

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA – UFU
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - ICIAG
GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

IVAIR JOSÉ DE MORAIS JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE CANOLA
PRODUZIDAS A PARTIR DE PLANTAS INFECTADAS PELO
Cauliflower mosaic virus (CaMV)**

**Uberlândia
2017**

IVAIR JOSÉ DE MORAIS JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE CANOLA
PRODUZIDAS A PARTIR DE PLANTAS INFECTADAS PELO
*Cauliflower mosaic virus (CaMV)***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
curso de Agronomia, da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito parcial à obtenção do
título de engenheiro agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Alison Talis Martins Lima

**Uberlândia
2017**

IVAIR JOSÉ DE MORAIS JÚNIOR

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE CANOLA PRODUZIDAS A PARTIR DE PLANTAS INFECTADAS PELO *Cauliflower mosaic virus (CaMV)*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de engenheiro agrônomo.

Uberlândia, 13 de Março de 2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Alison Talis Martins Lima - ICIAG/UFU
Orientador

Prof.a Dr.a Flavia Andrea Nery Silva - ICIAG/UFU
Membro

Eng. Agr. Ms. Luciana Nunes Gontijo
Membro

Resumo

A cultura da canola (*Brassica napus*) vem sendo implantada na região do cerrado mineiro desde 2014 como uma nova alternativa para a rotação de culturas. Porém, pouco é conhecido sobre os fatores bióticos e abióticos que afetam a produtividade da cultura em condições de cerrado. O *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) já foi identificado causando perdas na cultura, entretanto, o impacto da infecção viral sobre a qualidade fisiológica das sementes permanece desconhecido. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo analisar a qualidade fisiológica de sementes de canola produzidas a partir de plantas inoculadas com o CaMV. Plantas de canola foram inoculadas mecanicamente em casa de vegetação à prova de insetos e a colheita das sementes foi realizada no momento da maturação fisiológica. O peso de mil sementes (PMS) e os aspectos relacionados à germinação foram avaliados seguindo-se as normativas previstas nas Regras de Análise de Sementes (RAS). A análise dos resultados obtidos indicou que a infecção pelo CaMV não afetou o PMS e a germinação, assim como a obtenção de plântulas saudáveis, plântulas anormais e sementes não germinadas.

Palavras-chaves: *Brassica napus*, sementes, *Cauliflower mosaic virus*, cerrado mineiro.

Abstract

The cultivation of canola (*Brassica napus*) has been implemented in the “cerrado” region of Minas Gerais since 2014 as a new alternative for crop rotation. However, the knowledge on biotic and abiotic factors that affect the crop productivity in the “cerrado” conditions remains scarce. *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) has already been identified causing losses in field conditions; however, the impact of the virus infection on the physiological quality of seeds remains largely unknown. In this context, the present work aimed to analyse the physiological quality of canola seeds produced from CaMV inoculated plants. Canola plants were mechanically inoculated in an insect-proof greenhouse and the seeds were harvested at physiological maturation. The thousand seed mass (TSM) and aspects related to germination were evaluated according to the guidelines established in the Rules of Seed Analysis. The analysis of the results indicated that the CaMV infection did not affect the TSM and germination, as well as obtaining healthy seedlings, abnormal seedlings and non-germinated seeds.

keywords: *Brassica napus*, seeds, *Cauliflower mosaic virus*, cerrado mineiro

Trajetória acadêmica do pesquisador

Ivair José de Moraes Júnior iniciou os estudos de graduação em Engenharia Ambiental na Universidade de Uberaba em 2010. Após um ano de curso, decidiu ingressar em outro curso das ciências agrárias: engenharia agrônoma. Iniciou os estudos então no Centro Universitário do Planalto de Araxá e, em 2013, através da seleção pelo ENEM, começou a cursar o mesmo curso na Universidade Federal de Uberlândia, em Uberlândia, Minas Gerais. A partir de então, em 2013, iniciou os primeiros passos na Universidade no Laboratório de Física dos Solos (LAMAS).

Durante o período de maio de 2016 a dezembro de 2016, participou como pesquisador na área de fitopatologia desenvolvendo a pesquisa de “Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de canola infectadas com *Cauliflower mosaic virus*”. Ainda em 2016, participou em dois projetos de extensão: InterAÇÃO com o PET, realizado no Parque do Sabiá no município de Uberlândia e Paisagismo realizados por alunos da agronomia na casa de repouso Recanto dos Lírios.

Já participou de apresentações em mostras científicas com os seguintes trabalhos: Potencialização da germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) com a utilização de giberelina (2016), Projeto Horta Terapêutica (2016), Semana Integrativa – Recepção dos calouros do curso de agronomia (2016), Dia de campo em silvicultura (2016) e Potencialização da germinação de sementes de cenoura (*Daucus carota* utilizando giberelina (2016). Além disso, atuou como monitor nas seguintes disciplinas: Física do solo (2014/15), Nematologia Agrícola (2014), Culturas do Arroz e trigo (2016) e Entomologia e Acarologia Aplicada (2016).

