 1981.
- BERGAMIN FILHO, A. & KIMATI, H. Variedades resistentes. In: GALLI, F (Ed). **Manual de Fitopatologia**, vol I. 2.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1978. p.297-313.
- BERNARDS, M. A., LEWIS, N. G. The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: changing paradigm. **Phytochem.**, Washington, v. 47, p. 915-933, 1998.
- BESTWICK, C. S., BROWN, I. R., MANSFIELD, J. W. Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. **Plant Physiol.**, Rockville, v. 118, p.1067-1078, 1998.

BETCHEL, D. B.; POMERANZ, Y. Ultrastructure and cytochemistry of mature oat (*Avena sativa* L.) endosperm, the aulerone layer and starch endosperm. **Cereal Chem.**, St. Paul, v. 58, n. 1, p. 61-69, 1981.

BETCHEL, D. B. How the structure of the wheat cariopsis should be modified to increase its end use value. In: POMERANZ, Y. **Wheat is unique: structure, composition, processing, end-use properties, and products**. Saint Paul: American Association Cereal Chemistry, 1989, cap. 5, p. 71-83.

BLUM, M. M. C. ***Pyrenophora avenae*: ocorrência, inóculo, patogenicidade e sobrevivência**. Porto Alegre, 1997. 111f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

BLUM, M. M. C., ALMEIDA, J. L., REIS, E. M. Avaliação da incidência da Helminthosporiose da aveia na parte aérea da cultura da aveia e semente colhida. In: REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 18., 1998, Londrina. **Resultados Experimentais...** Londrina: Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Aveia, 1998. p. 25-30.

BLUM, M. M. C.; REIS, E. M.; MATSUMURA, A. T. & MARTINELLI, J. A. Decomposição de resíduos culturais de aveia. In: REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 15, 1995, Guarapuava. **Resultados...** Guarapuava: Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Aveia, 1995. p. 187-188.

BOCCHESI, C. A. C. ***Pyrenophora avenae*: especificidade a tecido, análise enzimática e de virulência**. Porto Alegre, 2000. 98f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

BOCCHESI, C. A. C., MARTINELLI, J. A., MATSUMURA, A. T. S., FEDERIZZI, L. C. & PRESTES, A. M. Virulência, atividade enzimática e padrões de isoesterases de *Pyrenophora chaetomioides*, agente etiológico da mancha de grãos e folhas de aveia. **Fitopatol. Bras.**, Brasília, v. 28, p. 11-16, 2003.

BOCCHESI, C. A. C., MARTINELLI, J. A., MATSUMURA, A. T. S., FEDERIZZI, L. C. et al. Especificidade de *Pyrenophora avenae* aos tecidos da semente de *Avena sativa* e sua atividade enzimática. **Fitopatol. Bras.**, Brasília, v. 26, p. 180-184, 2001.

BOEWE, G. H. **Diseases of wheat, oats, barley and rye**. Illinois: Natural History Survey, 1960. 157p.

BOTELLA, M. A., QUESA, M. A., KONONOWICZ, A. K., BRESSAN, R. A. et al. Characterization and in situ localization of a salt-induced tomato peroxidase mRNA. **Plant Mol. Biol.**, Belgium, v. 25, p. 105-114, 1994.

BROWN, C. M.; WEBER, E. J.; WILSON, C. M. Lipid and amino acid composition of developing oats (*Avena sativa* L, cultivar 'Brave'). **Crop Sci.**, Madison, v. 10, p. 488-490, 1970.

