

Métodos de inoculação artificial de *Alternaria alternata* em sementes de canola

Paulo Roberto Khun¹, Stela Maris Kulczynski², Cristiano Bellé³, Rodrigo Ferraz Ramos⁴, Marcia Gabriel⁵

¹ Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Mondaí, Santa Catarina, Brasil.
E-mail: paulokuhn@epagri.sc.gov.br

² Departamento de Ciências Agronômicas e Ambientais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul, Brasil.
E-mail: stelamk@terra.com.br

³ Departamento de Solos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.
E-mail: crbelle@gmail.com

⁴ Departamento de Solos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.
E-mail: rodrigoferrazramos@gmail.com

⁵ Departamento de Defesa Fitossanitária Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.
E-mail: gabriel.marcia@gmail.com

Submetido em: 15 ago. 2019. Aceito: 11 out. 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.21674/2448-0479.61.20-28>

Resumo

Como alternativa aos métodos tradicionais e baseada no princípio de controle de germinação, a inoculação sobre meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), utilizando a técnica de restrição hídrica, tem sido também empregada na promoção de infecção de sementes com fungos fitopatogênicos. O objetivo deste trabalho foi de avaliar diferentes métodos de inoculação artificial de *Alternaria alternata* em sementes de canola (*Brassica napus*). Os métodos de inoculação artificial basearam-se em método de suspensão de conídios por 30 minutos, contato das sementes com a colônia fúngica em BDA sem restrição hídrica e o método da restrição hídrica em meio BDA com períodos de inoculação de 24, 48, 72 e 96 horas. O percentual germinativo das sementes foi inversamente proporcional à colonização de *Alternaria alternata* nas mesmas. O método de restrição hídrica com os diferentes períodos de inoculação foi o que proporcionou maior incidência de *Alternaria alternata* nas sementes de canola consequentemente, apresentaram o menor vigor. A inoculação das sementes por meio da técnica de restrição hídrica possibilitou a obtenção de sementes com níveis diferenciados de infecção. Os maiores índices de doença nas sementes de canola inoculadas artificialmente foram alcançados em potencial hídrico modificado.

Palavras-chave: *Brassica napus*. Restrição hídrica. Germinação. Vigor. Patologia de sementes.

Abstract

Artificial inoculation methods of *Alternaria alternata* in canola seeds

As an alternative to the traditional methods based on the principle and control germination, inoculation of the culture medium potato dextrose agar (PDA), using the technique of water restriction, has also been employed in the promotion of seed infection with phytopathogenic fungi. The objective of this study was to evaluate different methods of artificial inoculation of *Alternaria alternata* in canola seeds (*Brassica napus*). The techniques of artificial inoculation were based on exposition of canola seeds in spore suspension for 30 minutes, exposition of seeds with fungal colony on PDA without water restriction and with water restriction in PDA medium com inoculation periods of 24, 48, 72 and 96 hours. The percentage of seed germination was inversely proportional to the colonization of *Alternaria alternate*. The water restriction technique with different periods of inoculation promoted the highest incidence of *Alternaria alternata* in canola seeds consequently, showing less force. Inoculation of seeds by water restriction technique allowed obtaining canola seeds with different levels of infection. The highest rates of disease were achieved in canola seeds inoculated artificially in modified water potential.

Keywords: *Brassica napus*. Fluid restriction. Germination. Vigor. Seed pathology

Introdução

A canola (*Brassica napus*) é uma espécie oleaginosa, da família das crucíferas, com grande incorporação nos sistemas de produção de grãos do Sul do Brasil (ESTEVEZ *et al.*, 2014). A expansão da cultura da canola pode ser prejudicada, entre outros fatores, pela presença de doenças principalmente causadas por fungos. Entre as doenças fúngicas que ocorrem na cultura da canola estão a canela estão a canela-preta (*Phoma lingam*), oídio (*Erysiphe polygoni*), podridão-branca-da-haste (*Sclerotinia sclerotiorum*) e mancha-de-alaternaria (*Alternaria* spp.). A mancha de alternaria (*Alternaria brassicae*, *Alternaria raphani* e *Alternaria alternata*) pode causar em plântulas o “damping off” e a necrose em cotilédones e hipocótilos, afetando o desenvolvimento. Restos culturais são fontes de disseminação de *Alternaria* spp., principalmente sob altas temperaturas e alta umidade relativa do ar. Sementes precocemente infectadas podem ser destruídas ou tornarem-se chochas e na fase de maturação fisiológica, transportarem micélios e esporos destes fungos (CARDOSO *et al.*, 1996; ESTEVEZ *et al.*, 2014).

