

# FUNGOS CAUSADORES DE HELMINTOSPORIOSE ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE AVEIA-PRETA (*AVENA STRIGOSA*, SCHREB.)

## HELMINTHOSPORIOSIS-INDUCING FUNGI ASSOCIATED WITH BLACK-OAT (*Avena strigosa* Schreb.) SEEDS

FARIAS, Cândida R. J. de <sup>1</sup>; DEL PONTE, Emerson M. <sup>2</sup>; LUCCA FILHO, Orlando A. <sup>3</sup>; PIEROBOM, Carlos R. <sup>4</sup>

### RESUMO

Isolados fúngicos com características de fungos causadores de helmintosporiose foram encontrados associados às sementes de aveia-preta produzidas no Estado do Rio Grande do Sul. Observações de características morfológicas permitiram a identificação das seguintes espécies: *Bipolaris sacchari*, *B. cynodontis*, *B. sorokiniana*, *Drechslera avenaceae*, *D. dematioidea* e *D. gramineae*. Sementes inoculadas artificialmente apresentaram redução drástica de germinação no teste padrão em rolo de papel. Todas as espécies demonstraram ser patogênicas à plântulas de aveia-preta, quando inoculadas com suspensão de conídios, causando sintomas típicos de helmintosporiose e resultando em 20 a 50% de plântulas mortas. *B. sorokiniana* foi o fungo mais agressivo tanto na redução da germinação com na morte de plântulas inoculadas. Conídios dos fungos cultivados sobre folhas de *Typha* sp. apresentaram maiores dimensões, comparado com meio de ágar. Este é o primeiro relato da associação dos fungos *B. cynodontis* e *B. sacchari* em sementes de plantas no gênero *Avena*.

Palavras-chave: *Bipolaris*, *Drechslera*, variabilidade fenotípica.

### INTRODUÇÃO

A aveia-preta (*Avena strigosa*, Schreb.) é uma forrageira de grande importância econômica para a pecuária do Estado do Rio Grande do Sul por fornecer pastagem de boa qualidade no período da estação fria (BAIER et al., 1989). No entanto, falhas no sistema de manejo da cultura e na pós-colheita, têm sido responsáveis por problemas fitossanitários na lavoura, bem como na qualidade fisiológica e sanitária das sementes produzidas. Levantamentos em sementes de aveia-preta, produzidas na região, têm permitido verificar a baixa qualidade sanitária das mesmas. Diversos patógenos e fungos de armazenamento têm sido relatados associados às sementes de aveia-preta, sendo as espécies comumente detectadas pertencendo aos gêneros *Fusarium*, *Drechslera*, *Bipolaris*, *Colletotrichum*, *Phoma*, *Curvularia*, *Stagonospora*, *Epicoccum*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Nigrospora* (BEVILAQUA & PIEROBOM, 1995; FARIAS et al., 2001)

Diversos fungos, quando presentes nas sementes podem provocar aborto, deformações, podridões, descolorações e necroses, com reflexos na diminuição da viabilidade e da germinação das mesmas (NEERGARD, 1979). Helmintosporioses em cereais e forrageiras de inverno são provocadas por espécies de fungos dos gêneros *Bipolaris* e *Drechslera*, diferenciados por caracteres morfológicos e conidiogênese e que, anteriormente, eram agrupados no gênero *Helminthosporium* (ALCORN, 1988).

A Helmintosporiose do trigo, causada por *Bipolaris sorokiniana*, e da cevada, causada por *Drechslera graminea* e *D. teres*, são doenças de grande importância econômica para esses cereais. Nesse patossistema, as sementes infectadas constituem-se no principal mecanismo de sobrevivência do fungo entre safras agrícolas, o que garante a continuidade do seu ciclo de vida. Ainda, os fungos causadores de helmintosporiose, podem ter influência negativa direta na germinação e no estabelecimento de pastagens. Já em sementes armazenadas, têm a capacidade de sobreviver como micélio no endosperma da semente, sob condições de estresse hídrico, e colonizar o sistema radicular e parte aérea durante a germinação (NEERGARD, 1979).

