

MICROFLORA DE SEMENTES DE COLZA (*Brassica napus* L. VAR. *oleifera* METZG.)

Microflora of Rape Seeds (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzg.)

Eloicy Minussi* e Rosane Cadore**

RESUMO

Utilizou-se nos anos de 1981, 1982, 1983, 1984 e 1985 os métodos tradicionais em patologia de sementes: "blotter" e cultivo em BDA (batata-dextrose-ágar), a fim de determinar os microrganismos patogênicos em sementes de diferentes cultivares de colza.

O fungo *Alternaria* esteve presente em todos os anos analisados e na maioria das cultivares. Duas espécies de *Alternaria* foram encontradas: *A. brassicae* e *A. brassicicola*, com predominância da última. O gênero *Alternaria* foi constatado nos tegumentos e tecidos embrionários, com maior porcentagem nos tegumentos.

Houve alta incidência de bactérias em todos os anos e métodos analisados; pela frequência e intensidade de ocorrência no campo, supõe-se que se trata de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente da podridão negra.

Os patógenos de armazenamento, como *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizopus*, também foram frequentes e podem ser responsáveis pela deterioração de sementes de colza, determinando redução da germinação e vigor.

UNITERMOS: Microflora, sementes, colza (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzg.).

SUMMARY

Laboratory studies were conducted from 1981 up to 1985 in order to determine the pathogenic organisms in or inside seeds of different rape cultivares. The methods used were the blotter and growth in a PDA medium.

* Professora Adjunto do Departamento de Defesa Fitossanitária, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria. Pesquisadora do CNPq. 97.119 - Santa Maria, RS.

** Acadêmica de Agronomia e bolsista de Iniciação à Pesquisa junto ao Departamento de Defesa Fitossanitária, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria. 97.119 - Santa Maria, RS.

The fungi *Alternaria* was present in all years and on most of the cultivars. Two species were detected: *A. brassicae* and *A. brassicicola* as predominant. The genera *Alternaria* was found both on the teguments and embryonic tissues, with greater percentagem on teguments.

A high incidence of bacteria was observed in every year and methods analized. By the frequency and intensity of occurrence in the field it is postulated to be the species *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Storage pathogens such as *Penicillium*, *Aspergillus* and *Rhizopus* were frequent and can be responsible for rape seed deterioration that resulted on germination and seed vigor losses.

KEY WORDS: Mycoflora, seeds, rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) Metzg.

INTRODUÇÃO

A cultura da colza vem sendo estudada desde 1974 pela COTRIJUI, Ijuí - RS, como uma alternativa de plantio no inverno, no Rio Grande do Sul, tendo em vista que o trigo tem apresentado baixa produtividade devido às condições de clima e ataque de doenças.

O maior interesse da cultura da colza é a produção de sementes que contêm alto teor de óleo, que é utilizado para diversas finalidades como: indústrias de sabão, plásticos e alimentação humana. A colza ocupa o quinto lugar no mercado internacional de óleos vegetais, logo após a palma, a soja, o côco e o girassol. O principal ácido gorduroso que entra na sua composição é o ácido erúico.

A colza destinada à produção de óleo para a alimentação humana e farelo para a alimentação animal não devem apresentar concentrações superiores a 2% de ácido erúico e 15 μmol de glucosinolato por grama de farelo desengordurado, respectivamente.

Trabalhos de seleção e melhoramento desenvolvidos pela Cooperativa Regional Tritícola Serrana Ltda - COTRIJUI, resultaram em cultivares com teores de ácido erúico e glucosinolato dentro dos limites aceitáveis, para uso na alimentação humana.

CHANGSRI & WEBER (2) testaram a inoculação em treze diferentes crucíferas com *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola* e *A. raphani*. As doenças resultantes da inoculação nos hospedeiros foram muito semelhantes. A cor castanha dos conídios e conídios de *A. brassicae*

e os longos bicos desses esporos, distingue esse fungo das demais espécies. Os outros devem ser determinados pelo exame dos esporos no microscópio. Em batata-dextrose-ágar, culturas de *A. brassicae* e *raphani* produziram crescimento micelial branco. O primeiro cresce mais lentamente. *A. brassicicola* desenvolveu uma colônia de cor preta fuliginosa.

NEEGARD (8) obteve alta esporulação de *A. brassicae* e *A. brassicicola* em extrato de malte e nutriente agar padrão. ATKINSON (1) encontrou pouca ou nenhuma esporulação em vários meios testados e concluiu que a variação na produção de esporos está correlacionada com as espécies de fungos do que com os nutrientes. Meio contendo extrato de levedura produziu alta esporulação de algumas espécies.