Em diversos estudos com a maioria dos fungos, a inoculação de sementes tem sido tradicionalmente realizada por meio do método da embebição das mesmas em suspensão de conídios e em contato direto com as colônias. Como alternativa aos métodos tradicionais e baseada no princípio de controle de germinação, a inoculação sobre meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), utilizando a técnica de restrição hídrica, tem sido também empregada na promoção de infecção de sementes com fungos fitopatogênicos (MACHADO *et al.*, 2001; JUNGES *et al.*, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2016; BERTAGNOLLI *et al.*, 2017).

O condicionamento osmótico visa possibilitar o contato das sementes com substrato úmido por períodos de tempo mais prolongados, postula-se que esta tecnologia pode ser aplicada com eficácia na inoculação de *A. alternata* em sementes de canola. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de diferentes métodos de inoculação artificial de *A. alternata* em sementes de canola.

Material e Métodos

Para o crescimento micelial de *A. alternata* em meio de cultura osmoticamente modificado, o fungo foi isolado de hastes de plantas de canola com sintomas da doença, sendo as culturas puras do patógeno mantidas em meio artificial BDA (batata-dextrose-ágar) sob temperatura de 25°C (BOD) com um fotoperíodo de 12 horas, durante 14 dias para crescimento micelial e esporulação.

O meio agarizado osmoticamente modificado com restrição hídrica foi preparado pela adição dos solutos de cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl) e Manitol ao BDA na proporção de 0,0; -0,8; -1,0 e -1,2 MPa. Após a adição dos solutos em cada concentração ao meio BDA, este foi autoclavado e vertido na proporção de 20 mL por placa de *Petri*.

Para avaliação da influência dos restritores hídricos sobre o desenvolvimento de *A. alternata* foi realizada a transferência de um disco de 13,65 mm de diâmetro da colônia pura do fungo para o centro de cada placa. As avaliações foram realizadas a cada 24 h, medindo-se no verso de cada placa o crescimento micelial do fungo em cada tratamento, até que a colônia ocupasse toda placa. O índice de crescimento micelial (ICM), foi determinado seguindo-se a fórmula proposta por Oliveira (1991).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (restritor x potencial osmótico) com seis repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste F, a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

Para avaliação de métodos de inoculação artificial de *A. alternata* em sementes de canola. O meio agarizado osmoticamente modificado foi preparado com o restritor que melhor expressou o crescimento micelial de *A. alternata*, no experimento I. As sementes de canola (cultivar Hyola 61) foram previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio (NaClO) a 1% durante um minuto e, em seguida, lavadas em água esterilizada e secas ao ar, sob papel toalha. Foram realizados os seguintes métodos de inoculação artificial:

Método da suspensão de conídios por 30 minutos: a suspensão de conídios foi formada a partir da cultura pura do fungo *A. alternata*. As suspensões foram calibradas para a concentração de 10^8 conídios.mL⁻¹. Após, as sementes de canola, previamente desinfestadas, foram imersas na suspensão de conídios por 30 min, e colocadas para secar sobre papel toalha esterilizado.

Método de contato das sementes com a colônia fúngica em BDA sem restrição hídrica: as sementes de canola foram colocadas na placa de *Petri*, em camada simples, diretamente sobre o crescimento micelial das colônias puras de *A. alternata*, e mantidas em contato por 24 h.

Método da restrição hídrica: o meio agarizado osmoticamente modificado com restrição hídrica foi preparado pela adição do soluto NaCl ao BDA na proporção de -0,8 MPa. O fungo *A. alternata* foi inoculado no meio com restrição hídrica, sendo as placas incubadas em BOD, com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h, por 14 dias. Após o término do período de incubação foram colocadas as sementes de canola sobre a colônia fúngica e incubadas novamente por três períodos de tempo diferentes: 24, 48, 72 e 96 h. E como testemunha foram utilizadas sementes de canola livres de patógenos.