Participou de atividades extracurriculares em áreas externas às Ciências Agrárias, como técnico na formação de uma horta para pacientes em estado de melhoria em parceria com alunos da psicologia e enfermagem, possuindo então um trabalho publicado em anais “Horta terapêutica: promoção de saúde em centro de atenção psicossocial para álcool e outras drogas (2016)”. No mesmo ano, participou da banca de seleção como avaliador do PET-ODONTO do programa de graduação em odontologia.

Durante toda a graduação, participou de 19 eventos, congressos, exposições e feiras. Destacando: VII Simpósio Internacional de Tecnologia de Aplicação (2015), Vem pra UFU (anos de 2015 e 2016), I Behavioral Ecology and Interactions Symposium (2015). Atuou também na organização dos seguintes eventos: II Curso de capacitação técnica para RT’s na

produção de sementes de forrageiras tropicais (2015), IX Ciclo de Seminários da Agronomia (2015) e Ciclos de Palestras PET Apresenta.

Desde dezembro de 2014 faz parte do Programa de Educação Tutorial (PET) do curso de Agronomia, tutorado pelo Professor Reginaldo de Camargo. Desde junho de 2016, também participa do projeto Horta Terapêutica como fonte de inspiração para um crescimento no âmbito técnico e social.

Em 2017 iniciou o estágio obrigatório do curso de agronomia da Universidade Federal de Uberlândia na empresa Bayer Crop Science Vegetable Seeds no município de Uberlândia – MG.

Lista de ilustrações

Figura 1 - Tela anti-afídeos e local de condução do experimento em casa de vegetação.....	18
Figura 2 - Fotomicrografia de inclusões citoplasmáticas em células do tecido epidérmico de brássicas coletadas no município de Uberlândia.....	19

Lista de tabelas

Tabela 1 – Comparaçao entre tratamentos com infecção causada por <i>Cauliflower Mosaic Virus</i> (CaMV) (+) e tratamentos testemunhas (-), no peso de mil sementes de canola.....	22
Tabela 2 – Desempenho no teste de germinação de sementes de canola produzidas a partir de plantas inoculadas com <i>Cauliflower Mosaic Virus</i> (CaMV) (+) e plantas sadias (-)	23

Sumário

1	Introdução.....	9
2	Problemática e Delimitação.....	10
3	Objetivo	11
4	Revisão bibliográfica.....	12
	4.1. A cultura da canola.....	12
	4.2. <i>Cauliflower mosaic virus</i> (CaMV).....	14
	4.3. Transmissão por afideos	15
5	Material e métodos	17
	5.1. Local de condução dos experimentos.....	17
	5.2. Obtenção do isolado viral.....	17
	5.3. Condução de plantas de canola em casa de vegetação	17
	5.4. Identificação do isolado viral	18
	5.5. Inoculação e confirmação da infecção viral	19
	5.6. Colheita das sementes produzidas em plantas inoculadas com o CaMV	19
	5.7. Avaliação do peso de mil sementes (PMS).....	20
	5.8. Teste de germinação	20
	5.9. Análise estatística	21
6.	Resultados e discussão	22
	6.1. Peso de mil sementes (PMS)	22
	6.2. Qualidade fisiológica das sementes.....	22
7.	Conclusão	24

1 Introdução

A canola (*Brassica napus*, L.) é cultivada, principalmente, na Europa, Ásia, América do Norte e Austrália para a produção de óleo (OZTURK, 2010). No Brasil, a produção se concentra principalmente na região Sul do país, devido a fatores climáticos. Porém, o cultivo vem aumentado na região Sudeste devido a seleção de plantas voltadas para tolerância à seca, à temperaturas elevadas e a possibilidade de sua utilização na rotação de culturas com o milho e a soja. Além desses fatores, há a fácil adaptação de conjuntos maquinários para sua semeadura e colheita. Há também uma grande concentração de indústrias extratoras de óleo na região Sudeste, aumentando ainda mais a possibilidade da sua vinda para a região (TEIXEIRA, 2012).

A canola tem sido considerada, segundo CHRISTEN (2001), uma cultura excelente para a rotação de cultura com outros cereais, devido a esse processo causar uma interrupção no ciclo de vida de patógenos no solo, prevenindo o aumento de doenças nos cereais, maior eficácia no controle de plantas infestantes e melhorando a qualidade do solo devido ao seu desenvolvimento radicular profundo.

O *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), agente causador do mosaico da couve-flor, é um dos fitopatógenos das crucíferas, e que comumente pode causar sintomas na cultura da canola. Cardoso et al., em 1996, observou que além de induzir o mosaico, o CaMV foi capaz de causar um clareamento nas nervuras secundárias e também um espessamento da nervura central das folhas.

No Brasil, há relatos do CaMV infectando a cultura no Sul do país, mas não há trabalhos que relatam a capacidade de infecção de populações locais do vírus e seu impacto sobre a produtividade da cultura no cerrado brasileiro. Com o início do cultivo da canola no estado de Minas Gerais, dados mais precisos são necessários para a averiguação do potencial fitopatogênico das populações de CaMV presentes em outras espécies de crucíferas.