Segundo COOK et alii (3), *X. campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson invade as sementes através do funículo, podendo chegar aos tegumentos, embora não se consiga observá-lo microscopicamente; comprovou-se, porém, que sementes com funículo infectado resistem ao tratamento químico e são reagem ao tratamento com água quente, o que demonstra que a bactéria penetrou nas sementes.

Existe ainda, a possibilidade de infecção superficial no momento da trilha (COOK et alii, 3).

O fungo *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*) ataca diversas crucíferas e, segundo Allen & Smith (1961), citados por VALIELA (13), pode ser transmitido por sementes, ainda que em baixas proporções.

O objetivo do presente trabalho foi determinar os patógenos ocorrentes em sementes de colza nos anos de 1981, 1982, 1983, 1984 e 1985.

MATERIAIS E MÉTODOS

No ano de 1981 foram utilizados cinco cultivares de colza: CTC-1, CTC-2, CTC-4, CTC-5 e CTC-7, fornecidas pela COTRIJUI, Ijuí-RS, e analisadas através dos métodos "blotter" e isolamento em meio de Ágar-Água. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco repetições, cada repetição constituída de uma placa de Petri com 100 sementes.

A fim de estudar a localização de *Alternaria* spp. nos tecidos da semente de colza foram utilizados 400 sementes da cultivar CTC-1, tomadas ao acaso e esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 1% durante 5 minutos e, logo após, lavadas em água destilada

esterilizada durante 20 minutos para descolar os tegumentos dos tecidos embrionários. Em condições assépticas, os tegumentos foram separados dos tecidos embrionários e cada parte colocada separadamente em placas de Petri contendo Ágar-Água (50 tegumentos ou embriões por placa). O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições (ELLIS et alii, 4).

Após sete dias de incubação sob luz contínua e a temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ em Biotronette Mark III Environmental Chamber foi determinada a porcentagem de ocorrência de *Alternaria* nos tegumentos e embriões das sementes.

Nos anos de 1982, 1983, 1984 e 1985, utilizou-se como substrato no teste "blotter" duas camadas de papel filtro embebidas em uma solução de 2,4 D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) na concentração de 50 ppm, a fim de inibir a germinação e facilitar a observação dos patógenos (NAUMOVA, 7) e o meio Ágar-Água foi substituído pelo meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA), por ser um meio pobre e impedir o crescimento de muitos patógenos (TUIITE, 12).

No método blotter não foi utilizada a desinfecção prévia das sementes e no teste de cultivo em Ágar-Água ou BDA foi efetuada a desinfecção superficial com hipoclorito de sódio a 1 durante 4 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante os anos de 1981, 1982, 1983, 1984 e 1985 encontram-se nas tabelas 1 a 10.

Em ambos os métodos as sementes da cultivar CTC-1 apresentaram maior porcentagem de colônias de *Alternaria*. Duas espécies diferentes de *Alternaria* foram encontradas: *A. brassicae* (Berk.) Sacc., com conídios grandes, célula superior pontiaguda e isolados, e *A. brassicicola* (Schw.) Wiltch, com conídios pequenos e catenulados.

Sementes da cultivar CTC-7 apresentaram, tanto no método blotter como isolamento em água-agua, grande incidência de *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Penicillium*, de ação destrutiva em grãos armazenados. Apenas um isolado de *Aspergillus* foi identificado como *A. flavus* Link. Embora não tenha sido feita a determinação de micotoxina, sabe-se que, dependendo da concentração, pode causar a morte do homem e dos animais.

Em ambos os métodos a cultivar Tower apresentou colônias de *Al-*

TABELA 1. Porcentagem média de colônias de fungos e bactérias em sementes de cinco cultivares de colza determinadas através do método "blotter" no ano de 1981.

Gêneros	Cultivares				
	CTC-1	CTC-2	CTC-4	CTC-5	CTC-7
<i>Alternaria</i>	52,5*	5,0	2,5	12,5	12,5
<i>Aspergillus</i>	17,5	12,5	22,5	60,0	42,5
<i>Penicillium</i>	15,0	15,0	7,5	0,0	15,0
<i>Rhizopus</i>	2,5	2,5	12,5	7,5	5,0
<i>Epinoceum</i>	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0

* Porcentagem média de colônias em cinco repetições, cada repetição com 100 sementes.

TABELA 2. Porcentagem média de colônias de fungos e bactérias em sementes de cinco cultivares de Colza, determinadas através do cultivo em Agar-Água no ano de 1981.