A eficiência da metodologia de inoculação de *A. alternata* em sementes de canola utilizando-se os diferentes métodos de inoculação artificial foi avaliada considerando os parâmetros:

Teste de germinação e primeira contagem da germinação: conduzido com quatro repetições de 100 sementes, previamente inoculadas, colocadas sobre substrato de papel germitest umedecido com 2,5 vezes o seu peso com água destilada, colocadas no germinador regulado com temperatura constante de $25 (\pm 2)^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar variando entre 80-85%, com fotoperíodo de 12 h. As contagens foram realizadas aos 4 e aos 7 dias após a semeadura (Brasil 2009). Foram determinadas as porcentagens de plântulas normais, anormais e sementes mortas. O teste de primeira contagem de germinação foi realizado conjuntamente com o teste de germinação sendo avaliado o número de plântulas normais aos 4 dias após a semeadura.

Comprimento de plântula: foram utilizadas quatro repetições de 10 plântulas normais escolhidas ao acaso, e medidas a parte aérea e a raiz com o auxílio de uma régua graduada. Este teste foi realizado aos sete dias, conjuntamente com o teste de germinação e aos 21 dias, em campo, conjuntamente com o teste de emergência.

Índice de velocidade de emergência: foi realizado a partir da semeadura de quatro repetições de 100 sementes inoculadas, por tratamento em bandejas plásticas de 10 kg, contendo uma mistura de areia e solo, na proporção de 1:1, previamente esterilizados. As sementes foram colocadas em sulcos abertos e cobertas com uma fina camada da mistura de areia e solo, computando-se diariamente, a partir do início da emergência, o número de plântulas que atingiram o cotilédone exposto acima do solo, até que o processo se estabilizasse. O cálculo do índice de velocidade de emergência foi realizado através da fórmula Maguire (1962).

Emergência de plântulas a campo: conduzido juntamente com o índice de velocidade de emergência. As avaliações foram realizadas aos 7 e aos 21 dias após a semeadura, determinando-se as porcentagens de emergência de plântulas normais.

Índice de doença: o índice de doença (ID) foi obtido segundo a escala de McKinney (1925). Este índice foi calculado com base na escala de notas de infecção, aplicando-se a fórmula: $ID = (f.n)100 / F.N$, sendo: ID = índice de doença; f = número de plântulas em cada nota da escala; n = grau de infecção da escala; F = número total de plantas inoculadas; N = grau máximo de infecção.

Teste de sanidade: a sanidade das sementes foi determinada pelo “*Blotter test*” (Machado 1988). Para tanto, 4 repetições de 100 sementes foram acondicionadas em caixas gerbox, contendo três folhas de papel germitest previamente umedecidas em água deionizada e esterilizada. A seguir as caixas foram incubadas por sete dias à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 12 h. As sementes foram examinadas sob microscópio estereoscópico, sendo o resultado expresso em porcentagem de sementes com ocorrência de *A. alternata*.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com seis repetições. Os dados obtidos em cada teste foram submetidos à análise de variância e ao teste *F*, a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

Resultados e Discussões

Os resultados referentes aos índices de crescimento micelial de *A. alternata* em meio BDA modificado com NaCl, KCl e manitol, nos potenciais testados, interferiram no crescimento micelial de *A. alternata*. Constataram-se diferenças estatísticas significativas entre os restritores, no entanto, apenas nos tratamentos com maior potencial osmótico, onde os restritores Manitol, nos potenciais -1,0 e -1,2 MPa, e KCl, no potencial -1,0 MPa, reduziram o crescimento micelial do fungo (Tabela 1). O maior crescimento fúngico foi observado no meio modificado com o restritor NaCl, no potencial -0,8 MPa. Este fato concorda com resultados

verificados por Machado et al (2001) em relação ao crescimento reduzido de *Colletotrichum acremonium*, nos potenciais osmóticos de -1,0 e -1,2 MPa.

Tabela 1 – Crescimento micelial (mm) de *Alternaria alternata* em meio agarizado (BDA) osmoticamente modificado pelas soluções de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl) e Manitol, sob diferentes potenciais osmóticos.