Dentre os fungos associados às sementes de plantas do gênero *Avena*, descritas na literatura, incluem-se as espécies: *Bipolaris havaiensis*, *B. sorokiniana*, *B. spicifer*, *B. victoriae*, *Drechslera biseptata*, *D. dematioidea*, *D. phlei*, *D. avenaceae*, *D. dictyoides*, *D. japonica*, *D. pendicellata*, *D. siccans*, *D. triseptata*, e *D. semeniperda* (RICHARDSON, 1979; SIVANESAN, 1987). Na literatura nacional, a maioria dos trabalhos sobre variabilidade de fungos causadores de helmintosporiose, tem sido conduzidos em aveia-branca (*Avena sativa* L.) (MEHTA, 1998; MEHTA, 1999) incluindo análises no nível molecular (MEHTA, 2001). Para a aveia-preta, são escassos os estudos sobre a variabilidade e patogenicidade de tais patógenos. O presente trabalho teve como objetivos identificar no nível de espécie e verificar a patogenicidade de isolados de fungos do antigo grupo *Helminthosporium* encontrados associados às sementes de aveia-preta produzidas no Estado do Rio Grande do Sul.

<sup>1</sup> Eng. Agr., Doutorando, Bolsista CAPES, Programa de Pós-graduação em Fitossanidade, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/, CP 354, Pelotas, RS. E-mail: candidajacobsen@bol.com.br

<sup>2</sup> Eng. Agr., Dr., Programa de Pós-graduação em Fitossanidade, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/, CP 354, Pelotas, RS. E-mail: edelponte.faem@ufpel.edu.br

<sup>3</sup> Eng. Agr., Dr., Prof. Adjunto, Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/, CP 354, Pelotas, RS. E-mail: lucaf@ufpel.edu.br

<sup>4</sup> Eng. Agr., Dr., Prof. Titular, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/, CP 354, Pelotas, RS. E-mail: pierobom@ufpel.edu.br

(Recebido para Publicação em 30/01/2004, Aprovado em 07/10/2004)

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Patologia de Sementes da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, com fungos obtidos de dezenas de lotes de sementes fiscalizadas de aveia-preta, oriundos de diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul. Durante a leitura do teste de sanidade, foram isolados os fungos com características similares àqueles do antigo grupo *Helminthosporium*, os quais foram utilizados no presente estudo.

### Identificação e cultivo dos isolados

Para diferenciação dos gêneros *Bipolaris* e *Drechslera*, conídios dos isolados foram induzidos à germinar em placa de Petri contendo ágar e água, seguido de incubação em sala de crescimento com temperatura ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo (12h luz/12h escuro) controlados, por um período de 3 a 4 horas. Os caracteres morfologia de conídio, hilo e conidióforo, germinação dos conídios, posição e direção do crescimento do tubo germinativo e ontogenia dos septos foram observados (ALCORN, 1988). Os isolados foram cultivados em dois tipos de substrato: BDA e folhas de *Typha* sp., este último, preparado como se segue: segmentos de 10 cm de folha foram dispostos verticalmente em tubos de ensaio contendo 10 mL de água esterilizada, posteriormente esterilizados por autoclavagem. Após 14 dias procedeu-se às avaliações de comprimento, largura e número de septos de 100 conídios de cada isolado. As características observadas foram fotografadas e comparadas com descrições e ilustrações da literatura (ELLIS, 1971; CHIDAMBARAM et al., 1973; SIVANESAN, 1987).

### Preparo do inóculo

Os isolados fúngicos foram cultivados em placa de Petri contendo meio de cultura BDA e incubados por 14 dias em câmara de crescimento com condições controladas de temperatura ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo (12h luz/12h escuro). Após, adicionou-se 10 mL de água destilada e esterilizada em cada placa de Petri e, com auxílio de um pincel esterilizado, homogeneizou-se a massa de esporos. A suspensão, depois de filtrada em um funil com gaze, foi coletada em um tubo de ensaio. Em seguida, padronizou-se a suspensão em 2000 esporos/ml com auxílio de câmara de Neubauer. A inoculação das sementes foi feita através de imersão, por 48 horas em câmara de crescimento, na suspensão de esporos em placa de Petri.

