

ESPECIFICIDADE DE *Pyrenophora avenae* AOS TECIDOS DA SEMENTE DE *Avena sativa* E SUA ATIVIDADE ENZIMÁTICA*

CARLA A.C. BOCCHESI**¹, JOSÉ A. MARTINELLI¹, AIDA T.S. MATSUMURA¹, LUIZ C. FEDERIZZI**²,
LUÍS F. DRESCH³ & MARCELO TELLIER³

¹ Departamento de Fitossanidade; ² Departamento de Plantas de Lavoura; ³ Bolsistas de Iniciação Científica, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Cx. Postal 776, 90012-970, Porto Alegre-RS

(Aceito para publicação em 25/01/2001)

Autor para correspondência: José A. Martinelli

BOCCHESI, C.A.C., MARTINELLI, J.A., MATSUMURA, A.T.S., FEDERIZZI, L.C., DRESCH, L.F. & TELLIER, M. Especificidade de *Pyrenophora avenae* aos tecidos da semente de *Avena sativa* e sua atividade enzimática. Fitopatologia Brasileira 26:180-184. 2001.

RESUMO

Manchas nos grãos de aveia (*Avena sativa*) é limitante à sua comercialização por tornar o produto escuro e não permitir seu uso pela indústria alimentícia. A localização do micélio de *Pyrenophora avenae* nos grãos de aveia e sua atividade enzimática podem esclarecer a causa das manchas. O objetivo deste trabalho foi determinar a localização de *P. avenae*, na cariopse de aveia, avaliar a sua atividade enzimática e seu efeito sobre proteínas e lipídios dos grãos de aveia. A localização do micélio nos tecidos da cariopse foi determinada após hidratação e cortes da mesma, seguido da análise dos tecidos sob lupa e microscópio. Para avaliação da atividade enzimática foram utilizados 18 isolados de *P. avenae* obtidos das principais regiões produtoras de aveia do Brasil, avaliando-os quanto às suas atividades amilolítica, proteolítica e lipolítica,

sendo realizada por plaqueamento das estruturas vegetativas em meio sólido específico para as enzimas testadas. As determinações do percentual de proteínas e lipídios foram obtidas pelos métodos de Kjeldahl e Blich & Dyer, respectivamente. O micélio de *P. avenae* é a principal causa da mancha nos grãos de aveia, localizando-se nos três tecidos do pericarpo. O fitopatógeno apresenta boa atividade enzimática para lipase e protease porém insignificante para a amilase. Os grãos de aveia manchados e sadios não diferiram nos teores de proteínas e de lipídios. Esses teores foram mais elevados nos tecidos superficiais do pericarpo e aleurona independente da presença ou não de manchas, justificando o crescimento superficial de *P. avenae* sobre os grãos de aveia.

Palavras-chave: manchas escuras, cariopse, aveia.

ABSTRACT

Specificity of *Pyrenophora avenae* for kernel tissues of *Avena sativa* and its enzymatic activity

The presence of dark spots on oat (*Avena sativa*) kernels has been a limiting factor toward their commercialization in Brazil since they make affected kernels less acceptable to the industry. The mycelium localization of *Pyrenophora avenae* on the kernels and its enzymatic activity may be involved in the cause of the spots. The objectives of this work were to determine the localization of *P. avenae* mycelium on the caryopsis tissues, its enzymatic activity and its effects on lipids and protein contents. The localization of the mycelium in tissues was determined by analysis of kernel slices under microscope and stereomicroscope after hydration. The evaluation of the enzymes lipase, protease, and amylase was performed on 18 isolates, selected from the most cultivated areas of

southern Brazil, by growing the isolates on enzyme-specific media. Proteins and lipids were analyzed by Kjeldahl and Blich & Dyer methods, respectively. The *P. avenae* mycelium is the main cause of kernel spots in oats and its growth is restricted to the cells of the pericarp. *Pyrenophora avenae* has good lipase and protease enzymatic activity but poor amylase activity. Spotted oat kernels did not differ in protein and lipid content when compared to healthy ones. In particular, their content was higher in the external tissues of the pericarp than in the rest of the grain, regardless of the presence of the spots. These results may explain the superficial growth of *P. avenae* mycelium in oat caryopsis and its association with the kernel spot.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a cultura da aveia (*Avena sativa* L.) cresceu em importância no sul do Brasil, tornando-se uma

* Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (2000)

** Bolsista do CNPq

MATERIAL E MÉTODOS

das principais alternativas para o plantio em áreas agrícolas nos meses de inverno (Federizzi *et al.*, 1997). A aveia utilizada para o consumo humano ou animal necessita de qualidade compatível com a exigência do mercado consumidor, sendo avaliada a cor externa e/ou interna dos grãos, o percentual de proteínas, além de outros itens (Tamaki, 1998).

Recentemente, no entanto, a presença de grãos manchados é um problema de grande magnitude e particular do sistema de produção brasileiro. A ocorrência de grãos manchados deprecia o produto e impede a sua comercialização, com perdas quase totais dos lotes que apresentam alta percentagem de grãos escurecidos, e desta forma colocando em risco toda a cadeia produtiva.

Trabalhos preliminares realizados por Blum (1997) constataram a alta frequência de *Pyrenophora avenae* Ito e Kurib em grãos manchados de aveia, o que indica que este patógeno pode ter um importante papel na formação das manchas. Turner & Millard (1931) relataram as características específicas do micélio de *P. avenae* no tecido da semente, tais como: escuro, espesso, muito septado, irregular e intracelular. Destacaram ainda a sua localização nos tecidos dos grãos de aveia, especificamente, dentro das células do pericarpo e na superfície das glumas. Boewe (1960) descreveu que os grãos infetados podem adquirir coloração marrom na base e tornarem-se enrugados. Porém, Reis (1987) relata que a colonização ou infecção das sementes sob condições naturais é causada por parasitas necrotróficos. Estudos recentes, efetuados por Blum (1997), constataram que não existe sintomatologia para identificação de patógenos em sementes, que possa ser utilizada para a diagnose. Porta & Montorsi (1982) avaliaram a incidência de *P. avenae* nas glumas, cariopses sem embriões e embriões, e constataram a incidência muito alta nas glumas (mais de 94%), razoavelmente alta sobre os tecidos da cariopse (mais de 46%) e pequeno percentual no embrião. Forcelini (1991), após efetuar experimentos com sementes desinfestadas, concluiu que a maior parte do inóculo está localizado no endosperma, justificando assim, as altas taxas de transmissão apresentadas. Reis & Casa (1998) mencionaram que o patógeno encontra-se como micélio principalmente no pericarpo e endosperma dos grãos. Apesar da existência de vários trabalhos envolvendo a localização do micélio, seus resultados permanecem contraditórios fazendo com que este assunto ainda mereça uma investigação mais criteriosa.

A possibilidade de que a localização do micélio esteja relacionada com o escurecimento do grão ainda não foi demonstrada experimentalmente. Informações adicionais sobre a habilidade enzimática do patógeno e a disponibilidade de nutrientes nos diferentes tecidos da semente poderiam auxiliar na compreensão da formação das manchas sobre os grãos. Neste âmbito de entendimento, o presente trabalho se realizou com o objetivo de determinar a localização do micélio nos tecidos dos grãos e associar a sua atividade enzimática com os principais componentes dos grãos, como as proteínas, lipídios e o amido.

Localização do micélio de *Pyrenophora avenae* no grão de aveia

Para determinar a localização do micélio fez-se, inicialmente, plaqueamento de grãos inteiros descascados e de partes internas e externas de grãos em meio de cultura, incubados em câmara de crescimento com 20 °C e fotoperíodo de 12 h. Após a hidratação dos mesmos, fez-se cortes nas sementes para a observação do micélio nos diferentes tecidos, com auxílio de lupa e microscópio.