Restritor	Potencial osmótico (Mpa)			
	0,0	- 0,8	- 1,0	-1,2
NaCl	B 9,45 a*	A 10,66 a	AB 10,18 a	AB 10,16 a
KCl	B 9,41 a	A 10,54 a	AB 10,39 b	AB 10,43 a
Manitol	A 9,38 a	A 9,84 a	B 7,77 b	B 7,71 b
CV (%)	6,64			

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (0,05).

Resultados diferentes ao encontrado no presente estudo, foram obtidos por Carvalho et al. (2009) ao estudarem o efeito da adição de NaCl e manitol ao meio BDA com potenciais osmóticos de -0,4; -0,6; -0,8; -1,0 e 1,2 MPa, no crescimento micelial de *A. radicina*, os autores observaram que a redução do potencial osmótico, induzida por manitol e pela mistura de manitol e NaCl, nos potenciais -1,0 e -1,2, resultou no aumento do índice de crescimento micelial (ICM). Os solutos utilizados proporcionaram maior ICM em relação ao tratamento testemunha (BDA) em todos os potenciais osmóticos testados.

Carvalho et al. (2001) observaram que colônias de *Colletotrichum lindemuthianum* apresentam um maior diâmetro médio em BDA modificado osmoticamente com manitol, até o nível de restrição de - 0,6 MPa, tendendo ao declínio em potenciais hídricos mais negativos até a restrição de 1,0 MPa. Já Farias et al. (2009) observaram que a adição de NaCl, produzindo níveis negativos de potencial hídrico, não promoveu um maior estímulo ao crescimento de *Bipolaris sorokiniana* em comparação a testemunha (sem restrição hídrica), enquanto que a adição de maior quantidade de sacarose e KCl estimulou o maior crescimento das colônias até os níveis testados (0,0; - 0,4; - 0,6 e - 0,8 MPa), exceto para a sacarose, onde o pico de crescimento da colônia, ocorreu no nível de restrição de - 0,6 MPa, com queda no nível - 0,8 MPa.

Considerando-se os diferentes potenciais osmóticos de cada restritor (Tabela 1) verifica-se que para o restritor NaCl, a dose de - 0,8 Mpa foi a que resultou em um maior crescimento micelial com um diâmetro de 10,66 mm, diferindo estatisticamente da dose 0 (testemunha) com 9,41 mm, porém, não diferindo dos demais tratamentos. O restritor KCl, também no mesmo potencial (-0,8 MPa) proporcionou o maior crescimento micelial (10,54 mm) diferindo da testemunha (9,41 mm) (Tabela 1). Para o restritor Manitol, a concentração de - 0,8 MPa resultou em um crescimento micelial de 9,84 mm, não diferindo da testemunha (9,41 mm), porém houve diferença estatística quando comparado com os demais tratamentos que expressaram menores diâmetros de crescimento micelial (Tabela 1).

No entanto, em trabalhos com *Ascochyta paspali* (MORLEY et al., 1993), *A. alternata* e *Botrytis cinerea* (ALAM et al., 1996), verificou-se que o uso de manitol para alterar o potencial hídrico do substrato proporcionou um aumento no diâmetro micelial dos fungos. A partir de potenciais osmóticos muito negativos pode ocorrer o efeito negativo direto da restrição hídrica no crescimento dos fungos, sendo a faixa de inibição variável entre as espécies de fungos (ALAM et al., 1996).

O maior estímulo ao crescimento fúngico obtido com a adição de NaCl pode estar relacionado a permeabilidade seletiva da membrana, associado à compatibilidade ou toxidez de solutos adicionados no substrato, pode influenciar o crescimento diferenciado de fungos a diferentes solutos osmóticos (DUNIWAY, 1979).

Em relação aos resultados referentes à interferência dos diferentes métodos de inoculação de *A. alternata* sobre a germinação das sementes de canola, verifica-se que esta, foi inversamente proporcional a contaminação de *A. alternata* expressa pelo alto índice de doença observado nas sementes submetidas ao meio agarizado modificado osmoticamente, com maiores períodos de exposição (Tabela 2). Quando Costa et al. (2003) estudaram o efeito do uso da restrição hídrica na inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro, também observaram que a germinação das sementes foi menor naquelas que permaneceram inoculadas por mais tempo em meio modificado osmoticamente.