### Patogenicidade em sementes e plântulas

Uma amostra de 200 sementes inoculadas com a suspensão de conídios, foram distribuídas em 4 repetições de 50 sementes, em rolo de papel toalha previamente umedecido com água destilada e postas para germinar a  $20^\circ\text{C}$ ., conforme as Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 1992). Para a observação da patogenicidade e agressividade, 120 plântulas de aveia-preta foram cultivadas em bandejas plásticas (42 x 28 x 10 cm), contendo uma camada de seis (6) cm de terra (substrato para mudas produzido por Humus Fértil Comercial de Adubos Orgânicos Ltda – Pelotas, RS). Plântulas de aveia-preta, aos 21 dias após a semeadura, foram mantidas sob cobertura plástica por um período de 48 horas antes e após a inoculação. Esta foi feita por pulverização da suspensão de

esporos na parte aérea das plantas até a capacidade máxima de retenção, com o uso de um pulverizador manual. Os sintomas da doença foram observados aos 14 dias após a inoculação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Identificação de espécies

De acordo com as características de germinação de conídios e comparações com descrições e ilustrações da literatura, os 6 isolados foram divididos em 2 grupos, sendo 3 pertencentes ao gênero *Bipolaris* e 3 ao gênero *Drechslera*. A observação de demais características morfológicas, bem como das medições de estruturas em cultivo, permitiram a determinação das seguintes espécies, baseando-se em descrições e ilustrações da literatura (ELLIS, 1971; CHIDAMBARAM et al., 1973; SIVANESAN, 1987): *D. avenaceae* (M.A. Curtis ex Cooke) Shoem. = *Pyrenophora chaetomioides* Speg. (telemorfo); *D. dematioidea* (Bubák & Wróblewski) Subram.; *D. graminea* (Rabenh. ex Schlecht.) Shoem. = *Pyrenophora graminea* S. Ito & Kurib. (telemorfo); *B. cynodontis* (Maringoni) Shoemaker = *Cochliobolus cynodontis* Nelson (telemorfo); *B. sacchari* (E.J. Butler) Shoem.; *B. sorokiniana* (Sacc.) Shoem. = *Cochliobolus sativus* (S. Ito & Kurib) Drechsler ex Dastur (telemorfo).

Os valores descritos na literatura para dimensões conidiais das espécies identificadas apresentam uma grande amplitude de variação, conforme também foi observado no presente estudo. Comparando-se os dois substratos, verificou-se que, no geral, o comprimento de conídios foi maior no substrato constituído de folhas de *Typha* do que em meio agarizado (Tabela 1). Alguns estudos com outras espécies destes gêneros relataram variações em dimensões influenciadas pela nutrição (ALCORN, 1988). SIVANESAN (1987) observou que conídios de *Bipolaris oryzae* formados sobre glumas de trigo ou em cultura sobre palha de trigo apresentaram-se com maiores dimensões e mais escuros do que conídios formados sobre folhas como substrato.

A variabilidade fenotípica em relação ao meio nutritivo pode gerar dificuldade, em alguns casos, na identificação da espécie baseando-se apenas nas dimensões conidiais, o que torna necessária a observação de outras características morfológicas e estruturais para uma identificação com maior segurança. *D. dematioidea* apresenta conídios com ápices arredondados de coloração mais escura e com paredes espessas (Figura 1A). Em *D. avenaceae* verifica-se a formação de conidióforo geniculado na base (Figura 1B). No caso de *D. graminea* é característica a formação de conidióforo secundário (Figura 1C). Em *B. cynodontis*, ocorre a formação de vesícula globosa antes do tubo germinativo, sendo esta característica facilmente observada (Figura 1D). *B. sorokiniana* caracteriza-se pela formação de conídios fusóides com paredes espessas (Figura 1E). *B. sacchari* apresenta a formação de conídeos em grupo (Figura 1F).

### Patogenicidade em sementes e plântulas

Todas as espécies de *Bipolaris* e *Drechslera* exerceram influência negativa na germinação, promovendo redução da germinação no teste padrão. *B. sorokiniana* foi o que mais prejudicou a germinação, enquanto que *D. dematioidea* foi menos agressivo, porém reduziu a germinação em 50% em relação à testemunha (Tabela 2).