A atividade enzimática

Neste teste foi utilizada uma amostragem de 18 isolados de *P. avenae* obtidos das três principais regiões produtoras de aveia no sul do Brasil (RS, SC e PR), avaliando-os quanto às suas atividades amilolítica, lipolítica e proteolítica. Os meios sólidos para análise dos complexos enzimáticos amilase, protease e lipase foram os propostos por Hankin & Anagnostakis (1975).

Discos de micélio do fungo com 0,5 cm de diâmetro, recortados da borda de colônias jovens, foram repicados para o centro de placas de Petri, para cada um dos três tipos de meio sólido, vedadas, identificadas e levadas à câmara de incubação sob temperatura de 23 °C, durante cinco dias. Foram utilizadas cinco repetições.

O procedimento de revelação para a detecção da atividade tanto de protease como de amilase, ocorreu no quinto dia. Para lipase no sétimo dia. Na análise de protease utilizou-se solução saturada de amônia e a reação foi notada pela presença de halo transparente em contraste com meio opaco. Para amilase utilizou-se solução alcoólica de iodo e a reação foi notada pela presença de halo amarelado em contraste com o meio escurecido. E para revelação da lipase, as placas foram mantidas durante dois dias sob refrigeração a temperatura de 4 °C para a formação de cristais de sais de cálcio, sendo notado pela presença de halo claro em volta da colônia.

A avaliação consistiu na medição de dois diâmetros ortogonais, da colônia e do respectivo halo. A atividade enzimática foi estimada semiquantitativamente usando um índice enzimático (I) que expressa a relação do diâmetro médio da colônia pelo diâmetro médio do halo. Deste modo, os isolados com maior índice são os que possuem menor atividade enzimática. Para comparar a atividade enzimática da lipase, amilase e protease dos 18 isolados fez-se a análise da variância, considerando as repetições, as enzimas e os isolados como efeitos principais (dados não mostrados). Para a comparação das médias foi utilizado o teste de Duncan (5%).

Determinação do percentual de proteínas e lipídios

As determinações do percentual de proteínas e lipídios de grãos de aveia da cultivar UFRGS-16/safra 1998 foram obtidas pelos métodos de Kjeldahl (Padmore, 1990) e Bligh & Dyer (1959), respectivamente. Para a comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A localização de *P. avenae* nos tecidos da cariopse de aveia (Figuras 1 e 2) foi superficial, limitada aos três tecidos do pericarpo. De acordo com Turner & Millard (1931) o fungo consegue penetrá-los facilmente, porém não tem habilidade para transpô-los, pois na testa da cariopse de aveia, *P. avenae* encontra a barreira para sua penetração.

A localização do micélio de *P. avenae* no grão de aveia ofereceu condições para avaliar melhor as exigências nutricionais do patógeno, considerando que a cariopse tem alta concentração de proteínas, lipídios e amido, alguns deles específicos para determinados tecidos. A maior fração de carboidratos encontra-se no endosperma amiláceo, com concentração muito baixa na camada de aleurona e embrião (Hoseney, 1994). Por outro lado, proteínas e lipídios, particularmente nas cultivares modernas, concentram-se nos tecidos do pericarpo (Peterson, 1992). Os resultados da atividade enzimática de *P. avenae* (Figura 3) podem explicar a razão da localização restrita àqueles tecidos, pois *P. avenae* mostrou insignificante atividade amilolítica, levando a crer que a falta desta habilidade enzimática o restringe ao pericarpo. Ao contrário, a grande atividade lipolítica e proteolítica justificaria a preferência por estes tecidos superficiais, os quais possuem lipídios e proteínas em valores mais elevados (Tabela 1). Os resultados do efeito de *P. avenae* sobre os teores de proteína bruta e lipídios em grãos inteiros ou suas camadas superficiais não apresentaram alteração significativa entre grãos manchados e não manchados (Tabela 1). De uma forma mais simples, duas hipóteses poderiam explicar a manutenção dos teores de proteínas e lipídios observados. A primeira, devido a insensibilidade do teste, em função da pequena porção do grão afetado pelo fungo e, a segunda, da reposição de teores