Tabela 2 – Porcentagens médias de germinação (plântulas normais, anormais e sementes mortas), de sementes de canola (*Brassica napus*), cultivar Hyola 61 submetidas a diferentes métodos de inoculação artificial de *Alternaria alternata*.

Tratamentos	Germinação (%)		
	Normais	Anormais	Mortas
Testemunha	96,00 a*	2,50 b	1,50 b
Suspensão de conídios	66,50 bc	22,50 a	11,00 b
BDA sem restritor hídrico	75,50 b	20,50 a	4,00 b
BDA+NaCl /-0,8MPa/24horas	86,50 a	15,50 a	13,00 b
BDA+NaCl /-0,8MPa/48horas	15,50 c	12,50 a	77,00 a
BDA+NaCl /-0,8MPa/72horas	0,50 c	0,50 b	97,00 a
BDA+NaCl /-0,8MPa/96horas	0,50 c	0,00 b	99,50 a
CV (%)	19,26	21,71	19,29

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (0,05).

No presente estudo verificou-se também que a associação do fungo *A. alternata* às sementes de canola, independente do método de inoculação, proporcionaram o maior número de plântulas anormais e sementes mortas em relação a testemunha (sem inoculação) (Tabela 2). O alto índice do patógeno associado às sementes de canola, nos tratamentos com o meio modificado osmoticamente e com maior período de contato com o fungo (48, 72 e 96 h), ocasionaram maior número de sementes mortas, justificando o número reduzido de plântulas normais e anormais. Isto provavelmente se deve ao fato destes métodos proporcionaram além de infestação, também infecção (Tabela 2).

Ávila *et al.* (2007) ao estudarem o efeito da restrição hídrica induzida por manitol em sementes de canola, observaram que ocorreu redução na porcentagem de germinação das sementes à medida que o potencial osmótico foi diminuindo. Observaram também, que os valores de germinação apresentaram-se satisfatórios, quando as sementes foram submetidas até o nível de potencial osmótico de -0,25 MPa, a partir desse nível de potencial osmótico, ocorreu redução significativa na germinação, e quando as sementes foram submetidas a potenciais osmóticos inferiores a -1,0 MPa, a germinação foi severamente afetada, apresentando valores próximos de zero. De acordo com Togni *et al.* (2005), a inoculação de alternaria em sementes de coentro diminui a germinação das sementes.

Pedroso *et al.* (2010) na avaliação da porcentagem de plântulas anormais e de sementes mortas, através da restrição hídrica verificaram o efeito nocivo de *A. alternata* e *A. dauci*, onde ambos promoveram um aumento no número de plantas defeituosas e morte das sementes inoculadas com suspensão de conídios.

De acordo com os resultados da Tabela 3, verificamos efeitos significativos dos métodos artificiais de inoculação de *A. alternata* em sementes de canola sobre o vigor das sementes expressos pelas variáveis primeira contagem da germinação, comprimento de parte aérea e raiz de plântulas em laboratório e a campo. Os métodos de restrição hídrica com maiores tempos de exposição das sementes ao fungo (48, 72 e 96 h) foram os que causaram maiores reduções do vigor diferindo dos demais métodos e da testemunha, demonstrando-se como métodos eficientes de inoculação. Os métodos contato com a colônia fúngica em BDA sem restritor hídrico, suspensão de conídios e restrição hídrica (BDA+ NaCl /-0,8MPa/24h) não diferiram entre si quanto ao vigor, entretanto numericamente pode-se observar que as sementes inoculadas produziram menor quantidade de plântulas normais e com tamanho reduzido (Tabela 3).

O comprimento médio da parte aérea e de raiz no ensaio realizado em laboratório mostra a influência de *A. alternata* sobre o vigor das sementes de canola quando submetidas ao método da restrição hídrica, principalmente quando aumenta o período de contato com o fungo. Com 96 horas de contato das sementes com a colônia fúngica, pode-se verificar-se que não ocorreu a emissão de parte aérea e raiz pelas sementes devido à alta agressividade da *A. alternata* (Tabela 3). Em trabalho realizado por Togni *et al.* (2005) com sementes de coentro, foram encontrados resultados semelhantes, pois a presença de fungos, além de prejudicar a germinação, também interferiu no desenvolvimento das plântulas.