- CARVALHO, F. I. F. & FEDERIZZI, L. C. Evolução da cultura da aveia no sul do Brasil. **Trigo e soja**, Porto Alegre, v. 102, p. 16-19, 1988.
- * CARVALHO, F. I. F.; FEDERIZZI, L. C.; NODARI, R. O.; SCHEEREN, P.; SERENO, M. J. M. Trigo, triticale, aveia e cevada na Depressão Central do Rio Grande do Sul. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, n. 319, p. 34-39, 1980.
- CHOPRA, A.; KHULLER, G. K. Lipids of pathogenic fungi. **Prog. Lipid. Res.**, Oxford, v. 22, p. 189-220, 1983.
- COCHRANE, M. P. Observations on the germ aleurone of barley. Phenol oxidase and peroxidase activity. **Ann. Bot.**, Oxford, v. 73, p. 121-128, 1994.
- COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA. Recomendações tecnológicas para o cultivo da aveia. Pelotas: UFRGS/UFPEL, 2000. 69p.
- COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA. Recomendações tecnológicas para o cultura da aveia. Passo Fundo: UPF, 2003. 87p.
- COSTA NETO, J.P. Fungos observados em gramíneas e leguminosas no Rio Grande do Sul. **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária**, Porto Alegre, v. 9, p. 51-67, 1967.
- DMITRIEV, A. P.; TVERKOY, L. A.; KOZLOVSKY, A. G. & GRODZINSK, D. M. Phytoalexins from onion and their role in disease resistance. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, Cambridge, v. 37, p. 235-244, 1990.
- DRECHSLER, C. Some graminicolous species of *Helminthosporium*. **J. Agr. Res.**, Washington, v. 24, p. 641-739, 1923.
- EKSTRAND, B.; GANGBY, I.; AKESSON, G. Lipase activity in oats- distribution, ph dependence and heat inactivation. **Cereal Chem.**, St. Paul, v. 69, n. 4, p. 379-381, 1992.
- ELLIS, M. B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Kew: CAB, 1971. 608p.
- * EVERS, A. D.; BLAKENEY, A. B.; O'BRIEN, L. O. Cereal structure and composition. **Aust. J. Agric. Res.**, Melbourne, v. 50, p. 629-650, 1999.
- FARKAS, G. L.; LOVREKOVICH, L. Enzyme levels in tobacco tissues affected by wildfire toxin. **Phytopathol.**, St. Paul, v. 55, p. 519-524, 1965.
- FARKAS, G. L.; STAHMANN, M. A. On the nature of changes in peroxidase isozymes in bean leaves infected by southern bean mosaic virus. **Phytopathol.**, St. Paul, v. 56, p. 669-667, 1966.
- * FEDERIZZI, L. C.; MILACH, S. C. K.; PACHECO, M. T., et al. Melhoramento da aveia. In: BORÉM, A. (Ed). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, 1999. p. 131-157p.

- FLOSS, E. L. Aveia, alternativa para produção de grãos, pastagem e cobertura verde. In: DARIO, G. A. (Ed). **Curso de Atualização em Fitotecnia**. Piracicaba: Ceres, 1991. p. 37-49.
- FLOSS, E. L. Aveia. In: BAIER, A. C.; FLOSS, E. L.; AUDE, M. I. da S. **As lavouras de inverno-1**, Rio de Janeiro: Globo, 1988. p.16-74.
- FLOSS, E. L.; SILVEIRA, A. A. E.; VERAS, . L.; et al. Produção e industrialização de aveia. In: FIOREZE, I (Ed). **Pólo de desenvolvimento científico e tecnológico-núcleo de alimentos**. Passo Fundo: Ediupf, 1998. p.55-88.
- FORCELINI, C. A. Fungicidas inibidores da síntese de esteróis. I. Triazoles. **Rev. An. de Patol. Plant.**, Passo Fundo, v. 2, p. 335-355, 1994.
- FREY, K. J. Remaking a crop gene pool: the case of *Avena*. **Agric. Impr. Station**, Taiwan, n. 35, p. 1-4, 1994.
- FREY, K. J.; HAMMOND, E. G. Genetics, characteristics, and utilization of oil in cariopses of oat species. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Iowa, v. 52, n. 9, p. 358-362, 1975.
- FULCHER, R. G. Morphological and chemical organization of oat kernel. In: WEBSTER, F (Ed). **Oats chemistry and technology**. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1986. p.47-74.
- GABRIEL, B. L. **Biological electron microscopy**. New York: Van Nostrand Reinhold Company Inc, 1982. 264p.
- GONNER, M. V.; SCHLOSSER, E. Oxidative stress in interactions between *Avena sativa* L and *Drechslera* spp. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, Cambridge, v. 42, n. 3, p. 221-234, 1993.
- GOUGH, F. J.; McDANIEL, M. E. Occurrence of oat leaf blotch in Texas in 1973. **Plant Dis. Rep.**, Washington, v. 58, p. 80-81, 1974.
- GUTKOSKI, L. C.; PEDÓ, I. **Aveia: composição química, valor nutricional e processamento**. São Paulo: Livraria Varela, 2000. 191p.
- HAMMERSCHMIDT, R., KUC, J. A. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiol. Plant Pathol.**, London, v. 20, p. 61-71, 1982.
- HAMMERSCHMIDT, R., NUCLE, E. M., KUC, J. A. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiol. Plant. Pathol.**, London, v. 20, p. 73-82, 1982.
- HARDER, D. E. & HABER, S. Oat diseases and pathology techniques, In: MARSHALL, H. G. & SORRELS, M. E. **Oats Science and Technology**. Madison: S. H. Mickelson, 1992, p. 354-357.

