

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**OCORRÊNCIA E TRANSMISSÃO DE
Alternaria spp. EM SEMENTES DE CANOLA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Patricia Migliorini

Santa Maria, RS, Brasil.

2014

**OCORRÊNCIA E TRANSMISSÃO DE
Alternaria spp. EM SEMENTES DE CANOLA**

Patricia Migliorini

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração Técnicas de Beneficiamento e Sanidade de Sementes, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agronomia**

Orientador (a): Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria, RS, Brasil.

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Migliorini, Patricia
Ocorrência e transmissão de *Alternaria* spp. em
sementes de canola. / Patricia Migliorini.-2014.
119p.; 30cm

Orientadora: Marlove Fátima Brião Muniz
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, RS, 2014

1. Armazenamento 2. Brassica napus L. 3. Fungos 4.
Maturação fisiológica 5. Patogenicidade I. Muniz, Marlove
Fátima Brião II. Título.

© 2013

Todos os direitos autorais reservados a Patricia Migliorini. A reprodução de partes ou de todo deste trabalho só poderá ser feita mediante citação da fonte.

Endereço eletrônico: pati.migliorini@gmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

**A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado**

**OCORRÊNCIA E TRANSMISSÃO DE
Alternaria spp. EM SEMENTES DE CANOLA**

elaborada por
Patricia Migliorini

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marlove Fátima Brião Muniz, Dr^a.
(Presidente/Orientador)

Luciana Zago Ethur, Dr^a.
(UNIPAMPA)

Stela Maris Kulczynski, Dr^a.
(UFSM)

Santa Maria, 24 de fevereiro de 2014.

Dedico este trabalho aos meus pais, Virgilio e Geci, e ao meu irmão Francisco, por todo amor, apoio e incentivo em todos os dias da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela minha vida, pela sabedoria e por todas as minhas conquistas.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós Graduação em Agronomia, pela oportunidade de realização do mestrado.

À professora Dr^a Marlove Fátima Brião Muniz, pela paciência, orientação e ajuda prestada durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

Às professora Dr^a Elena Blume e Liliane Henning pela co-orientação e disponibilidade sempre que solicitadas.

À banca examinadora, constituída pela Prof^a Stela Maris Kulczynski e Luciana Zago Ethur.

Aos meus pais, mesmo longe sempre estiveram presentes em todos os momentos, me dando força para continuar sempre. A vocês, minha eterna gratidão.

Ao meu irmão Francisco e a minha cunhada Halanna pelo incentivo.

Ao Fernando pelo carinho, paciência e ajuda.

Às queridas amigas Juceli Müller, Paola Milanesi, Caciara Maciel, Emanuele Junges, Clair Walker, Tuane Araldi da Silva e aos colegas Ricardo Feliciano dos Santos, Ricardo Mezzomo e Moacir Tuzzin, pela grande ajuda, disponibilidade e amizade oferecida durante a execução desse trabalho.

Aos demais colegas e amigos, que de uma forma ou outra se envolveram nessa pesquisa: Camila Pollet, Danieli Brum, Bruna Bastos, Marcieli Barbieri, Leíse Hekcler, Marciéli Bovolini, Cláudia Dutra, Geralda Beatriz, Raquel Stefanello, Geísa Finger, Giseli Noal, Graziela Piveta, Marília Lazarotto, Evandro Missio, Tiago Cechinatto (*in memoriam*), Carisiane Jaroczewki, Lizieli Soares, Daiane Dalla Nora, Kelin Bexaira, Laura Vargas, Kati Steckling, Pâmela Steckling, Priscila Barbieri, Jonas e Eliana Vogt, muito obrigada.

Aos funcionários do Departamento de Defesa Sanitária, Maria Nevis e Fernando Cognato, pelos ensinamentos e amizade nesses dois anos.

A todos os meus amigos, em especial, a Giseli Valentini, Adriane Rebonatto, Crislaine Suzana e Patricia Bertoncelli pela amizade durante todo esse tempo.

A Embrapa Trigo e ao Dr. Gilberto Omar Tomm pelo fornecimento das sementes.

Enfim, a todas aquelas pessoas que, mesmo não mencionadas, torceram e participaram, de alguma forma dessa trajetória. Agradeço!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria

OCORRÊNCIA E TRANSMISSÃO DE *Alternaria* spp. EM SEMENTES DE CANOLA

AUTOR: PATRICIA MIGLIORINI
ORIENTADORA: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 24 de fevereiro 2014.

Sementes de *Brassica napus* L. var. oleifera Metzg. (canola) podem ser via de transporte de organismos fitopatogênicos que tem capacidade de afetar a qualidade fisiológica da semente e causar doenças em diferentes estádios de desenvolvimento da cultura. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar e identificar as espécies de *Alternaria* spp. associadas às sementes de canola durante o processo de produção e armazenamento e avaliar o seu potencial de transmissão e patogenicidade. Para tanto, os experimentos foram conduzidos na área experimental do Departamento de Defesa Fitossanitária e no Laboratório de Fitopatologia, ambos da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS. Foram utilizadas sementes dos híbridos Hyola 401, Hyola 61 e Hyola 60. Para os experimentos realizados a campo, o delineamento foi blocos ao acaso e para aqueles realizados no laboratório foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado. Foram realizadas observações durante o desenvolvimento das plantas, após o início da maturação das sementes, na colheita e durante o armazenamento, as quais envolveram avaliações da qualidade física, fisiológica e sanitária das sementes. Através do teste de transmissão, foi verificada a ocorrência de *Alternaria* spp. causando sintomas de “*damping-off*” nas plântulas. Foram obtidos seis isolados do patógeno, sendo os mesmos inoculados nas sementes para comprovar a sua patogenicidade. Procedeu-se a caracterização morfológica pelo Manual de identificação de *Alternaria* e, para a identificação molecular, foi adotado o seqüenciamento da região genômica do Fator de Elongação-1 α . Os resultados obtidos permitem concluir que o ponto de maturidade fisiológica das sementes de canola ocorre aos 58 dias após a plena floração. Com o decorrer da maturação das sementes, ocorreu aumento dos índices de contaminação por *Alternaria* spp. nas sementes, os quais decresceram durante o armazenamento. As espécies *A. brassicicola*, *A. japonica* e *A. alternata* afetaram a qualidade fisiológica das sementes e foram patogênicas à canola, causando necrose no colo e tombamento de plântulas.

Palavras-chave: Armazenamento. *Brassica napus* L. Fungos. Maturação fisiológica. Patogenicidade.

ABSTRACT

Master course Dissertation
Graduate Program in Agronomy
Federal University of Santa Maria

OCCURRENCE AND TRANSMISSION OF *Alternaria* spp. IN CANOLA SEEDS

AUTHOR: PATRICIA MIGLIORINI

ADVISER: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

Location and Date of Presentation: Santa Maria, february 24, 2014.

Seeds of *Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzg. (canola) may transport pathogenic organisms that have the ability to affect seed quality and cause diseases at different stages of crop development. The objective of this study was to evaluate and identify the species of *Alternaria* spp. associated with seeds canola during the process of manufacture and storage and to evaluate the potential for transmission and pathogenicity. Experiments were conducted at the Plant Protection Department and Laboratory of Phytopathology, both in the Federal University of Santa Maria, Santa Maria - RS. Hybrid seeds from Hyola 401, Hyola 61 and Hyola 60 were used. Field experiments utilized a randomized blocks design, while lab experiments were based on completely randomized design. Plants were evaluated after the onset of seed maturation, at harvest and during storage. During this period, assessments of physical, physiological and sanitary quality of seeds were performed. Through the transmission test was checked for the occurrence of *Alternaria* spp. causing symptoms of "damping-off" the seedlings. Six isolates of the pathogen were obtained, which were inoculated on seeds to check the pathogenicity. The morphological identification was made by visual observation of *Alternaria* and genetic identification using sequenced genomic region of Elongation Factor - 1 α . The results showed that the physiological maturation of canola seed occurs 58 days after full bloom. Ripening increased the levels of contamination of *Alternaria* spp. seeds and decreased during storage. The species *A. brassicicola*, *A. japonica* and *A. Alternaria*, that affected the physiological quality of seeds and canola, were pathogenic causing necrosis on his lap and seedling *damping-off*.

Keywords: Storage. *Brassica napus* L. Fungi. Physiological maturity. Pathogenicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Dados de precipitação total e temperatura média em decêndio, durante a condução do experimento no ano de 2012. Santa Maria – RS, 2013. 59
- Figura 2 – Massa fresca e massa seca de sementes de canola Hyola 401 (a), Hyola 61 (b) e Hyola 60 (c), em função da época da colheita. Santa Maria – RS, 2013. 60
- Figura 3 – Teor de água das sementes de canola Hyola 401 (a), Hyola 61 (b) e Hyola 60 (c), em função da época da colheita. Santa Maria – RS, 2013. 62
- Figura 4 – Germinação de sementes de canola Hyola 401 (a), Hyola 61 (b) e Hyola 60 (c), em função da época da colheita. Santa Maria – RS, 2013 64
- Figura 5 – Condutividade elétrica de sementes de canola Hyola 401 (a), Hyola 61 (b) e Hyola 60 (c), em função da época da colheita. Santa Maria – RS, 2013. 65
- Figura 6 – Incidência de *Alternaria alternata* em sementes de canola Hyola 401 (a), Hyola 61 (b) e Hyola 60 (c), em função da época da colheita. Santa Maria – RS, 2013. 68
- Figura 7 – Germinação das sementes de canola, durante o período de armazenamento. Santa Maria – RS, 2013. 80
- Figura 8 – Incidência de: a) *Alternaria brassicicola* e b) outros patógenos, detectados no teste de sanidade em sementes de canola, em função do período de armazenamento. Santa Maria – RS, 2013. 81
- Figura 9 – Análise de regressão para incidência de *Alternaria alternata* em sementes de canola durante o período de armazenamento. Santa Maria – RS, 2013. 82
- Figura 10 – Sintomas observados em plântulas de canola, no teste de patogenicidade. Tombamento em pós-emergência de plântulas (A); necrose e micélio de *Alternaria brassicicola* na região do hipocótilo (B e C). 86
- Figura 11 – Colônias puras dos seis isolados de *Alternaria* spp. crescidos em meio V8-ágar, por 10 dias. 89
- Figura 12 – Características morfológicas de seis isolados de *Alternaria* spp., vistas em microscópio óptico em aumento de 40 x. A) isolado I1; B) isolado I2; C) isolado I3; D) isolado I4; E) isolado I5 e; F) isolado I6. A barra presente em cada imagem correspondente à medida de 20 µm. 93
- Figura 13 – Dendograma baseado no método “Neighbor-joining” derivado das sequências da região EF-1α, com base em 5000 réplicas de “bootstrap”, dos isolados de *Alternaria* spp. (I1, I2, I3, I4, I5 e I6), e de sequências obtidas no GenBank de diferentes isolados de *Alternaria* spp. O número nas ramificações representa o valor de “bootstrap”. *Ceratocystis fimbriata* (HM569615) foi utilizado como *outgroup*. Santa Maria – RS, 2013. 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados de <i>Alternaria</i> spp. provenientes de folha e sementes de diferentes híbridos de canola.	50
Tabela 2 – Emergência (E), ciclo vegetativo de emergência a plena floração (CV), ponto de maturidade fisiológica (PMF) e o ciclo total da emergência a colheita (CT), visualizados em três diferentes híbridos de canola. Santa Maria – RS, 2013.	56
Tabela 3 – Incidência de mancha de alternaria em folhas (IMAF) e siliquis (IMAS), de diferentes híbridos de canola. Santa Maria – RS, 2013.	57
Tabela 4 – Condições meteorológicas, durante a floração e maturação fisiológica das sementes de canola, safra 2012/2012. Santa Maria – RS, 2013.	67
Tabela 5 – Médias das variáveis de incidência de <i>Alternaria brassicicola</i> , <i>Alternaria japonica</i> e outros patógenos em sementes de canola, em função dos dias após a plena floração (DAFP). Santa Maria – RS, 2013.	69
Tabela 6 – Qualidade física e fisiológica de sementes de canola, provenientes de plantas cultivadas em Santa Maria. Santa Maria – RS, 2013.	72
Tabela 7 – Incidência de <i>Alternaria</i> spp. (Alt) <i>Fusarium</i> spp. (Fus) <i>Phoma</i> spp. (Pho), <i>Aspergillus</i> spp. (Asp), <i>Penicillium</i> spp. (Pen), <i>Botrytis</i> spp. (Bot) e <i>Rhizopus</i> spp. (Rhi) em sementes de canola. Santa Maria – RS, 2013.	74
Tabela 8 – Emergência, sementes mortas e plântulas sintomáticas avaliados no teste de transmissão.	76
Tabela 9 – Percentual de gêneros fúngicos identificados no teste de transmissão por sementes de canola, cultivados no município de Santa Maria – RS, 2013.	77
Tabela 10 – Análise de variância para os caracteres de porcentagem de germinação e sanidade, em sementes de canola cultivados em Santa Maria – RS e armazenado em condição de ambiente não controlado.	78
Tabela 11 – Germinação de sementes de canola armazenada em condições de ambiente não controlado. Santa Maria – RS, 2013.	79
Tabela 12 – Valores médios de incidência de <i>Alternaria alternata</i> (%) em sementes de canola durante o período de armazenamento. Santa Maria – RS, 2013.	82
Tabela 13 – Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de canola Hyola 61, inoculadas com isolados de <i>Alternaria</i> spp. Santa Maria – RS, 2013.	84
Tabela 14 – Diâmetro médio das colônias de <i>Alternaria</i> spp. (DMC) após sete dias de incubação, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), produção média de esporos e coloração da colônia, em meio V8-ágar, incubado à 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas.	88

Tabela 15 – Caracterização morfológica de conídios de isolados de *Alternaria* spp. encontrados em folha e sementes de canola..... 91

Tabela 16 – Código de acesso no *GenBank*, cobertura (%), similaridade (%) e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região genômica EF-1 α . . 94

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Análise de solo	117
Anexo B – Descrição dos meios de cultura utilizados no trabalho	118
Anexo C – E-mail	119

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Cultura da canola	25
2.2 Qualidade das sementes	28
2.3 Maturidade fisiológica.....	30
2.3.1 Características da espécie	30
2.3.2 Qualidade física e fisiológica das sementes	31
2.3.3 Qualidade sanitária	34
2.4 Armazenamento de sementes	35
2.5 Gênero <i>Alternaria</i>	37
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 Origem das sementes e local dos experimentos	41
3.2 Caracterização inicial da qualidade das sementes de canola	41
3.2.1 Teor de água	41
3.2.2 Teste de germinação	42
3.2.3 Teste de sanidade.....	42
3.3 Instalação e condução dos experimentos à campo.....	43
3.4 Observações fenológicas.....	44
3.5 Incidência de mancha de alternaria em folhas e siliquis.....	45
3.6 Qualidade das sementes em diferentes estádios de maturação	45
3.6.1 Massa fresca e seca das sementes.....	46
3.6.2 Teor de água	46
3.6.3 Teste de germinação	46
3.6.4 Condutividade elétrica.....	46
3.6.5 Teste de sanidade.....	47
3.7 Qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de canola na colheita	47
3.7.1 Teste de transmissão	48
3.8 Qualidade das sementes de canola durante o armazenamento	48
3.9 Avaliação da patogenicidade de isolados de <i>Alternaria</i> spp.....	49
3.9.1 Isolamento dos fungos	49
3.9.2 Inoculação de <i>Alternaria</i> spp. nas sementes.....	50
3.10 Caracterização morfológica dos isolados de <i>Alternaria</i> spp.	51
3.10.1 Índice de velocidade de crescimento micelial e diâmetro da colônia.....	51
3.10.2 Esporulação	52
3.10.3 Cor da colônia.....	52
3.10.4 Caracterização morfológica dos conídios.....	52
3.11 Caracterização molecular dos isolados.....	53
3.12 Procedimentos estatísticos	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 Caracterização inicial da qualidade das sementes	55
4.2 Observações fenológicas.....	55
4.3 Incidência de mancha de alternaria em folhas e siliquis de canola.....	57
4.4 Qualidade das sementes em diferentes estádios de maturação	59
4.5 Qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de canola na colheita	71

4.6 Qualidade das sementes de canola durante o armazenamento.....	78
4.7 Avaliação da patogenicidade de isolados de <i>Alternaria</i> spp.....	83
4.8 Caracterização morfológica dos isolados de <i>Alternaria</i> spp.....	87
4.9 Caracterização molecular.....	93
5 CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

1 INTRODUÇÃO

A canola (*Brassica napus* L. var. oleifera Metzg.) pertence à família das Brassicaceae, que inclui diversas espécies, dentre elas oleaginosas, hortaliças e plantas daninhas. A planta é originada de uma seleção geneticamente modificada da colza (*Brassica napus* var. oleifera Metzg. e *Brassica campestris* var. oleifera Metzg.), a qual buscou-se obter materiais genéticos de baixos teores de ácido erúico no óleo e glucosinalatos no farelo, nocivos ao homem e aos animais.

Essa cultura se destaca entre as oleaginosas, sendo a terceira mais produzida mundialmente perdendo apenas para a palma (*Elaeis guineensis*) e soja (*Glycine max* L.). Nos últimos anos a produção vem crescendo e desperta grande interesse pela indústria devido a excelente qualidade do óleo produzido para a alimentação humana e produção de biocombustível. Porém, para o avanço promissor da cultura no Brasil, é necessário que se conheça os fatores que envolvem e afetam o seu potencial, tanto no rendimento como na qualidade das sementes. Dentre estes fatores, a definição do momento ideal da colheita e problemas relacionados à fitossanidade são de extrema importância.

A canola apresenta características marcantes como ampla floração, maturação desuniforme e deiscência das síliquas, atributos esses que pertencem às espécies de *Brassica*, e que dificultam a colheita. Assim, a medida que se retarda a colheita das sementes, problemas relacionados a perda de rendimento e deterioração das sementes poderão ocorrer, principalmente pela exposição das sementes às condições menos favoráveis do ambiente, injúrias por patógenos e insetos, e também pela perda de sementes através da deiscência natural das síliquas. No entanto, ao adiantar a colheita, podemos encontrar sementes imaturas, mal formadas e com alto teor de umidade, inviabilizando o armazenamento das mesmas.

A qualidade física, fisiológica e sanitária das sementes pode ser influenciada por diversos fatores que ocorrem durante o processo de maturação fisiológica, bem como nas etapas de pré e pós-colheita. Estas etapas abrangem diferentes processos, os quais podem amenizar ou intensificar o processo deteriorativo. O armazenamento das sementes inicia-se ainda na planta, logo após o ponto de maturação fisiológica, sementes colhidas antes ou após esse período, apresentam um menor potencial de armazenamento (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

A máxima qualidade fisiológica das sementes é alcançada por ocasião da maturidade fisiológica, período que coincide com o máximo acúmulo de matéria seca, vigor e germinação

(POPINIGIS, 1985). No entanto, os patógenos são um dos principais fatores que causam deterioração das sementes, esses estão presentes desde o processo de produção, durante a colheita e armazenamento. A presença desses nas sementes, pode resultar em efeitos diretos como redução do potencial germinativo, vigor, emergência, período de armazenamento, além de serem responsáveis pela transmissão de doenças de parte aérea e radicular. Os patógenos tornam-se ativos, quando encontram condições favoráveis, podendo atacar a semente, plântulas e plantas adultas.

Os principais gêneros fúngicos que se associam a sementes de canola são *Alternaria*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Botrytis*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. O gênero *Alternaria* é comumente relatado como um dos principais agentes causais de doenças que ocorrem em *Brassica*. As alternarioses podem ocorrer tanto em plântulas como em plantas adultas de canola. Ao infectar as sementes, elas podem destruí-las completamente, causando perdas na germinação e quando transmitidas às plântulas causam necroses nos cotilédones e hipocótilo, levando ao tombamento e morte em pré e pós-emergência. Em plantas adultas, os sintomas são manchas foliares, que inicia-se nas folhas externas, posteriormente avançando para todas as partes da planta (CARDOSO et al., 2005). No Brasil, há carência de pesquisas voltadas a correta identificação de espécies de *Alternaria*, bem como o período da associação do patógeno e sua sobrevivência nas sementes, e as consequências que estas podem trazer a cultura, em diferentes estádios de desenvolvimento das plantas.

Neste contexto, o objetivo geral do trabalho foi avaliar e identificar as espécies de *Alternaria* spp. associadas às sementes de canola durante o processo de produção e armazenamento e avaliar o seu potencial de transmissão e patogenicidade. Como objetivos específicos estabeleceram-se: a) identificar os estádios fenológicos da cultura; b) verificar a incidência de mancha de alternaria em folhas e síliquas de canola; c) acompanhar a maturação fisiológica das sementes; d) avaliar a qualidade física, fisiológica e sanitária das sementes durante a maturação fisiológica, colheita e armazenamento; e) verificar a transmissão e patogenicidade de *Alternaria* spp. e; f) caracterizar morfológicamente e molecularmente os isolados de *Alternaria* spp. em nível de espécie.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura da canola

A canola (*Brassica napus* L.) é uma oleaginosa pertencente à família das Brassicaceae, que compreende uma vasta gama de espécies cultivadas em todo o mundo. São plantas importantes para a alimentação humana, produção de óleos e ainda na produção de biocombustíveis. Esta espécie foi desenvolvida a partir da seleção geneticamente modificada da colza (*Brassica napus* L. var. oleifera Metzg. e *Brassica campestris* L. var. oleifera Metzg.), visando a obtenção de variedades que contenham menor teor de ácido erúcido no óleo de canola ($\leq 2\%$) e menor teor de glucosinolatos no seu farelo ($\leq 30 \mu\text{mols g}^{-1}$) (CANadian Oil Low Acid) (TOMM et al., 2009a). O baixo teor de ácido erúcido é necessário para que o produto seja destinado ao consumo humano, sem riscos de intoxicação, enquanto que o teor de glucosinolatos modifica o sabor da proteína no farelo, e em baixas quantidades é de excelente qualidade para a alimentação animal (CHRIST et al., 1997).

Dentre as oleaginosas a canola destaca-se pela produção de óleo, encontra-se entre a terceira mais produzida mundialmente, ficando atrás apenas da palma (*Elaeis guineenses*) (33,05%) e da soja (*Glycine max*) (27,52%), com uma participação de 15,54%. Os principais produtores e consumidores são: Europa, América, Ásia e Oriente Médio. No cenário mundial a produção se encontra em torno de 61,0 milhões de toneladas e com uma área de 34,8 milhões de hectares, enquanto que no Brasil, as maiores plantações estão no Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul, correspondendo aproximadamente uma área cultivada de 43,8 mil ha, produção de 54,7 mil toneladas e produtividade média de 1.523 kg/ha^{-1} . Entre os estados, o Rio Grande do Sul se destaca pela maior participação na produção nacional, com 30,5 mil ha, o que representa uma participação de 55,75%, e um área de 28,2 mil ha (64,4%) (MORI¹, 2013).

O óleo de canola destinado à alimentação humana apresenta elevado teor de ômega-3 (ácido linolênico), vitamina E, gorduras monoinsaturadas, melhor composição de ácidos graxos e baixos teores de gordura saturada em comparação a outros óleos vegetais como girassol, soja e oliva (TOMM et al., 2009a), por esse motivo é um dos mais indicados pelos

¹ Palestra apresentada por Claudia de Mori no VI curso de capacitação e difusão de tecnologia na cultura da canola, Passo Fundo, abril de 2013.

médicos e nutricionistas para uma alimentação mais saudável. Outra opção bastante atraente pelas indústrias é a utilização do óleo para a produção de biodiesel, obtido por meio do processo de transesterificação, o que torna esse material em uma fonte renovável de energia, resultando em uma alternativa ao uso do petróleo. A área cultivada vem expandindo nos últimos anos, principalmente por ser uma alternativa viável para a rotação de culturas, a diversificação agrícola e cobertura vegetal do solo no período de inverno (TOMM et al., 2009a). Um ponto favorável desta cultura está no fato de que o mercado brasileiro assegura toda a comercialização através de empresas interessadas no refino e distribuição do óleo comestível e de biodiesel (TOMM et al., 2009a).

No Brasil, emprega-se somente cultivares de primavera da espécie *Brassica napus* L., devido o padrão de rendimento ser superior nos diferentes ambientes de cultivo (TOMM et al. 2009a). A canola é uma planta autógama, com taxa de alogamia superior a 20% (TOMM et al., 2009b). As plantas são herbácea, com porte variável de 0,5 a 1,7 m, hábito de crescimento indeterminado e frutos do tipo síliqua; as raízes são pivotantes e com ramificação lateral; já as flores são agrupadas em racemos, pequenas e amarelas, formadas por quatro pétalas dispostas em cruz, um pistilo e seis estames. O florescimento progride da base para o ápice de uma inflorescência individual e inflorescências múltiplas que são produzidas em momentos diferentes na mesma planta, assim, sementes de vários estágios de desenvolvimento estão presentes na mesma planta, de forma simultânea. As síliquas medem aproximadamente 6 cm de comprimento, dentro das quais encontram-se as sementes, estas, por sua vez, são esféricas e medem cerca de 2 mm de diâmetro, e quando maduras, tem coloração marrom. O comprimento das síliquas e o número de sementes são variáveis conforme o material genético. As folhas inferiores da planta são pecioladas e formam a roseta. Após a elongação do caule, as folhas são lanceoladas e abraçam parcialmente a haste (CORDEIRO et al., 1999; GARCÍA, 2007).

Atualmente os materiais genéticos cultivados no Brasil, são desenvolvidos na Austrália em um programa de melhoramento genético que inclui a resistência à canela preta, doença causada pelo fungo *Phoma lingam*, uma das principais doenças nas lavouras de canola do Brasil e Paraguai. Contudo, sementes híbridas são produzidas e importadas da Argentina e na sua grande maioria, são denominados Hyola (TOMM et al., 2009b). Os híbridos são de primeira geração (F1), que apresentam potencial produtivo superior e são uniformes na expressão de suas características, mas não geneticamente estáveis, uma vez que nas gerações seguintes desta mesma população, são perdidas as características iniciais, tornando-se desuniformes e que conseqüentemente causarão elevadas perdas de rendimento. Assim, a cada

nova safra são necessário a aquisição de sementes para a semeadura nas lavouras (WILKINSON; CASTELLI, 2000).

No ano de 2013 a produção da canola foi prejudicada pela falta de sementes no mercado, devido a períodos de estiagem que afetaram os campos de multiplicação na Argentina (TOMM, 2013 apud ANTUNES, 2013). Desta forma o Brasil, torna-se refém dessa tecnologia, pela dependência das importações de sementes, que afeta diretamente o crescimento e a expansão da cultura. Diante desse fato, a falta de sementes no comércio faz com que alguns produtores utilizem os grãos (sementes de segunda geração - F2), colhidos em lavouras de híbridos semeados no ano anterior, para a semeadura na próxima safra (TOMM et al., 2009b). Esta técnica acarreta sérios riscos se a qualidade sanitária e fisiológica das sementes não for assegurada, principalmente pelo prejuízo e insucesso no estabelecimento da lavoura, e um menor rendimento da cultura (GOODWIN, 2006), além de que essas sementes podem ser fonte de disseminação de patógenos para novas áreas de plantio (TOMM et al., 2009a). Cardoso et al. (2005), relataram que em análises sanitárias de lotes de sementes provenientes de campos do Rio Grande do Sul e do Paraná, estavam frequentemente contaminados por *Alternaria* spp.

A ocorrência de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, entre outros fatores, pode prejudicar a cultura da canola, visto que os danos causados pelos patógenos tendem a ser favorecidos pela disponibilidade de inóculo, presença de material suscetível e condições climáticas favoráveis. Essa interação gera um ambiente favorável à infecção, desenvolvimento e disseminação das doenças (CARDOSO et al., 1996). O primeiro levantamento da ocorrência de doenças associados a cultura da canola realizado no Brasil, foi em 1993 e 1994, no Estado do Paraná, sendo identificados como patógenos causadores de doenças, os gêneros fúngicos *Sclerotinia*, *Alternaria*, *Erysiphe*, *Rhizoctonia*, *Albugo* e *Phoma*, além de bactérias e vírus (CARDOSO et al., 1996). Mais recentemente Tomm et al. (2009a) destacaram a mancha de alternaria ou pinta preta, causada pelos patógenos *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola*, *A. raphani* (sinônimo de *A. japonica*) e *A. alternata*; canela preta, sendo o agente causal *Leptosphaeria maculans* (forma assexual *Phoma lingam*); podridão branca, causada por *Sclerotinia sclerotiorum*; e, a podridão negra das crucíferas (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) como uma das principais doenças de ocorrências no estado do Rio Grande do Sul.

Muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas em busca de informações para as condições brasileiras, principalmente porque o cultivo da canola é recente. No entanto, poucas informações são relacionadas com doenças durante o seu desenvolvimento. Segundo Tomm et

al. (2009b), a incidência e a severidade de doenças tem sido esporádicas e relativamente pequenas. Porém é de extrema importância conhecer os fatores que envolvem e afetam desempenho da cultura, pois a geração de diversas informações poderá contribuir para a expansão da cultura e também em uma maior produção e renda aos produtores de canola.