Tabela 3 - Valores médios de primeira contagem da germinação (PCG) (%), comprimento (mm) médio de parte aérea (PA) e raiz em laboratório e a campo de sementes de canola (*Brassica napus*) cultivar Hyola 61, submetidas a diferentes métodos de inoculação artificial de *Alternaria alternata*.

Tratamentos	PCG	Laboratório (mm)		Campo (mm)	
		PA	Raiz	PA	Raiz
Testemunha	72,00 a*	45,47 a	64,10 a	77,20 ab	105,97 a
Suspensão de conídios	69,00 a	40,29 a	48,05 a	66,22 ab	51,76 c
BDA sem restritor hídrico	65,00 a	24,77 ab	26,9 b	61,72ab	49,35 c
BDA+NaCl /-0,8MPa/24horas	50,00 b	32,86 ab	55,50 a	82,87 a	87,07 b
BDA+NaCl /-0,8MPa/48horas	16,50 c	17,05 bc	22,97 b	67,23 b	66,08 c
BDA+NaCl /-0,8MPa/72horas	5,00 d	1,22 c	1,71 b	33,18 c	26,42 d
BDA+NaCl /-0,8MPa/96horas	2,50 d	0,00 c	0,00 b	15,41 d	10,00 e
CV (%)	12,88	20,65	18,36	11,12	12,05

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (0,05).

Analisando os valores médios de emergência a campo aos 7 e 21 dias (Tabela 4) verifica-se que os métodos de inoculação artificial de suspensão de conídios, contato com a colônia fúngica em BDA sem restritor hídrico e o método da restrição hídrica (BDA+NaCl/-0,8MPa/ 24horas) não foram eficientes para garantir uma maior infecção das sementes com *A. alternata*, pois estas sementes apresentaram boa emergência de plântulas, não diferindo da testemunha que apresentou 91,50 e 95,50 % de emergência a campo aos 7 e 21 dias, respectivamente. Entretanto, os métodos da restrição hídrica com maiores períodos de exposição com as sementes (48, 72 e 96 h) reduziram significativamente a emergência de plântulas, o que pode ter sido o resultado de um maior nível de infecção das sementes inoculadas por este método (Tabela 4).

Tabela 4 – Porcentagens médias de emergência a campo aos 7 e 21 dias após a sementeira, índice de velocidade de emergência (IVE) e índice de doença (ID) de sementes de canola (*Brassica napus*), cultivar Hyola 61 inoculadas com *Alternaria alternata* através de diferentes métodos artificiais de inoculação.

Tratamento	Emergência a campo (%)		IVE	ID
	7 dias	21 dias		
Testemunha	91,50 a*	95,50 a	8,59 a	0,00 d
Suspensão de conídios	92,55 a	93,95 a	5,75 b	21,50 c
BDA sem restritor hídrico	91,72 a	92,75 a	4,16 b	21,00 c
BDA+NaCl /-0,8Mpa/24horas	91,50 a	92,25 a	8,46 a	22,50 c
BDA+NaCl /-0,8Mpa/48horas	45,50 b	50,25 b	6,53 b	22,50 c
BDA+NaCl /-0,8Mpa/72horas	7,50 c	7,50 c	4,29 c	34,00 b
BDA+NaCl /-0,8Mpa/96horas	4,00 c	4,00 c	3,50 c	45,50 a
CV (%)	4,84	6,07	5,58	4,89

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (0,05).

Constataram-se diferenças significativas apenas nos métodos de restrição hídrica com maiores exposição das sementes, onde se observa que o maior tempo de contato das sementes com a colônia fúngica provocou o aumento da infecção das sementes pelo patógeno, consequentemente causando redução na velocidade de emergência e no estande final (Tabela 4). As sementes expostas ao fungo por 72 e 96 horas sofreram maior pressão de inóculo, provocando a morte de sementes, refletindo em menor vigor.

Pode-se verificar que à medida que reduziu o potencial osmótico diminuiu o índice de velocidade de emergência das plântulas de canola (Tabela 4). Resultados semelhantes foram observados por Pedroso et al. (2010), pois a utilização da restrição hídrica e suspensão de conídios foram métodos eficientes para a inoculação artificial das sementes de salsa com *A. alternata* e *A. dauci*, que reduziram a velocidade de emer-

gência, comprimento de raiz e comprimento total de planta. De acordo com Ávila *et al.* (2007), o aumento no potencial osmótico ocasiona um decréscimo gradual significativo no comprimento das plântulas de milho, resultado também confirmado por Machado *et al.* (2004), utilizando em sementes de soja tratadas com soluções de manitol e NaCl.