- HARGREAVES, J.A. The nature of the resistance of oat leaves to infection by *Pyrenophora teres*. **Physiol. Plant Pathol.**, London, v. 20, p. 165-171, 1982.

- HOI, S. W., HOLLAND, J. B., HAMMOND, E. G. Herdability of lipase activity of oat caryopses. **Crop Sci.**, Madison, v. 39, p. 1055-1059, 1999.

- HOSENEY, R. C. **Principles of cereal: science and technology**. 2 ed. St. Paul: The American Association of Cereal Chemistry, 1994. 378p.

- IVANOFF, S. S. The cause of spikelet drop of oats. **Plant Dis. Rep.**, Beltsville, v. 3, p. 206-207, 1963.

- JONES, D. G. & CLIFFORD, D. B. C.. **Cereal diseases their pathology and control**. Chichester: John Wiley. 1983. 309p.

- KENNETH, R. On the taxonomy, morphology and geografic origins of *Pyrenophora teres* Drechsler and allied species. **Bull. Res. Counc. of Israel**, Jerusalém, v. 11, p. 55-83, 1962.

- KERBY, K., SOMERVILLE, S. C. Purification of an infection-related, extracellular peroxidase from barley. **Plant Physiol.**, Rockville, v. 100, p. 397-402. 1992.

- LAGRIMINI, L. M. Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. **Plant Physiol.**, Rockville, v. 96, p. 577-583, 1991.

- LÂNGARO, C. L.; MORAIS, M. G.; PRESTES, A. M. et al. O uso de cultivares resistentes no controle da helmintosporiose da aveia. REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 20, 2000, Pelotas. **Resultados Experimentais...** Pelotas: Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Aveia, 2000. p.160-161.

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

- LEE, I. , HAMMOND, E, G.. 1990. Oat (*Avena sativa*) caryopses as a natural lipase bioreactor. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Iowa, v.67, p.761-765.

- LEONARD, W. H.; MARTIN, J. H. **Cereal Crop**. New York: Mac Millan,1968. 824p.

- LUKE, H. H.; WALLACE, A. T.; CHAPMAN, W. H. A. A new symptom incited by the oat leaf blotch pathogen, *Helminthosporium avenae*. **Plant Dis. Rep.**, Beltsville, v. 2, p. 109-110, 1957.

- MACHADO, G. **Introdução à microscopia eletrônico de varredura: príncípios físicos e suas aplicações**. Porto Alegre, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 06 jun.2001. Apostila do curso.