2.2 Qualidade das sementes

O uso de sementes de boa qualidade é determinante para o sucesso da cultura, contribuindo para que sejam alcançados altos níveis de produtividade. Os principais atributos que definem a qualidade das sementes são as características fisiológicas e sanitárias, tais como altas taxas de vigor, germinação e de sanidade, bem como a garantia de pureza física e genética (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

Na semente se encontram todos os genes que caracterizam a espécie, esses vão influenciar o desempenho da cultivar, estabelecimento do estande, assim como a expressão dos atributos de qualidade agrônômica como o ciclo, produtividade, resistência a pragas e doenças, entre outras características (KRZYŻANOWSKI et al., 2008; MARCOS FILHO, 2005). No entanto, a qualidade das sementes poderá ser influenciada pelo local, época de cultivo e condições climáticas, como: temperatura, umidade relativa do ar, precipitação e fotoperíodo (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Já a integridade física da semente, depende dos processos de colheita, beneficiamento e armazenamento, a qual está associada a pureza física, uniformidade de tamanho, umidade das sementes e danificação mecânica.

O potencial fisiológico abrange a capacidade das sementes em desenvolver funções vitais, tais como: germinação, vigor e longevidade (POPINIGIS, 1985). A germinação das sementes é realizada em ótimas condições, controladas e padronizadas, permitindo dessa forma que as sementes expressem a máxima germinação, enquanto que os resultados obtidos no campo geralmente são inferiores aos obtidos do laboratório. Desta forma, é necessário complementar os resultados do teste de germinação com outros testes, de modo que a qualidade das sementes seja assegurada. Nestes casos, os testes de vigor são realizados para fornecer maiores informações sobre o comportamento das sementes, numa ampla variação das condições do ambiente, muito parecidas com aquelas encontradas no campo (BARROS et al., 2002).

Ávila et al. (2005), avaliando a correlação de testes de laboratório e de campo, em sementes de canola, observaram que os testes de laboratório (germinação, primeira contagem do teste de germinação, envelhecimento acelerado e condutividade elétrica) foram eficientes para estimar o potencial de emergência de plântulas no campo, enquanto que o índice de velocidade de emergência não foi adequado para avaliar a qualidade fisiológica. Segundo Marcos Filho (2005), nos testes de vigor são avaliadas um conjunto de características que determinam o potencial para a emergência rápida e uniforme de plântulas, em que, ao obter lotes de sementes com alto vigor, haverá uma maior probabilidade do lote apresentar um melhor desempenho, em relação a lotes menos vigorosos sob variação relativamente ampla das condições do ambiente.

Já a qualidade sanitária das sementes é resultante da ação integrada de uma série de fatores que ocorrem durante todo o processo de produção. Os patógenos, quando associados às sementes podem levar ao comprometimento das mesmas, como também a redução do rendimento da cultura (MACHADO, 1988). Sabe-se que as sementes são importantes veículos de disseminação de doenças, podendo introduzir patógenos em áreas livres da doença (NEERGAARD, 1979).

Os patógenos são classificados em dois grupos, fungos de campo e fungos de armazenamento. Os de campo invadem as sementes antes da colheita e são fortemente influenciadas pelas condições climáticas (elevada precipitação, umidade relativa do ar e temperatura) durante a maturação das sementes. Estes patógenos podem utilizar a semente como meio de sobrevivência e disseminação, e quando patogênicos, são responsáveis, além da transmissão de doenças radiculares e de parte aérea, pelo decréscimo da qualidade fisiológica, pela morte das sementes antes de iniciar o processo germinativo e infecção e morte nas plântulas durante a fase inicial de desenvolvimento (ROBERTS, 1972). Já os fungos de armazenamento são os principais responsáveis pela deterioração das sementes, podendo invadi-las antes mesmo do ponto de maturação fisiológica e, normalmente, estão associados às más condições de armazenamento, especialmente relacionadas ao estado físico, teor de água e possível inóculo inicial presente nas sementes (LUCCA FILHO, 1995). Os principais gêneros fúngicos de campo associados as sementes de canola são *Alternaria* spp., *Phoma* spp., *Cladosporium* spp., *Botrytis* spp., *Epicoccum* spp., e *Fusarium* spp., e os fungos de armazenamento são *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. (BRAZAUSKIENE; PETRAITIENE, 2006; JAJOR et al., 2012).

Medina et al. (2009), estudando a sobrevivência de fungos associados as sementes de triticale, durante o armazenamento, verificaram o comprometimento da qualidade sanitária

das sementes em razão da sobrevivência de patógenos importantes para a cultura, e esses quando patogênicos, comprometeram a germinação das sementes por ocasião das plântulas infectadas. Entretanto, Peixoto et al. (1998) em sementes de milho, constataram que a incidência de patógenos não afetou o vigor dos lotes pesquisados. Em soja, o ataque de patógenos é considerado uma das principais causas que levam à perda da qualidade fisiológica das sementes, a qual contribui para a redução de vigor e germinação (MERTZ et al., 2009).

De acordo com Ávila et al. (2005), estudos conduzidos com a cultura da canola, referentes a tecnologia de produção de sementes são escassos e a baixa qualidade das sementes tem sido relacionada, principalmente, à desuniformidade da maturação, o que dificulta o processo de colheita das sementes (DIAS, 1992). A qualidade destas pode ainda ser sensivelmente afetada pelas condições ambientais durante o período de desenvolvimento no campo, bem como das condições de colheita, secagem, beneficiamento e armazenamento (CARRARO et al., 1985).

2.3 Maturidade fisiológica

2.3.1 Características da espécie

A maturação das sementes de canola inicia a partir das ramificações inferiores e segue em direção às superiores e após nos ramos secundários, ocorrendo então, na mesma planta, síliquas maduras, verdes e em alguns casos, a presença de flores (PANOZZO, 2012). Dessa forma, a colheita torna-se uma das etapas mais críticas do cultivo da canola, uma vez que a maturação das síliquas é bastante desuniforme e, quando realizada em épocas inadequadas, pode ocorrer perdas consideráveis em quantidade e qualidade das sementes.

Quando a colheita é retardada, tem-se um aumento da deiscência das síliquas, que associado a variação de umidade relativa do ar, provoca rachaduras e enrugamento das sementes devido à perda e ganho de água e, conseqüentemente, ocorre a aceleração da deterioração nas sementes pela maior facilidade da entrada de insetos e fungos, assim como a exposição do tecido embrionário ao ambiente (BORBA et al., 1982; MARCHIORI JÚNIOR, 2002). Entretanto, adiantando-se a colheita, podemos encontrar sementes mal formadas, imaturas e com elevado teor de umidade, fatos estes que poderão acarretar também em

problemas futuros durante o armazenamento, assim como o menor teor de óleo nos grãos (DA SILVA et al., 2011).

De acordo com Thomas et al. (2003) e Tomm et al. (2009a), as sementes de canola atingem a maturidade fisiológica com teor de água variando de 30 a 35%. Recomenda-se, para evitar perdas na colheita, o corte e enleiramento, que consistem em cortar e enleirar as plantas quando 40 a 60% das sementes começarem a alterar a cor verde para marrom ou preto (TOMM, 2007), sendo, todavia, a melhor época aquela quando, pelo menos 70% das sementes, apresentam a coloração preta (SIMON, 1993). Desta maneira, após o corte e enleiramento, entre 8 a 15 dias, as plantas estão prontas para serem colhidas com teor de água em média de 10% nas sementes (TOMM, 2007). Outra opção é a colheita mecânica direta, em que a cor do grão é o melhor indicador. Neste caso, a partir da maturação fisiológica, deve-se realizar avaliações diariamente, para verificar qual é o melhor momento de iniciar colheita (TOMM et al., 2009a). Rossetto e Nakagawa (2000) verificaram um aumento de sementes de coloração preta com o decorrer das colheitas e, para Rossetto et al. (1997), a melhor qualidade fisiológica das sementes avaliadas após a colheita, foram obtidas a partir dos 126 dias após a semeadura. Além disso, Rossetto et al. (1998), verificaram que a antecipação da época de colheita, como método de redução de perda, não resulta em benefícios consistentes ao rendimento das sementes.

2.3.2 Qualidade física e fisiológica das sementes

O processo de maturação fisiológica consiste numa série de alterações morfológicas, físicas, fisiológicas e bioquímicas que ocorrem a partir da fertilização do óvulo, prosseguindo até o momento em que as sementes estão prontas para a colheita (MARCOS FILHO, 2005). Durante esse processo, ocorrem modificações no teor de água, na massa de matéria seca, no tamanho, na germinação e no vigor das sementes (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

A maturidade fisiológica coincide com o momento em que cessa a transferência de matéria seca da planta para as sementes, e nesta ocasião, o potencial fisiológico é elevado, se não o máximo (MARCOS FILHO, 2005). Diante deste fato, seria natural a decisão de efetuar a colheita quando as sementes atingissem a maturidade fisiológica. Entretanto, a semente neste período ainda contém elevados teores de água. Essa umidade das sementes dificulta o beneficiamento e armazenamento, além de que pode haver um aumento dos danos mecânicos

por amassamento e deterioração, e ao atrasar a colheita, a partir da maturidade fisiológica, inevitavelmente inicia-se o processo de deterioração, caracterizado pela queda progressiva e irreversível da germinação e vigor (MARCOS FILHO, 2005; POPINIGIS, 1985). O processo deteriorativo é influenciado pelas condições climáticas, manejo cultural, ataques de insetos e pela presença de patógenos durante a fase de produção de sementes. Assim, para que um lote de sementes apresente um desempenho desejado é necessário que a colheita seja realizada mais próxima possível da maturidade fisiológica. De acordo com Popinigis (1996), a obtenção de sementes de boa qualidade fisiológica é dificultada em espécies que apresentam desuniformidade na maturação, essas podem variar em função da espécie e do local de cultivo. Desta forma, se faz necessário estabelecer alguns parâmetros que permitam a definição da época mais adequada da colheita.

O processo germinativo das sementes pode ocorrer nas sementes imaturas, porém estas não resultam em plântulas vigorosas, como aquelas obtidas no ponto de maturidade fisiológica (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Para Barbelo e Marcos Filho (1998), o ponto máximo de vigor é a época mais adequada para a colheita. Enquanto que vários autores, trabalhando com a maturidade fisiológica em várias espécies, apontam o máximo de acúmulo de matéria seca como sendo o melhor e mais seguro indicativo, quando as sementes atingiram a maturidade fisiológica (AMIRI HOGHAN et al., 2009; BRAGA JÚNIOR, 2009; MARROCOS et al., 2011; MATHEUS et al., 2011; PESSOA et al., 2010).

De acordo com Elias e Copeland (2001), as sementes de canola apresentaram maior germinação e vigor a partir da sexta semana após a formação das siliquas (data da maturação fisiológica). Em sementes de pepino, Nakada et al. (2011) verificaram que a melhor qualidade das sementes foi obtida aos 45 e 50 dias após a antese, coincidindo com a maior massa seca das sementes e elevado teor de água. Enquanto que Botelho et al. (2010), encontraram a melhor qualidade das sementes e produtividade, quando essas apresentaram um teor de água de 16%, e ao atrasar a colheita observaram queda na qualidade fisiológica das sementes e menor produtividade devido a deiscência das vagens.

No processo que envolve a formação das sementes, algumas características são utilizadas para determinar o momento em que elas atingem a sua máxima qualidade fisiológica. Dentre elas, são observadas alterações no teor de água durante todo o processo de desenvolvimento da semente. Os teores iniciais de água na semente, logo após a sua formação, variam de 70 a 80%, e apresentam um declínio lento nesta fase e, em seguida, inicia-se uma rápida desidratação até estabilizar, a partir de então, passa a oscilar com os valores de umidade relativa do ar. Em espécies ortodoxas, as sementes chegam na maturação

fisiológica quando os teores de água variam entre 30 a 50% (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). No entanto, o conteúdo de água das sementes oscila de acordo com a espécie, cultivar e as condições climáticas. Esse processo que envolve o grau de umidade das sementes durante a sua formação, está relacionado com a importância da água nos processos de enchimento e maturação das sementes, ou seja, no transporte dos produtos fotossintetizados das folhas para as sementes em formação (reserva), sendo necessário que se mantenha a umidade, até o máximo peso da matéria seca e, posteriormente, inicia-se a rápida desidratação (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

O conteúdo de matéria seca em uma semente em formação, ocorre inicialmente de forma lenta e em seguida o fluxo de acúmulo de matéria seca é intensificado e constante, até atingir o seu máximo, e a partir deste momento as sementes se desligam da planta mãe (MARCOS FILHO, 2005). Entretanto, o máximo acúmulo é mantido por algum tempo, e podendo no final, sofrer um pequeno decréscimo, como resultado de perdas pela respiração (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

De acordo com Marcos Filho (2005), algumas sementes são capazes de germinar em poucos dias após a fecundação do óvulo, contudo, essa afirmação se refere à protrusão radicular e não a formação de plântulas normais. Para algumas espécies, pode acontecer dormência com o decorrer da maturação fisiológica (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012), sendo esta uma estratégia das plantas para evitar uma antecipada germinação. Esse fenômeno, visto durante a maturação, dificulta a avaliação e a definição do momento em que as sementes adquirem a máxima capacidade germinativa. As sementes de *Brassica napus* L. apresentam pouca ou nenhuma dormência primária (dormência natural), mas sim, dormência secundária (dormência induzida) que é desencadeada por meio de algum tipo de estresse, tal como: luz, umidade ou temperatura, durante o armazenamento ou na germinação das sementes (FEI et al., 2009). Para Carvalho e Nakagawa (2012), a germinação das sementes é o processo a qual ocorre o início da multiplicação celular, seguido do processo de crescimento da protusão radicular e das estruturas da parte aérea, resultando em uma nova planta.

As modificações do vigor da semente ocorrem paralelamente ao acúmulo de matéria seca, assim, sementes vigorosas aumentam com o decorrer da maturação, atingindo seu máximo vigor em épocas coincidente com máximo peso de matéria seca (MARCOS FILHO, 2005). Carvalho e Nakagawa (2012) relatam que há vários métodos para testar o vigor, mas não há nenhum método padronizado que possa ser recomendado para todas as espécies. Durante a maturação de sementes de canola, Elias e Copeland (2001) verificaram que os testes de vigor como o envelhecimento acelerado e o teste frio (teste de resistência ao

estresse), foram eficientes para distinguir sementes imaturas e de baixa qualidade durante o processo de formação das sementes. Botelho et al. (2010), observaram que a integridade funcional das membranas celulares nas sementes é adquirida gradativamente durante o seu desenvolvimento. Desta forma, testes que avaliem o vigor através da integridade dos sistemas de membranas celulares podem ser úteis para a avaliação da qualidade das sementes em formação. Neste caso, o teste de condutividade elétrica pode ser utilizado. Vieira et al. (2002), descrevem que esse teste determina a quantidade de lixiviados na solução de embebição das sementes, sendo os menores valores correspondentes à menor liberação de exsudatos, que indicam maior vigor, revelando uma menor intensidade de desorganização dos sistemas de membranas das células.

2.3.3 Qualidade sanitária

Doenças ocorridas durante o período de florescimento e maturação fisiológica, proporcionam grandes riscos de infecção e contaminação nas sementes, pois nesse período ocorre a transferência do inóculo a partir da planta, para as sementes em formação. Para Duczek et al. (1999) e Seidle et al. (1995), a ocorrência dos fungos do gênero *Alternaria* em sementes de canola, aumenta durante o período prolongado de permanência no campo. Segundo Rimmer et al. (2007), os patógenos podem causar perdas na produção e na qualidade das sementes de canola, principalmente quando o desenvolvimento da infecção ocorre durante o período de floração, formação das síliquas e maturação das sementes. De acordo com Popinigis (1985), a qualidade das sementes tende a reduzir na fase final de maturação, principalmente, se as condições ambientais forem desfavoráveis como, a alta umidade relativa do ar, precipitação e temperaturas elevadas.

A infecção de patógenos durante a formação das sementes, transmitidos ou não para as plântulas, podem ser responsáveis por danos diretos e indiretos que implicam na redução da produção, como também, naqueles que depreciam qualitativamente as sementes. Os problemas causados pelos patógenos transmitidos por sementes podem ser: tombamentos, murchas, crestamentos, manchas foliares, deformação ou descoloração de órgãos, podridões, dentre outros (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). No entanto, a presença de microorganismos nas sementes não é suficiente para garantir que ele irá infectar a planta, pois vários fatores influenciam na transmissão, dentre eles está a quantidade de inóculo, micro-

organismos do solo e da própria semente, condições climáticas, fatores físicos do solo e o tempo de sobrevivência do patógeno na semente. Porém, a associação do patógeno na semente indica um potencial de transmissão e de possível estabelecimento da doença no campo (MARINO et al., 2008).

Henning et al. (2011), avaliando a qualidade sanitária de sementes de milho em diferentes estádios de maturação, observaram que a incidência dos fungos *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp. e *Fusarium moniliforme* diminuíram à medida que as sementes atingiram a maturidade fisiológica. Estes mesmos autores não relataram a interferência desses patógenos na qualidade fisiológica. Pedroso et al. (2008), verificaram uma variação da ocorrência de patógenos em diferentes épocas de colheita de sementes de *Zinnia elegans*. Já, Braccini et al. (2000), em sementes de soja, observaram elevada correlação na redução do poder germinativo com o aumento na porcentagem de sementes infectadas por fungos e bactérias, durante a realização da colheita em diferentes épocas. Muniz e Porto (1998), constataram que durante a maturação de sementes de cenoura, houve um aumento dos índices de contaminação por diferentes espécies de *Alternaria* e estas sobreviveram por cinco a doze meses após a colheita.

2.4 Armazenamento de sementes

O armazenamento das sementes tem por objetivo manter os estoques no período de entressafra para posterior comercialização, ou para conseguir melhores preços no mercado. No entanto, a qualidade inicial da semente, obtida no campo, deve ser mantida durante este período, até a realização da próxima semeadura (TANAKA, 2001).

A qualidade fisiológica e sanitária das sementes é influenciada pelas condições de ambiente e de manejo durante as etapas de pré e pós-colheita (MARCOS FILHO, 2005). Dessa forma, ao contrário do que se pensa, o armazenamento das sementes começa ainda no campo, logo após ao ponto de maturidade fisiológica (POPINIGIS, 1985). Nesse período, se as condições climáticas e de manejo cultural não forem adequadas, modificações graduais no caráter fisiológico e bioquímico das sementes poderão ocorrer (BRACCINI et al., 2000). Após a colheita, o armazenamento das sementes deve ser conduzido de maneira a preservar a qualidade fisiológica e sanitária e minimizar a velocidade do processo de deterioração, esses por sua vez podem ser influenciados por diversos fatores como: o teor de água com que as sementes foram armazenadas, temperatura, umidade relativa do ar e embalagens de

conservação (TOLEDO et al., 2009). As condições inadequadas de ambiente durante o armazenamento das sementes, aceleram o processo de deterioração, diminuem a viabilidade da semente, além de proporcionar condições favoráveis ao desenvolvimento de insetos e patógenos (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). As condições que favorecem esse processo é decorrente da elevada umidade relativa do ar, que proporciona o reinício das atividades metabólicas do embrião, enquanto que a temperatura elevada ocasiona aumento da atividade respiratória e esgotamento das substâncias de reserva acumuladas (AGUIAR, 1995).

Em sementes de sorgo, De Sousa et al. (2009) observaram um aumento do teor de água, com a redução da qualidade fisiológica no final do período de armazenamento. Medina et al. (2009), em triticale, relataram redução da capacidade germinativa, com um aumento linear de sementes mortas ao final de 12 meses. Em sementes de arroz Teló et al. (2012), verificaram a menor qualidade fisiológica das sementes no final do período de seis meses de armazenamento, independentemente das condições que estas foram submetidas durante esse período.

Segundo Carvalho e Nakagawa (2012), os fungos são os principais micro-organismos responsáveis pela destruição das sementes durante o armazenamento. Muitas espécies fúngicas, normalmente, são saprófitas, tornando-se parasitas das plântulas. Os fungos de campo, presentes nas sementes, diminuem durante o armazenamento, enquanto que a incidência de fungos de armazenamento aumenta nesse período, vistos em sementes de arroz (MACEDO et al., 2002; TELÓ et al., 2012), triticale (MEDINA et al., 2009), soja (GALLI et al., 2007) e milho (TANAKA et al., 2001).

Os fungos de armazenamento estão presentes nas sementes recém-colhidas e geralmente em porcentagens mais baixas, mas sobrevivem bem nas condições de armazenamento, sendo potencializadas ou não, pela condição inicial das sementes. Estes poderão acarretar em redução da viabilidade, diminuição do percentual de germinação, aumento de ácidos graxos, deterioração das sementes e produção de toxinas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Os patógenos de campo reduzem a qualidade fisiológica das sementes, além de serem eficientes veículos de disseminação a curtas e longas distâncias e em novas áreas de cultivo, e quando encontram condições de ambiente favoráveis, são capazes de causar sérios danos à cultura (FRANÇA NETO; HENNING, 1984). Tekrony et al. (1984), atribuíram o aumento da viabilidade de sementes de soja com a diminuição do fungo *Phomopsis* spp. durante o armazenamento. De acordo com esses autores, alguns patógenos associam-se à semente durante a sua formação (campo) e durante o armazenamento, perdem a viabilidade, deixando de interferir na qualidade das sementes.

2.5 Gênero *Alternaria*

O gênero *Alternaria*, pertence a subdivisão Deuteromycetes, classe Hyphomycetes, ordem Hyphales e família Dematiaceae (ROTEM, 1995). Simmons (2007) descreveu, com base nas características morfológicas, 275 espécies de *Alternaria*, essas sendo saprófitas, endofíticas ou patogênicas. São conhecidas por causarem graves perdas a várias culturas e caracterizam-se por infectar sementes, plântulas, folhas, caules, hastes, flores, siliquas e frutos. Desta forma, as espécies de *Alternaria* afetam as plantas em qualquer estágio de desenvolvimento (WOUDENBERG et al., 2013).

Em *Brassica*, as alternarioses estão entre as doenças fúngicas mais comuns e destrutivas do mundo (VERMA; SAHARAN, 1994). No início do desenvolvimento da plântula são observados necroses marrom escuras em cotilédone e hipocótilo, seguido de tombamento (“*damping-off*”), resultando na destruição total da plântula. Em plantas adultas, causam redução da área fotossintética, sendo inicialmente observados sintomas nas folhas mais velhas, caracterizadas por lesões circulares concêntricas e com halo clorótico; nas nervuras, caules e ramos, as lesões são deprimidas, oblongas ou lineares e, já nas siliquas, são puntiformes, irregulares, deprimidas, necróticas, pardas ou negras (CARDOSO et al., 2005).

A doença é favorecida por condições de alta umidade relativa do ar, precipitação e temperaturas moderadas. Para que ocorra infecção deve-se ter pelo menos 9 horas de água livre na superfície da planta; os sintomas aparecem entre dois a quatorze dias após a infecção, dependendo do material genético e das condições ambientais. Sementes, plantas daninhas e restos de cultura contaminadas são as principais fontes de inóculo e, sua disseminação ocorre através do vento e de sementes infectadas (MARINGONI, 2005). Rimmer et al. (2007), observaram que a incidência de *Alternaria* spp. nas plantas e em sementes de canola são favorecidos principalmente pela alta umidade relativa do ar, durante o período floração, desenvolvimento das siliquas e maturação das sementes.

As principais espécies que causam a doença mancha de alternaria em canola, e ainda associam-se às sementes são: *A. brassicae* (Berk.), *A. brassicicola* (Schw.) Wilt., *A. japonica* (Yoshii) e *A. alternata* (Fr) Keissl. Dentre estas espécies, a *A. alternata* é considerada pouco agressiva (CARDOSO et al., 2005). No entanto, a mancha de alternaria, causada por *A. brassicae* é descrita como uma das doenças mais destrutivas que afetam *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*, e *B. campestris*, onde surtos desta doença podem levar a redução da produtividade em até 36% (DUCZEK et al., 1999; VERMA; SAHARAN, 1994).

Alternaria brassicae pode infectar qualquer parte da planta, os sintomas são lesões cloróticas e necróticas nas folhas, pecíolos, caule, inflorescência, siliquas e sementes. Em epidemias severas, provoca a queda prematura de folhas e siliquas, infecta as sementes e pode provocar aborto e deformação de siliquas. Quando infecta as sementes, estas podem ficar chochas, perdem a germinação e ainda podem transportar o micélio desse fungo (CARDOSO et al., 1996). O desenvolvimento da doença é favorecido por temperaturas entre 20 a 24 °C e umidade relativa do ar entre 70 a 90%. De acordo com Cardoso et al. (2005), variedades resistentes tem apresentando efeitos significativos no tamanho e número de lesões, no período de latência, na taxa de infecção e na capacidade de esporulação. Duczek et al. (1999), verificaram que a incidência de *A. brassicae* em sementes de canola, causam redução da germinação e peso das sementes.

A infecção de *Alternaria brassicicola* em canola causa perdas prematuras de sementes, redução da qualidade do óleo e na produtividade (HODGKINS; MAC DONALD, 1986). Esse patógeno foi responsável por perdas de 20 a 50% no rendimento de canola na Alemanha (DAEBELER et al., 1986). A doença se manifesta nas folhas, onde observa-se lesões pequenas e necróticas, com o desenvolvimento tornam-se circulares, concêntricas e com halo clorótico, as manchas são menores que aquelas de *A. brassicae* e a coloração é mais escura, quase negra, a infecção é favorecida por temperaturas moderadas e alta umidade relativa (VERMA; SAHARAN, 1994). Os sintomas são também observados em plântulas, através de necrose no cotilédone e hipocótilo, além de “*damping-off*” (MARINGONI, 2005). Reis e Boiteuw (2010), verificaram que *A. brassicae* e *A. brassicicola* são capazes de infectar vários hospedeiros (*Brassica*) em diferentes condições ambientais encontradas no Brasil; relataram ainda, que os sintomas causados por esses patógenos são bastante semelhantes, dificultando a identificação correta da espécie.

A *Alternaria alternata* é um fungo comumente encontrado infestando ou/e infectando sementes. Essa associação pode ocorrer através de infecções das inflorescências, resultando na maioria dos casos, em morte das sementes ou na infecção posterior em plântulas. Mesmo sendo considerado um patógeno fraco, pode produzir grandes prejuízos, pelo fato de ser transmitido por semente (NEERGAARD, 1979). De acordo com Jajor et al. (2012), esta espécie tem capacidade de produzir micotoxinas, as quais podem afetar a qualidade do produto (óleo vegetal) a partir das sementes contaminadas. Brazauskiene e Petraitiene (2006) relataram que a *A. alternata* foi o fungo mais frequente em sementes de canola. A frequência e a incidência do patógeno, depende da gravidade da ocorrência da doença nas siliquas, para contaminar ou infectar as sementes (JAJOR et al., 2012).

Alternaria japonica (sinônimo de *A. raphani*) é conhecido por atacar hipocótilo e cotilédones em plântulas e, também folhas, pecíolos, caule, inflorescência, siliquis e sementes. São encontrados frequentemente em nabo e rabanete (MARINGONI, 2005). Duczek et al. (1999), detectaram a *A. raphani* em sementes de canola em níveis muito baixos em comparação de *A. brassicae* e *A. aternata*. Quando infectam o embrião da semente, causa morte das plântulas antes ou depois da emergência. Nas folhas as lesões são pequenas, de cor cinza a preta com halo amarelo (MARINGONI, 2005).

Em estudos conduzidos com sementes de canola no Paraná, tem-se verificado a presença de *Alternaria* spp. frequentemente nas sementes (ÁVILA et al., 2004; MARCHIORI JÚNIOR, et al., 2002; MIGLIORINI, 2012). Seidle et al. (1995) observaram que a infecção por *A. brassicae*, *A. raphani* e *A. aternata* em sementes de canola, variaram com o ano e cultivar, e estas, dependem das condições climáticas e local de cultivo.

O conhecimento sobre a variabilidade de fungos é importante para o entendimento da dinâmica populacional e definição de estratégias que auxiliem na compreensão da patogenicidade, severidade e agressividade, que podem influenciar a dinâmica da doença na natureza (LAZAROTTO, 2013). Moreira (2008) verificou variabilidade entre 120 isolados de *A. brassicicola* oriundos de diferentes sistemas de cultivo e espécies de *Brassica* em Pernambuco, ressaltou que as razões da variabilidade entre os isolados são desconhecidas. O alto nível de variabilidade genética não é comum em outras espécies de *Alternaria*. Em *A. alternata* estudos comprovam uma grande diversidade genotípica (ARADHYA et al., 2001; ADACHI et al., 1993; MORRIS et al., 2000).

Para Reis e Boiteuw (2010) a identificação das espécies de *Alternaria* que atacam as *Brassica* no Brasil não são confiáveis, principalmente por não apresentar uma identificação precisa do patógeno, assim como o cumprimento dos postulados de Koch. Dessa forma, existe a necessidade da identificação das espécies de *Alternaria* que atacam a cultura da canola, a qual podem ser realizadas através de estudos sobre a caracterização morfológica e molecular. Os métodos baseados em características morfológicas não fornecem uma classificação totalmente segura, no entanto, a ausência dessas informações pode comprometer as análises subsequentes na construção de bases de dados moleculares dos organismos (LAZAROTTO, 2013). Assim, a análise molecular baseada nos ácidos nucleicos tem sido usada para demonstrar a diversidade genética de isolados. Métodos moleculares baseados em análise de DNA são ferramentas que facilitam a caracterização, a identificação e a diagnose rápida de patógenos, dando maior credibilidade aos estudos de identificação da espécie (WOUDENBERG et al., 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem das sementes e local dos experimentos

Foram utilizadas sementes de canola (*Brassica napus* L. var. oleifera) dos híbridos Hyola 401, Hyola 61 e Hyola 60, importadas da Argentina e fornecidas pela Embrapa Trigo – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Passo Fundo - RS, produzidas na safra 2011/2011.