Tabela 1 – Dimensões e número de septos (valor mínimo, médio e máximo) de espécies de *Bipolaris* e *Drechslera* isoladas de sementes de aveia-preta, cultivadas em dois substratos, comparados com relatos da literatura (n=100).

Fungo	Substrato	Comprimento	largura	Nº septos
<i>B. cynodontis</i>	BDA	29,6 (56) 81	11(16)22	3(7)11
	<i>Typha</i> <sup>1</sup>	41(72)103	11(14)19	5(8)12
	Literatura <sup>2</sup>	35(50)75	10(13)16	3(7)9
<i>B. sacchari</i>	BDA	22(44)67	7(10)15	2(6)11
	<i>Typha</i>	33(69)100	7(11)15	5(9)13
	Literatura	35(65)96	9(13)17	5(8)9
<i>B. sorokiniana</i>	BDA	40(60)81	11(20)22	3(6)10
	<i>Typha</i>	26(65)89	15(19)26	2(6)11
	Literatura	40(80)120	17(20)28	3(8)12
<i>D. avenaceae</i>	BDA	33 (65)100	11(14)18	3(5)8
	<i>Typha</i>	37(64)111	7(11)15	2(4)8
	Literatura	25-140	12-22	2(6)9
<i>D. dematioidea</i>	BDA	19(32)55	7(10)15	2(3)5
	<i>Typha</i>	37(55)74	7(10)15	2(4)6
	Literatura	20(36)70	10(14)16	2(3)7
<i>D. graminea</i>	BDA	22(38)81	7(11)15	2(3)7
	<i>Typha</i>	30(61)118	7(11)15	2(4)7
	Literatura	27(70) 110	12(15)23	1-7

1 - Substrato de folhas de *Typha* esterilizadas dispostas em tubo de ensaio com 10 ml de água

2 – ELLIS (1971 , 1987) CHIDAMBARAM et al. (1973)

Tabela 2 – Germinação de sementes e morte de plântulas sob a influência de inoculação com suspensão de esporos (2000 conídios/ml) de diferentes espécies de fungos causadores de helmintosporiose, isolados de sementes de aveia-preta oriundo do Estado do Rio Grande do Sul

Espécie inoculada	% germinação	% plântulas mortas
Testemunha	89	5,8
<i>Bipolaris cynodontis</i>	17	20,8
<i>Bipolaris sacchari</i>	35	40,8
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	8	51,6
<i>Drechslera avenaceae</i>	22	19,2
<i>Drechslera dematioidea</i>	43	37,5
<i>Drechslera graminea</i>	20	16,6

Todas as espécies de fungos apresentaram-se patogênicas em plântulas de aveia-preta, retratando os sintomas típicos de helmintosporiose em 100% dos indivíduos inoculados. A agressividade, na forma de promoção de morte de plântulas, variou entre as espécies entre de 20 a 50% de plântulas mortas. *D. graminea* foi menos agressivo às plântulas enquanto que *B. sorokiniana* provocou o mais alto percentual de plântulas mortas, bem como o menor percentual de germinação de sementes (Tabela 2). Plantas da testemunha também apresentaram necrose nas folhas devida, provavelmente, à contaminação das plântulas com fungos naturalmente presentes no interior da semente ou no ambiente, resultando em morte de 5,8% de plantas. Os resoluções dos fungos nas plantas inoculadas, confirmaram a presença do patógeno previamente inoculado.

Os fungos *B. cynodontis* e *B. sacchari* estão sendo pela primeira vez relatados em sementes do gênero *Avena*. *B. cynodontis* é de ocorrência comum em *Cynodon dactylon* (L.) Pers, conhecida como grama-bermuda ou grama-seda. A ocorrência desse fungo já foi relatada em outras gramíneas como *Agropiron*, *Hordeum*, *Oryza*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Triticum*, *Zea*, *Festuca* e *Secale*. O fungo *B. sacchari*, agente causal da doença mancha-ocular na cana-de-açúcar, foi também relatado associado às sementes de plantas de *Zea*, *Cynodon*, *Pennisetum* e *Panicum*. A ocorrência de *B. sorokiniana* e sua alta agressividade pode ser resultado de sua presença na região, causando a mancha marrom ou helmintosporiose do trigo, um cereal extensivamente cultivado no sul do Brasil na mesma região de onde se originaram os lotes contaminados.