Para o índice de doença, as médias obtidas mostram a eficiência da utilização do método da restrição hídrica para inoculação de *A. alternata* em sementes de canola, pois no período de 96 horas de contato com a colônia fúngica, verificou-se um índice de doença de 45,50, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, acarretando em uma alta severidade de alternariose (Tabela 4).

No teste de sanidade (*Blotter test*) das sementes de canola inoculadas artificialmente com *A. alternata* através de diferentes métodos de inoculação, observa-se que para a testemunha não foi verificada a incidência do fungo associada às sementes (Figura 1). Os métodos de suspensão de conídios e contato com a colônia fúngica em BDA sem restritor hídrico direto resultaram em uma colonização de *A. alternata* nas sementes em torno de 80%. Os métodos da restrição hídrica com os períodos de 24 e 48 h de contato das sementes, proporcionaram uma incidência de *A. alternata* de 75 % (Figura 1). Para os maiores períodos de contato das sementes com a colônia fúngica, 72 e 96 horas, pode-se observar a alta colonização de *A. alternata*, com 100% de infestação (Figura 1).

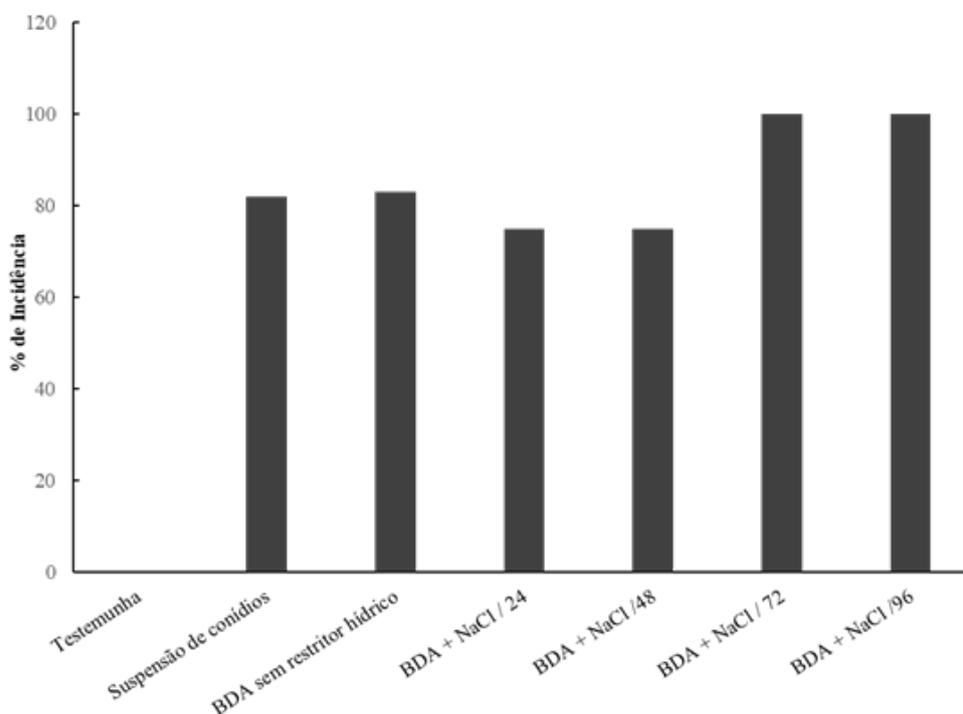


Figura 1
Incidência de *Alternaria alternata*, em sementes de canola inoculadas artificialmente, obtida pelo *Blotter test*

A ocorrência de *A. alternata* no método de inoculação artificial da restrição hídrica principalmente nos períodos de 72 e 96 horas corroboram mais uma vez com os resultados obtidos nos testes anteriores, mostrando sua eficiência na colonização das sementes de canola.