2 Problemática e Delimitação

A tropicalização da canola, de fato, se mostra relevante por diversos fatores, como a sua capacidade produtiva, logística adequada do estado de Minas Gerais para exportação, diversificação de culturas em campo e funcionando como uma cultura alternativa para quebra de ciclos de vida de pragas e fitopatógenos. O CaMV é um vírus com potencial patogênico à cultura e que pode causar perdas.

Logo, como há relatos de infecção no Sul do Brasil, há a possibilidade de infecção de lavouras conduzidas no cerrado de Minas Gerais. Portanto, há uma necessidade de geração de informações sobre a infecção da canola por populações locais do CaMV e seu impacto na cultura.

3 Objetivo

Nesse estudo, objetivou-se avaliar a qualidade fisiológica das sementes de canola produzidas a partir de plantas inoculadas com o CaMV.

4 Revisão bibliográfica

4.1. A cultura da canola

A canola (*Brassica napus* L. var *oleifera*) é considerada uma espécie oleaginosa pertencente à família *Brassicaceae* e ao gênero *Brassica*. Atualmente, no Brasil, a composição dos grãos produzidos gira em torno de 24 a 27% de proteína e 38% de óleo. Seu grão apresenta uma alta porcentagem de ômega-3, vitamina E, gorduras monoinsaturadas e baixo teor de gordura saturada (TEIXEIRA, 2012).

A canola vem de um trabalho de melhoramento da colza. Em 1974, o então pesquisador Baldur Stefansson da Universidade de Manitoba, desenvolveu a primeira variedade com níveis reduzidos de ácido erúcico e glucosinolatos, considerada como uma variedade Double low. Essa variedade então foi a primeira a preencher os requisitos impostos pelo Department of Health and Welfare do governo federal do Canadá, o qual indicava que altos níveis de ácido erúcico e glucosinolatos não eram essenciais para o desenvolvimento humano. Logo, o nome canola foi desenvolvido para se referir àquela semente, óleo, torta e farelo proveniente de variedades que possuem 5% ou menos de ácido erúcico em seu óleo e 5 miligramas ou menos de glucosinolatos. O nome foi registrado pela Western Canadian Oilseed Crushers Association, vindo do termo Canadian Oil Low Acid, que nada mais é que a indicação de um óleo de colza com baixos teores de ácido erúcico e glucosinolatos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2012).

A canola é uma oleaginosa proveniente de regiões frias, tipicamente de inverno, logo, para implantação no Brasil, é necessário que haja um melhoramento genético para que a mesma possa ser cultivada em temperaturas mais elevadas. A Embrapa iniciou os trabalhos para a tropicalização e foram testados 30 genótipos diferentes para garantir a produção em baixas latitudes e em altitudes acima de 600 metros. Isso possibilitaria uma otimização das terras, possibilitando mais de uma safra no mesmo ano no bioma cerrado, como Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e São Paulo (EMBRAPA, 2014).

No início da exploração da canola no Brasil, eram utilizadas cultivares de polinização aberta, as quais, por sua vez, apresentavam maturação desuniforme e ciclo maior que os híbridos atuais. Portanto, a partir do princípio de se obter cultivares uniformes, foram substituídas as cultivares de polinização aberta pelos híbridos, que apesar de possuírem um custo maior com as sementes, apresentam maior produtividade (EMBRAPA, 2014).

Segundo Tomm (2009), ao se empregar híbridos adequados tem-se um rendimento de grãos mais elevado devido ao benefício do vigor híbrido e do maior potencial genético de materiais desenvolvidos recentemente, que na média é 32% maior que as cultivares de polinização aberta. Além disso, a planta híbrida tem um estabelecimento e desenvolvimento mais rápido e uniforme, o que contribui muito para a condução e colheita da lavoura.

No Brasil, principalmente para o Sul do país, essa cultura apresenta-se como uma alternativa econômica para compor sistemas de rotação com a cultura do trigo e outros cereais de inverno cultivados, ocupando áreas ociosas e gerando renda, podendo ser matéria prima tanto para a indústria de óleo vegetal como também para farelo da composição de alimentação animal (KIMATI et al., 2005).

A canola está sujeita as doenças que causam danos em crucíferas, por ser parte dessa família, que inclui espécies como o nabo, repolho, mostarda, couve manteiga, couve flor, couve-de-bruxelas, brócolos, nabo forrageiro, rabanete, dentre outros. Dentre os agentes patogênicos a essa cultura, temos: fungos, bactérias e vírus, onde sua ocorrência está distribuída de acordo com a disponibilidade do inóculo, condições climáticas e presença de material suscetível. A combinação desses fatores pode favorecer ou não o surgimento e a ocorrência de danos pelas doenças (COMMONWEALTH AGRICULTURAL BUREAU, 1980).