O trabalho foi realizado na área experimental e no Laboratório de Pesquisa em Fitopatologia “Dr^a. Elocy Minussi”, ambos do Departamento de Defesa Fitossanitária (DFS), do Centro de Ciências Rurais, na Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS. A área experimental de campo está situada na Depressão Central do Rio Grande do Sul, com coordenadas de latitude 29° 43’ 04 Sul e longitude de 53° 43’ 01 Oeste e altitude de 116 metros. O solo é classificado como um Argissolo Vermelho distrófico arênico, com terreno de topografia plana (EMBRAPA, 1999). O clima da região segundo Köppen, pertence ao tipo Cfa, subtropical úmido com verões quentes e sem estação seca definida (HELDWEIN et al., 2009).

Os dados de precipitação pluviométrica e temperatura média foram obtidos junto a Estação Climatológica Principal da Universidade Federal de Santa Maria.

3.2 Caracterização inicial da qualidade das sementes de canola

Após o recebimento dos lotes, as sementes foram submetidas à avaliação inicial da qualidade através dos seguintes testes:

3.2.1 Teor de água

O teor de água das sementes foi determinado pelo método de estufa a 105 °C, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Foram utilizadas quatro

subamostras de 4,5 g de peso úmido de sementes, colocadas em estufa à temperatura constante de 105 ± 3 °C. Após o período de 24 h, as amostras foram novamente pesadas e o resultado final expresso em porcentagem.

3.2.2 Teste de germinação

Para a realização do teste de germinação foram utilizadas oito subamostras de 50 sementes por repetição, totalizando 400 sementes. A semeadura foi realizada em rolo de papel umedecido com água destilada, equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. Os rolos foram acondicionados em câmaras tipo BOD com temperatura controlada de 25 °C e fotoperíodo de 12 h. A contagem foi realizada no sétimo dia após a semeadura, conforme recomendado e descrito nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais, anormais, sementes mortas e duras.

3.2.3 Teste de sanidade

O teste de sanidade foi conduzido utilizando-se 400 sementes não desinfestadas, divididas em oito repetições de 50 sementes, realizado através do método do papel filtro ou “blotter test”, com congelamento. Para este, as sementes foram distribuídas em caixas de plásticos transparentes (gerbox), previamente desinfestadas com álcool 70% e uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, contendo três folhas de papel filtro, umedecidas com água destilada e esterilizada. As sementes foram incubadas em câmara do tipo BOD, a 25 °C com regime de 12 h de escuro, durante um período de 24 h. Em seguida, para a inibição da germinação, foram submetidas ao congelamento por mais 24 h. Após esse procedimento, retornaram à câmara BOD por mais cinco dias, completando-se um período total de sete dias para a posterior determinação das porcentagens médias de fungos presentes nas sementes. As análises foram realizadas com o auxílio do microscópio estereoscópico e ótico para observações das estruturas morfológicas dos fungos, os quais foram identificados em nível de gênero, com auxílio da bibliografia especializada de Barnett e Hunter (1999), e em nível de espécie (*Alternaria* spp.) segundo o Manual de identificação de *Alternaria* (SIMMONS,

2007). Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes infestadas por fungos, segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Após a realização dos testes iniciais, foram realizados os seguintes procedimentos para a instalação e condução dos experimentos:

3.3 Instalação e condução dos experimentos à campo

O experimento à campo foi conduzido no delineamento de blocos ao acaso, com três repetições. O solo da área experimental foi preparado com uma aração e duas gradagens, sendo a espécie antecessora à canola a cultura do milho, cultivado na safrinha. A adubação e a correção do pH do solo foram baseadas nos resultados de análise química do solo e nas recomendações para a cultura da canola, para produtividade de grãos de aproximadamente 2000 kg ha⁻¹, conforme descritas no Manual de Adubação e Calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO, 2004). Foi aplicada adubação de cobertura de 35 kg de N ha⁻¹, na forma de uréia, quando as plantas de canola apresentavam quatro folhas verdadeiras (TOMM, 2007).

A semeadura dos híbridos Hyola 401, Hyola 61 e Hyola 60, procedeu-se no dia 22 de junho de 2012, sendo realizada manualmente de forma a obter-se 60 plantas m², em parcelas constituídas de seis fileiras de plantas, com espaçamento de 0,35 m entre si e 5 m de comprimento, perfazendo área de 10,5 m². As sementes estavam tratadas com Thiram[®] na dose 200 g / 100 kg⁻¹ de sementes.

As técnicas culturais e de controle de pragas foram realizadas de acordo com a recomendação para a cultura (TOMM et al., 2009a). Foram feitas aplicações de inseticida para o controle de formigas (*Atta* spp.) aos 28 dias após a emergência (DAE) e das traças das crucíferas (*Plutella xylostella*) aos 45 DAE. As plantas daninhas foram controladas por capina manual durante o crescimento e desenvolvimento da cultura.

A coleta das sementes durante o processo de maturação fisiológica, iniciou-se 30 dias após a plena floração (DAPF) e procedeu-se em intervalos de sete dias até a realização da colheita final, quando as sementes apresentavam teor de umidade abaixo de 9% (TOMM et al., 2009a). Para as colheitas, vinte e cinco síliquas de cada unidade experimental foram escolhidas aleatoriamente, com exceção das síliquas das plantas de bordadura. Estas foram colhidas do ramo secundário das plantas e colocadas em embalagens plásticas e encaminhadas

ao laboratório, para evitar alterações no teor de água das sementes. Todos os híbridos foram semeados na mesma época e as coletas das síliquis ocorreram em épocas diferentes.

Quando as sementes atingiram o ponto de maturidade fisiológica, houve o corte e enleiramento das plantas, sendo colhidas uma área útil da parcela de 7 m², as quais foram depositadas sobre lona plástica em estufa agrícola por sete dias, afim de ocorrer a secagem natural das sementes e plantas. Após a secagem, as sementes foram beneficiadas durante um período de 85 a 100 dias, estas, foram debulhadas manualmente e então peneiradas para a separação de impurezas e uniformização quanto ao tamanho, em peneiras de crivo oblongo. Durante esse processo foram descartadas as sementes retidas na peneira nº 2,2 mm e com tamanho inferior à peneira nº 1,8 mm, desta forma utilizaram-se sementes retidas na peneira de nº 2,0 mm. As sementes foram homogeneizadas por tratamento (híbrido) e em seguida, acondicionadas em sacos de papel, devidamente identificadas, fechadas e armazenadas no laboratório, em condição de ambiente não controlado, durante o período de fevereiro a junho de 2013.

3.4 Observações fenológicas

Durante a condução do experimento à campo foram realizadas algumas observações de acordo com os critérios utilizados por TOMM et al. (2007): **a) emergência:** quando 50% das plântulas das parcelas emergiram, expressa em dias após a semeadura; **b) ciclo vegetativo:** considerou-se o período (dias) entre a emergência das plântulas e aquele em que 50% das plantas da parcela estavam florescendo, ou seja, em plena floração; **c) ponto de maturidade fisiológica:** considerou-se o período (dias) entre a emergência e até quando as sementes mudaram de cor verde para marrom e; **d) ciclo total:** foi considerado o período (dias) entre a emergência das plântulas e a colheita, que foi realizado quando as sementes estavam com teor de umidade abaixo de 9%.

Para essas avaliações não foram realizadas análises estatísticas, somente observação visual das parcelas.

3.5 Incidência de mancha de alternaria em folhas e siliquas

Aos 88 dias após a emergência (DAE) foram feitas avaliações de incidência de mancha de alternaria em folhas (IMAF) e aos 126 DAE em siliquas de canola (IMAS). A IMAF foi determinado através do percentual de plantas com sintomas da doença, na área útil da parcela (7 m²), sendo visualizados sintomas nas folhas mais velhas, caracterizados por lesões pequenas e necróticas e, nas folhas mais jovens lesões circulares, concêntricas e com halo clorótico. Para avaliação da IMAS, 25 siliquas da área útil da parcela, foram coletadas aleatoriamente, a qual procedeu-se a observação de pequenas manchas puntiformes, irregulares, deprimidas, necróticas, pardas ou negras nas siliquas. Para a confirmação da presença de *Alternaria* spp., foram realizadas coletas das partes com sintomas. Em laboratório, fragmentos de lesões foram retirados e desinfetados com uma solução de álcool a 70% (1 minuto), em seguida, com uma solução de hipoclorito de sódio comercial a 1%, por 1 minuto e após, lavadas com água destilada e esterilizada por três vezes durante 1 minuto cada. Após esse procedimento, os fragmentos das folhas e siliquas foram mantidos em câmara úmida por 72 h. Posteriormente, foram preparadas lâminas e observadas ao microscópio óptico, para identificação dos fungos associados as lesões.

O experimento foi composto por três tratamentos (híbridos) e três repetições, utilizando o delineamento de blocos ao acaso.

3.6 Qualidade das sementes em diferentes estádios de maturação

A avaliação da qualidade das sementes durante o processo de maturação fisiológica foi realizado em diferentes épocas de colheita, onde procedeu-se a coleta das siliquas em cada unidade experimental, seguido da debulha manual das sementes e a homogeneização das repetições de cada tratamento (híbrido); os procedimentos foram realizados imediatamente após cada coleta e então, as sementes foram submetidas as análises de laboratório, mencionadas a seguir.

Para análise das variáveis da qualidade física, fisiológica e sanitária das sementes foi considerado as épocas de colheita aos 30, 37, 44, 51, 58 e 65 dias após a plena floração (DAPF) como tratamentos para cada genótipo, utilizando-se o delineamento experimental

inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e de regressão polinomial em função das épocas de colheita. Foram testados os modelos linear, quadrático e cúbico, sendo selecionado o modelo significativo de maior ordem para explicar os resultados.

3.6.1 Massa fresca e seca das sementes

Para a determinação da massa fresca e seca das sementes, foram utilizadas quatro subamostras de 100 sementes ($\pm 4,5$ g), para cada período de coleta. As sementes foram submetidas a pesagens em balança analítica com precisão de 0,001 g, para a determinação de massa fresca. A massa seca das sementes foi obtida após a permanência em estufa a 105 ± 3 °C por 24 h. Após esse período de secagem, as amostras foram mantidas sob vácuo em dessecador por 10 minutos e quando o material atingiu temperatura ambiente, foram realizadas as pesagens (BRASIL, 2009).

3.6.2 Teor de água

O teor de água das sementes foi determinado a partir dos dados de massa fresca e seca, utilizando o método de estufa a 105 ± 3 °C, durante um período de 24 h. Os resultados foram expressos em porcentagens com base no peso úmido das sementes (BRASIL, 2009).

3.6.3 Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado conforme descrito no item 3.2.2.

3.6.4 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica das sementes foi determinada por quatro repetições de 50 sementes. Estas foram pesadas em balança de precisão de duas casas decimais (0,01 g) e em

seguida, as sementes foram imersas em 25 mL de água destilada e mantidas em câmara tipo BOD à 25 °C, durante 24 h. Decorrido esse período de imersão, a condutividade elétrica da solução foi determinada por meio de leitura em condutivímetro digital portátil modelo BEL W 12-D, e os resultados expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de semente (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999).

3.6.5 Teste de sanidade

O teste de sanidade das sementes foi realizado em cada época de colheita, conforme descrito no item 3.2.3.

3.7 Qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de canola na colheita

Após o beneficiamento, as sementes foram submetidas aos testes para a avaliação referente ao período da época da colheita, no entanto, quando as avaliações foram realizadas as sementes estavam com 100, 90 e 85 dias de armazenamento para Hyola 401, Hyola 61 e Hyola 60 respectivamente, as quais foram submetidas as seguintes testes: **a) determinação do teor de água:** conforme descrito no item 3.2.1, utilizando-se oito subamostras de 4,5 g de peso úmido de sementes; **b) peso de mil sementes:** efetuado de acordo com as Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009), através da pesagem de oito amostras de 100 sementes coletadas aleatoriamente do volume colhido da parcela; **c) teste de germinação:** descrito no item 3.2.2; **d) comprimento total de plântulas:** retirou-se ao acaso 10 plântulas normais de cada repetição, obtidas no último dia de contagem do teste de germinação. As plântulas foram mensuradas com auxílio de régua graduada. Após fez-se a média e os resultados foram expressos em cm/plântula; **e) condutividade elétrica:** descrito no item 3.6.4; **f) emergência de plântula:** realizado em bandejas plásticas contendo substrato comercial, esterilizado em autoclave por duas horas (com intervalo de 24 h) a 1 atm e 120 °C. Foram semeadas 25 sementes em oito repetições, totalizando 200 sementes por tratamento, distribuídas em duas bandejas com substrato. O material permaneceu incubado em sala climatizada com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h, com irrigação manual, próximo a capacidade

de campo, sempre que necessário. A avaliação foi realizada aos 21 dias após a semeadura, computando-se, em porcentagens, o número de plântulas emergidas; **g) índice de velocidade de emergência:** realizado conjuntamente com o teste de emergência, no qual foram realizadas contagens diárias das plântulas emergidas até a estabilização de seu número. Para cada repetição foi aplicada a fórmula de Maguire (1962): $IVE = E_1/N_1 + E_2/N_2 + \dots + E_n/N_n$, onde: IVE = índice de velocidade de emergência; E_1, E_2, E_n = número de plântulas normais computadas na primeira, segunda e última contagem e N_1, N_2, N_n = número de dias entre a semeadura e a primeira, segunda e última contagem; **h) sanidade:** conforme descrito no item 3.2.3.

O experimento foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e oito repetições.

3.7.1 Teste de transmissão

Realizado conjuntamente com o teste de emergência de plântulas (descrito no item 3.7f). A avaliação do foi efetuada aos 21 dias após a semeadura, quando realizou-se a contagem de emergência, plântulas com sintomas e sementes mortas. Considerou-se como plântulas com sintomas aquelas que apresentavam qualquer mancha necrótica na região do colo. As plântulas com sintomas foram retiradas e colocadas em câmara úmida por sete dias, para a identificação dos patógenos presentes nas plântulas. A câmara úmida foi realizada em caixas “gerbox” previamente desinfestadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio a 1%, contendo duas folhas de papel filtro umedecido com água destilada e esterilizada.

O experimento foi inteiramente casualizado, com oito repetições e três tratamentos.

3.8 Qualidade das sementes de canola durante o armazenamento

As sementes produzidas no experimento de campo em Santa Maria – RS, foram beneficiadas e armazenadas em condição de ambiente sem controle de temperatura e umidade relativa do ar, por um período de 135 dias, durante os meses de fevereiro à junho de 2013. Estas foram submetidas aos seguintes testes, a cada 45 dias: **a) germinação:** realizado

conforme descrito no item 3.2.2 e; **b) sanidade:** instalado e avaliado conforme descrito no item 3.2.3.

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, bifatorial 3 x 5 (híbridos x tempo de armazenamento), com oito repetições.

3.9 Avaliação da patogenicidade de isolados de *Alternaria* spp.

3.9.1 Isolamento dos fungos

Os isolados de *Alternaria* spp. encontrados no teste de sanidade de sementes e em folha de canola, provenientes do cultivo da cultura no campo, foram transferidos para placas de Petri, contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Seis isolados de *Alternaria* spp. foram obtidos, sendo um de folha (I1) e cinco de sementes (I2, I3, I4, I5 e I6) (Tabela 1). Esses foram posteriormente utilizados nos testes subsequentes.

Os isolados passaram pela técnica de cultura monospórica, descrita por Fernandes (1993), com o objetivo de garantir a pureza do fungo. O procedimento foi realizado através de pequenas repicagem de uma porção do micélio do fungo, cultivado em meio BDA por sete dias e posteriormente, transferido para placas de Petri, contendo 5 mL de água destilada e esterilizada, estes foram agitados e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Agar-Água (AA). Retirou-se o excesso do líquido e as placas permaneceram inclinadas por 24 h, em temperatura ambiente. Com o auxílio de um microscópico ótico e uma alça metálica previamente flambada, um único esporo germinado foi retirado e transferido para placas contendo meio de cultura V8-ágar e, posteriormente incubados a 25 °C e fotoperíodo de 12 h.

Tabela 1 – Isolados de *Alternaria* spp. provenientes de folha e sementes de diferentes híbridos de canola.

Isolados	Órgão de coleta / Híbrido
I1	Folha / Hyola 61
I2	Semente / Hyola 60
I3	Semente / Hyola 401
I4	Semente / Hyola 60
I5	Semente / Hyola 61
I6	Semente / Hyola 401

3.9.2 Inoculação de *Alternaria* spp. nas sementes

O inóculo de *Alternaria* spp. foi multiplicado em meio V8-ágar a partir da cultura monospórica, mantido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, incubadas a uma temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h. Após dez dias de incubação, foi realizada a inoculação dos isolados nas sementes, através do método do contato direto com a cultura fúngica. Foram utilizadas sementes de canola do híbrido Hyola 61 (lote de sementes de primeira geração, sem tratamento químico), previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio 1% (1 minuto), seguido de álcool 70% (1 minuto) e, três banhos de água destilada e esterilizada. Em seguida, as sementes foram dispostas para secar sob papel-filtro esterilizado. Para cada tratamento (isolados de *Alternaria* spp.), foram utilizados 400 sementes, distribuídas em oito repetições de 50.

As sementes foram dispostas em contato com a cultura fúngica, com exceção das sementes do tratamento testemunha, que foram colocadas apenas em contato com o meio de cultura V8-ágar, onde permaneceram incubadas, com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25 °C, durante um período de 16 h, quando houve protrusão radicular na primeira semente, metodologia adaptada de Junges et al. (2013).

As sementes inoculadas com o patógeno foram submetidas aos testes de: **a) sanidade:** descrito no item 3.2.3; **b) germinação:** verificado no item 3.2.2; sendo também avaliado plântulas anormal infectada e sementes mortas; **c) comprimento total de plântulas:** descrito no item 3.7.d; **d) emergência de plântula:** visto no item 3.7.f, no entanto, foram utilizados como substrato areia esterilizada e a avaliação foi realizada quando houve a estabilização do número de plântulas emergidas; **e) plântulas infectadas:** realizado conjuntamente com o teste

de emergência, a qual avaliou-se a presença de tombamento de plântulas aos 30 dias após a semeadura. O resultado final foi expresso em porcentagens.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito repetições e sete tratamentos (6 isolados + tratamento testemunha).

3.10 Caracterização morfológica dos isolados de *Alternaria* spp.

3.10.1 Índice de velocidade de crescimento micelial e diâmetro da colônia

Discos de meio de cultura de 7 mm de diâmetro contendo micélio de *Alternaria* spp., provenientes de culturas monospóricas (item 3.9.1), foram transferidos para o centro de placas de Petri, contendo meio de cultura V8-ágar. As colônias foram incubadas durante sete dias em câmara de crescimento tipo BOD à temperatura de 25 °C e regime de luz alternada com fotoperíodo de 12 h.

A avaliação do crescimento micelial constituiu-se na medição, a cada 24 h, do diâmetro da colônia em dois eixos diretamente opostos. Os eixos foram pré-estabelecidos na primeira avaliação através da marcação no fundo da placa. A velocidade do crescimento micelial foi expressa em milímetros por dia, sendo avaliado até o sétimo dia após a instalação do teste. Através desses dados foi possível calcular o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) para cada isolado, utilizando a fórmula de Maguire (1962), adaptada por Oliveira (1991): $IVCM = \sum ((D - D_a) / N)$, onde o IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial; D = diâmetro médio atual da colônia; D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior e N = número de dias após a inoculação.

A avaliação do diâmetro da colônia foi realizada conjuntamente com a avaliação do IVCM, no sétimo dia de incubação, apresentando os valores em milímetros.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído seis tratamentos (isolados) e cinco repetições, onde cada repetição foi composta por uma placa de Petri.

3.10.2 Esporulação

Os isolados de *Alternaria* spp. foram incubados a 25 °C e fotoperíodo de 12 h durante 10 dias, em placas de Petri contendo meio de cultura V8-ágar. Decorrido esse período, foram adicionados 20 mL de água destilada e esterilizada sobre as colônias de *Alternaria* spp., e essas, foram submetidos a raspagem com auxílio da alça de Drigalski, tendo como objetivo a liberação dos conídios do fungo. A suspensão obtida foi filtrada em camada dupla de gaze para a retenção dos fragmentos miceliais e restos de meio de cultura. Posteriormente, foi realizada a determinação da concentração de conídios/mL da suspensão, com o auxílio da câmara de Neubauer (ALFENAS et al., 2007).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e seis tratamentos.

3.10.3 Cor da colônia

A coloração da colônia foi determinada de acordo com a escala de cores de Rayner (1970), através da observação da coloração produzida pelo fungo, em placas de Petri contendo meio de cultura V8-ágar. Para isso, as colônias foram incubadas por 10 dias, em temperatura de 25 °C e em regime de luz alternada com fotoperíodo de 12 h, após esse período a coloração das colônias foi comparada e determinada.

3.10.4 Caracterização morfológica dos conídios

Para a caracterização morfológica dos conídios de *Alternaria* spp., foram utilizados placas com as colônias do fungo cultivado para o teste de determinação da cor da colônia (item 3.10.3). Sementes de canola foram esterilizadas em autoclave por 20 minutos a 1 atm e 120 °C e posteriormente, foram dispostas sobre as colônias fúngicas durante 4 h, a fim de que as estruturas do fungo colonizassem as sementes. Em seguida, procedeu-se a montagem do teste de sanidade descrito no item 3.2.3. Decorrido 72 h da instalação do teste, foram feitas medições em 30 conídios de cada isolado, através do comprimento e largura (μm), septação

longitudinal e transversal e o número de células por conídio (SIMMONS, 2007). Foram confeccionadas lâminas, utilizando glicerina 15% para a visualização das estruturas, escolhidas de forma aleatória no microscópico ótico, a avaliação foi realizada com auxílio de uma ocular OSM, acoplada ao microscópico de contraste Olympus BX41[®], em aumento de 40x.

3.11 Caracterização molecular dos isolados

Todos os isolados de *Alternaria* spp. foram encaminhados para o Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo para o sequenciamento genético, a fim de identificá-los em nível de espécie. Esses isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA, durante 15 dias à 25 °C e fotoperíodo de 12 h.

A extração do DNA dos isolados foi realizada a partir da maceração do micélio, conforme descrito no protocolo por Doyle e Doyle (1991). As amostras de DNA genômico extraídas foram submetidas à Reação em Cadeias de Polimerase (PCR) para a amplificação da região do gene Fator de Elongação-1 α (*Elongation Factor-1 α – EF-1 α*) do rDNA. Para a amplificação, foi utilizado um fragmento de aproximadamente 1100 pb da região EF-1 α , com o par de oligonucleotídeos iniciadores EF-F (5' GTYGYATYGGYCACGTYGAYTC 3') e EF-R (5' ACRGCRACRGTYTGNCGCAT 3') (HARAKAVA², 2013).

A reação totalizou 25 μ L contendo aproximadamente 30 η g de DNA, tampão 10X (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 0,1% de tween 10; mM MgCl₂), 2,5 μ M de cada dNTP, 20 nM de MgCl₂, 25 η moles de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (Biogen), 5 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen[™] Life Technologies) e água ultrapura para completar o volume da reação. As reações foram realizadas em termociclador MJ Research, INC. PTC – 100MT, sob as seguintes condições térmicas: 94 °C por 2 min; 30 ciclos de 94 °C por 45 s; 55 °C por 30 s; 72 °C por 35 s e 72 °C por 10 min. Ao final da reação, o produto foi mantido a - 4 °C. Um controle negativo, sem DNA, foi incluído nas amplificações do PCR. Os produtos da PCR foram purificados com PEG 8000 13% e, nas reações de sequenciamento, utilizaram-se os oligonucleotídeos EF-F e EF-R. Para estas reações, foi seguido o protocolo fornecido pelo fabricante (Biogen).

² Informações fornecidas por e-mail, pelo pesquisador Ricardo Harakava.

Sequências de *Alternaria* spp. obtidas foram analisadas e comparadas com sequências já existentes através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), contra a base de dados do *GenBank*, sediado no NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (ALTSCHUL et al., 1997), a fim de comparar similaridades com outras espécies de *Alternaria*. As sequências do *GenBank* que apresentaram as melhores coberturas e os maiores escores de similaridade foram selecionadas e alinhadas juntamente com as sequências obtidas no sequenciamento pelo algoritmo CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994), utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999). Como *outgroup* para a confecção do dendrograma foi escolhido um isolado de *Ceratocystis fimbriata* para aprimorar a visualização da separação dos ramos no dendrograma. A análise filogenética foi conduzida utilizando-se o método de “*Neighbor-joining*”, com 5000 replicatas, pelo programa MEGA versão 5 (TAMURA et al, 2007).

3.12 Procedimentos estatísticos

Os experimentos de laboratório foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, enquanto que o de campo foi blocos ao acaso.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, para os dados com fator tempo procedeu-se a análise de regressão polinomial. Os dados expressos em porcentagem foram transformados em arco-seno $(x/100)^{1/2}$ para efeito de análise. No entanto, cabe ressaltar que as tabelas apresentam os valores originais (%). Posteriormente, determinou-se o coeficiente de correlação simples de Pearson (r) para avaliar incidência de *Alternaria* spp. nas sementes e sua influência no potencial fisiológico.

Para as análises estatísticas, utilizou-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2009) e para as análises de correlação o software Statistica versão 7.0 (STATSOFT, 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização inicial da qualidade das sementes

Inicialmente, as sementes de canola foram avaliadas quanto ao teor de água, germinação e sanidade. Todos os híbridos avaliados apresentaram teor de água de 6,4%. Na análise de porcentagem de germinação, o híbrido Hyola 401 apresentou 83%, e para os demais Hyola 61 e Hyola 60, 92% respectivamente. Os principais fungos associados às sementes foram *Penicillium* spp. e *Alternaria* spp., ambos com incidência de 1%, e *Aspergillus* spp. com incidência de 9% para Hyola 401 e 6% para Hyola 61 e Hyola 60. Estes dados, não foram avaliados estatisticamente, pois serviram apenas de base para o conhecimento da qualidade das sementes adquiridas.

De acordo com os resultados, observamos que os lotes de sementes de canola apresentavam germinação superior a 80%, valores estes, que estão de acordo com o padrão mínimo exigido para a comercialização de sementes no Brasil (ABRASEM, 2013). Quanto a qualidade sanitária verificou-se baixas porcentagens de fungos nas sementes, no entanto por se tratar de sementes importadas, deveriam ser isentas de patógenos. Ávila et al. (2005) avaliando quatro lotes comerciais de sementes de canola importadas do Canadá, verificaram elevada qualidade sanitárias das sementes devido a ausência de patógeno. Para Kubota et al. (2006), sementes comerciais devem ser avaliadas de forma contínua, uma vez que, a associação de patógenos as semente, causam sérios danos. Estes são responsáveis por doenças foliares, morte de plântulas em pré e pós-emergência, reduzem a viabilidade e a qualidade das sementes, afetando o estande inicial da cultura e que conseqüentemente podem diminuir a produtividade (MUHAMMAD ISMAIL et al., 2012).

4.2 Observações fenológicas

Na tabela 2, encontram-se as observações realizadas durante o ciclo da cultura da canola, em diferentes híbridos (tratamento), através dos caracteres relacionados a emergência (E), ao ciclo vegetativo (CV) que corresponde em dias da emergência até a plena floração das

plantas, o ponto de maturidade fisiológica (PMF) e o ciclo total que corresponde da emergência até a colheita (CT).

Tabela 2 – Emergência (E), ciclo vegetativo de emergência a plena floração (CV), ponto de maturidade fisiológica (PMF) e o ciclo total da emergência a colheita (CT), visualizados em três diferentes híbridos de canola. Santa Maria – RS, 2013.

Tratamento	E (dias)	CV (dias)	PMF (dias)	CT (dias)
Hyola 401	7	70	128	135
Hyola 61	7	80	138	145
Hyola 60	7	85	143	150

As plantas de canola cultivadas nas condições de Santa Maria – RS, apresentam diferença quanto a duração do seu ciclo. A emergência das plântulas para todos os híbridos foi verificada sete dias após a semeadura, quanto cerca de 50% das plântulas estavam emergidas (Tabela 2). O híbrido Hyola 60 demandou mais tempo para alcançar o pleno florescimento, 85 dias após a emergência (DAE), enquanto que Hyola 401 e 61 tiveram a floração plena aos 70 e 80 DAE, respectivamente. O ponto de maturidade fisiológica (PMF) foi observado uma semana antes da colheita (128, 138 e 143 DAE para Hyola 401, 61 e 60), determinado pelo teor de umidade dos grãos que se encontravam abaixo de 32% (Figura 3), e pela mudança de cor verde para marrom nas sementes (TOMM et al., 2009a). Verifica-se ainda que o Hyola 401 apresenta um menor ciclo entre os híbridos avaliados (135 DAE), seguido do Hyola 61 (145 DAE) e Hyola 60 (150 DAE) (Tabela 2). Esta variação encontrada no ciclo dos híbridos é atribuída, provavelmente, aos genótipos utilizados e época de cultivo. Tomm et al. (2009a), classifica os híbridos Hyola 401, 61 e 60, como de ciclos precoce, médio e longo respectivamente e, recomenda ainda que seja realizado a semeadura na ordem de ciclo mais longo para o mais precoce.