TABELA 1 - Teores de proteína bruta e lipídios em grãos inteiros de aveia (*Avena sativa*) ou em suas camadas superficiais, na ausência ou na presença de *Pyrenophora avenae*

Tratamento	Proteína Bruta (%)	Lipídios
1. Grãos inteiros de aveia sem manchas	13,38 a	5,28 a
2. Grãos inteiros de aveia com manchas	13,64 a	5,24 a
3. Pericarpo e aleurona sem manchas	16,95 b	6,50 b
4. Pericarpo e aleurona com manchas	17,03 b	6,84 b

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, significativamente pelo teste de Tukey 5%. CV = 8,5%.

semelhantes de proteínas e lipídios resintetizados nos tecidos do fungo, à medida que este os retira do grão, mantendo-os assim em níveis semelhantes.

Neste trabalho feito sobre especificidade a tecido, foi observado uma associação entre intensidade das manchas e densidade do micélio escuro nos tecidos. A ocorrência de um gradiente de severidade (Figura 4) pode ser devido a uma interação entre fatores ambientais favoráveis à infecção no estágio de grão leitoso e a compostos bioquímicos originados pelo reconhecimento do patógeno pela planta. A presença do micélio escuro nos tecidos do pericarpo pode ser uma das causas do escurecimento dos grãos. Outra possível causa seria a oxidação de compostos lipídicos específicos presentes nos tecidos superficiais da cariopse de aveia. A ocorrência de oxidação está associada comumente com o reconhecimento do patógeno e tem sido estabelecida para muitas interações planta patógeno (Mehdy, 1994), neste caso, porém, atuaria como um fator de suscetibilidade do hospedeiro, podendo ocorrer por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, através da ação de vários tipos ativos de oxigênio e radicais livres orgânicos citotóxicos, os quais são mantidos

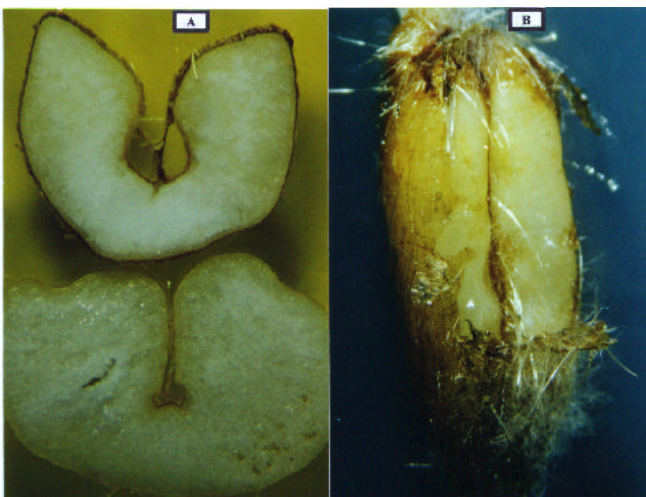


FIG. 1 - (A) Corte transversal de um grão manchado (acima) e sadio (abaixo) salientando o escurecimento superficial do primeiro; (B) Grão de aveia com pericarpo parcialmente removidos.