Segundo Kimati et al. (2005), um levantamento de doenças que afetam a cultura da canola foi realizado pela primeira vez entre os anos de 1993 e 1994 no estado do Paraná, por meio de uma colaboração entre a Organização das Cooperativas do Estado do Paraná (OCEPAR), atual COODETEC, e o Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR). Os patógenos fúngicos descritos afetando a cultura pertencem aos gêneros *Sclerotinia*, *Alternaria*, *Erysiphe*, *Rhizoctonia*, *Albugo* e *Phoma*. A fitobactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* também é capaz de incitar doença na cultura. Além desses patógenos algumas espécies de fitovírus foram relatadas na cultura: *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Turnip mosaic virus* (TuMV) e *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). Também foi identificada a ocorrência de plantas com variação clorótica de natureza não infecciosa. Barbosa et al. (1994), observaram que as sementes coletadas das plantas que possuíam clorose variegada originaram tanto plantas normais, como também plantas com clorose. Também foi observado que não houve o desenvolvimento de sintomas em plantas indicadoras inoculadas e foi concluído que a variação era devido a anomalias genéticas.

As três espécies virais que infectam a canola (CaMV, TuMV e CMV) são capazes de induzir mosaico foliar, porém, o CMV induz um mosaico mais acentuado. O CaMV é capaz

de provocar clareamento das nervuras secundárias e espessamento da nervura central nas folhas que são inoculadas mecanicamente. Existem cerca de 22 viroses que infectam naturalmente crucíferas: TuMV, CaMV, CMV, PVX (*Potato virus X*), TCV (*Turnip crinkle virus*), PoMV (*Pokeweed mosaic virus*), BWYV (*Beet western yellow virus*) e TYMV (*Turnip yellow mosaic virus*), onde o CaMV, CMV e o TuMV são os mais disseminados e potenciais causadores de danos econômicos (GRACIA et al., 1990).

A canola pode ser infectada por sete vírus diferentes, sendo, o CaMV e o TuMV os mais disseminados no mundo e que trazem maiores danos econômicos. Há relatos de que os danos à produção podem chegar a 80%. No Brasil, o primeiro relato de vírus afetando a produção de canola ocorreu em 1993 no Paraná, onde foram identificados esses dois vírus como causadores da infecção (KIMATI et al., 2005).

A eficiência de transmissão e as altas populações de insetos vetores desses vírus (afídeos) nas condições brasileiras reforçam a necessidade por novos estudos e adoção de medidas de prevenção e controle. É conveniente evitar a semeadura de canola em áreas próximas a outras crucíferas e curcubitáceas, as quais podem ser hospedeiras de vírus ou afídeos. Assim como não implantar lavouras próximas a áreas em que já possuem canola com estádio de desenvolvimento avançado, devido a ser uma provável fonte de inóculo desses patógenos. Deve-se também prevenir grandes populações de afídeos em lavouras que já possuem plantas infectadas, fazendo-se então necessário o controle de insetos para evitar a disseminação. A transmissão por semente já foi relatada para o CaMV e CMV, logo, deve-se evitar sementes oriundas de lavouras em que havia elevada incidência de viroses (CARDOSO et al., 1996).

4.2. *Cauliflower mosaic virus* (CaMV)

O *Cauliflower mosaic virus* é um membro representante do gênero *Caulimovirus*, e família *Caulimoviridae*, sendo transmitido por 27 espécies de afídeos de modo semi-persistente. Esse vírus possui uma gama de hospedeiros mais restrita quando comparada àquelas de outros vírus que infectam a canola, sendo restrito somente às brássicas (HERTEL et al., 2004). Vírus da família *Caulimoviridae* possuem genoma composto por DNA fita dupla circular e replicam-se através da transcrição reversa. Esses vírus possuem partículas isométricas com cerca de 50 nm de diâmetro e são causadores de inclusões citoplasmáticas dentro das células (HULL, 2004). Existem dois tipos de corpos de inclusões citoplasmáticas, também denominados viroplasmas, presentes em plantas infectadas com CaMV. Os dois

corpos representam agregados formados pelo acúmulo de um grande número de partículas virais (HULL, 2004).

Segundo Hertel et al. (2004), o CaMV já foi relatado causando sintomas em países como na Austrália, onde cerca de 20% das cultivares foram infectadas pelo vírus. Os sintomas descritos foram mosqueado e áreas cloróticas, mas o mais comum é a não apresentação de sintomas (infecções latentes). Doenças causadas por vírus na cultura da canola foram relatadas pela primeira vez em meados de 1980 na Austrália, onde o *Beet western yellow virus* (BWYV) foi relatado como sendo causador de sintomas na cultura. Desde então, outros vírus têm sido identificados na cultura. Em 1998, foram relatados o *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) e o *Turnip mosaic virus* (TuMV) causando danos na canola (KIMATI et al., 2005).