Estudos para identificação de patógenos veiculados por sementes de espécies forrageiras são incipientes e deve ser dispensada maior atenção à associação de patógenos com as sementes. LUCCA-FILHO (1999), em azevém-anual, observou que a presença de *D. oryzae* e *D. dyctyoides* provocou redução no vigor e germinação de sementes, influenciando negativamente o estabelecimento da pastagem. De acordo com os resultados deste trabalho, fungos de diferentes espécies dos gêneros *Bipolaris* e *Drechslera* ocorrem associados às sementes de aveia-preta e, potencialmente, podem trazer prejuízos no estabelecimento da cultura, além de se transmitirem para as plantas e infectarem as sementes ao final do ciclo, servindo de veículo para introdução destes patógenos em áreas isentas dos mesmos. Estudos estão sendo conduzidos para se verificar a patogenicidade destas espécies em outros cereais de inverno de maior importância econômica cultivados na região.

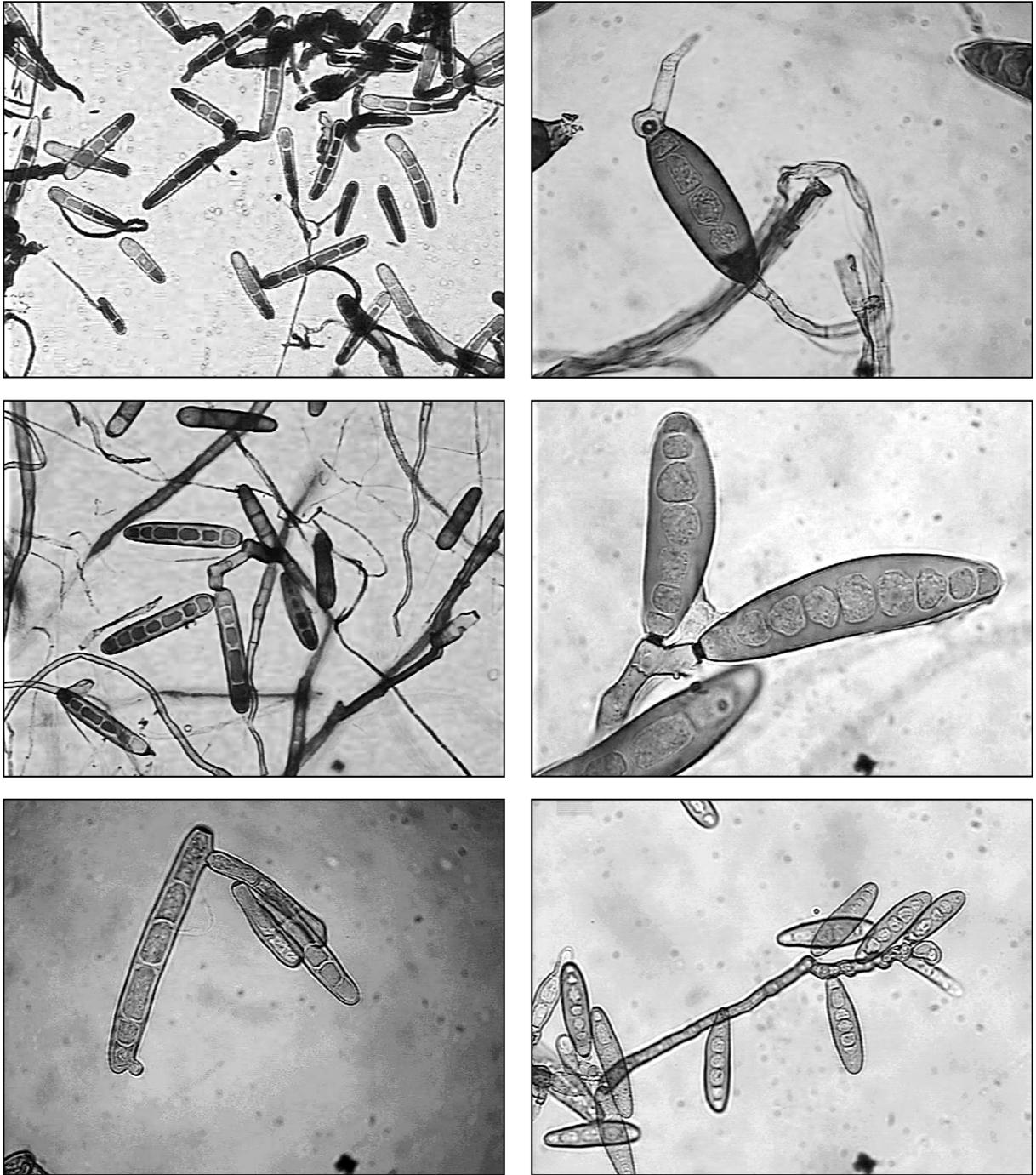


Figura 1 - Conídios e conidióforos de espécies de fungos causadores de helmintosporiose isolados de sementes de aveia-preta produzida no Rio Grande do Sul: A - *Drechslera dematioidea* ; B - *D. avenacea*; C - *D. gramineae*; D - *Bipolaris cynodontis*; E - *B. sorokiniana*; F - *B. sacchari*.

ABSTRACT

Fungal isolates of helminthosporiosis-inducing fungi were found associated with black-oat seeds surveyed in several regions of the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Observations of morphological aspects led to determine the following fungal species: *Bipolaris sacchari*, *B. cynodontis*, *B. sorokiniana*, *Drechslera avenaceae*, *D. dematioidea* and *D. gramineae*. Artificially inoculated seeds showed reduced germination on standard test. All species were pathogenic to black-oat seedlings with 20-50% of mortality. *B. sorokiniana* was the most aggressive species. Conidia grown on agar media showed lower length than those grown on *Typha* leaves as substrate. This is the first report of *B. cynodontis* and *B. sacchari* associated with *Avena* sp. seeds.