Rey *et al.* (2008) observaram a nítida vantagem do período de 96 horas de contato com a colônia fúngica em BDA osmoticamente modificado com NaCl com potências de -0,6; -0,8 e -1,0 Mpa, no número de sementes infectadas com *C. lindemuthianum*. Machado *et al.* (2007) ao avaliarem a incidência de fungos em sementes de algodoeiro pelo *Blotter test*, observaram que a restrição hídrica produzida por manitol e NaCl no potencial osmótico -1,0 MPa não interferiu no desenvolvimento e detecção de diferentes fungos em sementes de algodoeiro infectadas.

Considerações Finais

Verificou-se no presente estudo que o percentual germinativo das sementes foi inversamente proporcional à colonização de *A. alternata*. O método de restrição hídrica com os diferentes períodos de inoculação foi o que proporcionou maior incidência de *A. alternata* nas sementes de canola consequentemente o menor

vigor. A inoculação das sementes por meio da técnica de restrição hídrica possibilitou a obtenção de sementes com níveis diferenciados de infecção. Os maiores índices de doença nas sementes de canola inoculadas artificialmente foram alcançados em potencial hídrico modificado.

Referências

- ALAM, S. *et al.* Effects of equilibrium relative humidity on in vitro growth of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.36, n.3, p.383-388, 1996.
- ARAÚJO, D. V. *et al.* Transmission and effects of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* on cotton seeds. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 20, p.1815-1823, 2016.
- ÁVILA, M. R. Influência do estresse hídrico simulado com manitol na germinação de sementes e crescimentos de plântulas de canola. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p.98-106, 2007.
- BERTAGNOLLI, V. V. *et al.* Water potential and time of *Pyrenophora tritici-repentis* inoculation in wheat seeds. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p.1681-1690, 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.
- CARDOSO, R. M. DE L. *et al.* Doenças de canola no Paraná. **Boletim Técnico do IAPAR**, v. 34, p. 1-28, 1996.
- CARVALHO, E. M. *et al.* Uso da restrição hídrica na detecção de *Alternaria dauci* e *Alternaria radicina* em sementes de cenoura (*Daucus carota*). **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 4, p. 216-222, 2009.
- CARVALHO, J. C. B. *et al.* Crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* em relação à restrição hídrica do substrato agarizado. **Ciência Agrotécnica**, v. 25, n. 4, p. 999-1005, 2001.
- COSTA, M. L. N, *et al.* Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência Agrotecnica**. v. 27, n.5, p.1023-1030, 2003.
- DUNIWAY, J. M. Water relations of water molds. **Annual Review of Phytopathology**, v.17, n.1, p. 431-460, 1979.
- ESTEVEZ, R. L. *et al.* A cultura da canola (*Brassica napus* var. *oleifera*). **Scientia Agraria Paranaensis**, v.13, n.1, p.1-9, 2014.
- FARIAS, C. R. J. *et al.* Crescimento radial de *Bipolaris sorokiniana* em resposta a indução de restrição hídrica por solutos osmóticos em meio agarizado. **Revista Brasileira Agrociência**, v.10, n. 4, p. 457-460, 2009.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- JUNGES, E. *et al.* hídrica e peliculização na microbiolização de sementes de milho com *Trichoderma* spp. **Comunicata Scientiae**, v. 5, n. 1, p. 18-25, 2014.
- MACHADO, A. Q. *et al.* Potencial do uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 408-414, 2007.
- MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: FAEPE, 1988. 107p.
- MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 4, p. 62-67, 2004.
- MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 88-94, 2001.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n.1, p.176-177, 1962.
- MCKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal Agricultural Research**, v. 26, p.195-219, 1923.
- MORLEY, T. B. *et al.* The effects of water stress on the incidence and severity of paspalum leaf blight and on *Ascochyta paspali*. **Australasian Plant Pathology**, v. 22, n. 3, p.105-110, 1993.
- OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Fitossanidade). Universidade Federal de Lavras, Lavras. 1991.

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**, v. 32, n.3 p 79-85, 2010.

REY, M. S. *et al.* Inoculação de sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) com *Colletotrichum lindemuthianum* usando diferentes níveis de restrição hídrica. **Revista Brasileira Agrociência**, v.14, n 4, p.112-116, 2008.

TOGNI, D.A.J. *et al.* Incidência e transmissão de patógenos em sementes de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Summa Phytopathologica**, v. 31, p.31-76, 2005.