No caso do CaMV, que possui o genoma composto por uma molécula de DNA de fita dupla, o ácido nucléico entra no núcleo da célula e se associa a histonas do hospedeiro para formar uma espécie de “minicromossomo”. Desse modo, há a transcrição desse “minicromossomo” efetuada pela polimerase do hospedeiro, dando origem a duas moléculas de RNA de diferentes tamanhos, as quais migram para o interior do citoplasma onde ocorrerá a segunda etapa da replicação. A molécula menor de RNA é levada pelos ribossomos dando origem a uma grande quantidade da proteína que constituirá o viroplasma, ou seja, o local de replicação do vírus na célula. Essa proteína ativa a tradução da molécula maior de RNA para que ocorra a síntese das outras proteínas constituintes, como a transcriptase reversa e a proteína capsidial. A molécula maior então é usada como um molde para a síntese da primeira fita de DNA senso negativo por meio da transcriptase reversa. Por fim, é sintetizada a fita de DNA complementar para formar moléculas de fita dupla que serão encapsidadas em novas partículas virais. (AMORIM et al., 2011)

4.3. Transmissão por afídeos

A transmissão do CaMV para plantas de canola ocorre do modo semi-persistente. Nesse tipo de transmissão as partículas de vírus ficam aderidas à superfície cuticular do intestino anterior, chamado de estomodéu, que é a região que inclui a bomba de sucção, faringe e o esôfago. Nesse tipo de transmissão, o vírus não fica retido no estilete do inseto, como na transmissão não persistente. Para que o pulgão consiga adquirir o vírus, são necessários minutos a horas de alimentação. O vírus pode ficar retido no estomodéu por várias horas e não requer nenhum período de latência. Assim, o vírus não se multiplica no interior do afídeo e também não vai para a hemolinfa (KAZUKO, 2008).

Os pulgões que podem causar injúrias e transmitir viroses para a canola de maior importância são *Myzus persicae*, originário da China, de temperaturas amenas; *Brevicoryne brassicae*, que possui origem europeia e está amplamente distribuído em regiões temperadas e sub-tropicais e *Lipaphis erysimi* (SOUZA, 2004).

A fêmea alada de *B. brassicae* possui comprimento de 1,6 à 2,2 mm de comprimento, com tórax e cabeça escuros e abdômen verde-amarelado com faixas transversais de coloração enegrecida. Já sua forma áptera possui coloração da cabeça escura, tórax e abdômen verde acinzentado ou opaco com manchas escuras no dorso e de comprimento de 1,8 a 2,1 mm (SOUZA, 2004). O pulgão *M. persicae* possui cerca de 2 mm de comprimento, de coloração verde clara, quando for áptero e de coloração mais escura na cabeça, tórax e antenas quando alado. (GALLO et. al., 2002). Já o pulgão *L. erysimi*, possui como característica um comprimento de 1,4 a 2,4 mm e de coloração verde oliva (SOUZA, 2004).

Geralmente há grandes infestações na época de floração da canola, mas esses pulgões podem ser encontrados em todos os estádios da cultura. Podem ser encontrados na face inferior das folhas ou cotilédones e na base do caule. Dentro os sintomas, podem causar o enrolamento e deformação das folhas e, em último caso, levar a morte da planta (TOMM et al., 2009).

5 Material e métodos

5.1. Local de condução dos experimentos

O experimento foi realizado em casa de vegetação, mais especificamente, em uma câmara revestida com tela à prova de afídeos, durante o período de 25 de junho a 19 de outubro de 2016 na Universidade Federal de Uberlândia (UFU) localizada no município de Uberlândia, Minas Gerais. Testes diagnósticos para confirmação da infecção viral e testes para avaliação da qualidade fisiológica das sementes de canola foram conduzidos nos Laboratórios de Virologia (LAVIV) e de Análise de Sementes (LASEM), respectivamente, no período de 10 de maio à 7 de novembro de 2016.

5.2. Obtenção do isolado viral

As amostras de campo para obtenção do isolado viral foram coletadas em duas fazendas produtoras de plantas da família das brássicas da região de Uberlândia.

5.3. Condução de plantas de canola em casa de vegetação

O experimento foi conduzido utilizando-se vasos de 5 kg com uma mistura de areia, argila e substrato na proporção de 1:1:0,3. O substrato utilizado foi o Bioplant, produto elaborado com casca de pinus, esterco, serragem, fibra de coco, vermiculita, casca de arroz, cinza, gesso agrícola, carbonato de cálcio, magnésio, termofosfato magnesiano e aditivos (fertilizantes), o qual é inerte, estável e livre de agentes fitotóxicos, patogênicos, metais pesados, pragas e sementes de plantas infestantes.

Todo o experimento foi realizado em uma câmara à prova de insetos revestida com tela 25 mesh com cobertura de 25% para que não houvesse interferência externa de insetos transmissores de vírus durante a condução do experimento (Figura 1). Foram utilizadas plantas dos híbridos: Hyola 571, Hyola 576, Hyola 433, Hyola 61 e Hyola 411 em delineamento de blocos casualizado (DBC), em arranjo fatorial 5x2x3 (5 híbridos, presença ou ausência do vírus e 3 repetições), com 10 repetições, sendo cada repetição composta por um vaso, no qual foram semeadas 5 sementes e após desbastadas para 1 planta por vaso.

Figura 1. Tela anti-afideos e local de condução do experimento em casa de vegetação.