Gêneros	Cultivares				
	CTC-1	CTC-2	CTC-4	CTC-5	CTC-7
<i>Alternaria</i>	42,7*	5,2	0,7	0,5	1,7
<i>Aspergillus</i>	1,7	1,5	12,5	2,0	80,7
<i>Penicillium</i>	1,0	3,2	6,0	13,2	4,7
<i>Rhizopus</i>	-	-	-	-	31,2
Bactérias	1,7	3,5	0,7	0,5	15,5

* Porcentagem média de colônias em quatro repetições, cada repetição com 100 sementes.

ternaria com predominância no método de cultivo em BDA (Batata-Dextrose-Ágar).

Duas espécies diferentes de *Alternaria* foram encontradas: *A. brassicae* e *A. brassicicola* (CHANGSRI & WEBER, 2, NEEGARD, 8). As quinze cultivares apresentaram alta incidência de *Penicillium* no método

TABELA 3. Porcentagem de colônias de fungos e bactérias em sementes de 15 cultivares de colza, determinadas através do método "blotter", no ano de 1982.

Cultivares	Gêneros				
	Alt.*	Asp.	Pen.	Rhi.	Bac.
CTC-2	2**	16	80	2	-
CTC-4	-	8	90	-	-
CTC-7	-	2	70	-	2
Tower	5	10	82	-	-
Regent	-	2	64	2	2
Altex	-	2	36	-	-
Cresor	-	-	58	-	22
Lora	-	-	24	-	32
SR-8	-	-	68	2	6
Brutor	-	-	46	-	2
Orpai	-	-	46	-	10
Niklas	-	-	24	-	32
Gulliver	-	-	38	-	16
Pura	4	6	48	-	8
GB-8009	-	-	70	-	6

* Alt. = *Alternaria*; Asp. = *Aspergillus*; Pen. = *Penicillium*; Rhi. = *Rhizopus* e Bac. = Bactérias.

** Porcentagem média de colônias em cinco repetições, cada repetição com 100 sementes.

"blotter", variando de 24 a 90% de colônias.

No método de cultivo em BDA (Batata-Dextrose-Ágar) as colônias de *Aspergillus* estavam presentes nas cultivares CTC-4, na proporção de 21%, e na Regent, em 8%. Para detecção de aflatoxinas foi utilizado o meio de Côco-Agar (LIN & DIANESE, 5). Todos os isolados deram AT negativos.

A cultivar Gulliver apresentou 38% de colônias de bactérias pelo método de cultivo em BDA e Lora e Niklas apresentaram 32% pelo método de "blotter". A cultivar Tower mostrou-se isenta de bactérias em ambos

TABELA 4. Porcentagem de colônias de fungos e bacterias em sementes de 15 cultivares de colza, determinadas através do cultivo em BDA (Batata-Dextrose-Ágar), no ano de 1982.

Cultivares	Gêneros				
	Alt.*	Asp.	Pen.	Rhi.	Bac.
CTC-2	-	2	-	-	26
CTC-4	2**	12	-	-	8
CTC-7	-	-	-	-	-
Tower	14	-	-	-	-
Regent	-	8	-	-	24
Altex	-	-	-	6	14
Cresor	2	-	2	4	30
Lora	-	-	-	-	20
SR-8	-	-	-	-	-
Brutor	-	-	-	-	6
Orpal	-	-	-	-	6
Niklas	-	-	-	-	-
Gulliver	-	-	-	-	38
Pura	5	-	-	8	-
GB-8009	-	10	2	14	22

*Alt. = *Alternaria*; Asp. = *Aspergillus*; Pen = *Penicillium*; Rhi = *Rhizopus* Bac. = Bactérias.

** Porcentagem média de colônias em cinco repetições, cada repetição com 100 sementes.

os métodos utilizados. Para as bactérias encontradas não foi feita a determinação a nível de gênero, nem aplicado o teste de patogenicidade.

Em ambos os métodos foi determinada ocorrência de *Alternaria* nas cultivares CTC-4 e Regent e de bactérias nas cultivares CTC-4, Regent e Brutor através do método blotter e de cultivo em BDA.

No ano de 1984 houve alta incidência de bacterioses determinadas através do método blotter e cultivo em BDA. As sementes da cultivar CTC-2 apresentaram-se isentas de bactérias no método blotter. Através do método do cultivo em BDA foi determinada a presença do fungo

TABELA 5. Porcentagem média de colônias de fungos e bactérias em sementes de três cultivares de colza, determinadas através do método "blotter", no ano de 1983.