- MARTINELLI, J. A. **Custos da aplicação de fungicida na lavoura de aveia branca**. Porto Alegre, UFRGS, 15 de setembro de 2003.
- MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos Fitopatogênicos**. Recife: Imprensa Universitária, 1993. 277p.
- MURPHY, J. P.; HOFFMAN, L. A. The origin, history and production of oat. In: MARSHALL, H. G.; SORRELS, M. E. (Eds). **Oats Science and Technology**. Madison: Crop Science Soc, America, 1992. p 1-28.
- O'BRIEN, T. P.; McCULLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne: Termacarphi Pty Ltda, 1981, 345p.
- PAMAR, S., HAMMOND, E. G. Hidrolysis of fats and oils with moist oat cariopses. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Iowa, v. 71, p. 881-886, 1994.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Rev. An. Patol. Plant.**, Passo Fundo, v. 4, p. 1-51, 1994.
- PASCOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 1995. p. 417-452.
- PEDÓ, I.; SGARBIERI, V. C. Caracterização química de cultivares de aveia (*Avena sativa* L.). **Ciência e tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 78-83, 1997.
- PETERSON, D. M. Composition and nutritional characteristics of oat grain and products. In: MARSHALL, H. G.; SORRELS, M. E. (co-eds). **Oat Science and Technology**. Madison: Crop Science Soc. America, 1992, p. 265-292.
- RATTRAY, J. B. M. **Microbial Lipids**. New York :Academic Press, 1988. 697p.
- REES, R.G. & PLATZ, G.J. The epidemiology of yellow spot of wheat in southern Queensland. **Aust. J. Agric. Res.**, Melborne, v. 31, p. 259-267, 1980.
- REIS, E. M. & CASA, R. T. 1998. **Patologia de Sementes de Cereais de Inverno**. Passo Fundo: Aldeia Norte. 88p.
- REIS, E. M. & SOARES, R. M. Levantamento, transmissão e controle de fungos patogênicos associados a sementes de aveia. In: REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 15., 1995, Guarapuava. **Resultados Experimentais...** Guarapuava: Comissão Sul-brasileira de Pesquisa de Aveia, 1995. p. 330.
- REIS, E. M. Sobrevivência de fitopatógenos. In: ENCONTRO PAULISTA DE PLANTIO DIRETO, 1987, Piracicaba/ SP, **Trabalhos apresentados...**Piracicaba: FEALQ/ESALQ/USP, 1987. p. 73-89.
- RIBEIRO, A. S. Tratamento de sementes com fungicidas. **Rev. An. Patol. Plant.**, Passo Fundo, v. 4, p. 381-408, 1996.

ROSA, C. R. E. DA. **Estabelecimento de *Pyrenophora avenae* Ito & Kurib, em grãos de aveia (*Avena sativa* L.) em formação sob condições de campo.** Porto Alegre, 2002. 67f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

ROSA, C. R. E. DA, MARTINELLI, J. A., FEDERIZZI, L. C., BOCCHESI, C. A. C. Infecção de sementes por *Pyrenophora avenae* ITO & KURIB. A partir da emergência das inflorescências sob condições de campo. In: REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 21, 2001, Lages. **Resultados Experimentais...** Lages: Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Aveia, 2001, p. 141-142.

ROSA, C. R. E.; MARTINELLI, J. A.; FEDERIZZI, L. C.; BOCCHESI, C. A. C. Correlação entre a severidade nas folhas e incidência de *Pyrenophora avenae* nos grãos de genótipos de aveia branca. In: REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 23, 2003, Gramado. **Resultados Experimentais...** Gramado: Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Aveia, 2003. 350 p.

SAASTAMOINEN, M.; KUMPULAINEN, J.; NUMMELA, E. Genetic and environmental variation in oil content and fatty acid composition of oat. **Cereal Chem.**, St. Paul v. 66, n. 4, p. 296-300, 1989.

SABESTA, J., ZWARTZ, B.; HARDER, D. E., CORAZA, L., RODERICH, H. W., STOJANOVIC, S. Incidence and resistance of oats to fungus diseases in Europe in 1988-1994. **Ochr. Rosl.**, Warsaw, v. 32, n. 2, p. 103-113, 1996.

SCHILDER, A.M.C. & BERGSTROM, G.C. Infection of wheat seed by *Pyrenophora tritici-repentis*. **Can. J. Bot.**, Ottawa, v. 72, p.510-519, 1994.