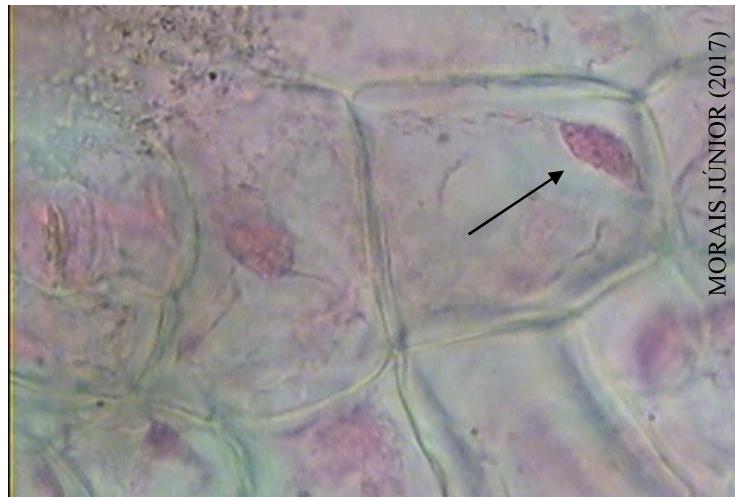
5.4. Identificação do isolado viral

A identificação de plantas infectadas pelo CaMV foi baseada na observação de inclusões citoplasmáticas do tipo viroplasmas em seções epidérmicas de folhas de brássicas. As inclusões citoplasmáticas presentes nas seções epidérmicas foram coradas com floxina B à 1%, sendo então possível sua visualização ao microscópio de luz.

Fragmentos de epiderme foram incubados no corante por 20 minutos e, posteriormente, lavados em água corrente durante uma hora para retirada do excesso de corante. Os cortes foram montados em lâmina para observação ao microscópio de luz. As inclusões tornaram-se prontamente visíveis na cor rósea-avermelhada (Figura 2).

Tecidos foliares nos quais foram observadas inclusões citoplasmáticas típicas do CaMV foram dessecados por meio da manutenção de fragmentos foliares no interior de placas de Petri juntamente com sílica em gel. A dessecação do material utilizado como fonte de inóculo permite sua conservação por longos períodos de tempo a temperaturas de 8°C.

Figura 2. Fotomicrografia de inclusões citoplasmáticas em células do tecido epidérmico de brássicas coletadas no município de Uberlândia.



5.5. Inoculação e confirmação da infecção viral

Os tecidos preservados foram, posteriormente, macerados em almofarizes contendo uma solução tampão composta por acetato de potássio à 10 milimol à pH 7,2 e carborundum (material abrasivo). Plantas foram inoculadas por meio da fricção de uma gaze embebida no extrato vegetal tamponado na superfície adaxial. Plantas utilizadas como testemunhas dos experimentos foram inoculadas somente com o tampão (sem o extrato das plantas infectadas). A inoculação foi realizada no período noturno para que as plantas pudessem se recuperar da inoculação na ausência de raios solares. A infecção das plantas inoculadas foi confirmada via observação de inclusões citoplasmáticas em seções de epiderme conforme descrito no item 5.4.

5.6. Colheita das sementes produzidas em plantas inoculadas com o CaMV

Síliquas foram colhidas separadamente quando o grão se apresentava em maturação fisiológica. Para determinar a maturação fisiológica, foi levada em consideração a troca de cores das síliquas de verde para verde-amarelado ou parda. As síliquas colhidas foram armazenadas em sacos de papel, para posterior debulha e realização dos testes nas sementes. Após debulhadas, as sementes foram condicionadas em sacos de papel e armazenadas em câmara fria até a realização dos testes.

5.7. Avaliação do peso de mil sementes (PMS)

Para determinar o peso de mil sementes (PMS), foram utilizadas oito repetições de cem sementes, pesadas em balança analítica. Após a pesagem das oito repetições, é calculado a variância, o desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV). O CV deverá apresentar valor inferior à 4% para atribuição do PMS. Logo, após a realização dos cálculos é realizado a média dos valores das cem sementes pesados e multiplicado por 10. Caso o CV ultrapasse 4% é necessária a realização da contagem de mais oito repetições de 100 sementes.

5.8. Teste de germinação

O teste de germinação foi conduzido em caixas gerbox de acrílico previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio. O substrato utilizado para realização do teste foi o papel mata borrão, onde foram colocadas 2 folhas do papel umedecidas com água destilada com 2,5 vezes o peso do papel. As sementes foram dispostas sobre o papel diretamente no gerbox. Dentro de cada gerbox, foi utilizada uma quantidade de 50 sementes espaçadas entre si de forma simétrica. Foi utilizada uma tampa para que não ocorresse a perda de água durante a germinação.

As caixas gerbox com as sementes foram levadas para a sala de germinação que consistia de uma combinação de germinadores (sala x câmara). A temperatura ambiente foi mantida constante (20°C) e o germinador (do tipo câmara) foi mantido à temperaturas alternadas de 20° a 30° C e fotoperíodo com 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Durante os 7 dias de condução do experimento, foi avaliada diariamente a protrusão da radícula de cada semente e a expansão do cotilédone. Cada híbrido foi dividido entre sementes controle negativo (-) e controle positivo (+). De cada controle, obteve-se 3 amostras que foram divididas em 2 sub-amostras cada. As sub-amostras constituíram uma média de valores para a amostra que representavam.