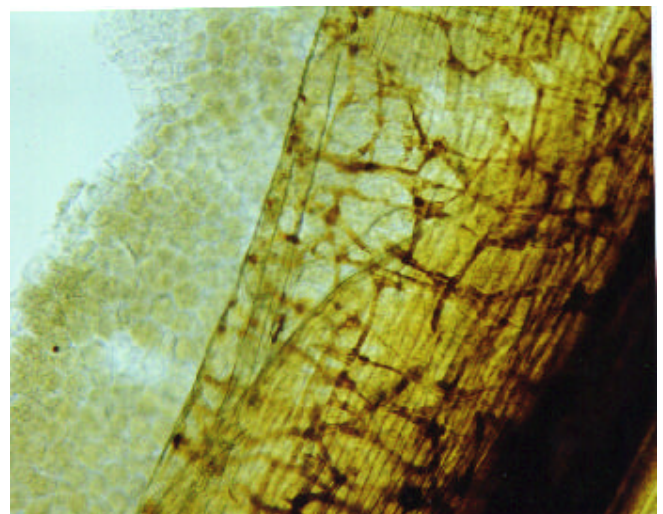
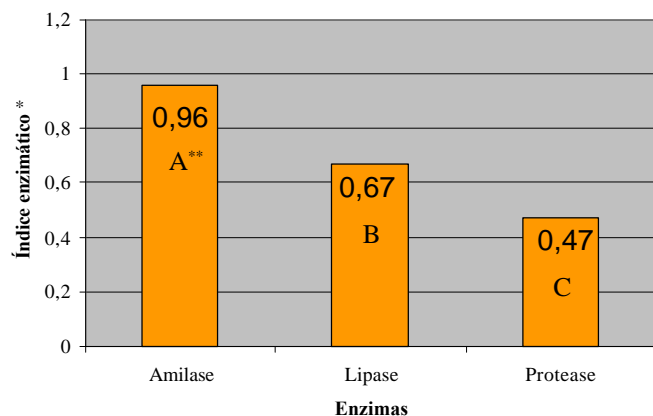


FIG. 2 - Detalhe do micélio de *Pyrenophora avenae* no interior do pericarpo de grãos de aveia branca.



(*): Os valores dos índices representam a relação diâmetro médio da colônia pelo diâmetro médio do halo. Deste modo, quanto maior o índice menor é sua atividade enzimática.

(**): Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo Teste de Duncan a 5%. C.V.: 9,55%

FIG. 3 - Índice de atividade enzimática de *Pyrenophora avenae* para as enzimas amilase, protease e lipase.

normalmente em baixos níveis. Gonner & Schlosser (1993) avaliaram que a peroxidação de compostos lipídicos em aveia, no estágio inicial da mancha foliar, após a inoculação com *P. avenae*, estava relacionada com grande aumento da atividade da lipoxigenase a qual ocasionava uma diminuição dos ácidos graxos insaturados mas nenhuma alteração no conteúdo dos ácidos graxos saturados. Esta reação inicial pode também estar ocorrendo no grão, sendo talvez mais acentuada nos tecidos superficiais das cultivares pela maior concentração e composição específica de alguns lipídios presentes (hipótese ainda não testada experimentalmente). De acordo com Anderson *et al.* (1991), a oxidação pode conduzir a uma ruptura da integridade da membrana proteína-lipídica, enfraquecimento do tecido e alteração do metabolismo conveniente ao desenvolvimento fúngico. Assim, não faria parte dos mecanismos de defesa contra *P. avenae* mas, ao contrário, poderia facilitar a colonização fúngica nos tecidos da semente.

Baseados na hipótese acima, os dados deste trabalho

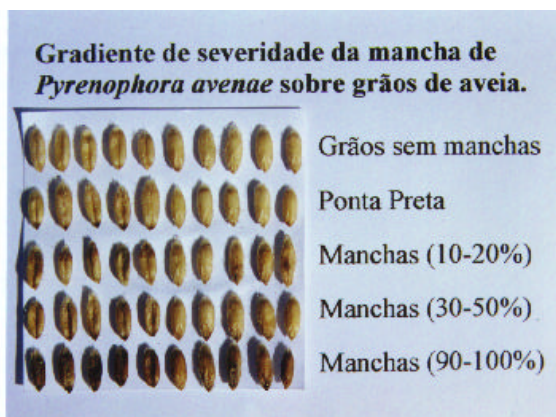


FIG. 4 - Gradiente de severidade da mancha de *Pyrenophora avenae* sobre grãos de aveia.