Conhecer as diferentes fases do ciclo da cultura é importante, pois pode viabilizar recomendações técnicas mais ajustadas de manejo nos ambientes de cultivo (BERGAMASCHI, 2012). Assim como potencializar a produção, pois sabe-se que, cultivares que apresentam ciclo vegetativo longo (tardio) tendem a apresentar uma maior produção, devido as reservas translocadas para o acúmulo de matéria seca nas estruturas reprodutivas. Enquanto que, a fase reprodutiva longa tende a incrementar o tempo de translocação de fotoassimilados para o enchimento das sementes produzidas (STRECK et al., 2006). No

entanto, quando se trata de doenças, o ciclo vegetativo e reprodutivo das plantas podem influenciar em uma maior ou menor incidência de patógenos. De maneira geral, as cultivares de ciclo mais longo (tardio) apresentam um maior potencial de dano pelos patógenos, pois estes permanecem mais tempo em contato com o hospedeiro, quando as condições ambientais forem adequadas para a sua permanência. Szopińska et al. (2007), verificaram que a incidência de *Alternaria* spp. em sementes de canola, aumenta gradualmente com a maturação fisiológica, inferindo que, quanto maior o tempo em que cultura permanecer no campo, maior será a contaminação desta.

4.3 Incidência de mancha de alternaria em folhas e siliquas de canola

Não foram constatadas diferenças significativas entre os híbridos quanto incidência de mancha de alternaria em folhas (IMAF) e siliquas (IMAS), com valores variando entre 9,77 a 13,83% nas folhas e em siliquas entre 18,66 a 30,66% (Tabela 3). Inicialmente, os sintomas apareceram nas folhas aos 88 DAE na fase de floração, sendo visualizadas lesões circulares concêntricas com halo clorótico e necrótico, de dimensões variadas. O mesmo foi observado por Brazauskienė e Petraitiene (2004) em plantas de canola, a qual verificaram as primeiras manchas de alternaria nas folhas inferiores, durante o pleno florescimento. Quanto ao aparecimento de lesões em siliquas estas foram avaliadas no início da sua formação, sendo observado pequenas manchas puntiformes, irregulares, deprimidas, necróticas, pardas ou negras nas siliquas. Verma e Saharan (1994) relatam que há uma elevação da intensidade da doença em *Brassica* quando as plantas se aproximam da maturação.

Tabela 3 – Incidência de mancha de alternaria em folhas (IMAF) e siliquas (IMAS), de diferentes híbridos de canola. Santa Maria – RS, 2013.

Tratamento	IMAF (%)	IMAS (%)
Hyola 401	13,83 ^{ns*}	22,66 ^{ns}
Hyola 61	10,46	30,66
Hyola 60	9,77	18,66

*Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{ns}: não significativo.

Jajor et al. (2008) em estudos realizados na Polônia com plantas de *Brassica napus* L., observaram baixas infestação de *Alternaria* spp., com incidências variando de 6,3 a 8% nas folhas e 6,5 a 9,3% nas siliquas, sendo encontrado frequentemente as espécies de *A. brassicae* e *A. alternata*, e raramente *A. brassicicola*. No entanto, no presente trabalho foram detectadas sintomas causados por *A. alternata* e *A. brassicicola*. Reis e Boiteuw (2010), descrevem que os sintomas causados por *A. brassicae* e *A. brassicicola* em diversas espécies de *Brassica*, são bastante semelhantes, dificultando a correta identificação das espécies.

O desenvolvimento de lesões nas folhas e siliquas causadas por *Alternaria* spp., é favorecido por água livre na superfície e alta umidade relativa do ar, enquanto a temperatura deve estar entre 15 à 25 °C (CARDOSO et al., 2005), esse ambiente se torna propício ao início da germinação dos esporos durante o processo de infecção (RIMMER et al., 2007)

Não foi observado a presença de outras doenças nas plantas avaliadas. O mesmo foi verificado por Panozzo (2012) em Viçosa – MG, segundo o autor, pode ser explicado por se tratar do primeiro ano de cultivo da canola no local, e também pelas condições climáticas desfavoráveis ao desenvolvimento de patógenos.

Na figura 1, são apresentados os dados em decêndio, da temperatura média e precipitação pluviométrica total, durante a realização do experimento. A temperatura média durante o cultivo da canola foi de 18,73 °C e a precipitação total de 644,4 mm, respectivamente. No último mês em que antecedeu a avaliação de incidência de mancha de alternaria (setembro e outubro), a precipitação foi elevada. Este volume de chuva demonstra que as condições ambientais foram favoráveis para o desenvolvimento da doença nas folhas e siliquas. Na maioria das vezes, a intensidade da doença é correlacionada positivamente com a elevada pluviosidade (VERMA; SAHARAN, 1994).

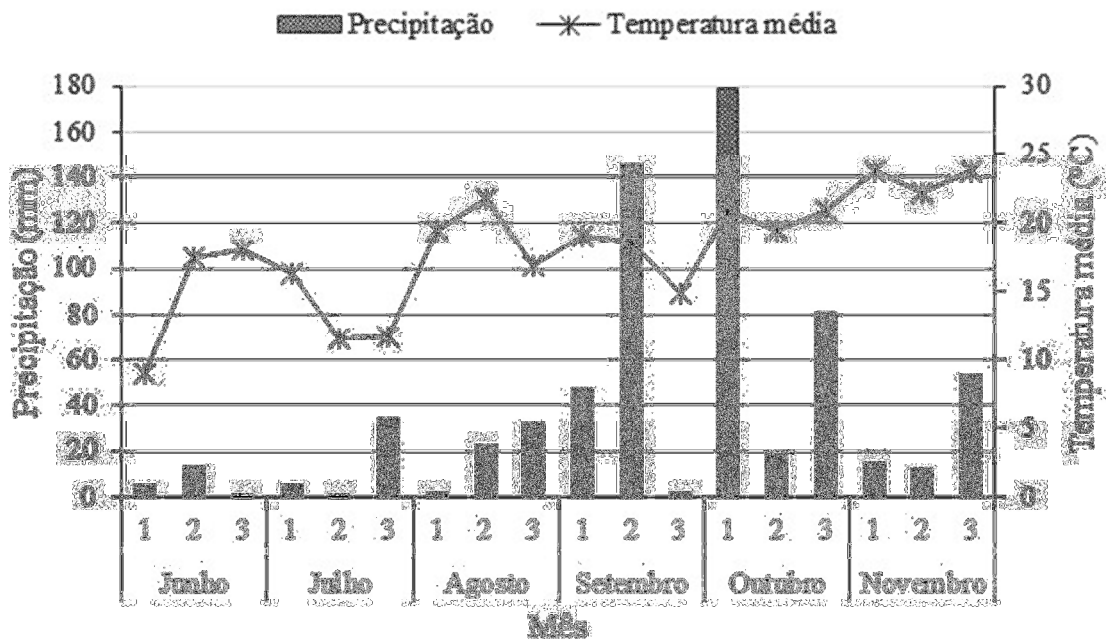


Figura 1 – Dados de precipitação total e temperatura média em decêndio, durante a condução do experimento no ano de 2012. Santa Maria – RS, 2013.

Fonte: UFSM (2013)

4.4 Qualidade das sementes em diferentes estádios de maturação

A colheita das sementes iniciou 30 dias após o pleno florescimento de cada genótipo (DAPF), avaliados aos 30, 37, 44, 51, 58 e 65 DAPF. Sendo que as coletas ocorreram em diferentes épocas, e deram-se início aos 100, 110 e 115 DAE, para os híbridos Hyola 401, 61 e 60 respectivamente.

Os dados referentes ao acúmulo de massa fresca e massa seca das sementes no momento de cada época de colheita estão apresentados na figura 2, os quais se ajustaram ao modelo quadrático da regressão polinomial. Foi observado uma relação crescente da massa fresca das sementes de canola, até atingir o seu máximo aos 51, 44 e 58 DAPF para os Hyola 401, 61 e 60 respectivamente, e a partir desta data, ocorreu uma relação decrescente até a última avaliação aos 65 DAPF, onde os resultados se igualaram aos valores de massa seca.

Durante a maturação das sementes de *Brassica oleracea*, Freitas et al. (2007) verificaram um nítido acréscimo da massa das sementes, até a colheita das síliquas de coloração arroxeadas, que constituía um teor de umidade nas sementes em torno de 35%.

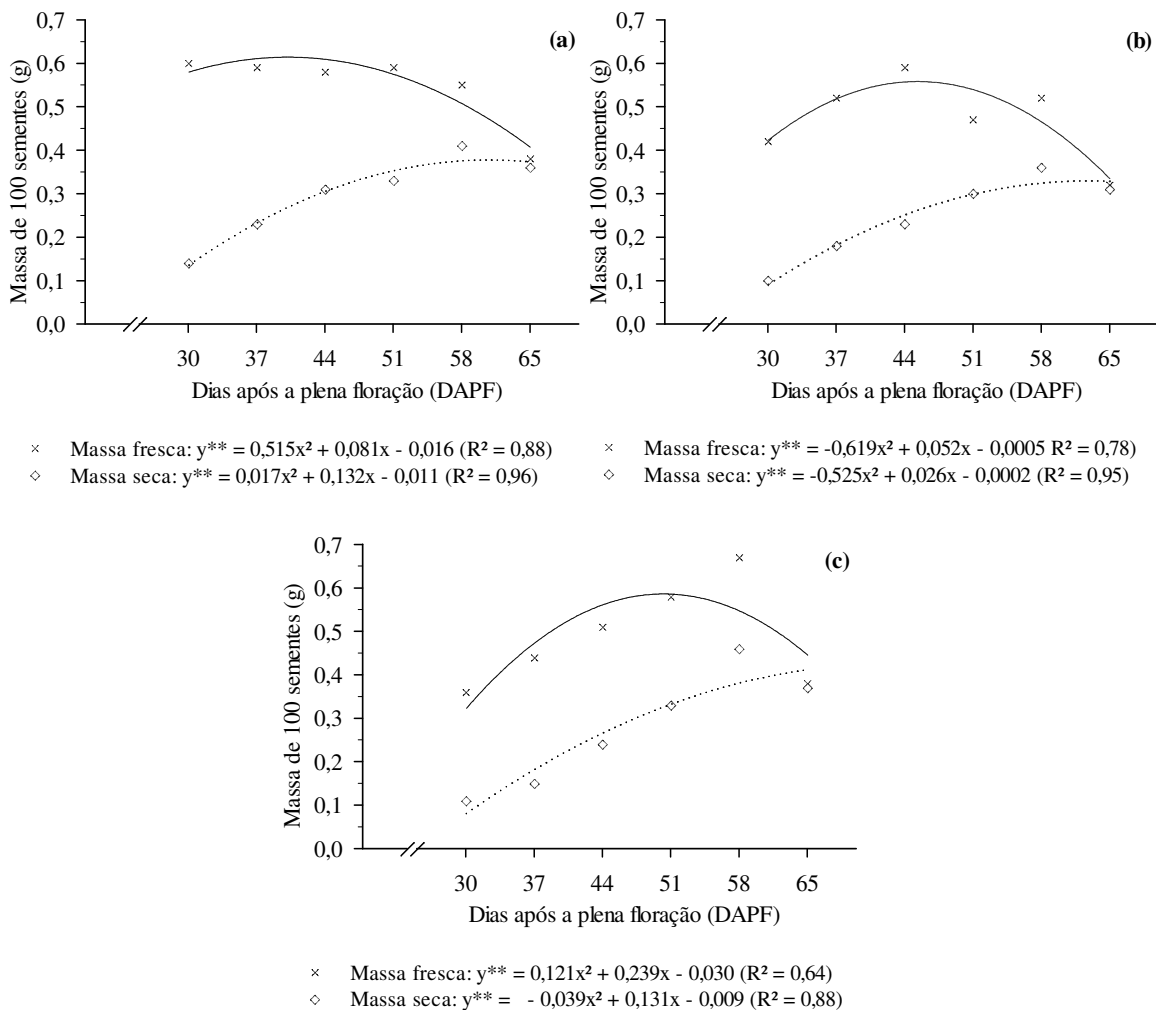


Figura 2 – Massa fresca e massa seca de sementes de canola Hyola 401 (a), Hyola 61 (b) e Hyola 60 (c), em função da época da colheita. Santa Maria – RS, 2013.

Ao avaliar diferentes épocas de colheita de canola, Rossetto e Nakagawa (2000) e Rossetto et al. (1997), verificaram estabilização do peso de mil sementes em colheitas posteriores a 112 e 126 dias após a semeadura (DAS). Segundo esses autores, a estabilização da massa das sementes indica a paralisação do acúmulo de matéria seca e a desidratação natural das sementes.

Em todos os genótipos avaliados, a massa seca das sementes (Figura 2) aumentou de forma gradual durante a sua formação, apresentando os maiores ganhos de peso aos 58 dias após a plena floração, com valores de 0,41, 0,36 e 0,46 g para Hyola 401, 61 e 60, respectivamente. Estes resultados demonstram que as sementes em formação estão acumulando matéria seca durante o processo de maturação fisiológica. No entanto, observou-se um decréscimo do conteúdo de matéria seca a partir dos 58 DAPF. Para Carvalho e

Nakagawa (2012) a diminuição do conteúdo da massa da semente após certo período, é resultado das perdas pela respiração da semente.

Para Ghassemi Golezani et al. (2011) e, Elias e Copeland (2001) sementes de canola, não apresentaram grandes mudanças do peso seco depois que atingem o seu máximo, essa variação foi observada durante a terceira e quarta semana após o início da formação das síliquas. Durante esse período ocorre a máxima translocação dos fotoassimilados presente nas folhas e caules para as sementes. Oliveira (2012) em sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), atribuiu o máximo acúmulo de massa seca, com o início do desligamento da semente da planta mãe, período em que ocorre a interrupção da transferência dos nutrientes e a paralisação do processo respiratório, resultando na desidratação natural das sementes.

Na figura 3, são apresentados os valores do teor de água das sementes nas diferentes épocas de colheita, a qual apresentou uma tendência linear para todos os genótipos. No início da formação das sementes, observa-se um elevado teor de água entre 76,41 a 74,36%, reduzindo-se com o passar dos dias durante a maturação fisiológica, quando encontramos valores menores que 3,8% aos 65 DAPF, resultando em uma redução diária de 3 a 4 % de umidade desde a última avaliação, aos 58 DAPF. Essa redução acentuada a partir da penúltima avaliação pode ser consequência da secagem das sementes em estufa agrícola, a qual pode ter acelerado o processo de desidratação. Este comportamento também foi verificado por Freitas et al. (2007), que observaram uma rápida queda da umidade das sementes, a partir do momento em que atingiram 35% de umidade, esse valor coincidiu com a secagem das síliquas e escurecimento das sementes. Braga Júnior (2009) observou durante a maturação fisiológica de sementes de mamona (*Racinus communis*), que o teor de água reduziu conforme aumentava o número de dias após a antese (DAA), ocorrendo redução acentuada a partir dos 42 DAA (23,4%), chegando a 6,3% de umidade em sete dias (49 DAA).

Ao analisar o teor de água das sementes e a massa seca, encontramos uma relação inversa entre as duas variáveis (Figura 2 e 3). Há um aumento da massa seca, enquanto ocorre a redução do teor de água das sementes com o passar dos dias. Sementes imaturas apresentam uma maior quantidade de água em seus tecidos nos primeiros estádios, isto é necessário para que possa ocorrer a transferência de matéria seca das plantas para as sementes, ou seja, acúmulo de reservas, e este processo ocorre em meio líquido (MARCOS FILHO, 2005). A desidratação das sementes e o acúmulo de massa seca no início do desenvolvimento das sementes ocorrem lentamente. Em seguida, o acúmulo de matéria seca começa a ficar mais intenso até atingir o máximo, e a partir deste momento a desidratação das sementes é

acelerada, resultando no desligamento das sementes da planta mãe (MARCOS FILHO, 2005). O máximo de massa seca das sementes foi encontrando quando os teores de umidade encontravam-se em 24,7, 31,7 e 31,5% para Hyola 401, 61 e 60 respectivamente, verificados aos 58 DAPF.

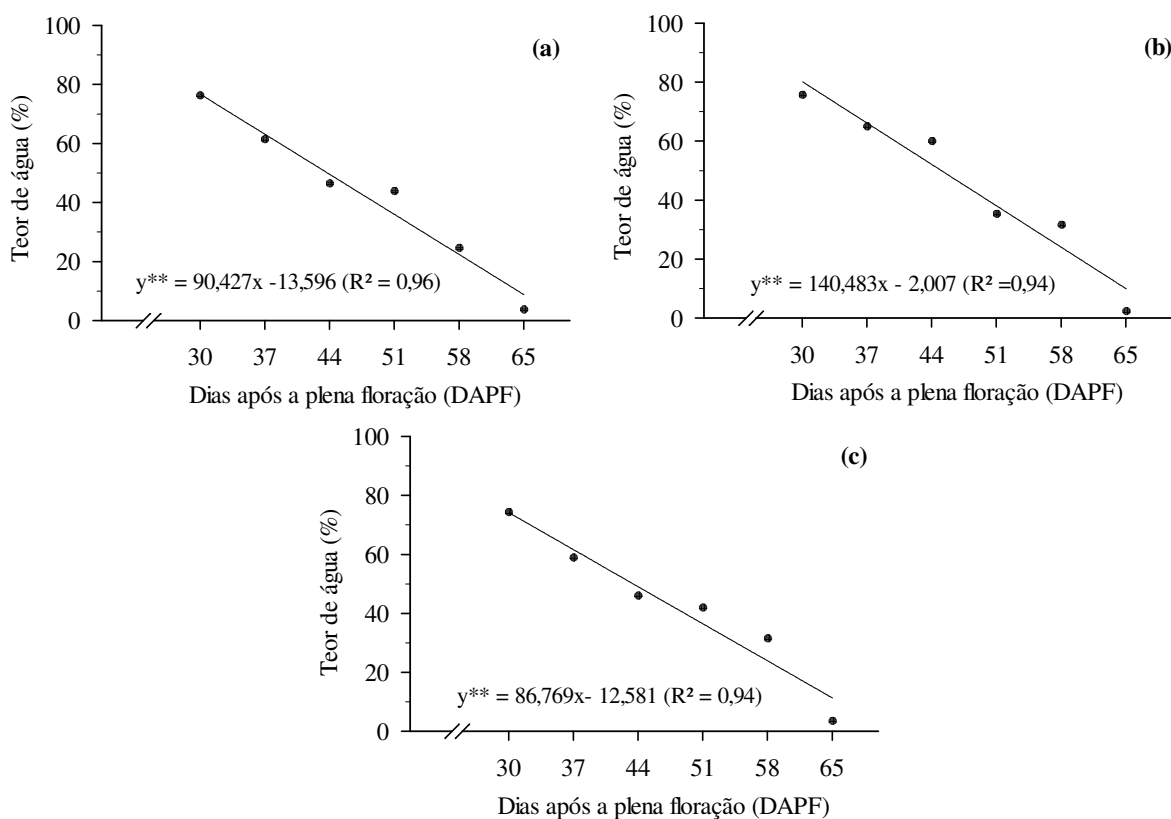


Figura 3 – Teor de água das sementes de canola Hyola 401 (a), Hyola 61 (b) e Hyola 60 (c), em função da época da colheita. Santa Maria – RS, 2013.

Oliveira (2012) estudando a maturação fisiológica de sementes de feijão-caupi, verificou a maturidade da massa das sementes, quando houve a estabilização da matéria seca e redução do teor de água das sementes. Nakagawa et al. (2005) em sementes de mucuna-preta (*Mucuna aterrima*), observou um declínio lento do teor de água até os 68 dias após a floração e após este período ocorreu uma rápida perda de água, acompanhada com o escurecimento das sementes. O teor de água elevado no início da formação das sementes, com posterior redução está relacionado com a importância da água durante o enchimento e maturação das sementes. Ou seja, para que os produtos fotossintetizados nas folhas e caules sejam transportados para as sementes em formação (acúmulo de reserva), é necessário que as sementes mantenham um

elevado grau de umidade até atingir o máximo de peso da matéria seca e após esse período vai ocorrer rápida desidratação das sementes (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

Na figura 4, verificam-se os valores de percentuais de germinação, na qual foi encontrado uma tendência linear para os híbridos Hyola 401 e Hyola 60, e quadrática, para o Hyola 61, em função dos dias após a plena floração. O aumento do percentual de germinação foi crescente durante o processo de maturação das sementes, sendo verificado o ponto de máxima germinação aos 51 (88%), 58 (81%) e 65 DAPF (78%), para Hyola 61, Hyola 401 e Hyola 60, respectivamente. Depois desse ponto, as sementes dos genótipos Hyola 401 e Hyola 61 apresentaram uma redução na porcentagem de germinação.

Ghassemi Golezani et al. (2011) verificaram que a máxima germinação durante a maturação fisiológica de sementes dessa mesma espécie, ocorre entre 63 à 68 dias após a antese, com posterior redução. Entretanto, Elias e Copeland (2001) relataram aumento da capacidade germinativa das sementes, após atingir o ponto de maturidade fisiológica, determinado pelo máximo acúmulo de massa seca. Esses autores atribuíram o resultado encontrado, com as possíveis alterações fisiológicas que ocorrem nas sementes após a maturidade.

Avaliando diferentes épocas de colheita em soja, Braccini et al. (2000) encontraram redução na porcentagem de germinação com o retardamento da colheita, em decorrência do avanço do processo de deterioração das sementes. Rossetto e Nakagawa (2000), constataram germinação superior nas três últimas épocas de colheita em sementes de canola, a partir dos 147 dias após a semeadura. O mesmo comportamento foi verificado por Rossetto et al. (1997) em sementes armazenadas por seis meses, em que verificaram germinação igual ou superior a 80%, quando a colheita das sementes foi realizada aos 140, 147 e 154 DAS.

Em sementes de mamona, Braga Júnior (2009) encontrou o máximo potencial de germinação aos 56 DAA, chegando ao valor de 91,2%. Esse mesmo autor ao analisar os resultados de germinação nos primeiros 14 dias após a antese, verificou que o eixo embrionário não estava formado, incapacitando o processo germinativo e que, a partir dos 21 DAA as sementes apresentavam germinação acima de 50%. No entanto, quando foi realizada a última avaliação, aos 63 DAA, foi verificada uma redução de 31,5% na germinação, concluindo que nesta espécie ocorre dormência nas sementes.

Avaliando a capacidade germinativa em sementes de feijão-caupi durante o processo de maturação fisiológica, Oliveira (2012) verificou o percentual máximo entre 30 e 35 DAA com valores superiores a 98%, e associaram a baixa germinação no início do desenvolvimento

à imaturidade das sementes. Nakagawa et al. (2005) observaram um acréscimo de sementes duras durante a secagem das sementes imaturas de mucuna preta.

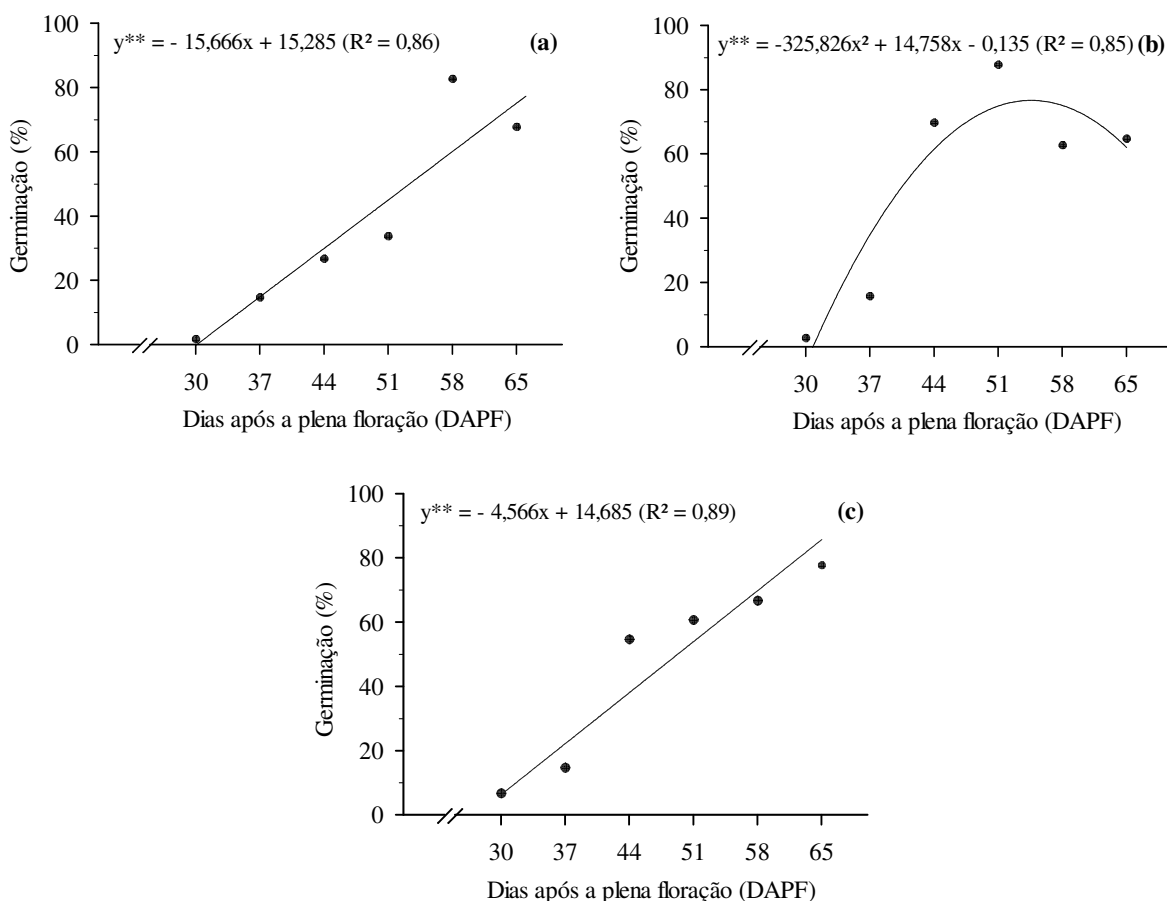


Figura 4 – Germinação de sementes de canola Hyola 401 (a), Hyola 61 (b) e Hyola 60 (c), em função da época da colheita. Santa Maria – RS, 2013

Ao analisar os dados do teste de condutividade elétrica (Figura 5), verificou-se tendência linear decrescente para as épocas de colheita em todos os genótipos avaliados. Observa-se ao decorrer do processo de maturação fisiológica, uma diminuição da lixiviação de solutos, evidenciando a imaturidade das sementes nos primeiros estádios de desenvolvimento, devido à maior quantidade de lixiviados na solução de embebição, caracterizada pelos maiores valores. No entanto, aos 58 DAPF, verificou-se os menores valores, talvez por uma possível organização das membranas celulares, que conseqüentemente, caracterizaram sementes mais vigorosas.

O teste de condutividade elétrica teve coerência com o máximo acúmulo de massa seca das sementes (Figura 2), desta forma, a medida que diminui a lixiviação ocorre a

estabilização da massa seca. Para Marcos Filho (2005), as modificações do vigor da semente ocorrem paralelamente ao acúmulo de matéria seca, assim, sementes vigorosas aumentam com o decorrer da maturação, atingindo o máximo vigor em épocas coincidentes com máximo peso de matéria seca.