Cultivares	Gêneros			
	Alt.*	Asp.	Rhi.	Bac.
CTC-4	10**	-	-	50
Regent	10	-	10	40
Brutor	-	10	-	40

* Alt. = *Alternaria*; Asp. = *Aspergillus*; Rhi. = *Rhizopus*; Bac. = bactérias.

** Porcentagem média de colônias em cinco repetições, cada repetição com 100 sementes.

Observação: Foi freqüente a ocorrência de dois ou mais gêneros de fungos em uma única semente.

TABELA 6. Porcentagem média de colônias de fungos e bactérias em sementes de três cultivares de colza, determinadas através de cultivo em meio de BDA (batata-dextrose-ágar), no ano de 1983.

Cultivares	Gêneros			
	Alt.*	Asp.	Rhi.	Bac.
CTC-4	10**	-	8	50
Regent	20	4	-	28
Brutor	5	5	2	36

* Alt. = *Alternaria*; Asp. = *Aspergillus*; Rhi. = *Rhizopus*; Bac. = bactérias.

** Porcentagem média de colônias em cinco repetições, cada repetição com 100 sementes.

Observação: Foi freqüente a ocorrência de dois ou mais gêneros de fungos em uma única semente.

TABELA 7. Porcentagem média de colônias de fungos e bactérias em sementes de onze cultivares de colza, determinada através do método "blotter", no ano de 1984.

Cultivares	Gêneros			
	Alt.*	Asp.	Fus.	Bac.
CTC-2	-	-	6	-
CTC-4	2**	2	2	8
Gulliver	-	-	8	14
Regent	-	-	8	26
Lora	-	-	8	28
Brutor	-	-	6	28
Niklas	2	-	2	32
Tower	-	-	4	28
Altex	-	-	8	8
CTC-614	-	-	-	4
GB-8009	-	-	8	36

* Alt. = *Alternaria*; Asp. = *Aspergillus*; Fus. = *Fusarium*; Bac. = bactérias.

** Porcentagem média de colônias em cinco repetições, cada repetição com 100 sementes.

Tricothecium em sementes de colza cv. CTC-614.

Apesar de se apresentar em baixa porcentagem nas sementes, apresenta grande potencial patogênico, conforme MINUSSI et alii (6), NOGUEZ & ROSSETO (9), RODRIGUES & SINCLAIR (10) e TANAKA (11).

A cultivar Brutor apresentou no ano de 1985 incidência de *Alternaria* nas sementes, o que não tinha sido constatado no ano de 1984. O ataque de bacterioses foi moderado, concordando com as avaliações de de campo onde obteve grau 3 (com 25-50% da área foliar atacada).

Os resultados da localização de *Alternaria* spp. nos tecidos da semente de colza encontram-se na Tabela 11.

O gênero *Alternaria* foi constatado tanto nos tegumentos como nos tecidos embrionários, com maior porcentagem de incidência nos tegumentos. Duas espécies de *Alternaria* estavam presentes indistintamente nos tecidos estudados: *A. brassicae* e *A. brassicicola*.

TABELA 8. Porcentagem média de colônias de fungos e bactérias em sementes de 11 cultivares de colza, determinadas através de cultivo em BDA (Batata-Dextrose-Ágar), no ano de 1984.

Cultivares	Gêneros					
	Alt.*	Asp.	Col.	Fus.	Tri.	Bac.
CTC-2	2	-	-	-	-	8
CTC-4	2	2	2	-	-	18
Gulliver	4	2	-	-	-	4
Regent	-	2	-	-	-	10
Lora	-	8	-	-	-	14
Brutor	-	-	-	2	-	14
Niklas	-	2	-	-	-	12
Tower	2	-	-	-	-	12
Altex	-	-	-	-	-	10
CTC-614	2	-	-	-	4	10
GB-8009	-	-	-	2	-	14

* Alt. = *Alternaria*; Asp. = *Aspergillus*; Col. = *Colletotrichum*; Fus. = *Fusarium*; Tri. = *Tricothecium* e Bac. = Bactérias.

** Porcentagem média de colônias em cinco repetições, cada repetição com 100 sementes.

TABELA 9. Porcentagem média de colônias de fungos e bactérias em sementes de colza cv. Brutor determinadas através do método "blotter" no ano de 1985.

Cultivar	Gêneros				
	Alt.*	Asp.	Pen.	Rhi.	Bac.
Brutor	25**	10	2	2	20

* Alt. = *Alternaria*; Asp. = *Aspergillus*; Pen. = *Penicillium*; Rhi. = *Rhizopus*; Bac. = bactérias.