podem sugerir ainda que a suscetibilidade à mancha de *P. avenae* no grão não esteja associada a reação nas folhas, tal como acontece em trigo [*Triticum aestivum* (L.) Thell.] com relação a *Pyrenophora tritici-repentis* (Dud) Drechs (Schilder & Bergstrom, 1994). Assim, o melhoramento visando apenas resistência à mancha foliar talvez não resolva o problema da mancha no grão de aveia, onde este patógeno ocasiona maior dano. Estudos analisando os aspectos fundamentais desta interação patógeno-hospedeiro em termos de reconhecimento molecular, fisiológico e bioquímico, como fatores críticos, tornam-se necessários para um melhor entendimento do processo da doença e a possibilidade de se desenvolver novas alternativas de controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, A.J., ROGERS, K., TEPPER, C.S. & BLEE, K. Timing of molecular events following elicitor treatment of plant cells. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 38:1-13. 1991.
- BLIGH, E.G. & DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37:911-917. 1959.
- BLUM, M.M.C. *Pyrenophora avenae*: ocorrência, inóculo, patogenicidade e sobrevivência. Porto Alegre, 1997. 111f. (Dissertação Mestrado), Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.
- BOEWE, G.H. Diseases of wheat, oats, barley and rye. Illinois: Natural History Survey, 1960. 157 p.
- FEDERIZZI, L.C., MILACH, S.C.K. & BARBOSA NETO, J.F. *et al.* Melhoramento genético de trigo e aveia no Brasil. In: Anais, Simpósio sobre Atualização em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Lavras, 1997. p. 129-146.
- FORCELLINI, C.A. Importância Epidemiológica de fungos do gênero *Helminthosporium* em sementes de trigo e cevada. In: Menten, J.O.M. (Ed). Patógenos em Sementes: detecção, danos e controle químico. Piracicaba: ESALQ/USP, 1991. p. 179-188.
- GONNER, M.V. & SCHLOSSER, E. Oxidative stress in interactions between *Avena sativa* L. and *Drechslera* spp. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42:221-234. 1993.
- HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 61:597-607. 1975.
- HOSENEY, R.C. Principles of cereal: science and technology. 2 ed. St. Paul: The American Association of Cereal Chemists, 1994. 378p.
- MEHDY, M.C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Planta Physiology* 105:467-472. 1994.
- PADMORE, J.M. Animal feed. In: Helrichs, K (Ed). Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists. 15. ed. Arlington: AOAC, 1990. p. 72.
- PETERSON, D.M. Composition and nutritional

- characteristics of oat grain and products. In: Marshall, H.G. & Sorrels, M.E. Oat Science and Tecnology. Madison: Crop Science Soc. America, 1992. p. 265-292.
- PORTA, A.P. & MONTORSI, F. Localizzazione di *Pyrenophora avenae* Ito *et* Kuribay. nel "seme" di avena. *Informatore Fitopatologica* 32:35-38. 1982.
- REIS, E.M. & CASA, R.T. Patologia de Sementes de Cereais de Inverno. Passo Fundo: Aldeia Norte Editora. 1998.
- REIS, E.M. Sobrevivência de Fitopatógenos. In: Livro de Resumos, Encontro Paulista de Plantio Direto, Piracicaba/SP, 1987. p. 73-89.
- SCHILDER, A.M.C. & BERGSTROM, G.C. Infection of wheat seed by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Botany* 72:510-519. 1994.
- TAMAKI, S.M. Qualidade do grão de aveia para a indústria. In: Anais, 18, Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia. Londrina: IAPAR, 1998. p. 41.
- TURNER, D.M. & MILLARD, W.A. Leaf-spot of oats, *Helminthosporium avenae* (Bri. and Cav.) Eid. *Annals of Applied Biology* 18:535-559. 1931.
-