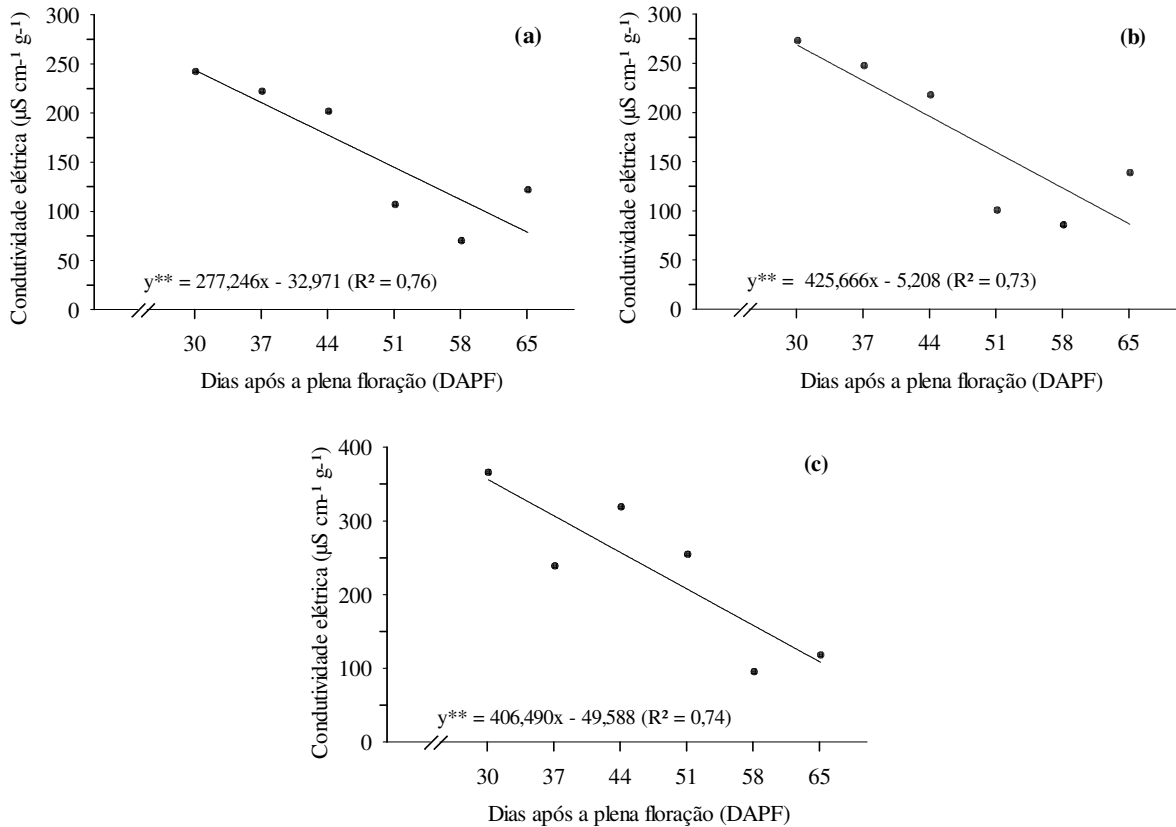


Figura 5 – Condutividade elétrica de sementes de canola Hyola 401 (a), Hyola 61 (b) e Hyola 60 (c), em função da época da colheita. Santa Maria – RS, 2013.

Esses resultados estão de acordo com trabalhos relatados em sementes de canola. Rossetto e Nakagawa (2000), verificaram altos valores de condutividade elétrica nas primeiras colheitas das sementes. Rossetto et al. (1997), observaram os menores valores de condutividade elétrica com o maior peso de mil sementes e ainda relacionaram os resultados com sementes completamente desenvolvidas e com membranas celulares bem formadas.

Foi verificado ainda, que na última avaliação aos 65 DAPF, houve um aumento da lixiviação de solutos na solução de embebição (Figura 5). Esse aumento pode estar associado a algum tipo de dano nas membranas celulares, desorganizando-as e resultando em uma maior quantidade de solutos no meio (NAKADA et al., 2010). Elias e Copeland (2001) verificaram

que as sementes imaturas de canola apresentam sensibilidade ao estresse, afetando significativamente o vigor destas.

Analisando os dados referentes ao Hyola 401 durante o processo de formação das sementes, através dos valores de massa seca (Figura 2a), teor de água (Figura 3a), germinação (Figura 4a) e condutividade elétrica (Figura 5a), verificou-se os máximos valores para essas variáveis, aos 58 dias após a plena floração, quando o teor de água das sementes era de 24,68%. Pode-se então afirmar que o máximo potencial fisiológico (germinação e vigor) coincide com o maior acúmulo de massa seca das sementes aos 58 DAPF. Entretanto, para o Hyola 60 e Hyola 61 não foi observado esse mesmo comportamento quanto à germinação e sim, o máximo acúmulo de massa encontra-se diretamente relacionado com o máximo vigor, quando o teor de água das sementes é em média de 31,5%. Para a variável massa fresca das sementes não foi possível encontrar uma relação direta entre as demais variáveis.

Trabalhando com sementes de canola, Elias e Copeland (2001) verificaram valores de germinação superiores aos de vigor no ponto de maturidade fisiológica, enquanto que na época da colheita das sementes essas diferenças eram mínimas. Durante a maturação fisiológica de sementes de pepino (*Cucumis sativus*), Nakada et al. (2011) verificaram que a maior quantidade de massa seca das sementes coincidiu com o maior peso de mil sementes, maior germinação e vigor quando o teor de água se encontrava em 33%. Ao analisar os resultados do presente trabalho, evidenciou-se acréscimos de germinação e vigor das sementes, após a estabilização da matéria seca. Segundo Marcos Filho (2005) as sementes presentes nesses estágios devem, provavelmente, estar passando por modificações bioquímicas, através de ajustes metabólicos, que ocorrem durante a paralisação do fluxo de reservas para a semente.

Para Huang et al. (2013) os processos que ocorrem durante a maturação fisiológica, interferem na qualidade fisiológica das sementes, no tamanho, na produção de óleo, no teor de proteína e na acumulação de nutrientes. Freitas et al. (2007) concluíram que a permanência das sementes de repolho no campo, deixa-as expostas às condições ambientais desfavoráveis, as quais podem ocasionar danos fisiológicos e sanitários, além de perda de semente por deiscência das síliquas. Para Da Silva et al. (2011) e Freitas et al. (2007), a antecipação da colheita possibilita a obtenção de sementes de maior qualidade sanitária e fisiológica.

As condições ambientais de precipitação total e temperatura média (Tabela 4), durante o período de florescimento (setembro) e maturação das sementes (outubro e novembro), foram extremamente favoráveis ao desenvolvimento e a disseminação da doença na cultura. Verma e Saharan (1994) descrevem que as condições de temperaturas amenas e adaptações às

interrupções do período de molhamento foliar favorecem o desenvolvimento de *Alternaria* spp. em plantas de *Brassica*.

Tabela 4 – Condições meteorológicas, durante a floração e maturação fisiológica das sementes de canola, safra 2012/2012. Santa Maria – RS, 2013.

Mês	Precipitação total (mm)*	Temperatura média (°C)
Setembro	193,6	16,9
Outubro	276,8	19,9
Novembro	78,8	22,6

*Fonte: UFSM (2013)

Os resultados da avaliação da qualidade sanitária das sementes obtida em função da época de colheita, encontram-se ilustrados na figura 6 e tabela 5. Na figura 6, estão apresentados os dados de incidência de *A. alternata* durante a formação das sementes, e foi verificado uma tendência quadrática para todos os híbridos em função dos dias após a plena floração. A incidência de *A. alternata* nas sementes aumentou significativamente nas duas últimas semanas de colheita, chegando aos 65 DAPF com porcentagens de 98, 99 e 93% para Hyola 401, Hyola 61 e Hyola 60 respectivamente.

Durante a formação das sementes de canola, Szopińska et al. (2007) encontram um aumento gradual de sementes contaminadas e infectadas por *A. alternata*. Jajor et al. (2012) observaram as maiores incidências de *Alternaria* spp. no final do período da maturação das sementes. O mesmo foi encontrado por Duczek et al. (1999), ao verificarem em sementes secas de canola níveis mais elevados de *A. alternata* e *A. brassicae*.

Vários são os fatores que influenciam a incidência de *Alternaria* spp. nas folhas, siliquis e sementes de canola, dentre eles estão o material genético utilizado, condições climáticas, local de cultivo e ano. Brazauskiene e Petraitiene (2006), verificaram suscetibilidade à *Alternaria* spp. em todos os genótipos de canola estudados, e ao mesmo tempo observaram o aumento da incidência da doença nas siliquis com a elevada precipitação. O mesmo foi visto por Jajor et al. (2012), ao relatarem que a presença da *Alternaria* spp. nas siliquis é altamente dependente da umidade relativa do ar e precipitação, e que esses fatores, estão diretamente relacionados com a incidência do patógeno nas sementes.

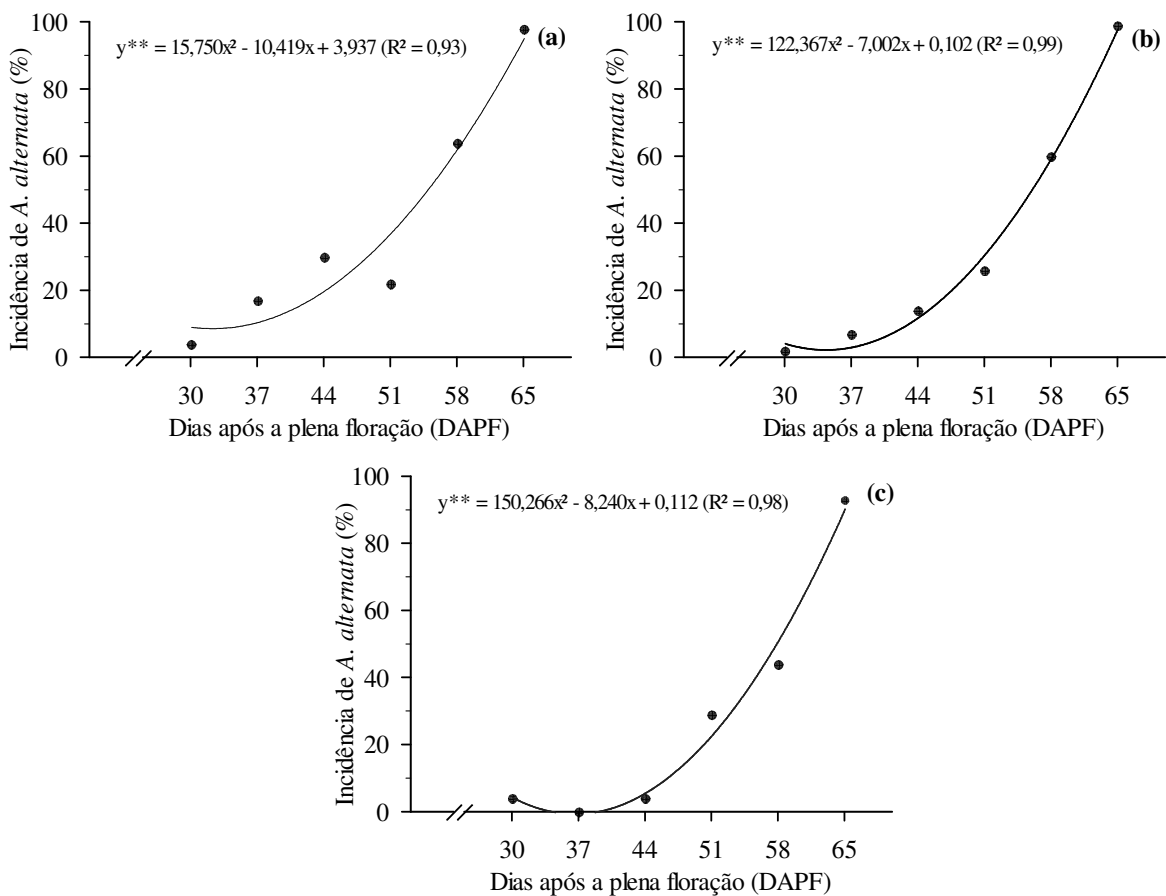


Figura 6 – Incidência de *Alternaria alternata* em sementes de canola Hyola 401 (a), Hyola 61 (b) e Hyola 60 (c), em função da época da colheita. Santa Maria – RS, 2013.

A infecção por patógenos nas sementes ocorre, na maioria das vezes, durante o período de formação das sementes, as quais são favorecidas pelas condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de doenças. Quando a doença encontra-se na planta mãe, a época de infecção das sementes pode variar, resultando em uma maior ou menor incidência de inóculo associada a elas. Desta forma, tem-se a transferência dos patógenos para as sementes em formação, dando origem a uma semente contaminada e, provavelmente, danos perante a qualidade destas irão ocorrer (MACHADO, 1994).

A incidência de micro-organismos em sementes de milho durante o processo de maturação, diminui à medida que se aproxima do ponto de maturidade fisiológica (HENNING et al., 2011). Entretanto Braccini et al. (2000), em sementes de soja, encontraram aumento da porcentagem de sementes infectadas por fungos e bactérias a medida em que estas foram mantidas no campo após a maturidade fisiológica. Rimmer et al. (2007) destacam que algumas espécies do gênero de *Alternaria* podem causar grandes perdas na quantidade e

qualidade das sementes de canola, especialmente quando o desenvolvimento da infecção ocorre durante o período de floração, formação de siliquis e maturação de sementes.

Na tabela 5 estão apresentados as médias referentes a incidência de *A. brassicicola*, *A. japonica* e a presença de outros patógenos, em diferentes épocas de colheitas através dos dias após a plena floração. Como o ajustamento da equação da regressão foi inferior a 60% para a variável “outros patógenos”, optou-se pela expressão dos resultados na forma de tabela, enquanto que, para *A. brassicicola* e *A. japonica* não houve ajuste na equação, referente ao fator tempo (dias após a plena floração).

Tabela 5 – Médias das variáveis de incidência de *Alternaria brassicicola*, *Alternaria japonica* e outros patógenos em sementes de canola, em função dos dias após a plena floração (DAPF). Santa Maria – RS, 2013.

DAPF	-----Hyola-----			-----Hyola-----			-----Hyola-----		
	401	61	60	401	61	60	401	61	60
	<i>Alternaria brassicicola</i> (%)			<i>Alternaria japonica</i> (%)			Outros patógenos (%)		
30	0 b*	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	33 a	10 bc	4 b
37	0 b	0	0	0	0	0	18 a	3 c	6,5 b
44	0 b	0,25	0	0	0	0,5	3,5 b	17 ab	1 b
51	6,5 a	0,25	0,5	0	0	0	20 a	5,5 bc	32 a
58	0,5 b	0,50	1	0	0	0	2,5 b	5,5 bc	15 ab
65	0 b	0,50	0	0	0	0	4,5 b	36 a	12 b
Média	1,16	0,25	0,25	0	0	0,08	13,62	13,08	11,96
CV (%)	37,61	27,29	42,29	0	0	24	28,75	34,42	35,77

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.
^{ns}: não significativo.

Baixas incidências de *A. brassicicola* durante o processo de formação das sementes foram detectadas. Observou-se a presença do patógeno a partir dos 44 DAPF para o Hyola 61 e 51 DAPF para Hyola 401 e Hyola 60, respectivamente (Tabela 5). Destacando-se o Hyola 401, com a maior incidência aos 51 DAPF (6,5%), enquanto que os demais genótipos e épocas de avaliações tiveram incidência menor ou igual a 1% e não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Köhl et al. (2010) ao avaliarem a incidência de *A. brassicicola* durante a maturação fisiológica de sementes de *Brassica oleracea* var. botrytis, verificaram a presença do fungo a partir da segunda semana após a floração, as quais tiveram um aumento lento até a maturidade das sementes, com posterior elevação da incidência quando estas amadurecem (70-90%).

Ao avaliar a incidência de *A. japonica*, verifica-se que somente o Hyola 60 aos 44 DAPF, apresentou a presença do fungo com percentual de 0,5%, porém os dados não foram significativos (Tabela 5).

Para Carvalho e Nakagawa (2012), o estabelecimento dos patógenos no interior das sementes ocorre através dos órgãos fertilizadores, resultando em sementes contaminadas ou infectadas. Entretanto, na maioria das vezes, a contaminação das sementes por patógenos comumente acontece pela mistura mecânica ou aderência passiva do inóculo por ocasião da manipulação de plantas, durante a colheita e beneficiamento. As sementes apresentam energia e nutrientes, onde muitos micro-organismos especializam-se em invadi-las e coloniza-las, de forma que quando associados a elas podem sobreviver por um longo período de tempo (MUNIZ; PORTO, 1998). Sendo desta forma, um risco para a introdução de patógenos em novas áreas de cultivo, quando ainda não se tem relatos de doenças, ou ainda favorece o acúmulo de inóculo, como também mortes de sementes e infecção em plântulas.

Os outros patógenos detectados nas sementes (Tabela 5), independente do genótipo e época de colheita, apresentaram incidência esporádica durante o processo de maturação fisiológica. Foram identificados os gêneros *Fusarium* spp., *Phoma* spp., *Botrytis* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Rhizopus* spp., que apresentaram uma incidência média de 13,62, 13,08 e 11,96% para Hyola 401, Hyola 61 e Hyola 60 respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por Szopińska et al. (2007) durante a maturação fisiológica de sementes de canola. Esses autores verificaram que a incidência do patógeno era variável com o estágio de desenvolvimento da semente e o ano de cultivo. Os gêneros fúngicos detectados foram similares aos encontrados por Jajor et al. (2012) e estes foram dependentes, dos materiais genéticos utilizados e das condições climáticas, principalmente durante o período de maturação e colheita das sementes de *Brassica napus* L. Brazauskienė e Petraitiene (2006), avaliando a sanidade de sementes de canola durante três anos, evidenciaram a frequência dos fungos *Alternaria* spp. e *Cladosporium* spp., com destaque para *Alternaria* spp. devido as maiores incidências detectadas. Porém Szopińska et al. (2007), observaram que o número de sementes contaminadas por *Alternaria* spp. durante a maturação de sementes de canola é mais elevado no final do período, enquanto que *Cladosporium* spp. ocorrem em altas porcentagens nos estágios iniciais do desenvolvimento das sementes.

Através desse trabalho, podemos verificar a presença de *A. alternata*, *A. brassicicola* e *A. japonica* associados a sementes de canola durante a sua formação. Com destaque para a *A. alternata* que foi predominante em todas as épocas de colheita e genótipo. Resultados

semelhantes também foram encontrados por diversos autores, referentes a predominância da *A. alternata* em sementes dessa mesma espécie (DUCZEK et al., 1999; JAJOR; KOZLOWSKA; WOJTOWICZ, 2012; JAJOR et al., 2013).

A. alternata esteve presente durante todo o processo de formação das sementes, com altos índices de contaminação aos 65 DAPF (época da colheita), enquanto que as demais espécies *A. brassicicola* e *A. japonica*, foram observadas a partir dos 44 DAPF em baixas incidências e em épocas esporádicas. Para Duczek et al. (1999) *A. alternata* é um patógeno frequentemente encontrado nas sementes de canola, apresentando maiores incidências no final do ciclo da cultura, no entanto é considerado um patógeno fraco, mas pode provocar grandes prejuízos, pelo fato de causar infecções em sementes e por elas serem transmitidas (NEERGAARD, 1979). Jajor et al. (2012) também observaram a presença de *A. brassicicola* em sementes de canola, no entanto a *A. alternata* foi mais abundante. Maringoni (2005) relatou que a presença de *A. japonica* está frequentemente associada a hospedeiros como, nabo (*Brassica rapa* L.) e rabanete (*B. sativus* L.), e podem apresentar lesões nas plântulas, folhas, pecíolos, caules, inflorescência, siliqua e sementes. A transmissão do patógeno ocorre principalmente por sementes e restos culturais contaminadas. No entanto, no presente trabalho, *A. japonica* foi observada em baixa incidência e ainda encontrada somente nas sementes do Hyola 60.

Sementes de canola contaminadas por *Alternaria* spp. são infectadas durante as fases iniciais ou finais de formação, que podem corresponder ou não a transmissão do inóculo. No entanto, quando estas estão associadas às sementes, podem utiliza-las como forma de sobrevivência, dando continuidade ao seu ciclo, que nesse caso, encontram nutrientes necessários ao seu crescimento e garantem a sua introdução na cultura já nos primeiros estágios de desenvolvimento das plantas (MEDINA et al., 2009).

4.5 Qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de canola na colheita

Na tabela 6, observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos, para as variáveis teor de água (TA), germinação (G), comprimento total de plântulas (CTP), condutividade elétrica (CE), emergência em bandejas (E) e índice de velocidade de emergência (IVE).

O teor de água das sementes variou entre 5,27% e 5,95% para o Hyola 401 e Hyola 61, os quais não diferiram significativamente do Hyola 60 (5,42%) (Tabela 6), resultados semelhantes foram obtidos por Ávila et al. (2004) ao observar baixos teores de umidade nas sementes de canola. Santos et al. (2012), concluíram que o teor de água das sementes de canola não influencia o processo germinativo. Essa variável tem por finalidade a manutenção da qualidade fisiológica das sementes para fins de armazenamento e principalmente para a comercialização (SILVA, 1988). Quanto ao peso de mil sementes (PMS), os tratamentos não apresentaram diferença significativa e esses variaram de 3,56 a 3,86 g (Tabela 6).

Os maiores valores de porcentagens de germinação foram encontrados nos tratamentos Hyola 61 e Hyola 60 (88% e 86%), diferindo significativamente do Hyola 401 (75%). O teste de germinação é um teste padrão, rotineiramente utilizados para avaliar a qualidade fisiológica das sementes. Este é conduzido em condições favoráveis, permitindo que as sementes expressem a máxima germinação (BRASIL, 2009) e geralmente superestima o potencial de desempenho das sementes, tornando-se necessário a realização de outros testes para a complementação destas informações, através de procedimentos capazes de detectar possíveis diferenças no desempenho de lotes, com germinação elevada ou semelhante (MARCOS FILHO, 2005). Desta forma, o teste de germinação pode ser complementado por vários testes de vigor, sendo eles: testes de emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), comprimento de plântulas (CTP) e condutividade elétrica (CE).

Tabela 6 – Qualidade física e fisiológica de sementes de canola, provenientes de plantas cultivadas em Santa Maria. Santa Maria – RS, 2013.

Tratamento	TA (%)	PMS (g)	G (%)	CTP (cm)	CE ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)	E (%)	IVE
Hyola 401	5,27 b*	3,86 ^{ns}	75 b	10,60 b	109,04 ab	94 ab	5,18 b
Hyola 61	5,95 a	3,76	88 a	12,23 a	124,12 a	92 b	5,17 b
Hyola 60	5,42 ab	3,56	86 a	12,46 a	96,54 b	98 a	6,00 a
CV (%)	5,06	5,99	3,23	8,97	18,04	2,53	12,1

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. TA: teor de água; PMS: peso de mil sementes; G: germinação; CTP: comprimento total de plântulas; CE: condutividade elétrica; E: emergência em bandejas e IVE: índice de velocidade de emergência.

As sementes dos tratamentos Hyola 60 e 61 apresentaram os maiores comprimentos de plântula (Tabela 6) e também o melhor comportamento no teste de germinação, desta maneira, as sementes desses genótipos apresentam bom desempenho de plântulas, por serem mais vigorosas e apresentarem um melhor potencial germinativo.

O teste de condutividade elétrica (CE) indicou o Hyola 60 como de maior vigor em relação ao Hyola 61, entretanto esses não diferiram significativamente do Hyola 401, o teste baseia-se na integridade das membranas celulares das sementes, então, sementes de baixo vigor apresentam uma maior lixiviação de solutos, resultando em baixa qualidade fisiológica. Em relação a porcentagem de emergência em bandejas (E), foi observado o mesmo comportamento entre os tratamentos, quando avaliados no teste de condutividade elétrica (Tabela 6). Assim, sementes do Hyola 60 apresentam maiores porcentagens de plântulas emergidas, do que o Hyola 61. Ávila et al. (2005) descrevem que o testes de condutividade elétrica e emergência, apresentam sensibilidade em diferenciar a qualidade fisiológica de lotes de sementes de canola.

Ao avaliar o índice de velocidade emergência, verifica-se que o Hyola 60 foi superior aos demais, conseqüentemente mais vigoroso (Tabela 6). Os resultados encontrados no presente trabalho, discordam de Ávila et al. (2005), ao relatar que o IVE não foi adequado para avaliar a qualidade fisiológica de *Brassica napus* L.

Os testes de vigor realizados (condutividade elétrica, emergência e IVE), foram eficientes para diferenciar os lotes de sementes, destacando o Hyola 60 o de melhor potencial fisiológico e o Hyola 401, como o de baixo desempenho. Porém alguns estudos apontam que o potencial fisiológico de semente de canola pode ser afetada por patógenos (DUCZEK et al., 1999; RUDE et al., 1999; VERMA; SAHARAN, 1994).

De acordo com o teste de sanidade, os principais gêneros fúngicos encontrados nas sementes foram: *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Phoma* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Botrytis* spp. e *Rhizopus* spp. (Tabela 7). Estes patógenos são comumente relatados em trabalhos com sementes de canola e sua incidência depende das condições climáticas durante o período de maturação e colheita, assim como os genótipos empregados (BRAZAUSKIENE; PETRAITIENE, 2006; JAJOR, et al. 2012).

Alternaria spp. foi o fungo em maior proporção, encontrado em todos os tratamentos, sua incidência máxima chegou a 91,66% em sementes do Hyola 60. Vários trabalhos têm demonstrado a predominância da *Alternaria* spp. em sementes de canola (ÁVILA et al., 2004; MARCHIORI JÚNIOR, et al., 2002; MIGLIORINI et al., 2011). De acordo com Cardoso et al. (2005), às espécies encontradas no Brasil, associadas as sementes são: *A. brassicae*, *A. raphani* (atualmente chamada de *A. japonica*), *A. brassicicola* e *A. alternata*. A ocorrência da *Alternaria* spp. em sementes pode produzir grandes prejuízos, visto que causa infecções em sementes e pode ser transmitida por elas para a plântulas (NEERGAARD, 1979). Além disto, estes patógenos causam redução na germinação e tombamento de plântulas em pré ou pós-

emergência (ROTEM, 1995) manchas foliares, queda prematura de folhas e síliquas (CARDOSO et al., 2005).

Tabela 7 – Incidência de *Alternaria* spp. (Alt) *Fusarium* spp. (Fus) *Phoma* spp. (Pho), *Aspergillus* spp. (Asp), *Penicillium* spp. (Pen), *Botrytis* spp. (Bot) e *Rhizopus* spp. (Rhi) em sementes de canola. Santa Maria – RS, 2013.

Tratamento	Incidência de fungos (%)						
	Alt	Fus	Pho	Asp	Pen	Bot	Rhi
Hyola 401	52,33 c*	0,16 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,50 ^{ns}	5,50 ^{ns}	3,50 a	1,83 ^{ns}
Hyola 61	68,33 b	0,16	0,16	0,66	4,50	1,16 b	0,00
Hyola 60	91,66 a	0,00	0,16	0,66	2,66	3,00 ab	0,00
Média	70,77	0,11	0,11	0,61	4,22	2,55	0,61
CV (%)	9,63	27,26	27,26	45,82	44,37	43,38	71,99

*Médias seguidas na mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. ^{ns}: não significativo.

Tohyama e Tsuda (1995), estudando lotes de sementes de diversas espécies de *Brassica*, constataram a presença de *A. japonica*, *A. alternata* e *A. brassicicola*. Segundo esses autores, as espécies patogênicas que causaram lesões necróticas nas plântulas foram a *A. brassicaceae* e *A. japonica*. A espécie mais frequente foi *A. alternata*, entretanto, este fungo foi considerado um patógeno fraco, por não apresentar sintomas, sendo observado apenas algumas lesões claras nos cotilédones.

Ao analisar os dados obtidos durante o trabalho, pode-se verificar uma relação entre o ciclo total dos híbridos (Tabela 2) e a incidência de *Alternaria* spp. nas sementes (Tabela 10). Observa-se que a alta incidência de *Alternaria* spp. nas sementes pode estar relacionada com o maior período de dias em que a cultura permaneceu no campo, visto para Hyola 60, seguido do Hyola 61 e Hyola 401.

Verificou-se ainda que os patógenos que ocorreram em menor incidência foram *Penicillium* spp., *Botrytis* spp., *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp., *Fusarium* spp. e *Phoma* spp., detectados em todos os tratamentos, exceto *Fusarium* spp. no Hyola 60 e *Phoma* spp. em Hyola 401 (Tabela 7). Alguns fatores podem interferir na infecção de patógenos nas sementes, como: genótipo, ambiente, práticas culturais, estágio de infecção na planta, severidade de infecção da planta mãe, infestação por insetos e manejo das sementes durante o beneficiamento (MACHADO, 2012). Migliorini et al. (2012), avaliando sementes de canola

produzidas em diferentes locais do Paraná, observaram que a incidência de patógenos nas sementes (geração F2), está relacionada ao material genético utilizado e o local de cultivo.

Fungos do gênero *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Rhizopus* spp., são considerados saprófitas e, frequentemente estão presentes nas sementes, esses podem causar deterioração das mesmas, principalmente quando armazenadas sob condições inadequadas, culminado com a perda da viabilidade e do valor comercial (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Muniz et al. (2004), relataram que *Aspergillus* spp. interferem na qualidade fisiológica de sementes de melão. Menten (1995) observa que *Rhizopus* spp. causa podridões em sementes e plântulas de algodão em pré e pós-emergência. Da mesma forma, foi constatada a presença de *Penicillium* spp. em sementes não emergidas de *Cedrela fissilis* (LAZAROTTO, 2010).

O gênero *Phoma* spp. foi observado em baixa incidência e apenas nos tratamentos Hyola 61 e Hyola 60. Cardoso et al. (2005) relatam que a doença é chamada de canela preta e se caracteriza por apresentar lesões foliares e cancos basais; quando detectada nas fases iniciais de desenvolvimento da cultura, podem causar tombamento, resultando em falhas na germinação e morte das plântulas. Para Szopińska et al. (2007), a associação do fungo *Phoma* spp. ocorre ocasionalmente em sementes de canola e esse pode estar aderido tanto no tegumento como no embrião da semente, infectando cotilédones e radícula.

A incidência de *Botrytis* spp. variou de 1,16 à 3,50%, respectivamente para Hyola 61 e Hyola 401. A presença desse fungo em sementes de grão de bico (*Cicer arietinum* L.), pode causar apodrecimento e posterior redução da germinação, conseqüentemente, afetando o estabelecimento de plântulas no campo (BURGESS et al., 1997). O mesmo tem sua incidência variável entre anos e encontra-se tanto internamente como externamente em sementes de canola (SZOPIŃSKA et al., 2007).