Key words: *Bipolaris*, *Drechslera*, phenotypic variation

REFERÊNCIAS

- ALCORN, J. L. The taxonomy of "*Helminthosporium*" species. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 37-56, 1988.
- BAIER, A.C.; FLOSS, E.L.; AUDE, M.I.S. **As lavouras de inverno**. 2. ed. São Paulo. 1989. 172p.
- BEVILAQUA, G.A.; PIEROBOM, C.R. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de aveia preta (*Avena strigosa*, Schreb) da zona sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Sementes**, v.17, p.19-22, 1995.
- BRASIL Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, D.F, 1992. 365 p.
- CHIDAMBARAM, P.; MATHUR, S.B.; NEERGARD, P. Identification of seed-borne *Drechslera* species. **Friesia**, v. 10, p.165-207. 1973.
- ELLIS, M.B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608p.
- FARIAS, C. R. J.; LUCCA FILHO, O. A.; PIEROBOM, C. R. et al. Qualidade sanitária de sementes de aveia-preta produzidas no estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n. 2, p.1-3, 2001.
- LUCCA FILHO, O.A.; PORTO, M. D. M.; MAIA, M.S. Fungos em sementes de azevém-anual (*Lolium multiflorum* Lam).e seus efeitos no estabelecimento da pastagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 2, p.142-147. 1999.
- MEHTA, Y.R. Molecular and pathogenic variability of *Drechslera* isolates from oats. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n.3, p. 590-596, 2001.
- MEHTA, Y.R. Manchas foliares da aveia-branca causadas por *Drechslera* spp. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA,18,Londrina, 1998. **Anais...**Londrina, 1998. p. 31-38. 1998.
- MEHTA, Y.R. *Drechslera* spp. atacando aveia-branca no Estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 265-267, 1999.
- NEERGARD, P. **Seed Pathology**. London: The Macmillan. 1979. 289p.
- RICHARDSON, M. J. **An annotated list of seed-borne diseases**. 3. ed. Surrey, England. 1979. 320p.
- SIVANESAN, A. **Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs**. Wallingford. 1987. 261p. (Cab International Mycological InstitutePapers,158).