SCHILDER, A.M.C. & BERGSTROM, G.C. Seed transmission of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal fungus of tan spot of wheat. **Eur. J. Plant. Pathol.**, Dordrecht, v. 101, p. 81-91, 1995.

SERENO TAVARES, M. J. C. **Variabilidade genética em *Avena sativa* L., *Avena sterilis* L, e em seus híbridos: avaliações agronômicas, morfológicas, citogenéticas e eletroforéticas.** Porto Alegre, 1991. 141f. Tese (Doutorado)-Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, 1991.

SIVANESAN, A. **Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs.** Wallingford: CAB. International Mycological Institute, 1987. 603p.

SULMAN, M.; FOX, G.; OSMAN, A.; et al. Relation between total peroxidase activity and susceptibility to black point in mature grains of some barley cultivars. **Proceedings of the 10th Australian Barley Technical Symposium**, 2001. Disponível na internet: <http://www.regional.org.au/au/abts/2001/t4/sulman.html> em 20 de março de 2003.

TEMPE, J. *Pyrenophora avenae* ITO & Kurib, (*Helminthosporium avenae* Eidam) The cause of seedling blight, leaf stripe and leaf spot of oats. **Proc. Int. Seed Test. Ass.**, Vollbek, v. 2, p. 117-140, 1964.

TEVIOTDALE, B. L., HALL, D. H. Factors affecting inoculum development and seed transmission of *Helminthosporium graminearum*. **Phytopathol.**, Saint Paul, v. 66, p. 295-301, 1976.

THOMAS, H. Oats, In: SMART, J, & SIMMONDS, N, W, (eds). **Evolution of crop plants**. 2 ed. New York: Longman Scientific & technical, 1995. p. 132-136.

THRO, A. M.; FREY, K. J. HAMMOND, E. G. Inheritance of fatty acid composition in oat (*Avena sativa* L.) cariopses. **Qual. Plant. Foods for Hum. Nutr.**, Boston, v. 32, n. 01, p. 29-36, 1983.

TRIONE, E. J.; ROSS, W. D. Lipids as bioregulators of teliospore germination and sporidial formation in the wheat bunt fungi, *Tilletia* species, **Mycologia**, New York, v. 80, n. 1, p. 38-45, 1988.

TURNER, D M.; MILLARD, W. A. Leaf-spot of oats, *Helminthosporium avenae* (Bri, and Cav,) Eid, **Ann. Appl. Biol.**, Warwickshire, v. 18, p. 535-559, 1931.

URQUHARD, A. A.; BRUMELL, C. A.; ALTOSAAR, I.; MATLASHEWSKI, G. J.; SAHASRABUDHE, M. R. Lipase activity in oats during grain maturation and germination, **Cereal Chem.**, St. Paul, v. 61, n. 2, p. 105-108, 1984.

URQUHART, A. A.; ALTOSAAR, I.; MATLASHEWSKI, G. J.; SAHASRABUDHE, M. R. Localization of lipase activity in oat grains and millet oat fractions, **Cereal Chem.**, St. Paul, v. 60, n. 2, p. 181-183, 1983.

WEPLER, R., HOLLAWAY, G. Cereal foliar fungicides-2002. ISSN 1329-8062. Disponível em <http://www.nre.vic.gov.au> em 18 de abril de 2003.

WILLIAMSON, P. M. Black point of wheat: *in vitro* production of symptoms, enzymes involved, and association with *Alternaria alternata*. **Aust. J. Agric. Res.**, Melbourne, v. 48, p. 13-19, 1997.

WRIGHT, K.H. & SUTTON, J.C. Inoculum of *Pyrenophora tritici-repentis* in relation to epidemics of tan spot of winter wheat in Ontario. **Can. J. Plant. Path.**, Ontario, v. 12, p. 149-157, 1990.

YOUNGS, V. L. Oat lipids and lipid-related enzymes. In: WEBSTER, F. H. **Oat chemistry and technology**. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 1986. p. 205-226.