Quando se correlacionou o fungo de maior incidência nas sementes (Tabela 7), com as variáveis de avaliação da qualidade fisiológica (Tabela 6), verificou-se que a associação da *Alternaria* spp. nas sementes não afetou o vigor (CTP (r 0,46) e IVE (r 0,45)) e a germinação (r 0,37). Esse comportamento deve estar relacionado com uma espécie *Alternaria* spp., pouco agressiva, que não influencia na qualidade das sementes. Rude et al. (1999) verificaram que a qualidade fisiológica de sementes de canola foi afetada pela presença de *Alternaria* spp., entre as espécies *A. brassicae* e *A. raphani* reduziram significativamente a germinação, enquanto que a *A. alternata* não apresentou nenhum dano.

De acordo com Machado (2012) um mesmo patógeno pode estar presente em um lote, ou em uma semente, sob uma ou mais formas de localização. Desta forma, patógenos que se localizam no embrião das sementes são facilmente transmitidos para as plântulas. Além da

localização deste fungo na semente, a qualidade e o tipo de inóculo, assim como os fatores ambientais (temperatura e umidade) também influenciam na capacidade de transmissão. Os patógenos transmissíveis ou não por sementes, afetam o desempenho destas no campo, onde o uso de sementes de baixo vigor resulta em um estande insatisfatório de plântulas, bem como uma maior vulnerabilidade das sementes ao ataque de patógenos (MACHADO, 1988). Os patógenos podem ser agentes causais de doenças de pré e pós-emergência de plântulas. Desta forma, quando presentes nas sementes, podem se tornar ativos, assim que encontrarem condições favoráveis para o seu desenvolvimento.

Segundo França Neto e Henning (1984), a incidência de patógenos nas sementes não significa necessariamente o comprometimento da germinação e origem de plântulas e plantas doentes. Contudo, torna-se importante conhecer os micro-organismos associados às sementes, e se esses poderão ser transmitidos ou não para as plântulas resultantes, assim como a capacidade de causar doenças em plantas (MÜLLER, 2013).

As variáveis analisadas e os seus respectivos resultados no teste de transmissão estão expostas na tabela 8. Os tratamentos avaliados apresentaram emergência acima de 92%, sendo o Hyola 60 o de maior porcentagem, bem como a menor média para sementes mortas em relação ao Hyola 61. Entretanto, verificou-se a maior média de plântulas sintomáticas para Hyola 60, as quais apresentaram manchas escuras na região do colo das plântulas emergidas. Muhammad Ismail et al. (2012), relataram que os fungos transmitidos via semente para às plântulas de couve flor eram *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Curvularia* spp., *Helminthosporium* spp. e *Chaetomium* spp., causando lesões escuras no colo e posteriormente, tombamento de plântulas.

Tabela 8 – Emergência, sementes mortas e plântulas sintomáticas avaliados no teste de transmissão.

Tratamento	Emergência (%)	Sementes mortas (%)	Plântulas sintomáticas (%)
Hyola 401	93,66 ab*	6,33 ab	0,33 b
Hyola 61	92,33 b	7,66 a	2,66 ab
Hyola 60	97,66 a	2,33 b	5,33 a
Média	94,55	5,44	2,77
CV (%)	2,53	50,85	65,17

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

Os fungos identificados no teste de transmissão associados a sementes de canola foram *Phoma* spp. e *Alternaria* spp. (Tabela 9). Somente estes foram transmitidos via semente para as plântulas e, apenas a transmissão de *Alternaria* spp., apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Isso demonstra que as maiores porcentagens de plântulas sintomáticas relacionou-se com as maiores porcentagens de *Alternaria* spp. associadas as sementes (Tabela 7). No entanto, para *Phoma* spp. foi verificado a transmissão somente para o Hyola 60 e em baixas porcentagens (0,33%), confirmando a afirmação de Cardoso et al. (2005) pela baixa transmissão de *Phoma* spp. das sementes para as plântulas.

Tabela 9 – Percentual de gêneros fúngicos identificados no teste de transmissão por sementes de canola, cultivados no município de Santa Maria – RS, 2013.

Tratamento	<i>Phoma</i> spp. (%)	<i>Alternaria</i> spp. (%)
Hyola 401	0,00 ^{ns}	0,33 b
Hyola 61	0,00	2,66 ab
Hyola 60	0,33	5,00 a
Média	0,11	2,66
CV (%)	31,58	65,3

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.
^{ns}: não significativo.

Corroborando com o presente trabalho, vários autores comprovam a ocorrência de *Alternaria* spp. em sementes e a sua transmissão para as plântulas, como: Nery et al. (2009) em sementes de nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L. var. oleiferus); Lazarotto et al. (2010) em paineira (*Ceiba speciosa*); Muhammad Ismail et al. (2012) em couve flor (*Brassica oleracea* var. botrytis); Moraes e Menten (2006) em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.); Verzignassi et al. (1997) em estévia (*Stevia rebaudiana*) e Seidle et al. (1995) em canola (*Brassica napus* L.). Esses autores ainda afirmam que as diferentes espécies desse gênero reduzem a qualidade das sementes, causam necrose em plântulas e tombamento em pré e pós-emergência.

4.6 Qualidade das sementes de canola durante o armazenamento

Os resultados da análise de variância das variáveis germinação e sanidade das sementes armazenadas durante 135 dias, estão expostas na tabela 10. Observa-se que não houve interação significativa entre os tratamentos para as variáveis incidência de *A. brassicicola*, *A. japonica* e outros patógenos, evidenciando-se que para esses fungos a presença da variabilidade genética entre os híbridos durante o armazenamento, não influencia na sua sobrevivência. Entretanto, constatou-se interação significativa entre os tratamentos para germinação e incidência de *A. alternata*.

Tabela 10 – Análise de variância para os caracteres de porcentagem de germinação e sanidade, em sementes de canola cultivados em Santa Maria – RS e armazenado em condição de ambiente não controlado.

Fontes de variação	GL	Germinação (%)	Quadrados médios			
			Sanidade (%)			
			A. <i>alternata</i>	A. <i>brassicicola</i>	A. <i>japonica</i>	Outros patógenos
Híbrido (H)	2	665,29*	3302,54*	14,57 ^{ns}	0,16 ^{ns}	14,62 ^{ns}
Armazenamento (A)	3	28,77 ^{ns}	10501,26*	21,95*	0,16 ^{ns}	291,26*
H x A	6	248,23*	1154,76*	5,01 ^{ns}	0,16 ^{ns}	19,01 ^{ns}
A x H	6	248,23*	1154,76*	5,01 ^{ns}	0,16 ^{ns}	19,01 ^{ns}
CV (%)		3,34	13,72	53,99	20	39,93

*: significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F. ^{ns}: não significativo.

As sementes de canola, apresentaram respostas diferentes quanto a porcentagem de germinação durante o período de armazenamento (Tabela 11), nas duas primeiras avaliações (zero e 45 dias) os genótipos Hyola 61 e Hyola 60, diferiram significativamente do Hyola 401. No entanto, as maiores médias de germinação durante o armazenamento das sementes foi observado para o Hyola 61, o que pode ser explicado pela manutenção da qualidade das sementes por um maior período de tempo durante o armazenamento para esse genótipo.

Tabela 11 – Germinação de sementes de canola armazenada em condições de ambiente não controlado. Santa Maria – RS, 2013.

Tratamento	Armazenamento (dias)			
	zero	45	90	135
Hyola 401	76,25 b	76,75 b	84,50 a	77,25 b
Hyola 61	89,75 a	83,25 a	87,25 a	89,75 a
Hyola 60	85,75 a	87,25 a	74,25 b	77,00 b
Média	83,91	82,41	82	81,33

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

Na figura 7, observa-se que houve um comportamento diferenciado para cada material genético durante o período de armazenamento, possibilitando ajuste da equação de primeiro grau para o Hyola 60, segundo grau para Hyola 61 e terceiro grau para Hyola 401. O Hyola 60 apresentou redução na germinação durante o armazenamento, chegando ao final de 135 dias com 77%, enquanto que, o Hyola 61 manteve a qualidade inicial do lote (89,75%). O genótipo Hyola 401, apresentou um pequeno aumento na germinação aos 90 dias (84,50%), com posterior redução aos 135 dias (77,25%). Rossetto et al. (1997), avaliando a qualidade das sementes de canola após seis meses de armazenamento, observaram valores de germinação igual ou superior a 80%. Alguns autores constataram acréscimo gradativo da qualidade das sementes até certo período de armazenamento, com posterior redução, a qual atribuíram esse comportamento à uma provável dormência primária das sementes, que é superada logo após o início do armazenamento, visto para crambe (*Crambe abyssinica*) (COSTA et al., 2012), cevada (*Hordeum vulgare* L.) (TUNES et al., 2010) e pepino (*Cucumis sativus* L.) (NAKADA et al., 2010). De acordo com Fei et al. (2009), sementes de *Brassica napus* L. apresentam dormência secundária, induzida por algum tipo de estresse.

Alguns autores atribuem a redução da germinação durante os meses de armazenamento à contaminação por patógenos, que estão presentes nas sementes (BRACCINI et al. 2000; DUCZEK et al., 1999; SOFIATTI; SCHUCH, 2005). Peixoto et al. (1998), não encontraram efeito da associação de micro-organismos com a redução do vigor em sementes de milho, durante o armazenamento. Enquanto Medina et al. (2009), verificaram a sobrevivência de fungos importantes para a cultura de triticale (*X. Triticosecale* Wittmack) durante o armazenamento, os quais comprometeram a qualidade sanitária das sementes através da sobrevivência de patógenos, e esses interferiram na germinação ocasionando plântulas infectadas.

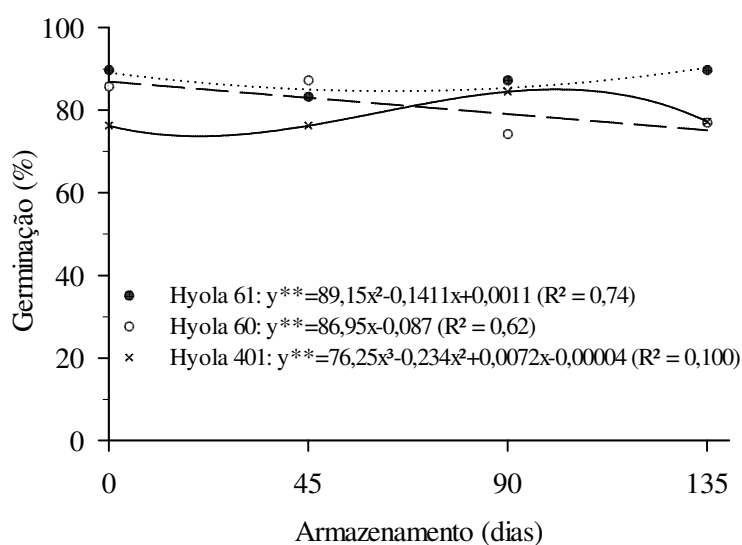


Figura 7 – Germinação das sementes de canola, durante o período de armazenamento. Santa Maria – RS, 2013.

Foi verificado que não houve diferença significativa entre os híbridos de canola para incidência de *A. brassicicola*, *A. japonica* e outros patógenos, avaliados durante o armazenamento das sementes (Tabela 10). No entanto, observa-se que o período de armazenamento influenciou na sobrevivência de *A. brassicicola* e outros patógenos (Figura 8 a e b). As doenças causadas por *A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. japonica* e *A. alternata* são conhecidas em diversas partes do mundo, por causar grandes prejuízos em *Brassica*. Quando estas estão associadas às sementes, podem agir como principal fonte de inóculo em áreas de cultivo, causando grandes perdas na produção e qualidade das sementes (SHRESTHA et al., 2005). Quando encontradas em plantas causam redução do potencial fotossintético nas folhas e siliques, senescência e queda prematura de siliques e sementes (CARDOSO et al., 2005).

Constatou-se uma baixa incidência de *A. brassicicola* durante os meses de armazenamento (<3%) (Figura 8 a). Köhl et al. (2010) verificaram que não houve aumento da contaminação de *A. brassicicola* após a colheita das sementes de couve flor. Em sementes de estévia, Verzignassi et al. (1997) constataram uma tendência crescente para *Alternaria stevia* quando o inóculo de *A. alternata* foi reduzindo após o período de armazenamento. Esses mesmos autores verificaram um rápido e vigoroso crescimento micelial e intensa esporulação de *A. alternata* na superfície da semente e do papel-filtro (teste de sanidade), o que associaram a um dos prováveis fatores que dificultaram a detecção da presença de *A. stevia* no início do armazenamento das sementes.

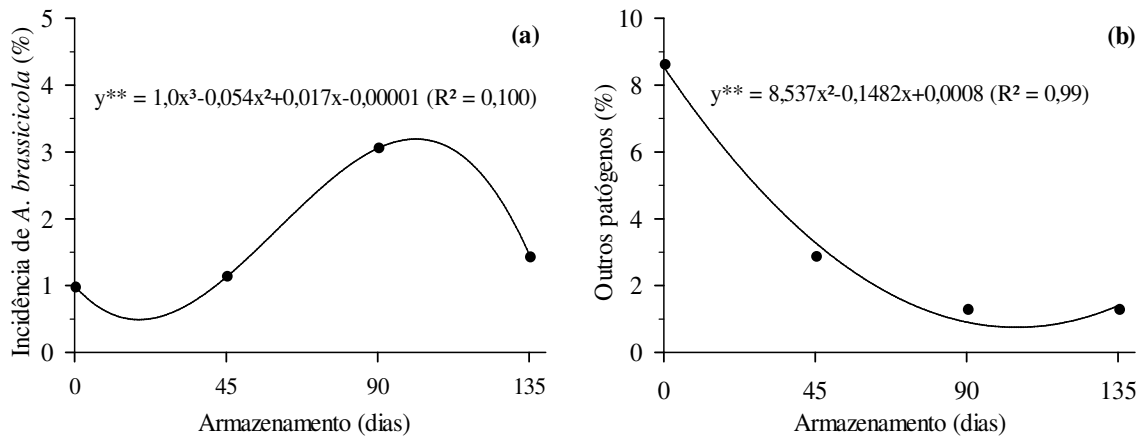


Figura 8 – Incidência de: a) *Alternaria brassicicola* e b) outros patógenos, detectados no teste de sanidade em sementes de canola, em função do período de armazenamento. Santa Maria – RS, 2013.

Na figura 8 b, observa-se a redução da incidência de outros patógenos presentes nas sementes com o decorrer dos dias de armazenamento, de modo que as sementes contaminadas chegaram a 1% no final dos 135 dias. Foram observados nas sementes os seguintes fungos: *Fusarium* spp., *Phoma* spp., *Botrytis* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Rhizopus* spp. Essa redução da incidência pode ter sido atribuída aos baixos teores de umidade nas sementes de canola quando colhidas (Figura 3), ou/e também pela perda da viabilidade do inóculo presente como contaminante superficial, durante o armazenamento (GALLI et al., 2007; MACEDO et al., 2002; MEDINA et al., 2009; TANAKA et al., 2001). Os patógenos normalmente estão relacionados, durante o armazenamento, com o estado físico, teor de água e possível inóculo inicial nas sementes, que pode resultar em maior ou menor incidência, pela temperatura, umidade relativa do ar e embalagens de conservação durante este período (TOLEDO et al., 2009).

Ocorreu interação significativa entre os híbridos e o período de armazenamento para incidência de *A. alternata* nas sementes (Tabela 10). O Hyola 60 apresentou as maiores médias de *A. alternata* nas duas primeiras avaliações (zero e 45 dias), o mesmo foi observado aos 90 dias de armazenamento (41%), porém este não diferiu significativamente do Hyola 401 (40,75%) (Tabela 12). Aos 135 dias, foi observado uma maior incidências para o Hyola 401 (33,5%), a qual diferiu dos demais genótipos. Os resultados demonstram que com o aumento do tempo de armazenamento, ocorre a diminuição da incidência de *A. alternata* nas sementes de canola (Figura 9), no entanto, os híbridos apresentaram comportamento diferenciado. A porcentagem de sementes infectadas por esse patógeno mantiveram-se abaixo de 33,5% aos

135 dias de armazenamento. Resultados semelhantes do declínio da incidência de *A. alternata* durante o armazenamento das sementes, também foram verificados em triticale, cenoura e arroz (MEDINA et al., 2009; MUNIZ; PORTO; 1998, TELÓ et al., 2012).

Tabela 12 – Valores médios de incidência de *Alternaria alternata* (%) em sementes de canola durante o período de armazenamento. Santa Maria – RS, 2013.

Tratamento	Incidência de <i>A. alternata</i> (%)			
	Armazenamento (dias)			
	zero	45	90	135
Hyola 401	51,00 c	56,75 b	40,75 a	33,50 a
Hyola 61	63,50 b	47,00 b	26,50 b	16,00 b
Hyola 60	94,00 a	75,50 a	41,00 a	22,75 b
Média	69,5	59,75	36,08	24,08

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.
^{ns}: não significativo.

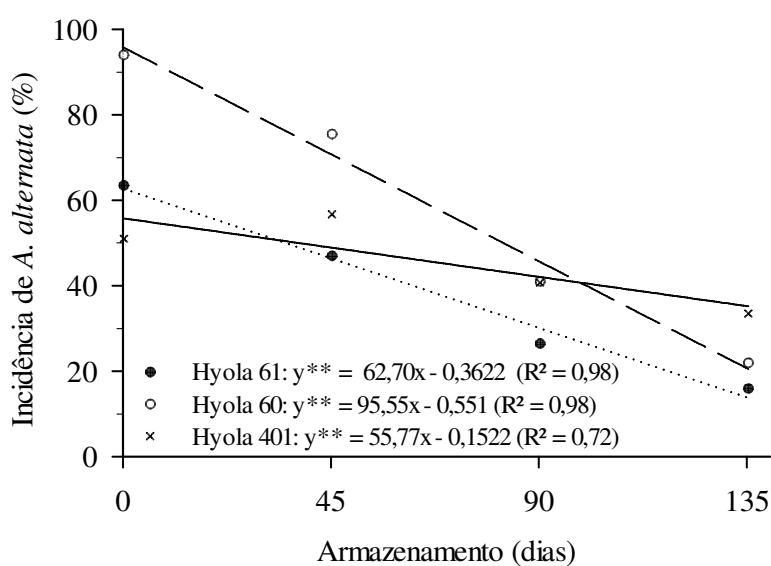


Figura 9 – Análise de regressão para incidência de *Alternaria alternata* em sementes de canola durante o período de armazenamento. Santa Maria – RS, 2013.

O fato das sementes apresentarem alta incidência de *A. alternata* e *A. brassicicola* ao final do período de armazenamento (135 dias), que coincide com o final da época de semeadura da canola, revela o comprometimento da qualidade sanitária dessas sementes, principalmente porque as espécies de *Alternaria* são os principais patógenos que estão

associados as sementes de *Brassica* e estas podem causar sérios danos as culturas, em diversas fases de desenvolvimento das plantas (BRAZAUSKIENE; PETRAITIENE, 2004; DUCZEK et al., 1999; MASETO et al., 2009; TOMM et al., 2009a).

Desta forma, os patógenos usam a semente para sobreviver durante o período de armazenamento e esses podem causar redução do potencial fisiológico, como também podem ser transmitido para as plântulas ou plantas.

4.7 Avaliação da patogenicidade de isolados de *Alternaria* spp.

Na tabela 13, encontram-se os valores de sanidade, germinação e vigor resultante das inoculações de *Alternaria* spp. em sementes de canola no teste de patogenicidade, onde observa-se diferença significativa entre os tratamentos.

Sementes inoculadas com isolados de *Alternaria* spp. apresentaram 100% de incidência, diferindo significativamente da testemunha (11%) (Tabela 13). Portanto a colonização das sementes ocorreu de forma satisfatória, uma vez que o método de contato com a colônia do patógeno possibilitou a infecção das sementes e a expressão dos sintomas (Tabela 13). Esse método foi adotado com sucesso por Moraes e Menten (2006) para a inoculação de *Alternaria* spp. em sementes de feijão, Lazarotto et al. (2010) para a inoculação de *Rhizoctonia* spp. em sementes de cedro (*Cedrela fissilis*) e Maciel (2012) na inoculação de *Fusarium* spp. em sementes de pinus (*Pinus elliotti*).

Através dos resultados é possível observar que houve diferença significativa entre os tratamentos quanto à germinação, sendo que sementes inoculadas com os isolados I1, I2, I3 e I4, apresentaram baixa germinação. Os isolados I5 e I6 contribuíram para a redução da germinação, mas não tão expressivamente quantos os primeiros quatro isolados; e ao avaliar a porcentagem de sementes mortas observa-se que os valores variaram de 1 a 7% entre os tratamentos.

Tabela 13 – Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de canola Hyola 61, inoculadas com isolados de *Alternaria* spp. Santa Maria – RS, 2013.

Isolados	Sanidade	-----Germinação-----			-----Vigor-----		Sanidade
	I (%)	G (%)	PAI (%)	SM (%)	CT (cm)	E (%)	PI (%)
I1	100 a*	17 c	76 a	7 a	4,9 c	75 a	100 a
I2	100 a	17 c	81 a	2 bc	4,6 c	39 b	100 a
I3	100 a	13 c	83 a	4 abc	4,2 c	36 b	100 a
I4	100 a	8 c	87 a	5 ab	4,5 c	78 a	100 a
I5	100 a	77 b	17 c	6 ab	8,9 a	88 a	12 b
I6	100 a	68 b	31 b	1 c	6,6 b	95 a	3 c
Testemunha	11 b	93 a	5 d	2 bc	8,5 a	98 a	2 c
CV (%)	8,08	12,24	10,25	30,28	5,31	14,45	12,99

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. I: incidência de *Alternaria* spp.; G: germinação; PAI: plântula anormal infectada; SM: sementes mortas; CT: comprimento total de plântula; E: emergência; PI: plântula infectada no teste de emergência. I1 ao I6: Isolados de *Alternaria* spp.

Os patógenos tornam-se ativos quando as condições ambientais forem favoráveis, e desta forma, a qualidade das sementes pode ser influenciada pelo ambiente em que as mesmas se encontram, o qual pode favorecer o desenvolvimento e a colonização de patógenos do hospedeiro, reduzindo o número de sementes viáveis, capazes de produzir plântulas normais sob condições favoráveis de campo (PEDROSO, 2009). Resultados semelhantes foram observados recentemente em um estudo feito com sementes de couve flor, onde verificou-se que a infecção por *Alternaria* spp. interferiu na germinação de sementes (MUHAMMAD ISMAIL et al., 2012). Seidle et al. (1995) encontraram três espécies de *Alternaria* (*A. brassicae*, *A. raphani* e *A. alternata*) associadas as sementes de canola e essas foram responsáveis pela redução da germinação.

Em relação aos resultados obtidos na variável comprimento de plântulas (Tabela 13), observou-se novamente a influência dos patógenos no desenvolvimento das plântulas, verificando tendência semelhante aos resultados obtidos no teste de germinação, onde os isolados I1, I2, I3 e I4 mostraram os menores comprimentos de plântulas, conseqüentemente menor vigor. Para Nakagawa (1999), o comprimento de plântulas é um parâmetro indicado para mensurar possíveis diferenças de vigor, considerando-se que plântulas com menores valores são menos vigorosas. Pedroso et al. (2010) estudando a presença de *A. alternata* e *A. dauci* em sementes de salsa (*Petroselinum crispum*), relataram que os patógenos prejudicaram o desenvolvimento das plântulas, assim como a germinação das sementes. Dessa forma,

quando os patógenos estão associados às sementes, podem promover debilitação das plântulas como também a redução da população.

No entanto, quando avaliada a emergência de plântulas em bandejas não foram observados as mesmas diferenças encontradas nos demais testes, a não ser os isolados I2 e I3 que apresentaram menor emergência nos primeiros 15 dias após a semeadura (Tabela 13). Esses resultados demonstram que os isolados associados às sementes apresentam comportamento diferenciado durante os estágios iniciais de desenvolvimento, quando avaliados fora de ambiente controlado (casa de vegetação). Para Santos et al. (2000) alguns fungos infectam a plântula sistemicamente, reduzindo o seu vigor e só manifestando os sintomas mais tarde. De acordo com Pedroso et al. (2010), as condições de laboratório são adequadas para a realização dos testes, pois além de favorecer o desenvolvimento das sementes, estas condições, também são propícias para a ação dos fungos, não ocorrendo o mesmo em casa de vegetação, uma vez que, os agentes patogênicos possuem particularidades, como temperatura e umidade adequadas para agir.

Os resultados de plântula anormal infectada (PAI), obtidos no teste do rolo de papel, confirmam os resultados de plântulas infectada em bandejas aos 30 dias após a semeadura (PI), demonstrando que os primeiros quatro isolados foram mais agressivos em relação ao I5 e I6, porém, constatou-se que todos os isolados foram transmitidos para as plântulas (Tabela 13), alguns em baixas porcentagens (isolado I5 e I6) e outras em porcentagens mais elevadas (isolados I1, I2, I3 e I4). Desta forma, os 4 primeiros isolados foram considerados patogênicos, pois a diferença estatística em relação a testemunha demonstra que os sintomas ocorreram por efeito da inoculação, enquanto que, os isolados I5 e I6 estão associados às sementes de forma saprófita, não acarretando prejuízo ao desenvolvimento inicial da cultura. Já a ocorrência de plântulas sintomáticas na testemunha pode estar associada com a contaminação natural das sementes, como pode ser visto no teste de sanidade. Os sintomas verificados nas plântulas foram manchas escuras na região do colo, seguido de tombamento (Figura 10).

Vários trabalhos tem mostrado o efeito prejudicial da *Alternaria* spp. quando associado às sementes, estas podem apresentar plântulas anormais e mortes em sementes, como observado em sementes de salsa (PEDROSO et al., 2010), melão (HENRIQUE et al., 2008) e feijão (MORAES; MENTEN, 2006); conseqüentemente também pode ser observada redução do estande final (SALUSTIANO et al., 2005).

Tohyama e Tsuda (1995) testaram a patogenicidade de *A. alternata*, *A. japonica* e *A. brassicicola* em plântulas de diversas espécies de *Brassica*, e verificaram que somente a *A.*

japonica e *A. brassicicola* foram patogênicos, independente da espécie hospedeira, esses fungos causaram lesões necróticas nos cotilédones, folhagens e pecíolo, respectivamente. No entanto, nesse mesmo trabalho os autores evidenciaram que a *A. alternata* não foi patogênica nas espécies de plantas estudadas; em plântulas de fedegoso (*Senna macranthera*), Mello et al. (2001), verificaram a ação menos agressiva dos isolados de *A. alternata*; e Pedroso et al. (2010) em sementes de salsa. Esses resultados podem ser justificado pelo fato da *A. alternata* ser considerada saprófita, para algumas espécies de plantas. Porém, vários trabalhos comprovam a patogenicidade desse fungo em diversas culturas (BOITEUX; REIFSCHNEIDER, 1993; CHELLEMI; MUELLER, 1995; GOMES; DHINGRA, 1983; LOGRIECO et al., 2009; SHAHDA et al., 1995).

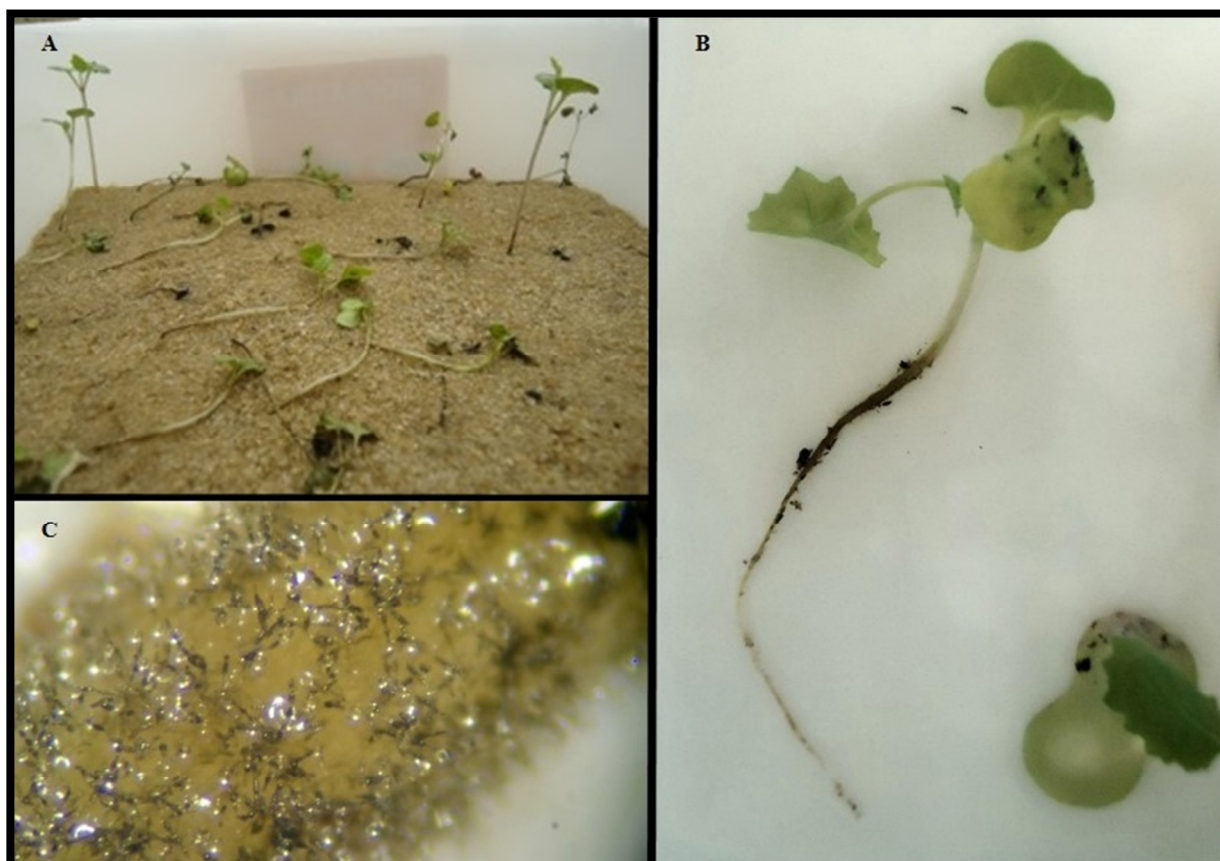


Figura 10 – Sintomas observados em plântulas de canola, no teste de patogenicidade. Tombamento em pós-emergência de plântulas (A); necrose e micélio de *Alternaria brassicicola* na região do hipocótilo (B e C).