As plântulas e sementes foram analisadas utilizando como base a RAS, onde dividem-se em sementes mortas, sementes duras, plântulas normais e plântulas anormais. Plântulas são consideradas normais quando demonstram potencial para continuar o processo de crescimento e dar origem a uma planta saudável. Já plântulas anormais, são aquelas que não mostram potencial para desenvolver e dar origem a plantas normais, podendo estar danificadas, deformadas ou deterioradas. Já as sementes não germinadas foram divididas em sementes mortas, que são aquelas que não germinam e apresenta-se amolecidas, e sementes

duras, que são aquelas sementes que permanecem sem absorver água, ou seja, não ficam intumescidas (REGRAS DE ANÁLISE DE SEMENTES, 2009).

5.9.Análise estatística

Análises estatísticas foram conduzidas no programa Sisvar versão 5.6 (Ferreira, 2011) utilizando-se o teste de Tukey a 5% de significância.

6. Resultados e discussão

6.1. Peso de mil sementes (PMS)

Plantas que apresentaram inclusões citoplasmáticas do tipo viroplasmas foram consideradas positivas para a infecção pelo CaMV. Essas plantas foram conduzidas em casa de vegetação para a coleta de sementes a fim de se avaliar o possível impacto da infecção viral sobre sua qualidade fisiológica. Com relação ao peso de mil sementes, houve diferença significativa entre os tratamentos positivos (sementes produzidas a partir de plantas infectadas pelo CaMV) e negativos (sementes produzidas a partir de plantas inoculadas apenas com o tampão sem o extrato contendo partículas virais) dentro de um mesmo híbrido, com exceção do híbrido Hyola 571 que não diferiu estatisticamente (Tabela 1).

Com relação aos híbridos Hyola 571, Hyola 61 e Hyola 411, houve redução do peso de mil sementes quando estas foram produzidas em plantas infectadas pelo CaMV.

Tabela 1. Comparação entre tratamentos com infecção causada por CaMV (+) e tratamentos testemunhas (-), no peso de mil sementes de canola.

	Hyola 576		Hyola 433		Hyola 571		Hyola 61		Hyola 411	
Tratamento	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Peso (g)	4,013 a	3,474 b	3,560 a	2,867 b	4,236 a	4,373 a	3,292 b	4,008 a	3,537 b	3,859 a
Redução (g)	-	-			0,137		0,716		0,322	

*Médias aplicadas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade, dentro de cada híbrido.

Com relação ao peso de mil sementes, os valores de produção da canola estão em torno de 2,5 a 3,8 gramas quando em condições de campo (SANCHES et al., 2014). Em cultivares de trigo infectadas pelo *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV), Dalbosco e Schons (2002) encontraram diferenças significativas entre plantas sintomáticas e assintomáticas quando levado em consideração o peso de mil sementes.

6.2. Qualidade fisiológica das sementes

A porcentagem de germinação de um lote corresponde à proporção do número de sementes que produziu plântulas classificadas como normais.

Levando-se em consideração a formação de plântulas normais e anormais, os híbridos Hyola 576, Hyola 433, Hyola 571 e Hyola 61 não se diferiram estatisticamente quando infectados e quando não infectados com o vírus, tanto para formação de plântulas normais quanto para formação de plântulas anormais. O híbrido Hyola 411, quando infectado pelo vírus, apresentou uma porcentagem superior na formação de plântulas anormais demonstrando uma possível alteração fisiológica causada pelo vírus no desenvolvimento da semente (Tabela 2).

Tabela 2. Desempenho no teste de germinação de sementes de canola produzidas a partir de plantas inoculadas com Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) (+) e plantas saudáveis (-).

Híbrido	Plântulas normais (%)		Plântulas anormais (%)	
	(+)	(-)	(+)	(-)
Hyola 576	69,4 a	72 a	30,6 a	28 a
Hyola 433	60 a	59,4 a	40 a	40,6 a
Hyola 571	78 a	22 a	78 a	22 a
Hyola 61	80,7 a	80,6 a	19,4 a	19,3 a
Hyola 411	50,6 a	44,6 a	55,4 b	49,4 a

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

Segundo Walsh e Tomlinson (1985), a germinação de sementes de plantas de canola infectadas não foi afetada se semeadas logo após a colheita. Mas, após o armazenamento dessas sementes por um ano, a germinação de sementes de plantas infectadas por vírus foi significativamente menor que a de sementes produzidas a partir de plantas livres de vírus.

7. Conclusão

- De acordo com os resultados obtidos, o CaMV é capaz de infectar plantas de canola na região do cerrado mineiro e em condições de manejo em casa de vegetação.
- O peso de mil sementes é afetado pela infecção do CaMV, causando alteração no peso da semente. Porém, essa alteração varia de acordo com o híbrido utilizado.
- Levando-se em conta a germinação e a obtenção de plântulas, o CaMV não afetou a obtenção de plântulas normais e anormais quando comparado à testemunha não infectada, com exceção Hyola 411, que teve a porcentagem de plântulas anormais significativamente maior quando infectada.
- Apesar dos relatos de redução na produtividade da cultura devido à infecção pelo CaMV, o mesmo não afetou a qualidade fisiológica de sementes de canola, quando cultivada em casa de vegetação.