** Porcentagem média de colônias em cinco repetições, cada repetição com 100 sementes.

TABELA 10. Porcentagem média de colônias de fungos e bactérias em sementes de colza cv. Brutor, determinadas através do cultivo em BDA, no ano de 1985.

Cultivar	Gêneros				
	Alt.*	Asp.	Pen.	Rhi.	Bac.
Brutor	10**	10	2	5	15

* Alt. = *Alternaria*; Asp. = *Aspergillus*; Pen. = *Penicillium*; Rhi. = *Rhizopus*; Bac. = bactérias.

** Porcentagem média de colônias em cinco repetições, cada repetição com 100 sementes.

TABELA 11. Porcentagem de ocorrência de *Alternaria* spp. nos tecidos de sementes de colza cv. CTC-1.

Tecidos	Repetições				
	I	II	III	IV	Média
Tegumento	30	20	20	40	27,5
Embrião	10	10	5	30	13,7

CONCLUSÕES

1- O gênero *Alternaria* esteve presente em todos os anos analisados e na maioria das cultivares. Duas espécies de *Alternaria* foram encontradas: *A. brassicae*, com conídios grandes, célula superior pontaguda e isolados, e *A. brassicicola*, com conídios pequenos e cate nulados. Esta última foi predominante.

2- O gênero *Alternaria* foi constatado tanto nos tegumentos como nos tecidos embrionários, com maior porcentagem nos tegumentos.

3- Houve alta incidência de bactérias em todos os anos e métodos analisados. Não foram classificados a nível de gênero nem foi efetuado teste de patogenicidade, mas, pela intensidade de ocorrência no campo, supõe-se que se trata de *X. campestris* pv. *campestris*, agente da podridão negra que ocorre em colza todos os anos e em todas as cul-

tivares e locais analisados, em condições de campo.

4- Os patógenos de armazenamento, como *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizopus*, também foram freqüentes e podem ser responsáveis pela deterioração de sementes de colza, determinando redução da germinação e vigor.

BIBLIOGRAFIA CITADA

1. ATKINSON, R.G. Studies on the parasitism and variation of *Alternaria raphani*. *Can. J. Research*, 28:288-317, 1950.
2. CHANSURI, W. & WEBER, G.F. Three *Alternaria* species pathogenic on certain cultivated crucifers. *Phytopathology*, 53:643-48, 1968.
3. COOK, A.A.; LARSON, R.H. & WALKER, J.C. Relation of the black rot pathogen to cabbage seed. *Phytopathology*, 42:316-20, 1952.
4. ELLIS, M.A.; ILYAS, M.B. & SINCLAIR, J.B. Effect of three fungicides on internally seed borne fungi and germination of soybean seeds. *Phytopathology*, 65:553-56, 1975.
5. LIN, M.T. & DIANESE, J.C. A coconut - Agar medium for rapid detection of Aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology*, 66:1466-69, 1976.
6. MINUSSI, E. & BELLÉ, R.A. Efeito de fungicidas na germinação e vigor de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). *Fitopatologia Brasileira*, 6:151-7, 1981.
7. NAUMOVA, N.A. *Testing of seeds for fungous and bacterial infection*. Jerusalém, Israel Program of Scientific Translations Ltd., 1972. 145 p.
8. NEEGARD, P. *Danish species of Alternaria and Stemphylium*. London, Oxford Univ. Press, 1945. 560 p.
9. NOGUEZ, M.A. & ROSSETTO, E. Redução do poder germinativo de sementes de soja provocada por *Tricothecium roseum* Link. In: REUNIÃO CONJUNTA DE PESQUISA DE SOJA RS/SC, 3, Porto Alegre, 18-22/agosto, 1975. Porto Alegre, agosto/1975. n.p. (mimeografado)
10. RODRIGUES, A. & SINCLAIR, J.B. *Tricothecium* sp. pathogenic to soybean seeds. *Proc. Amer. Phytopath. Soc.*, 3:293 (Abst.), 1976.
11. TANAKA, M.A.S. *Tricothecium roseum* Link. associado a sementes de soja com baixa germinação. *Fitopatologia Brasileira*, 3:107-8, 1978.
12. TUIITE, J. *Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria*. Minneapolis, Minn., Burgess Publ. Co., 1969. 239 p.
13. VALIELA, M.U.F. *Introducción a la Fitopatología. 3. Hongos*. 3ª ed. Buenos Aires, Colección Científica del INTA, 1978. 779 p.