Fonte: MIGLIORINI (2013).

De acordo com Cardoso et al. (2005), as espécies *A. brassicicola*, *A. brassicae*, *A. alternata* e *A. japonica*, são comumente relatadas na literatura por causar tombamento em pré e pós-emergência de plântulas de canola, apresentando lesões no hipocótilo e cotilédone, sendo posteriormente vistos sintomas em folha, caule e siliqua.

Desta forma, a associação da *Alternaria* spp. em sementes de canola, resulta em perdas significativas na qualidade, comprovando assim que os isolados podem ser transmitidos via semente para as plântulas resultantes.

4.8 Caracterização morfológica dos isolados de *Alternaria* spp.

A caracterização morfológica dos patógenos auxiliam na verificação da diversidade dos fungos que afetam um determinado hospedeiro (LAZAROTTO, 2013). Dessa forma, o conhecimento sobre as características morfológicas de colônias, micélio e conídios são necessários na diferenciação de patógenos (DHINGRA; SINCLAIR, 1995).

Na tabela 14, observa-se as características morfológicas dos isolados de *Alternaria* spp. avaliados aos sete e 10 dias. As colônias dos isolados I5 e I6 cresceram rapidamente durante o período de incubação. Esses mesmos isolados apresentaram os maiores resultados do IVC, com valores de 21,17 e 21,89 mm dia⁻¹, respectivamente. Já o isolado I3 apresentou menor IVC (11,99 mm dia⁻¹) e DMC (45,07 mm dia⁻¹), este, porém, não diferiu significativamente do isolado I2 (47,58 mm) no DMC. Segundo Lazarotto (2013), estas variáveis são importantes na diferenciação e agrupamentos de isolados de *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. Mello et al. (2001), observaram que dois isolados de *Alternaria* spp. em *Senna obtusifolia* alcançaram crescimento mais rápido que os demais isolados, ocupando toda a superfície da placa de forma irregular. Esses isolados foram posteriormente identificados através de marcadores moleculares como *A. alternata* (TIGANO et al., 2003). Para Klebs (1900 apud ROTEM, 1998) o crescimento micelial abundante pode restringir e, até mesmo, inibir a esporulação dos fungos.

Tabela 14 – Diâmetro médio das colônias de *Alternaria* spp. (DMC) após sete dias de incubação, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), produção média de esporos e coloração da colônia, em meio V8-ágar, incubado à 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Isolados	DMC de <i>Alternaria</i> spp. (mm)	IVCM (mm/dia)	Esporulação ($\times 10^5$ con/mL)	Coloração da Colônia ¹
I1	52,97 c*	14,92 c	54,03 a	Marrom olivácea a marrom escuro
I2	47,58 d	13,61 c	20,49 b	Marrom olivácea a marrom escuro
I3	45,07 d	11,99 d	32,72 b	Marrom olivácea a marrom escuro
I4	61,38 b	16,98 b	0,338 c	Verde acinzentado
I5	74,67 a	21,17 a	0,058 c	Cinza claro
I6	76,57 a	21,89 a	0,282 c	Cinza escuro
CV (%)	4,47	4,27	49,39	-

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. ¹ A cor da colônia foi determinada através da escala de cores de Rayner.

Ocorreram diferenças significativas entre os isolados de *Alternaria* spp. em relação a esporulação (Tabela 14). As colônias fúngicas dos isolados I1, I2 e I3 apresentaram abundante formação de esporos, sendo o isolado I1 considerado o de maior esporulação ($54,03 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ de suspensão) e os I4, I5 e I6 de esporulação mínima. Silva e Melo (1997) descrevem que esta é uma característica comum de algumas espécies do gênero *Alternaria*, a baixa capacidade ou mesmo a ausência de esporulação em meio de cultura. Peres et al. (2003), ressaltam que as características morfológicas dos fungos são altamente instáveis e dependentes da composição do meio utilizado, das condições de incubação e das variações intrínsecas ao patógeno. Pulz e Massola Jr (2009) analisaram a influência de alguns meios de cultura e fatores físicos (temperatura, comprimento de onda da luz, injúria e fotoperíodo) sobre o crescimento micelial e a esporulação das espécies de *A. dauci* e *A. solani*, evidenciaram que essas características são altamente influenciadas pelo meio de cultivo (V8-ágar), temperatura (25 °C), luz (NUV), fotoperíodo (12 h luz NUV / 12 h escuro) e injúrias no micélio (raspagem das colônias). Para Pereira et al. (2006) a taxa de esporulação de um patógeno influencia na determinação da sua capacidade de dispersão, afetando a distribuição espacial da espécie.

A coloração das colônias dos isolados foi também utilizada para a caracterização morfológica (Tabela 14 e Figura 11). Os isolados I1, I2 e I3 apresentam características muito próximas, diferindo do I4 e estes do I5 e I6. Essas pigmentações observadas foram determinados de acordo com a descrição de Rayner (1970) aos 10 dias após a inoculação.

A caracterização morfofisiológica, assim como a identificação molecular, são úteis na identificação e discriminação complementar do isolados. Ramjgathesh e Ebenezar (2012)

utilizaram os seguintes caracteres para descrição morfológica de isolados de *A. alternata*: tamanho do conídio (comprimento e largura), forma do conídio, número de células, pigmentação e esporulação de colônia. Michereff et al. (2003) verificaram a variabilidade de 38 isolados de *A. brassicicola*, a qual foi avaliada através das variáveis fisiológicas (taxa de crescimento micelial, esporulação e germinação de conídios), epidemiológicas (severidade, período de incubação, taxa da progresso de doença e área abaixo da curva) e sensibilidade a fungicida.

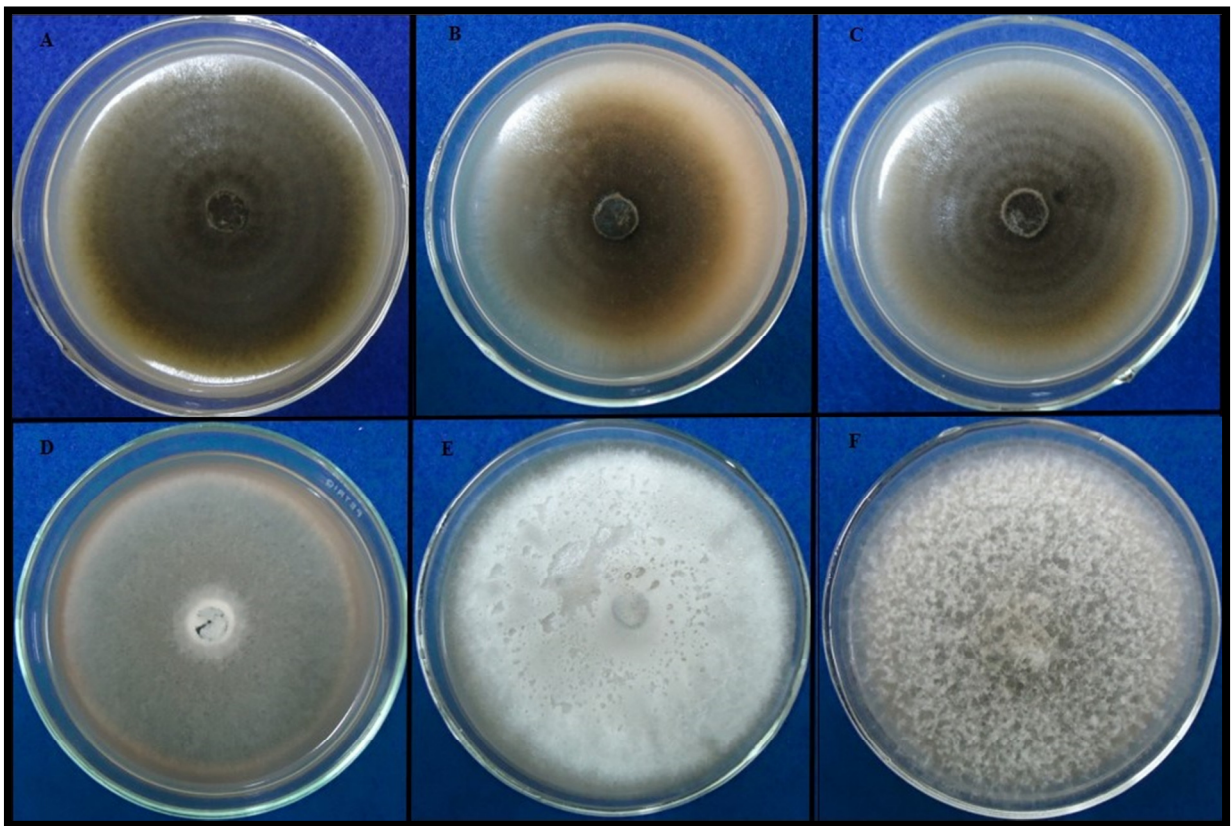


Figura 11 – Colônias puras dos seis isolados de *Alternaria* spp. crescidos em meio V8-ágar, por 10 dias. A) isolado I1; B) isolado I2; C) isolado I3; D) isolado I4; E) isolado I5 e; F) isolado I6.

Fonte: MIGLIORINI (2013).

Outras variáveis morfológicas também foram avaliadas para melhor caracterização dos isolados, entre elas as características relacionadas com conídios (dimensões, número de septos e células) de *Alternaria* spp. (Tabela 15). De acordo com esses critérios, foram identificadas três espécies de *Alternaria*, que serão descritos a seguir.

Os isolados I1, I2, I3 foram alocados na seção II j, segundo o Manual de identificação de *Alternaria* (SIMMONS, 2007); em que compreende as espécies de: *A. brassicicola*, *A. mimicula*, *A. septorioides*, *A. solidaccana*, *A. dumosa*, *A. citri* e *A. alternata*. Com base nas características contempladas na chave de classificação morfológica, as espécies foram identificadas como *A. brassicicola*. O tamanho dos conídios variou de 11,2 – 62,5 μm de comprimento e 5 – 20 μm de largura, de 0 a 2 septos longitudinais e até 8 transversais, sendo que os conídios apresentam de 1 a 12 células. Woudenberg et al. (2013) descrevem os conídios de *A. brassicicola*, como sendo de formato elipsóide, ovóide ou as vezes obclavate, de tamanho pequeno ou moderado, apresenta septos transversais, com pouco ou nenhum septo longitudinal e comumente se encontram em cadeias de 20 ou mais e as vezes ramificados.

Com base na descrição de Simmons (2007) o isolado I4 foi classificado como *Alternaria japonica*, a qual pertence a seção II A-1. Apresenta conídios ovóides curtos a longos, com septos transversal e longitudinal, cujo os septos transversais são visivelmente contraídos e encontra-se cadeias curtas. Na tabela 15 verifica-se que o comprimento do conídio variou de 82,5 – 35 μm e largura 22,5 – 13,7 μm , com septos transversais de 2 – 8 e longitudinal 0 – 3, sendo visualizados de 4 – 11 células por conídio. Esse patógeno apresenta a maior média de tamanho de conídio, número de septos e de células, entre os isolados avaliados; esses valores de dimensões estão coerentes com as descrições de Rop et al. (2009) e Bassimba et al. (2013).

Tabela 15 – Caracterização morfológica de conídios de isolados de *Alternaria* spp. encontrados em folha e sementes de canola.

Isolados	Valores	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Septo longitudinal (n°)	Septo transversal (n°)	N° de células
I1	Máximo	60,0	20,0	2	8	12
	Mínimo	16,2	7,50	0	1	2
	Média	33,1	10,3			4,83
I2	Máximo	51,2	17,5	2	5	7
	Mínimo	16,2	5,00	0	1	2
	Média	33,9	11,8			4,66
I3	Máximo	62,5	17,5	0	7	8
	Mínimo	11,2	5,00	0	0	1
	Média	32,1	10,0			4,03
I4	Máximo	82,5	22,5	3	8	11
	Mínimo	35,0	13,7	0	2	4
	Média	55,7	17,3			6,6
I5	Máximo	45,0	12,5	4	6	8
	Mínimo	15,0	5,00	0	1	2
	Média	29,0	8,90			4,76
I6	Máximo	40,0	15,0	3	5	8
	Mínimo	8,75	7,50	0	1	2
	Média	26,8	11,3			4,53

Os isolados I5 e I6 também foram alocados na seção II j. descrito por Simmons (2007), e identificado como *A. alternata*. Os conídios apresentam de 2 - 8 células, sendo classificado como relativamente pequeno (15 – 45 x 5 – 12,5 µm / 8,75 – 40 x 7,5 - 15 µm), de 1 a 6 septos transversais, com pouco (4) ou nenhum septo longitudinal. De acordo com Simmons (2007) os conídios se apresentam com cadeias ramificados ou não, com formato ovóide ou elipsóide e conidióforos simples, retos ou curvos. Mello et al. (2001) caracterizando morfológicamente isolados de *Alternaria* spp. em *Senna obtusifolia*, verificaram menores valores médios de comprimento e largura de conídios, assim como número de septos transversais para isolados de *A. alternata*. O autor ainda ressaltou que este patógeno foi menos agressivo a plântulas de fedegoso e, o mesmo também foi observado por Bulajic et al. (2009) em plântulas de várias espécies da família Apiaceae.

Na figura 12, é possível verificar o tamanho, forma e o número de septos dos conídios de *Alternaria* spp. Todos os isolados se desenvolveram em sementes de canola, através do teste de sanidade por 72 h; as sementes utilizadas foram previamente esterilizadas e colocadas em contato com a cultura fúngica durante 4 h. Esse método foi adotado devido os isolados I4,

I5 e I6 apresentarem pouca esporulação em meio de cultura (Tabela 14). Dessa forma então, foi possível fazer avaliações relacionadas a morfometria de conídios.

Alguns estudos envolvendo a identificação morfológica de *A. japonica*, recentemente também utilizaram técnicas, relacionadas ao cultivo do patógeno em meio de cultura com fragmentos dos seus respectivos hospedeiros (BASSIMBA et al., 2013; GARIBALDI et al., 2011). De acordo com Carneiro et al. (2012), a análise do conídio desenvolvido no próprio tecido do hospedeiro é importante para uma caracterização mais precisa do fungo.

Diante do exposto, a caracterização dos fungos, associados as sementes e folha de canola, foram baseadas nas características morfológicas e identificadas como: *A. brassicicola*, (I1, I2 e I3) *A. japonica* (I4) e *A. alternata* (I5 e I6). No entanto, essa técnica, para muitos patógenos, pode ser afetada pelo ambiente de cultivo, tornando-se difícil a sua caracterização (FALEIRO et al., 2003). Desta forma, o uso de técnicas moleculares permite uma melhor caracterização e identificação de patógenos, dando mais confiabilidade aos resultados, principalmente quando ambos são confrontados, assim torna-se uma ferramenta importante para uma melhor identificação dos isolados (LAZAROTTO, 2013).



Figura 12 – Características morfológicas de seis isolados de *Alternaria* spp., vistas em microscópio ótico em aumento de 40 x. A) isolado I1; B) isolado I2; C) isolado I3; D) isolado I4; E) isolado I5 e; F) isolado I6. A barra presente em cada imagem correspondente à medida de 20 μ m.

Fonte: MIGLIORINI (2013).

4.9 Caracterização molecular

Valores de cobertura e similaridade entre os isolados de *Alternaria* spp. deste estudo e os acessos disponíveis no “*GenBank*”, calculados através do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), podem ser observados na tabela 16. Tais resultados foram encontrados com o sequenciamento da região do fator de alongação EF-1 α . Para a confecção do dendrograma filogenético foi escolhido um isolado de *Ceratocystis fimbriata* (HM569615) como *outgroup*, apenas para aprimorar a visualização das separações dos ramos do dendrograma.

Tabela 16 – Código de acesso no *GenBank*, cobertura (%), similaridade (%) e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região genômica EF-1 α .

Espécie	Código de acesso	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>Alternaria mimicula</i>	JQ672449	62	99	Lawrence et al. (2012)*
<i>A.brassicicola</i>	JQ672450	62	99	Lawrence et al. (2012)*
<i>A.conoidea</i>	JQ672448	62	99	Lawrence et al. (2012)*
<i>A.japonica</i>	AY375367	62	100	Inderbitzin et al. (2006)
<i>A.japonica</i>	JQ672447	69	100	Lawrence et al. (2012)*
<i>A.angustiovoidea</i>	JQ672465	60	99	Lawrence et al. (2012)*
<i>A.maritima</i>	JQ672464	60	99	Lawrence et al. (2012)*
<i>A.gaisen</i>	JQ672463	60	99	Lawrence et al. (2012)*
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	HM569615	-	-	Harrington (2010)

*Acessos lançados no *GenBank*, porém ainda não publicados.

Os acessos disponíveis no *GenBank* foram utilizados para a construção da dendrograma filogenético (Figura 13), sendo escolhidos os que apresentavam maior similaridade e cobertura da sequência após o alinhamento. A partir da análise de sequências, foram observadas variações entre as espécies dos isolados de *Alternaria* spp. Os isolados I1, I2 e I3 possuem alta similaridade com as espécies de *A. mimicula*, *A. brassicicola* e *A. conoidea*; o isolado I4 foi altamente similar a *A. japonica*, e os isolados I5 e I6, apesar de terem sido similares a *A. angustiovoidea*, também possuem proximidade genética com as espécies *A. maritima* e *A. gaisen*.

Para a construção da árvore filogenética (Figura 13), os isolados I1, I2 e I3 apresentaram suporte de *bootstrap* igual a 100, para os acessos de *A. mimicula* (JQ672449) e *A. brassicicola* (JQ672450). Esses resultados divergem daqueles obtidos na análise morfológica para *A. mimicula*, porém, estão de acordo com características muito próximas a de *A. brassicicola*, conforme descrito por Simmons (2007). Assim, ressalta-se a importância da utilização de ambas metodologias para identificação de isolados de *Alternaria* spp.

O isolado I4 obteve similaridade com uma espécie do agregado *A. japonica*, fornecendo indícios de que este isolado possa pertencer a essa espécie (*bootstrap* igual a 100). O isolado apresentou menor proximidade com outras espécies, como *A. mimicula*, *A. brassicicola*, *A. angustiovoidea*, *A. maritima*, *A. gaisen* e *Ceratocystis fimbriata* que ficaram arrançados em outros clados.

O isolado I6 se agrupou em um clado maior, conjuntamente com *A. gaisen*, *A. angustiovoidea* e *A. maritima*, ao passo que o isolado I5 se agrupou no mesmo clado, porém com uma dissimilaridade genética ligeiramente maior. Com base nessa sequência não foi

possível definir, de forma conclusiva, as espécies em questão, pois embora esses isolados tenham ficado no mesmo clado que as demais espécies de *Alternaria* spp. (JQ672465, JQ672464, JQ672463), e apresentado uma alta similaridade de 99% com as sequências disponíveis no *GenBank*, o suporte de *bootstrap* foi de 62, considerado intermediário, uma vez que valores de *bootstrap* superiores a 90 são considerados altos e relevantes para determinação de espécies de patógenos (SCHROERS et al., 2009).

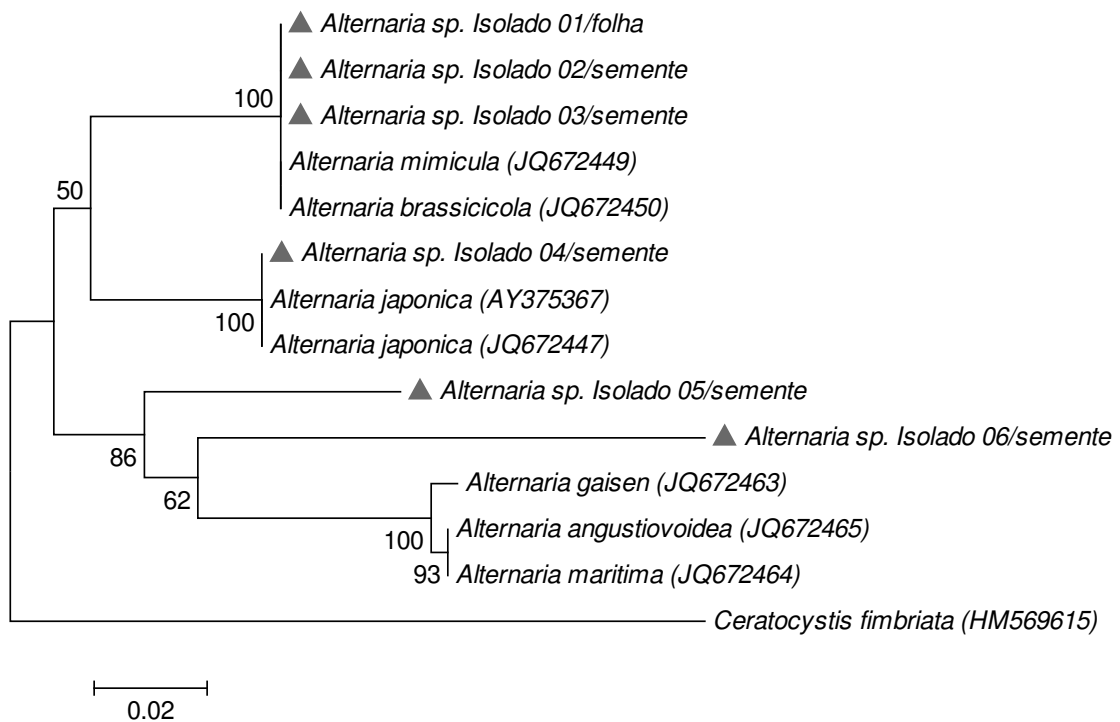


Figura 13 – Dendrograma baseado no método “*Neighbor-joining*” derivado das sequências da região EF-1 α , com base em 5000 réplicas de “*bootstrap*”, dos isolados de *Alternaria* spp. (I1, I2, I3, I4, I5 e I6), e de sequências obtidas no *GenBank* de diferentes isolados de *Alternaria* spp. O número nas ramificações representa o valor de “*bootstrap*”. *Ceratocystis fimbriata* (HM569615) foi utilizado como *outgroup*. Santa Maria – RS, 2013.

Diante do exposto, a identificação molecular baseada na região do fator de alongação EF-1 α do rDNA, dos isolados de *Alternaria* spp. obtidos a partir de sementes e folha de canola, se agruparam em três clados. Woudenberg et al. (2013) recentemente publicaram um trabalho, em que explicam que ocorre semelhança entre as espécies, através da identificação molecular, dessa forma, seria necessário sequenciar outras regiões genômicas afim de determinar com precisão a identificação em nível de espécie, bem como associar a características morfológicas, pois essas são complementares nesse processo de identificação e

conferem mais confiabilidade ao resultado. Esses mesmos autores classificaram as espécies de *Alternaria* em seções, de acordo com os isolados obtidos no presente trabalho podemos alocar os isolados I1, I2 e I3 a seção *A. brassicicola*; o isolado I4 a seção *A. japonica*; e os isolados I5 e I6 na seção *A. alternata*.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

A maior qualidade das sementes acontece aos 58 dias após a plena floração, coincidindo com o maior acúmulo de massa seca e máximo vigor.

A associação de *Alternaria* spp. em sementes de canola ocorre durante a maturação fisiológica e persiste no armazenamento.

As espécies *A. alternata*, *A. brassicicola* e *A. japonica* afetam a qualidade fisiológica das sementes e foram patogênicas à canola, causando necrose no colo e tombamento de plântulas.

Alternaria spp. é transmitida das plantas para as sementes e das sementes para as plântulas resultantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRASEM. Associação Brasileira de Sementes e Mudanças. Instrução Normativa nº 45, de 17 de setembro de 2013. Brasília, 2013. Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br/wp.content/uploads/2012/10/Instru%C3%A7%C3%A3o.Norma.tiva.n%C2%BA.45.de.17.de.Setembro.de.2013.Padr%C3%B5es.de.Identity.e.Qualidade.Prod.e.Comerc.de.Sementes.Grandes.Culturas.epublica%C3%A7%C3%A3o-DOU-20.09.13.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2013.

ADACHI, Y. et al. Nuclear ribosomal DNA as a probe for genetic variability in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 3197-3205, 1993.

AGUIAR, I. B. Conservação de sementes. In: IF SÉRIE REGISTROS. **Manual técnico de sementes florestais**, São Paulo: Instituto Florestal, n. 14, p. 1-98, 1995.

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G. Produção, determinação e calibração da concentração de inóculo em suspensão. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Eds.). **Métodos em Fitopatologia**. Editora: UFV, Viçosa, 2007. p. 103-116.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

AMIRI HOGAN, H. et al. Genetic analysis of grain yield, days to flowering and maturity in oilseed rape (*Brassica napus* L.) using diallel crosses. **International Journal of Plant Production**, Gorgan, v. 3, n.2, p. 19-26, 2009.

ARADHYA, M. K.; CHAN, H. M.; PARFITT, D. E. Genetic variability in the pistachio late blight fungus, *Alternaria alternata*. **Mycological Research**, Manchester, v. 105, p. 300-306, 2001.

ÁVILA, M. R. et al. Adubação potássica em canola e seu efeito no rendimento e na qualidade fisiológica e sanitária das sementes. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 26, n. 4, p. 475-482, 2004.

ÁVILA, M. R. et al. Testes de laboratório em sementes de canola e a correlação com a emergência das plântulas em campo. **Revista Brasileira De Sementes**, Pelotas, v. 27, n. 1, p. 62-70, 2005.

ANTUNES, J. M. Canola: crescimento limitado pela falta de sementes. **Embrapa**, Passo Fundo, 14 de abr. 2013. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/impressao/noticias/2013/abril/3a-semana/canola-crescimento-limitado-pela-falta-de-sementes.htm>>. Acesso em: 10 jun. 2013.

BARBELO, C. J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botânica Brasilica**, Feira de Santana, v. 27, n. 2, p. 145-164, 1998.

BARROS, D. C. et al. Comparação entre testes de vigor para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de tomate. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 24, n. 2, p.12-16, 2002.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. St Paul, Minnesota: APS Press, 1998. 218 p.

BASSIMBA, D.; MIRA, J. L.; VICENT, A. First report of *Alternaria japonica* Causing Black Spot of Turnip in Spain. **Plant Disease**, St. Paul, v. 97, n. 11, p.1505-1505, 2013.

BERGAMASCHI, H. Fenologia. In: **Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia: Disciplinas de Graduação Relações Clima Planta**. Porto Alegre: UFRGS. Disponível em <<http://www.ufrgs.br/agropfagrom/disciplinas/502/fenolog.doc>>. Acesso em: 28 jul. 2012.

BOITEUX, L. S.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. *Alternaria alternata* como agente causal de lesões foliares em batata (*Solanum tuberosum*) no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília. v.18, p.454-457, 1993.

BORBA, C. S. et al. Época de colheita, rendimento de grãos e qualidade das sementes de colza (*Brassica napus* L. var. oleifera Metzg.). **Agronomia Sulriograndense**, Porto Alegre, v.18, n.2, p.39-58, 1982.

BOTELHO, F. J. E. et al. Desempenho fisiológico de sementes de feijão colhidas em diferentes períodos do desenvolvimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 900-907, 2010.

BRAGA JÚNIOR, J. M. **Maturação, qualidade fisiológica e testes de vigor em sementes de mamona**. 2009. 62 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2009.

BRACCINI, A. L. et al. Germinação e sanidade de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) colhidas em diferentes épocas. **Acta Scientiarum - Agronomy**, Maringá, v. 22, p. 1017-1022, 2008.

BRASIL, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

BRAZAUSKIENE, I.; PETRAITIENE, E. Effects of fungicide application timing on the incidence and severity of *Alternaria* blight (*Alternaria brassicae*) and on the productivity of spring oilseed rape (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera* annua Metzg.). **Agronomy Research**, Estonia, v. 2, n. 2, p. 121-133, 2004.

BRAZAUSKIENE, I.; PETRAITIENE, E. The occurrence of *Alternaria* blight (*Alternaria* spp.) and *Phoma stem canker* (*Phoma lingam*) on oilseed rape in Central Lithuania and pathogenic fungi on harvested seed. **Journal of Plant Protection Research**, Poznań, v. 46, n. 3, p. 295-311, 2006.