Referências bibliográficas

- ALFENAS, A. C.; GONÇALVES, R. M. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: Ed. UFV, 2007, 382 p.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN, A. F. **Manual de fitopatologia**. 4 ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. 704 p.
- BALBINO, L. C. **Doenças de canola no Paraná**. Londrina: IAPAR (Boletim técnico 51)/ Cascavel: COODETEC (Boletim técnico 34), 1996, 32p.
- BARBOSA, C. J.; LEITE, R. M. V. B. C.; CARDOSO, R. M. L.; OLIVEIRA, M. A. R. **Variegação clorótica de natureza não infecciosa em canola no Paraná**. In: Fitopatologia Brasileira, 19:288, 1994.
- COMMONWEALTH AGRICULTURAL BUREAU. **Diseases of rape**. Commonwealth Agricultural Bureau Annotated Bibliograph, n. M3, 1980. 38 p
- DALBOSCO, M.; SCHONS, J.; PRESTES, A. M.; CECCHETTI, D. **Efeito do vírus do mosaico do trigo sobre o rendimento de trigo e triticale**. Revista de Fitopatologia Brasileira vol. 27. no. 1. 2002.
- EMBRAPA. **Pesquisa quer tropicalizar a canola para expandir produção**. Produção vegetal. Brasil. Embrapa trigo. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2051801/pesquisa-quer-tropicalizar-a-canola-para-expandir-producao>>. Acesso em 13 de março de 2017.
- FOOD IGREDIENTS BRASIL. **Canola: uma variação genética mundialmente apreciada**. Revista Fi. N 21, 2012.
- GALLO, D. O.; NAKANO, S.; SILVEIRA NETO, R. P. L.; CARVALHO G. C.; BATISTA, E.; BERTI FILHO, J. R. P.; PARRA, R. A.; ZUCCHI, S. B.; ALVES J. D.; VENDRAMIM, L. C.; MARCHINI, J.R.; LOPES, S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002, 920 p.
- GRACIA, O.; IGLESIAS, V.A.; FELDMAN, J.M. **Viroses de las cruciferas en la región de Cuyo**. Argentina. Fitopatología Brasileira, 15(4):327- 333, 1990
- DB CITY. Disponível em: <<http://pt.db-city.com/Brasil--Minas-Gerais--Uberl%C3%A2ndia>>. Acesso em: 10 de setembro de 2016
- HERTEL, K.; SCHWINGHAMER, M.; BAMMACH, R. **Virus diseases in canola and mustard**. Agnote DPI 495, 1st edition. September, 2004.
- HULL, R. **Matthews' Plant Virology**. 4 ed. Elsevier Academic Press. 2004, 1001 p.
- KAZUKO, A. I. **Os pulgões são os principais vetores de vírus de plantas**. Disponível em: <<http://www.agrofit.com.br/portal/citros/54-citros/130-os-pulgoes-sao-os-principais-vetores-de-virus-de-plantas>>. Acesso em: 10 de outubro de 2016

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. B.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia**. 3 ed. São Paulo: Agronomica Ceres. 2v. 2005.

LEMOS, V. **Canola tropical é produzida em Uberlândia e já atrai mercado**. Disponível em: <<http://uipi.com.br/destaques/destaque-2/2014/08/04/canola-tropical-e-produzida-em-uberlandia-e-ja-atrai-mercado/>>. Acesso em: 28 de setembro de 2016

ÖZTÜRK, Ö. **Effects of source and rate of nitrogen fertilizer on yield, yield components and quality of winter rapeseed (*Brassica napus* L.)**. Chilean Journal of Agricultural Research, v.70, 2010, 132-141 p., 2010.

SANCHES, A. C.; GOMES, E. P.; RAMOS, W. B.; MAUAD, M.; SANTOS, S.; BISCARO, G. A. **Produtividade da canola sob irrigação e doses de adubação nitrogenada**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e ambiental. v. 18. n. 7. Campina Grande, 2014

SOUZA, V. P. **Dinâmica populacional de *Myzus persicae* (Sulzer, 1776), *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) e *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach, 1843) (Hemiptera: Aphididae) na região de Jaboticabal, SP**. 2004. 64 p. Dissertação – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2004.

TEIXEIRA, F. L. **Produtividade e qualidade de grãos de canola em função da adubação nitrogenada e sulfatada**. 2012. 43 p. (Dissertação em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2012.

TOMM, G. O.; WIETHOLTERS, S.; DALMAGO, G. A.; SANTOS, H. P. **Tecnologia para produção de canola no Rio Grande do Sul**. Embrapa. ISSN 1518-6512. 2009

WALSH, J. A.; TOMLINSON, J. A. **Viruses infecting winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*)**. Annals of Applied Biology, 107: 485-495 p. 1985.

ZERBINI, F. M. J.; CARVALHO, M. G.; ZAMBOLIM, E. M., **Introdução à virologia vegetal**. Viçosa: UFV, 145 p., 2002.