BULAJIĆ, A. et al. The presence of *Alternaria* spp. on the seed of Apiaceae plants and their influence on seed emergence. **Archives of Biological Sciences**, Belgrade, v. 61, n. 4, p. 871-881, 2009.

BURGESS, D. R.; BRETAG, T.; KEANE, P. J. Seed-to-seedling transmission of *Botrytis cinerea* in chickpea and disinfestation of seed with moist heat. **Animal Production Science**, Queensland, v. 37, n. 2, p. 223-229, 1997.

CARDOSO et al. **Doenças de canola no Paraná**. Londrina: IAPAR; Cascavel: COODETEC, 1996. 28 p. (Boletim técnico, IAPAR 51; Boletim técnico, COODETEC, 34).

CARDOSO, R. M. L.; LEITE, R. M. V. B. C.; BARBOSA, C. J. Doenças de canola (*Brassica napus* e *B. campestris*). In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p. 197-208.

CARNEIRO, Solange Monteiro de Toledo Pizza et al. Occurrence of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. in *Carthamus tinctorius* L., in the Paraná state. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 2, p. 163-165, 2012.

CARRARO, I. M.; BEGO, A.; ROCHA, A. Efeito do retardamento da colheita sobre a qualidade de sementes de soja em Palotina PR. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.7, n.3, p.123-132, 1985.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590 p.

CHELLEMI, D. O.; MUELLER, D. A new *Alternaria* leaf blight disease on tomato in North Florida. **Plant Disease**, St. Paul. v.79, p.426. 1995.

CHRIST, D.; CORRÊA, P. C.; ALVARENGA, E. M. Efeito da temperatura e da umidade relativa do ar de secagem sobre a qualidade fisiológica de sementes de canola (*Brassica napus* L. var. oleifera Metzg.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 150-154, 1997.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC. Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. 10. Ed. Porto Alegre, 2004. 404 p.

CORDEIRO, L. A. M. **Avaliação de características agronômicas e qualidade de sementes de canola (*Brassica napus* L. var. oleifera) cultivada em Viçosa-MG**. 1997. 103 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

CORDEIRO, L. A. M., REIS, M. S., ALVARENGA, E. S. A Cultura da Canola. 1º ed. Viçosa: UFV, 1999. 50 p.

COSTA, L. M. et al. Qualidade dos frutos de crambe durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 34, n. 2, 2012.

DA SILVA, J. A. G. et al. Dessecação em pré-colheita como estratégia de manejo na redução de perdas por fatores de ambiente em canola. **Current Agricultural Science and Technology**, Pelotas, v. 17, n. 1, p. 15-24, 2011.

DAEBELER, F. D.; RIEDEL, A.; RIEDEL, V. **Wissenschaftliche zeitschrift der wilhelm pieck-universitat rostock naturwissenschaftliche reiche**, Berlin: Der Rektore der Wilhelm Pieck Universität Rostock, v. 35. 1986. 52 p.

DE SOUZA, A. D. V. et al. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-mansão, nabo-forrageiro e crambe. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 44, n. 10, p. 1328-1335, 2009.

DHINGRA, O. D, SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. Boca Raton FL. Lewis Publishers. 1995.

DIAS, J. C. A. **Canola/colza: alternativa de inverno com perspectiva de produção de óleo comestível e energético**. Pelotas: Embrapa-CPATB, 1992. 46 p. (Boletim de Pesquisa, 3).

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.1, 13-15, 1991.

DUCZEK, L. J. et al. Effect of swathing on alternaria black spot in *Brassica rapa* canola in Saskatchewan. **Canadian journal of plant science**, Ottawa, v. 79, n. 2, p. 299-302, 1999.

ELIAS, S. G.; COPELAND, L. O. Physiological and harvest maturity of canola in relation to seed quality. **Agronomy journal**, Madison, v. 93, n. 5, p. 1054-1058, 2001.

EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa solos, 1999. 412 p.

FALEIRO, F. G. et al. Uso de marcadores RAPD na classificação de isolados de *Phytophthora* spp. causadores da podridão parda do cacauero no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, 2003.

FEI, H. et al. Metabolic and hormonal processes associated with the induction of secondary dormancy in *Brassica napus* seeds. **Botany**, Ottawa, v. 87, n. 6, p. 585-596, 2009.

FERNANDES, M.R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo – RS: EMATER – CNPT, 1993. 128p.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1984. 39 p.

FREITAS, R. A.; NASCIMENTO, W. M.; COIMBRA, K. G. Maturação e qualidade de sementes de repolho de verão sob condições tropicais. **Horticultura brasileira**, Brasília, v. 25, n. 4, p. 586-589, 2007.

GALLI, J. A.; PANIZZI, R. C.; VIEIRA, R. D. Efeito de *Colletotrichum dematium* var. truncata e *Phomopsis sojae* na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 40-46, 2007.

GARCÍA, E. R. **Manual de producción canola**. Puebla: Secretaria de Desarrollo Rural del Estado de Puebla, 2007. Disponível em: <<http://www.sdr.gob.mx/Contenido/Cadenas%20Productivas/DOCUMENTOS%20CADENAS%20AGROPECUARIAS/agricolas/CANOLA/MANUAL%20DE%20PRODUCCION%20CANOLA.htm>>. Acesso em: 15 nov. 2013.

GARIBALDI, A. et al. First Report of Leaf Spot of Wild (*Diplotaxis tenuifolia*) and Cultivated (*Eruca vesicaria*) Rocket Caused by *Alternaria japonica* in Italy. **Plant Disease**, St. Paul, v. 95, n. 10, p. 1316-1316, 2011.

GHASSEMI GOLEZANI, K. et al. Development of seed physiological quality in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) cultivars. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, Cluj-Napoca, v. 39, n. 1, p. 208-212, 2011.

GOODWIN, M. Three potential sources for increased canola oil production in the Canadian prairies to meet the needs of biodiesel demand. **Canola council of Canada**, Winnipeg, maio 2006. Disponível em: <<http://www.canolacouncil.org/media/509070.prairies.biodiesel.demand.may.2006.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2012.

GOMES, J. L. L.; DHINGRA, O. D. *Alternaria alternata* - A serious pathogen of white colored snap bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.8, p.173-177. 1983.

HALLI, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARAKAVA. R. Isolados de *Alternaria* [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <harakava@biologico.sp.gov.br> em 16 jan. 2013.

HELDWEIN, A. B.; BURIOL, G. A.; STRECK, N. A. O clima de Santa Maria. **Ciência & Ambiente**, n. 38, p. 43-58, 2009.

HENNING, F. A. et al. Qualidade sanitária de sementes de milho em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 316-321, 2011.

HENRIQUE, D. F., et al. Inoculação de *Alternaria alternata* em sementes de melão através da restrição hídrica. In: Congresso brasileiro de olericultura, 48., 2008, Maringá. **Anais...** Maringá: Associação Brasileira de Horticultura. 2008. 1CDROM.

HODGKINS, T.; MACDONALD, M. V. The effect of a phytotoxin from *Alternaria Brassicicola* on Brassica pollen. **The New Phytologist**, Oxford, v. 104, p. 631-636, 1986.

HUANG, D. et al. MicroRNAs and their putative targets in *Brassica napus* seed maturation. **BMC genomics**, London, v. 14, n. 1, p. 140, 2013.

IRIARTE, L. B.; VALETTI, O. E. **Cutivo da colza**. Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária - Inta, 2008. 156 p.

JAJOR, E.; WÓJTOWICZ, M.; PIECZUL, K. Effect of hydrothermal terms and timing of fungicide protection on the incidence of fungi of the genus *Alternaria* rape. **Progress in Plant Protection**, Poznań, v. 48, n. 3, p. 1048-1054, 2008.

JAJOR, E.; KOZLOWSKA, M.; WOJTOWICZ, M. Prevalence of fungi of the genus *Alternaria* on rape siliques and seeds depending on weather conditions. **Progress in Plant Protection**, Poznań, v. 52, n. 4, p. 1011-1015, 2012.

JAJOR, E.; HOROSZKIEWICZ JANKA, J.; WICKIEL, G. Influence of fungicide application on limitation of fungi on oilseed rape siliques and seeds. **Progress in Plant Protection**, Poznań, v. 53, n. 4, p. 768-773, 2013.

JUNGES, E. et al. Effect of priming and seed-coating when associated with *Bacillus subtilis* in maize seeds. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 44, n. 3, p. 520-526, 2013.

KRZYŻANOWSKI, F. C. et al. **A semente de soja como tecnologia e base para altas produtividades: série sementes**. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 8 p. (Circular técnica, 55).
KÖHL, J. et al. Epidemiology of dark leaf spot caused by *Alternaria brassicicola* and *A. brassicae* in organic seed production of cauliflower. **Plant Pathology**, Sutton Bonington, v. 59, n. 2, p. 358-367, 2010.

KUBOTA, Masaharu et al. Frequency of *Alternaria brassicicola* in commercial cabbage seeds in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 72, n. 4, p. 197-204, 2006.

LAZAROTTO, M. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de cedro e patogenicidade de *Rhizoctonia* spp.** 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2010.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, A. F. Detecção, transmissão, patogenicidade e controle químico de fungos em sementes de paineira (*Ceiba speciosa*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 2, p. 134-139, 2010.

LAZAROTTO, M. **Identificação e caracterização de *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. associado a *Carya illinoensis* no Rio Grande do Sul.** 2013. 156 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

LOGRIECO, A.; MORETTI, A.; SOLFRIZZO, M. *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. **World Mycotoxin Journal**, Wageningen, v. 2, n. 2, p. 129-140, 2009.

LUCCA FILHO, O. A. **Curso de tecnologia de sementes.** Brasília: ABEAS, 1995. 53p.

MACEDO, E. C.; GROTH, D.; SOAVE, J. Influência da embalagem e do armazenamento na qualidade sanitária de sementes de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 42-50, 2002.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações.** Brasília: Esal: Faepe, 1988. 107 p.

MACHADO, J. C. Patologia de sementes: significado e atribuições. In: CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção.** 5 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. cap. 15, p. 524 -590. 590 p.

MACIEL, C. G. ***Fusarium sambucinum* associado a sementes de *Pinus elliotti*: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle.** 2012. 93 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2012.

MAGUIRE, J. D. Spread of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MARCHIORI JUNIOR, O. et al. Qualidade e produtividade de sementes de canola (*Brassica napus*) após aplicação de dessecantes em pré-colheita. **Planta Daninha, Viçosa**, v. 20, p. 253-261, 2002.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas.** Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

MARINGONI, A. C. Doenças das crucíferas (brócolis, couve, couve-chinesa, couve-flor, rabanete, repolho e rúcula). In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia.** 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p. 197-208.

- MARINO, R. H. et al. Incidência de fungos em sementes de *Phaseolus vulgaris* L. provenientes do Estado de Sergipe. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 3, n. 1, p. 26-30, 2008.
- MARROCOS, S. T. P. et al. Maturação de sementes de abobrinha menina brasileira. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 2, p.272-278, 2011.
- MASETTO, T. E. et al. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de crambe produzidas no estado de mato grosso do sul. **Revista brasileira de oleaginosas e fibrosas**, Campina Grande, v. 13, n. 3, p. 107-113, 2009.
- MATHEUS, M. T.; LOPES, J. C.; CORRÊA, N. B. Maturação fisiológica de sementes de *Erythrina variegata* L. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 4, p. 619- 627, 2011.
- MEDINA, P. F.; TANAKA, M. A. S.; PARIS, J. J. Sobrevivência de fungos associados ao potencial fisiológico de sementes de triticale (*X. tritico-secale* Wittmack) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 4, p.017-026, 2009.
- MELLO, S. C. M. et al. Padrões isoenzimáticos e morfologia de isolados de *Alternaria* spp. patogênicos a *Senna obtusifolia*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 667-669, 2001.
- MENTEN, J. O. M. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. São Paulo: CibaAgro, 1995. 321 p.
- MERTZ, L. M.; HENNING, F. A.; ZIMMER, P. D. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 13-18, 2009.
- MICHEREFF, S. J. et al. Variabilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* no estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 656-663, 2003.
- MIGLIORINI, P. et al. Incidência e manejo de doenças em cultivares de canola (*Brassica napus* L. e *Brassica rapa* L.) produzidas na região Norte do Rio Grande do Sul. In: Jornada Acadêmica Integrada. 26º JAI, Santa Maria. **Anais eletrônicos...** Santa Maria: UFSM, 2011. Disponível em: < http://portal.ufsm.br/jai/anais/trabalhos/trabalho_1001218400.htm >. Acesso em: 10 nov. 2013.
- MIGLIORINI, P. et al. Qualidade sanitária de sementes de *Brassica napus* produzidas no estado do Paraná. In: XVI Simpósio de ensino, pesquisa e extensão, 2012, Santa Maria. **Anais eletrônicos...** Santa Maria: UNIFRA, 2012. Disponível em: <<http://www.unifra.br/eventos/sepe2012/Trabalhos/5616.pdf> >. Acesso em: 15 nov. 2013.

MUHAMMAD ISMAIL, S. A. A. et al. Seed-borne fungi associated with cauliflower seeds and their role in seed germination. **Pakistan Journal of Phytopathology**, Pakistan, v.24, p. 26-31, 2012.

MÜLLER, J. **Tratamento de sementes de melão e os efeitos sobre a qualidade sanitária e fisiológica**. 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

MUNIZ, M. F. B.; PORTO, M. D. M. Flutuação populacional e sobrevivência de *Alternaria* spp. em sementes de cenoura. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 449-453, 1998.

MUNIZ, M. F. B. et al. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de melão. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, n. 2, p. 144-149, 2004.

MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Transmissão de *Alternaria* spp. através de sementes de feijão e seu efeito sobre a qualidade fisiológica das sementes. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 4, p. 381-383, 2006.

MOREIRA, P. A. A. **Diversidade de isolados de *Alternaria brassicicola* (Schwn.) Wilt. de cultivos convencionais e orgânicos de brássicas de Pernambuco**. 2008. f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

MORI, C. de. **Cultura da canola: cenário e custos**. Passo Fundo, VI curso de capacitação e difusão de tecnologia na cultura da canola, 18 abr. 2013. Palestra.

MORRIS, P. F., CONNOLLY, M. S.; ST CLAIR, D. A. Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. **Mycological Research**, Manchester, v. 104, p. 286-292, 2000.

NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C.; ZUCARELI, C. Maturação, formas de secagem e qualidade fisiológica de sementes de mucuna-preta. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 27, n. 1, p. 45-53, 2005.

NAKADA, P. G. et al. Desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de pepino nos diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 113-122, 2011.

NAKADA, J. Teste de vigor baseados no desempenho das plântulas. In KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceito e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 2, p. 1-24. 218 p.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. v.2, London: Mc Millan Press. 1979. 1119 p.
NERY, M. C.; CARVALHO, M. L. M.; GUIMARÃES, R. M. Testes de vigor para avaliação da qualidade de sementes de nabo forrageiro. **Informativo Abrates**, Londrina, v. 19, n. 1, p. 9-20, 2009.

OLIVEIRA, G. P. **Maturação e qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) WALP.)**. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2008.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum anum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG, 1991.

PANOZZO, L. E. **Qualidade de sementes, características agronômicas e produtividade de híbridos de canola em diferentes épocas de semeadura e colheita em viçosa-MG**. 2012. 52 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

PEDROSO, D. C. et al. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Zinnia elegans* jacq. Colhidas em diferentes épocas. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 164-171, 2008.

PEDROSO, D. C. **Associação de *Alternaria* spp. com sementes de Apiáceas: métodos de inoculação e influência na qualidade fisiológica**. 2009. 121 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

PEDROSO, D. C. et al. Métodos de inoculação de *Alternaria alternata* e *A. dauci* em sementes de salsa e sua influência na qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 79-85, 2010.

PEIXOTO, A. R.; TORRES, S. B.; KARASAWA, M. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho produzidas no submédio São Francisco. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 12-15, 1998.

PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S., RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**: Brasília, v.31, n. 6, p. 572-578, 2006.

PERES, A. P. et al. Variabilidade morfofocultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n.5, p.1053-1062, 2003.

PESSOA, R. C. et al. Germinação e maturidade fisiológica de sementes de *Piptadenia viridiflora* (Kunth.) Benth relacionadas a estádios de frutificação e conservação pós-colheita. **Revista Árvore**, Viçosa, v.34, n.4, p.617-625, 2010.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985, 2ª. Ed. 289 p.

POPINIGIS, F.; PUIGNAU, J. P. Fatores que afetam a qualidade das sementes. In: PUIGNAU, J. P. **Diálogo XLV: Conservación de germoplasma vegetal**, Montevideo: IICA-PROCISUR, 1996. 166 p.

PULZ, P.; MASSOLA JR, N. S. Efeito de meios de cultura e fatores físicos no crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 2, p. 121-126, 2009.

RAMJEGATHESH, R.; EBENEZAR, E. G. Morphological and physiological characters of *Alternaria alternata* causing leaf blight disease of onion. **International Journal Plant Pathology**, v. 3, n. 2, p. 34-44, 2005.

RAYNER, R. W. **A mycological colour chart**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK. 1970. 34 p.

REIS, A.; BOITEUX, L. S. *Alternaria* species infecting brassicaceae in the Brazilian neotropics: geographical distribution, host range and specificity. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 92, n. 3, p. 661-668, 2010.

RIMMER S. R.; SHATTUCK V.I., BUCHWALDT I. 2007. **Compendium of Brassica Diseases**. St. Paul: APS Press. 2007. 117 p.

ROBERTS. E. H. Cytological, genetical, and metabolic changes associated with loss of viability. In: ROBERTS, E. H. **Viability of seeds**. London: Chapman and Hall, 1972. p. 253-306.

ROP, N. K.; KIPROP, E. K.; OCHUODHO, J. O. *Alternaria* species causing black spot disease of *Brassicacae* in Kenya. In: **African Crop Science Conference Proceedings**, EL-Minia, p. 635-640, 2009.

ROSSETTO, C. A. V.; NAKAGAWA, J.; ROSOLEM, C. A. Efeito da adubação potássica e da época de colheita na qualidade fisiológica de sementes de canola (*Brassica napus* L. var. oleifera Metzg.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 348-353, 1997.

ROSSETTO, C. A. V.; NAKAWA, J.; ROSOLEM, C. A. Efeito da adubação potássica e da época de colheita na produtividade de canola. **Revista brasileira de ciência do solo**, Viçosa, v. 22, n. 1, p. 87-94, 1998.

ROSSETTO, C. A. V.; NAKAGAWA, E. J. Qualidade fisiológica de sementes de canola (*Brassica napus* L.) var. oleifera Metzg. em função da coloração do tegumento, durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 31-37, 2000.

ROTEM, J. **The genus *Alternaria***: biology, epidemiology and pathogenicity. (2 Ed). St. Paul: APS Press, 1988. 326 p.

ROTEM, J. **The genus *Alternaria***. St. Paul: APS Press, 1995. 326 p.

RUDE, S. V.; DUCZEK, L. J.; SEIDLE, E. The effect of *Alternaria brassicae*, *Alternaria raphani* and *Alternaria alternata* on seed germination of *Brassica rapa* canola. **Seed science and technology**, Switzerland, v. 27, n. 2, p. 795-798, 1999.

SANTOS, A. et al. Disponibilidades hídricas do substrato na qualidade fisiológica de sementes de canola com diferentes teores de água. **Agrarian**, Dourados, v. 5, n. 18, p. 356-364, 2012.

SANTOS, A. F.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G. Transmissão de fungos por sementes de espécies florestais. **Floresta**, Curitiba: v.30, n.2, p. 119-128, 2000.

SALUSTIANO, M. E.; MACHADO, J. C.; PITTIS, J. E. Patogenicidade de *Alternaria helianthi* (Hansf.) e *Alternaria zinniae* (Pape) ao girassol a partir de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 27, n. 1, p. 138-143, 2005.

SCHROERS, H. J. et al. Taxonomy phylogeny of *Fusarium dimerum* sp. species group. **Mycologia**, [S.l.], v. 101, n.1, p. 44-70, 2009.

SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S. Caracterização de *Alternaria alternata*, degradador do fungicida carbendazim. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 621-626, 1997.

SEIDLE, E. et al. The effect of *Alternaria* blackspot of canola on seed quality and seed yield, and studies on disease control. **Agriculture Development Fund**, Saskatoon, p 41-41, 1995.

SHAHDA, W. T.; AL-RAMA, A. N. A. N.; RAGEH, S. A. *Damping off of some cucurbitaceous crops in Saudi Arabia with reference to control methods*. **Journal of Phytopathology**, Hamburg. v.143, p. 59-63, 1995.

SHRESTHA, S. K.; MUNK, L.; MATHUR, S. B. Role of weather on *Alternaria* leaf blight disease and its effect on yield and yield Components of Mustard. **Nepal Agricultural Research Journal**, Nepal, v. 6, p. 62-72, 2005.

SILVA, E. M. N. Determinação de umidade. In: PIÑA RODRIGUES, F. C. M. **Manual de análise de sementes florestais**. Campinas: Fundação Cargill, 1988. p. 60-69.

SIMON, J. Canola seed yield in relation to harvest method. In: JAWORSKI, C. A.; PHAKAK, S. O.; JANICK, J. **Second national symposium on new crops: exploration, research and commercialization**. Indiana: Marcel Dekker, 1993. p. 300-301.

SIMMONS, E. G. **Alternaria: an identification manual**. Netherlands: CBS Fungal Biodiversity Centre, 2007. 775 p.

SOFIATTI, V.; SCHUCH, L. O. B. Efeito de regulador de crescimento e controle químico de doenças na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.27, n.2, p.102-110, 2005.

STATSOFT. Statistica 7.0. Disponível m: www.statsoft.com>. 2004. Acesso em: 15 jan. 2014.

STRECK, N. A. B. et al. Duração do ciclo de desenvolvimento de cultivares de arroz em função da emissão de folhas no colmo principal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p 1086-1093, 2006.

SZOPÍŃSKA, D.; TYLKOWSKA, K.; STACH, A. Relationships between seed development stage, germination, occurrence and location of fungi in oilseed rape (*Brassica napus* spp. oleifera L.) seeds and the presence of *Alternaria* and *Cladosporium* spp. spores in the air. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, Poznań, v. 10, n. 4, 2007.

TAMURA, K. et al. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology Evolution**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

TANAKA, M. Sobrevivência de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho mantidas em duas condições de armazenamento. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 60-64, 2001.

TEKRONY, D. M. et al. Effect of date of harvest maturity on soybean seed quality and *Phomopsis* sp. seed infection. **Crop Science**, Madison, v.24, n.1, p.189-193, 1984.

TELÓ, G. M. et al. Aplicação de fungicida em plantas de arroz irrigado e seu efeito na qualidade de sementes durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 156-164, 2012.

THOMAS, P. **Canola grower's manual**. Winnipeg: Canola Council of Canada, 2003. Disponível em: <http://www.canolacouncil.org/canola_growers_manual.aspx>. Acesso em: 03 nov. 2013.

THOMPSON, J. D. et al. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

TIGANO, M. S.; ALJANABI, S.; MELLO, S. Corrêa Marques de. Genetic variability of Brazilian *Alternaria* spp. isolates as revealed by RAPD analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 117-119, 2003.

TOHYAMA, A.; TSUDA, M. *Alternaria* on cruciferous plants. 4. *Alternaria* species on seed of some cruciferous crops and their pathogenicity. **Mycoscience**, Ibaraki, v. 36, n. 3, p. 257-261, 1995.

TOLEDO, M. Z. et al. Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de feijão em função da aplicação tardia de nitrogênio em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 39, n. 2, p. 124-133, 2009.

TOMM, G. O. **Indicativos tecnológicos para produção de canola no Rio Grande do Sul**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007 32 p. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/canola/p_sp03_2007.pdf>. Acesso em 05 jun. 2012.

TOMM, G. O. et al. **Tecnologia para produção de canola no Rio Grande do Sul**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009a. 88 p. (Documentos, 92).

TOMM, G. O. et al. **Panorama atual e indicações para aumento de eficiência da produção de canola no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009b. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do118.htm>. Acesso em: 11 nov. 2013.

TUNES, L. M. et al. Armazenabilidade de sementes de cevada colhidas em diferentes épocas. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 3, 2010.

VERMA, P. R.; SAHARAN, G. S. **Monograph on Alternaria diseases of crucifers**. Saskatoon: Minister of Supply and Services Canada. 1994. 162 p.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F.C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 4.1- 4.26.

VIEIRA, R. D. et al. Condutividade elétrica e teor de água inicial das sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1333-1338, 2002.

WILKINSON, J.; CASTELLI, P. G. A Transnacionalização da indústria de sementes no Brasil: biotecnologias, patentes e biodiversidade. Rio de Janeiro, Action Aid: Rio de Janeiro, 2000. Disponível em: <<http://antigo.aspta.org.br/politicas-publicas/biodiversidade/A%20transnacionalizacao%20da%20industria%20de%20sementes%20no%20Brasil.pdf>>. Acesso em: 05 maio 2012.

WOUDENBERG, J. H. C. et al. *Alternaria* redefined. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 75, p. 171 -212, 2013.

ANEXOS

Anexo A – Análise de solo

	MEC - Universidade Federal de Santa Maria Centro de Ciências Rurais - Departamento de Solos	
	Santa Maria/RS Cep: 97105-900 Fone/Fax: (55)3220-8153 http://www.ufsm.br/solos	
Laudo de Análise de Solo		

Nome: PESQUISA UFSM
 Município: SANTA MARIA
 Localidade:

Solicitante: MARLOVE MUNIZ
 Endereço: CAMPUS
 Entrada: 28/05/12

Emissão: 19/06/2012

Registro	Cx.	Cel.	Identificação da amostra	Área (ha)	Sistema de cultivo	Prof. (cm)	Georref.
11461	C206	9					

Diagnóstico para acidez do solo e calagem

Registro	pH água 1:1	Ca	Mg	Al	H+Al	CTC efet.	Saturação (%)		Índice SMP
		cmol./dm ³					Al	Bases	
11461	5,0	5,9	2,3	0,5	6,2	9,2	5,4	58,3	5,7


Diagnóstico para macronutrientes e recomendação de adubação NPK-S

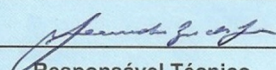
Registro	% MO	% Argila	Textura	S	P-Mehlich	P-resina	K	CTC pH7	K
	m/v			mg/dm ³			cmol./dm ³		mg/dm ³
11461	3,1	23,0	3,0	12,0	23,8	--X--	0,491	14,9	192,0

Diagnóstico para micronutrientes e relações molares

Registro	Cu	Zn	B	Fe	Mn	Na	Relações Molares		
	mg/dm ³						Ca/Mg	(Ca+Mg)/K	K/(Ca+Mg) ^{1/2}
11461	0,5	0,9	0,2	--X--	--X--	--X--	2,5	16,70	0,171

Vinculado à ROLAS-RS/SC
 S


PESQUISA
 ESTE LAUDO NÃO VALE
 FINANCIAMENTO BANCÁRIO


 Responsável Técnico
 Eng. Agr. Leandro Souza da Silva
 CREA: 83495

Anexo B – Descrição dos meios de cultura utilizados no trabalho

Meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

- 200 g de batatas descascadas e fatiadas;
- 20 g dextrose;
- 15 g de ágar;
- 1 L de água destilada;
- 0,05 mg de estreptomicina/100 mL de meio de cultura;

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Basic Plant Pathology Methods. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.

Meio de cultura Ágar-Água (AA)

- 17 g de Ágar;
- 1 L de água destilada.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Basic Plant Pathology Methods. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.

Meio de cultura V8-Ágar (V8)

- 170 mL de suco de vegetais V8;
- 20 g de Ágar;
- 1,5 g CaCO₃;
- 1 L de água destilada.

MILLER, P. M. V-8 juice agar as a general-purpose media for fungi and bactéria. Phytopathology, St. Paul, v.45, p. 461-462, 1995.

Anexo C – E-mail

De: Ricardo Harakava <harakava@biologico.sp.gov.br>
Enviado em: segunda-feira, 20 de dezembro de 2013 12:06 p.m.
Para: Patricia Migliorini
CC: <pati.migliorini@gmail.com>
Assunto: Isolados de Alternaria

Olá Patrícia,

Abaixo vão as informações para sua dissertação

Abs,

Ricardo

Os oligonucleotídeos iniciadores para o gene do fator de alongação (EF) foram EF-F (5' – GTYGTYATYGGYCACGTYGAYTC– 3') e EF-R (5' – ACRGCRACRGTYTGNCGCAT– 3') (desenvolvidos por Harakava)

----Mensagem original----

De: Patricia Migliorini
Enviada em: segunda-feira, 20 de dezembro de 2013 10:37 a.m
Para: Ricardo Harakava
CC: <harakava@biologico.sp.gov.br>
Assunto: Isolados de Alternaria

Bom dia Sr. Ricardo

Conversei com a minha orientadora, e ela sugeriu que eu pedisse para que o sr. me mandasse as sequências de nucleotídeos da região EF, para a confecção do dendrograma. Além disso me envie o nome dos primers que foram utilizados nas reações de PCR, pois preciso colocar no material e métodos.

No aguardo,

Grata, Patricia